

JÚNIA DAYRELL DE MOURA CORDEIRO

**Avaliação do perfil de proliferação celular na próstata dorsal
de ratos Wistar em envelhecimento**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro 2014

JÚNIA DAYRELL DE MOURA CORDEIRO

**Avaliação do perfil de proliferação celular na próstata dorsal
de ratos Wistar em envelhecimento**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro 2014

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

Dedico essa dissertação à minha família, meu porto seguro, minha motivação! Amo vocês imensamente!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar presente na minha vida, me guiando continuamente pelos caminhos certos e por colocar pessoas tão especiais nessa longa jornada.

Aos meus pais, Heliana e Arnaldo, pelo amor dedicado a mim e que são o meu suporte, serei sempre grata por poder contar com vocês. Ao meu irmão, Matheus, pelo carinho e amizade.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Cleida Aparecida de Oliveira, por ter realizado tudo o que estava ao seu alcance para a execução desse trabalho, pelo conhecimento oferecido e pelo crescimento como pessoa.

Ao Prof^o Dr^o Germán Arturo Bohórquez Mahecha, por toda sua ajuda e por se mostrar sempre disposto a realizar tudo.

À Rachel, por ter me trazido ao LABRE e pela grande amizade desde o primeiro dia em que nos conhecemos. Chel, tenho muita saudades de conviver com você todo dia!!

Ao Bernardo, pela paciência, compreensão, apoio e companheirismo, por me escutar e ajudar quando precisei.

Ao Davi, meu amor, pessoa tão pequena que tem o dom de me alegrar. Dindinha te ama muito!

Aos meus amados amigos do LABRE por todos os dias de convívio e que serão, sem dúvida, inesquecíveis. Monicats, amiga que ganhei, que sempre me faz rir e me entende como ninguém, os dias de trabalho foram muito mais fáceis e prazerosos com você por perto. Rê, Amandita, Carina e Laís, minhas gatinhas, que sempre foram tão prestativas, sempre conversando e me ajudando quando precisei! Cristiano, meu menino cinza, que apesar de todo o seu mau humor é uma pessoa muito especial. As minhas ICs favoritas, Pâmela, Roberta, Aryane, Luane, Fernanda, Camila e Luiza muito obrigada por me

ajudarem com tudo, vocês são uns amores! Ao André, por ser tão atencioso e sempre me fazer rir. Ao Gabriel, a pessoa mais engraçada e esquecida que conheci. As novas doutorandas do laboratório, Elisângela e Wiviane. Aos que já saíram do laboratório, mas que sempre aparecem para matar saudades, Polly, Lílian e Dieguito, adoro vocês! Vocês são INCRÍVEIS e INESQUECÍVEIS!!!

Ao Prof^o Emérito José Carlos Nogueira, por ser uma pessoa tão amável e por partilhar tanta sabedoria. Você é um exemplo para mim!!

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

RESUMO

A próstata desempenha papel importante na fisiologia do sistema genital masculino e fertilidade. Este órgão também é alvo de patologias importantes, como hiperplasia benigna e adenocarcinoma, sendo esse último o tipo de câncer não-cutâneo que afeta mais homens no Brasil e no mundo. A doença tem como principal alvo a zona periférica da próstata humana, região homóloga ao lobo dorsal da próstata do rato, que também é afetada por neoplasias espontâneas ou induzidas. A próstata é um clássico tecido andrógeno-dependente, entretanto, também é influenciado por estrógenos e seus receptores ER β , que participam na diferenciação e crescimento da glândula, bem como em suas patologias. De destaque é o fato de que com o progresso das alterações malignas há silenciamento da expressão de ER β . A idade é um fator de risco para o câncer de próstata, pois tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam em idosos. Corroborando esses dados, estudos preliminares indicam redução de ER β nos diferentes lobos prostáticos de ratos idosos, em locais estritamente relacionados a alterações proliferativas. Considerando o possível efeito anti-neoplásico de ER β , com seu papel antiproliferativo, pró-apoptótico e pró-diferenciação, é possível que exista relação entre anomalias proliferativas previamente detectadas em animais idosos com a redução desse receptor no epitélio prostático. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o perfil de proliferação celular na próstata dorsal (DP) de ratos Wistar adultos jovens a senescentes (3, 6, 12, 18 e 24 meses), com base em dois marcadores rotineiros de proliferação celular, o MCM7 e o PCNA. A análise histopatológica revelou que nos animais após 12 meses de idade ocorrem mais hiperplasia prostática e regiões de estratificação desordenada do epitélio, sugestivos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). As análises imunohistoquímicas de MCM7 e PCNA revelaram que a DP de animais adultos jovens é normalmente pouco proliferativa. Porém, durante o envelhecimento, há redução da proliferação celular no tecido em geral, mas aumenta a ocorrência de regiões de PIN, que se marcam intensamente pelo MCM7, mas não pelo PCNA, indicando a maior especificidade do primeiro marcador. As áreas de PIN são as mesmas que apresentam redução de ER β corroborando uma possível inter-relação entre o silenciamento desse receptor com condições malignas ou pré-malignas da próstata.

ABSTRACT

The prostate plays important role in the physiology of the male reproductive system and fertility. This organ is also target of important diseases such as benign hyperplasia and adenocarcinoma, the latter being the type of non-skin cancer that affects more men in Brazil and worldwide. The disease targets specially the peripheral zone of the human prostate, which is the homologous region to the rat dorsal lobe of the prostate, being also affected by spontaneous or induced neoplasias. The prostate is a classic androgen-dependent tissue, however, it is also influenced by estrogens and their ER β receptors. The estrogen system is involved in the differentiation and growth of the gland as well as in their pathologies, illustrated by the fact that the ER β expression is gradually silenced with the progress of the malignant changes. Age is a risk factor for prostate cancer, considering that the incidence and mortality increase in the elderly. Corroborating these data, preliminary studies indicate reduction of ER β in different prostatic lobes of old rats, in places closely related to proliferative changes. Considering that ER β have pro-apoptotic, anti-proliferative and pro-differentiation functions, it is possible that its silencing may be related to an imbalance between cell proliferation and death in these pathological conditions. Thus, the aim of this study was to determine the profile of cell proliferation in the dorsal prostate (DP) of young to senescent Wistar rats (3, 6, 12, 18 and 24 months), based on two routine markers, MCM7 and PCNA. Histopathological analysis revealed that the animals at 12 months onward presents prostatic hyperplasia and disordered regions of stratified epithelium, suggestive of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). Immunohistochemical analysis of MCM7 and PCNA revealed that the DP of young adult animals is usually little proliferative. However, during aging, there is a reduction of cellular proliferation in general tissue but increases the occurrence of PIN regions, which are intensely marked by MCM7, but not by PCNA, indicating a higher specificity of the first marker. The PIN areas are the same that have reduced ER β expression, thus confirming a possible interrelationship between the silencing of this receptor with malignant or pre-malignant conditions of the prostate.

LISTA DE ABREVIATURAS

α ERKO - Animal *knockouts* para ER α

β ERKO - Animal *knockouts* para ER β

Å - Ångström

AP - Próstata anterior

AR - Receptor de andrógeno

CDC - *Cell Division Cycle*

CDK - Quinase dependente de ciclina

CDT-1 - Licenciamento da cromatina e fator de replicação do DNA 1

DDK - Proteína quinase Dbf4-dependente

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAPol - Ácido desoxirribonucleico polimerase

DP - Próstata dorsal

DHT - Diidrotestosterona

ER α - Receptor de estrógeno do tipo α

ER β - Receptor de estrógeno do tipo β

E2 - Estradiol

ER - Receptor de estrógeno

GINS - Go, Ichi, Nii e San

G0 - *Gap 0*

G1 - *Gap 1*

G2 - *Gap 2*

HE - Hematoxilina e eosina

HPB - Hiperplasia prostática benigna

INCA - Instituto Nacional do Câncer

kDa - KiloDalton

LH - Hormônio luteinizante

LP - Próstata lateral

M - Mitose

MCM7 - *Minichromosome maintenance 7*

ODP - Ponto de determinação da origem

ORC - Complexo origem de replicação

PAS - *Periodic Acid-Schiff*

PBS - Tampão salina fosfato

PBST - Tampão salina fosfato contendo 0,05% tween

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PIN - Neoplasia intraepitelial prostática

PIP - *PCNA-Interacting Protein*

Pré-RC - Complexo pré-replicativo

PSA - Antígeno prostático específico

Pol ϵ - Polimerase do tipo ϵ

Pol δ - Polimerase do tipo δ

R - Domínio catalítico de arginina

RPA - Proteína de replicação A

S - Síntese

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida

siRNA - Ácido ribonucleico de pequena interferência

TBS - Tampão salina Tris-HCl

VP - Próstata ventral

WA - Walker A

3 β -HSD - 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

17 β -HSD - 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

μ m - Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação esquemática do epitélio normal da próstata de ratos.	3
Figura 2 - Localização dos receptores de estrógenos ER α e ER β na próstata e suas funções principais.	6
Figura 3 - Etapas do ciclo celular, indicando os pontos de ação das proteínas MCM7 e PCNA.	9
Figura 4 - Modelo estrutural do anel hexamérico do complexo MCM. Complexo MCM2-7 atuando como helicase na fita de DNA.	11
Figura 5 - Modelo de atuação do complexo MCM no licenciamento da replicação do DNA.	13
Figura 6 - Modelo estrutural do PCNA.	15
Figura 7 - Peso corporal de ratos Wistar em diferentes idades.	28
Figura 8 - Peso relativo da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades.	29
Figura 9 - Histopatologia da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades.	30
Figura 10 - Neoplasias intraepiteliais (PIN) da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento.	32
Figura 11 - Detecção de MCM7 na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento.	34
Figura 12 - Índices de células imunopositivas para MCM7 e índices de áreas de PINs imunomarcadas para MCM7 no epitélio da próstata dorsal de ratos	35

Wistar em envelhecimento.

Figura 13 - Áreas de PIN na próstata dorsal de ratos Wistar idosos imunomarcadas com ER β e MCM7. 36

Figura 14 - Detecção de PCNA na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. 37

Figura 15 - Índices de células imunopositivas para PCNA e índices de áreas de PINs imunomarcadas para PCNA no epitélio da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. 38

Figura 16 - *Western blotting* para MCM7 e PCNA extraídos da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades. β -actina foi utilizada como controle do ensaio. Representação gráfica da análise densitométrica das bandas de 80 e 36 kDa. 39

SUMÁRIO

	Página
I. REVISÃO DE LITERATURA	1
1. Características gerais da próstata.....	1
1.1 Histologia da próstata	2
2. Regulação hormonal da próstata.....	4
2.1 Andrógenos.....	4
2.2 Estrógenos	5
3. Patologias da próstata	7
4. Proliferação celular.....	8
4.1 MCM7 (<i>Minichromosome Maintenance 7</i>).....	10
4.2 PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)	14
II. JUSTIFICATIVA	17
III. OBJETIVOS.....	19
1. Objetivo geral	19
2. Objetivos específicos	19
IV. METODOLOGIA	21
1. Animais.....	21
2. Preparação dos tecidos.....	21
3. Histopatologia.....	22
4. Imunohistoquímica	23
5. Estudo quantitativo	24
6. <i>Western blotting</i>	24
7. Análise estatística	26
V. RESULTADOS	28

1. Peso corporal e da próstata dorsal	28
2. Histopatologia da próstata dorsal	29
3. Imunohistoquímica	33
3.1 MCM7	33
3.2 PCNA	36
4. <i>Western blotting</i>	38
VI. DISCUSSÃO	40
VII. CONCLUSÃO.....	46
VIII. PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS	50

I. REVISÃO DE LITERATURA

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. Características gerais da próstata

A próstata é uma das glândulas sexuais anexas ao sistema genital masculino de mamíferos. No homem, ela está localizada na cavidade pélvica, posteriormente à sínfise púbica, anterior ao reto e logo abaixo da bexiga, onde se dispõe ao redor da porção inicial da uretra, denominada uretra prostática (Aumüller & Adler, 1979; Hayashi *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2011). A próstata humana é composta por três zonas de acordo com a posição anatômica e diferenças histológicas, sendo a zona central, zona de transição e zona periférica (McNeal, 1988; Kumar & Majumder, 1995; Laczko *et al.*, 2005). Em ratos, o complexo prostático é composto por quatro pares de lobos sendo estes a próstata dorsal, a próstata anterior ou glândula de coagulação, a próstata ventral e a próstata lateral (Hayashi *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2011). A próstata anterior de ratos possui correspondência histopatológica com a zona central da próstata de homens, que é a região mais susceptível a hiperplasia benigna da próstata (HBP). Os lobos dorsais e laterais possuem homologia histopatológica com a zona periférica da próstata humana, que é o local de maior incidência de câncer (Pollard, 1973; Danielpour *et al.*, 1994). O lobo ventral não possui homologia com nenhuma das zonas da próstata humana.

A próstata é responsável por produzir e secretar o líquido prostático, uma secreção homogênea, leitosa e alcalina, que corresponde a aproximadamente 30% do líquido seminal, sendo responsável por viabilizar os espermatozoides e assim garantir a fecundação (Kumar & Majumder, 1995). Essa secreção é composta por várias enzimas como a fosfatase ácida, fibrinolisina, coagulase e antígeno prostático específico (PSA), bem como lípidos, íons zinco, citrato de cálcio, entre outros (Aumüller & Adler, 1979; Kumar & Majumder, 1995). A fibrinolisina, a coagulase e o PSA, além de outras enzimas, são responsáveis pela liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando a veiculação dos espermatozoides. A fosfatase ácida, através da conversão de fosforilcolina em colina, juntamente com os lípidos, estão envolvidos na nutrição dos espermatozoides. Já o citrato de cálcio possui importante papel, pois é dele a função de

alcalinizar o pH vaginal, função esta que é primordial para a sobrevivência dos espermatozoides nas vias genitais femininas. Os altos níveis de zinco são explicados pela importante função protetora, devido à ação antioxidante e antibacteriana (Aumüller & Adler, 1979; Kumar & Majumder, 1995).

1.1 Histologia da próstata

A próstata é uma glândula exócrina composta, encapsulada por uma fina camada de tecido conjuntivo fibroelástico e cujo parênquima é formado por numerosos adenômeros túbulo-alveolares. O epitélio dos adenômeros prostáticos é classificado como pseudoestratificado e comporta três tipos celulares, sendo as células luminais ou secretoras, as células basais e as células neuroendócrinas (Fig. 1) (El-Alfy *et al.*, 2000). Estas células são diferenciadas a partir de sua localização, morfologia e características fenotípicas. Em homens, as células basais são cuboides e estão na camada basal dispostas de forma contínua, enquanto as células luminais, colunares, se encontram logo acima da camada basal, dando ao epitélio um aspecto biestratificado (El-Alfy *et al.*, 2000; Pelletier, 2008). Em roedores, o epitélio dos adenômeros é formado por uma camada de células luminais e escassas células basais que estão na região basal do epitélio, onde a proporção é de uma célula basal para cada dez células luminais (El-Alfy *et al.*, 2000; Pelletier, 2008).

As células basais do epitélio prostático apresentam-se de forma cuboidal, achatada ou triangular, com núcleo pequeno e citoplasma escasso (Fig. 1) (Aumüller & Adler, 1979; Taylor & Risbridger, 2008). Algumas mostram-se indiferenciadas e são consideradas células-tronco (Aumüller & Adler, 1979; Signoretti *et al.*, 2000), enquanto outras, como ocorre em humanos, encontram-se diferenciadas e são imunopositivas para as enzimas 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) tipo 5 e 5 α -reductase tipo 2, demonstrando características esteroidogênicas (Pelletier, 2008).

As células luminais são colunares, com o núcleo arredondado localizado no terço basal do citoplasma (Fig. 1) (Aumüller & Adler, 1979). Esse tipo celular é o mais

frequente no epitélio e possui a função de produção e secreção dos constituintes do líquido prostático, tais como o PSA e a fosfatase ácida. Apresentam desenvolvido retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi, além de numerosos grânulos de secreção (Pelletier, 2008; Taylor & Risbridger, 2008).

As células neuroendócrinas estão distribuídas em todo o epitélio glandular de maneira irregular e tendem estar em maior abundância nos ductos principais (Fig. 1) (Abrahamsson & di Sant'Agnese, 1993). Existem dois tipos de células neuroendócrinas: as abertas e as fechadas, sendo que, as abertas são alongadas e alcançam o lúmen, enquanto as fechadas não atingem o lúmen, permanecendo entre a camada das células luminais e a lâmina basal (Abrahamsson & di Sant'Agnese, 1993; Abrahamsson, 1999). Estas células participam da regulação intraepitelial, atuando no crescimento, diferenciação e processos secretórios do órgão maduro (Abrahamsson & di Sant'Agnese, 1993). Secretam cromogranina A, serotonina, sinaptofisina, somatostatina, calcitonina, dentre outros (di Sant'Agnese, 1992; Abrahamsson, 1999; Taylor & Risbridger, 2008). Durante a fase inicial do desenvolvimento, essas células são encontradas em grande quantidade e após o nascimento, praticamente desaparecem e vão reaparecer após a puberdade (Taylor & Risbridger, 2008).

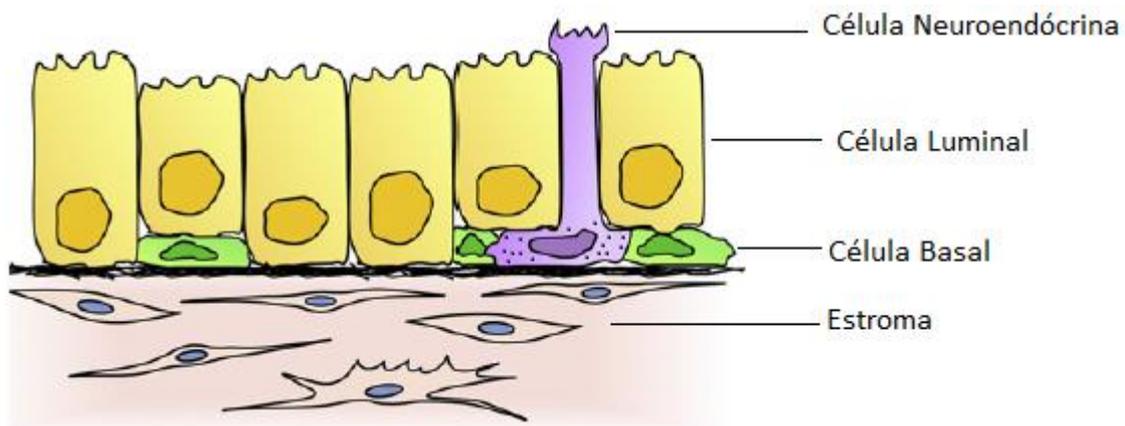


Figura 1: Representação esquemática do epitélio normal da próstata de ratos. Adaptado de Oldridge *et al.*, 2012.

O estroma de sustentação é composto por tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e fibras musculares lisas e dispersos macrófagos (Hayward *et al.*, 1996). A próstata humana caracteriza-se pela grande quantidade de fibras musculares lisas presentes no estroma prostático, o que diverge de roedores, nos quais as fibras musculares lisas concentram-se em delgada camada de três a cinco células de espessura, circundando o epitélio glandular (Hayward *et al.*, 1996).

2. Regulação hormonal da próstata

A próstata é uma glândula influenciada tanto por andrógenos quanto por estrógenos, hormônios sexuais que são produzidos pelas gônadas e o córtex da glândula adrenal, sendo as gônadas as principais produtoras (Maggiolini *et al.*, 1999; El-Alfy *et al.*, 2000).

É notório o papel dos andrógenos na diferenciação, crescimento e manutenção da próstata (Kirschenbaum *et al.*, 2006; Luu-The *et al.*, 2008; Wilson, 2011). Entretanto, sabe-se também da participação dos estrógenos, que além do seu papel benéfico pode atuar em desordens patológicas (Jarred *et al.*, 2000; McPherson *et al.*, 2007).

2.1 Andrógenos

A testosterona é o principal andrógeno do sistema genital masculino. Ela é produzida pelas células de Leydig através do estímulo do hormônio luteinizante (LH) e tem função de modular o crescimento normal e desenvolvimento da próstata (Adams *et al.*, 2002; Luu-The *et al.*, 2008). Na próstata, a testosterona é metabolizada pela enzima 5 α -reductase tipo 1 ou tipo 2 em diidrotestosterona (DHT), um andrógeno mais potente, o qual se liga com afinidade até dez vezes maior aos receptores de andrógenos (AR) (Wright *et al.*, 1999; Grossmann *et al.*, 2001; Bianco *et al.*, 2002). Esses receptores estão amplamente distribuídos por todo o sistema genital masculino, incluindo a

próstata, onde estão presentes no núcleo das células luminais e em algumas células basais e do estroma, especialmente as células musculares lisas perialveolares (Prins *et al.*, 1991; Pelletier, 2008; Izumi *et al.*, 2013).

Durante o período fetal, a DHT é fundamental para a diferenciação da genitália externa masculina e para o desenvolvimento da próstata (Bentvelsen *et al.*, 1995), sendo que na puberdade, é essencial para promover o crescimento da próstata e manutenção da sua morfofisiologia durante a vida adulta (Russell & Wilson, 1994).

2.2 Estrógenos

Além de ser metabolizada em DHT, a testosterona pode também ser metabolizada em estradiol (E2) através da ação da enzima citocromo P450 aromatase (Bianco *et al.*, 2002; Carreau *et al.*, 2003; Risbridger *et al.*, 2003). Os estrógenos exercem seus efeitos através de receptores nucleares específicos, denominados receptores de estrógenos (ER), que possuem dois subtipos, os ER α e os ER β , os quais ocorrem no tecido prostático, porém, com diferenças quanto à intensidade de expressão e distribuição (Kuiper *et al.*, 1996). Os ER α geralmente não estão presentes no epitélio normal, mas se expressam, mesmo que de forma muito baixa, em algumas células do estroma (Kuiper *et al.*, 1996; Enmark & Gustafsson, 1999; Makela *et al.*, 2000). Ao contrário, os ER β se expressam intensamente nas células luminais e basais do epitélio, além de algumas células do estroma (Horvath *et al.*, 2001; Pelletier, 2008).

Estudos experimentais e epidemiológicos têm revelado a participação relevante dos estrógenos nos processos de diferenciação e crescimento da próstata e também em suas desordens patológicas (Jarred *et al.*, 2000; Weihua *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2004). Embora haja informações sobre a ocorrência de alguma atividade de aromatase no estroma da próstata humana, essa enzima não é facilmente detectada no epitélio prostático normal de homens e nem de roedores (Risbridger *et al.*, 2003). No entanto, sua presença tem sido observada em células epiteliais tumorais chamando atenção para uma possível relação entre estrógenos e câncer de próstata. Tem sido proposto também que níveis elevados de estrógenos durante o desenvolvimento prostático podem

contribuir com a alta incidência de hiperplasia e câncer de próstata (Prins & Korach, 2008).

Tal como os ARs, os ERs pertencem à superfamília de receptores nucleares, que são fatores de transcrição regulados por ligantes (Matthews & Gustafsson, 2003). Através de modelos experimentais *knockouts* para ER α (α ERKO) ou para ER β (β ERKO), algumas funções mediadas por esses receptores estão sendo elucidadas e sugerem que os mesmos tenham papéis fisiológicos distintos na próstata (Prins *et al.*, 2001; Risbridger *et al.*, 2001). Ao ER α tem sido atribuído um papel proliferativo, visto que é o mediador de indução de metaplasia escamosa em animais β ERKO (sem ER β , mas com ER α), mas não em animais α ERKO (sem ER α , mas com ER β) (Risbridger *et al.*, 2001). Já os ER β estão relacionados com funções variadas na próstata, incluindo regulação de apoptose, proliferação e diferenciação celular, reveladas por suas propriedades pró-apoptóticas, anti-proliferativas e pró-diferenciação (Fig. 2) (Weihua *et al.*, 2001; Weihua *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Imamov *et al.*, 2004; McPherson *et al.*, 2007; Pravettoni *et al.*, 2007).

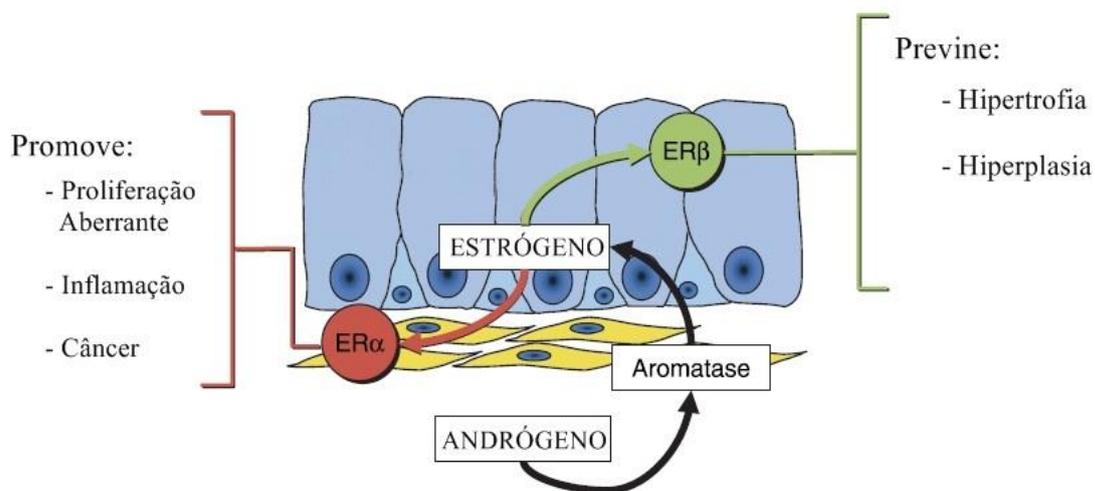


Figura 2: Localização dos receptores de estrógenos ER α e ER β na próstata e suas funções principais. Adaptado de Risbridger *et al.*, 2007.

3. Patologias da próstata

Doenças proliferativas da próstata têm se tornado um problema crescente na área médica, visto que provoca grande impacto em termos de morbidade, mortalidade e também com despesas médicas. A HBP e o câncer de próstata ocorrem com grande frequência em homens com idade acima de 50 anos, sendo a HBP muitas vezes considerada como um processo fisiológico relativo à idade (Laczko *et al.*, 2005; Begley *et al.*, 2008).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), o número de novos casos de câncer estimados para o Brasil em 2014 é de 68.800, um número considerável visto que há um risco de 70,42 casos a cada 100 mil homens, superando a estimativa para o câncer de mama, que é de 57.120 novos casos, no mesmo período. Para o mesmo ano, em Belo Horizonte, Minas Gerais, o câncer de próstata foi o tipo de câncer com maior incidência em homens (INCA, 2014).

Estudos experimentais e epidemiológicos na última década têm revelado a participação relevante dos estrógenos não só nos processos de diferenciação e crescimento da próstata, assim como em suas patologias (Jarred *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2004; McPherson *et al.*, 2007). Dessa forma, acredita-se que alterações relacionadas à idade no ambiente hormonal, marcada por uma diminuição na proporção de andrógenos em relação aos estrógenos séricos e teciduais podem contribuir para a evolução das alterações patológicas da próstata (Banerjee *et al.*, 2001).

O crescimento normal da próstata é dependente da interação sinérgica entre andrógenos e estrógenos (Alcaraz *et al.*, 2009; Ellem & Risbridger, 2010) e o desequilíbrio entre eles, comum na velhice, é crucial para ocasionar malignidade na próstata (Prins & Korach, 2008; Ellem & Risbridger, 2010). Além disso, a homeostase entre esses hormônios é capaz de manter a regularidade entre morte e proliferação celular evitando, assim, a evolução de mudanças patológicas como HBP e adenocarcinomas (Banerjee *et al.*, 2001; Ellem & Risbridger, 2010).

Corroborando a hipótese de que as alterações patológicas podem estar ligadas a alterações hormonais que ocorrem na próstata em envelhecimento, estudos preliminares

de nosso laboratório mostraram redução na expressão de ER β nos diferentes lobos prostáticos de ratos idosos, em locais estritamente relacionados a alterações proliferativas, como adenomas, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) ou de atrofia epitelial (Santos, 2011). Também em próstatas humanas, foi revelado um silenciamento progressivo de ER β com o avanço do desenvolvimento de carcinomas, onde há redução da expressão desse receptor em 77% dos casos (Horvath *et al.*, 2001).

4. Proliferação celular

O crescimento da próstata é regulado pelo equilíbrio entre proliferação e morte celular. O rompimento da homeostase dos mecanismos que regulam esses dois processos gera crescimento anormal da glândula (Harman *et al.*, 2001), o que está diretamente relacionado com as patologias mais frequentes da próstata: HBP e adenocarcinomas (McPherson *et al.*, 2010).

O ciclo celular é uma sequência de eventos onde a célula somática duplica seu material genético, dividindo-o igualmente entre suas células-filhas. Esse processo pode ser dividido em duas fases principais: intérfase e mitose. A intérfase é subdividida em fase G1 (*Gap 1*), S (Síntese) e G2 (*Gap 2*) e a mitose em prófase, metáfase, anáfase e telófase (Vermeulen *et al.*, 2003).

A fase G1 da intérfase compreende a preparação da célula para a síntese do DNA que ocorre na fase S. Em seguida, a célula entra na fase G2, que corresponde a preparação para entrada em mitose (Fig. 3). Quando as células estão em período de não-proliferação, considera-se que elas estão na fase G0 do ciclo, correspondente a um período de quiescência, onde o DNA encontra-se metilado impedindo o acesso da maquinaria de transcrição, e conseqüentemente bloqueando a transcrição gênica (Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003; Klose & Bird, 2006).

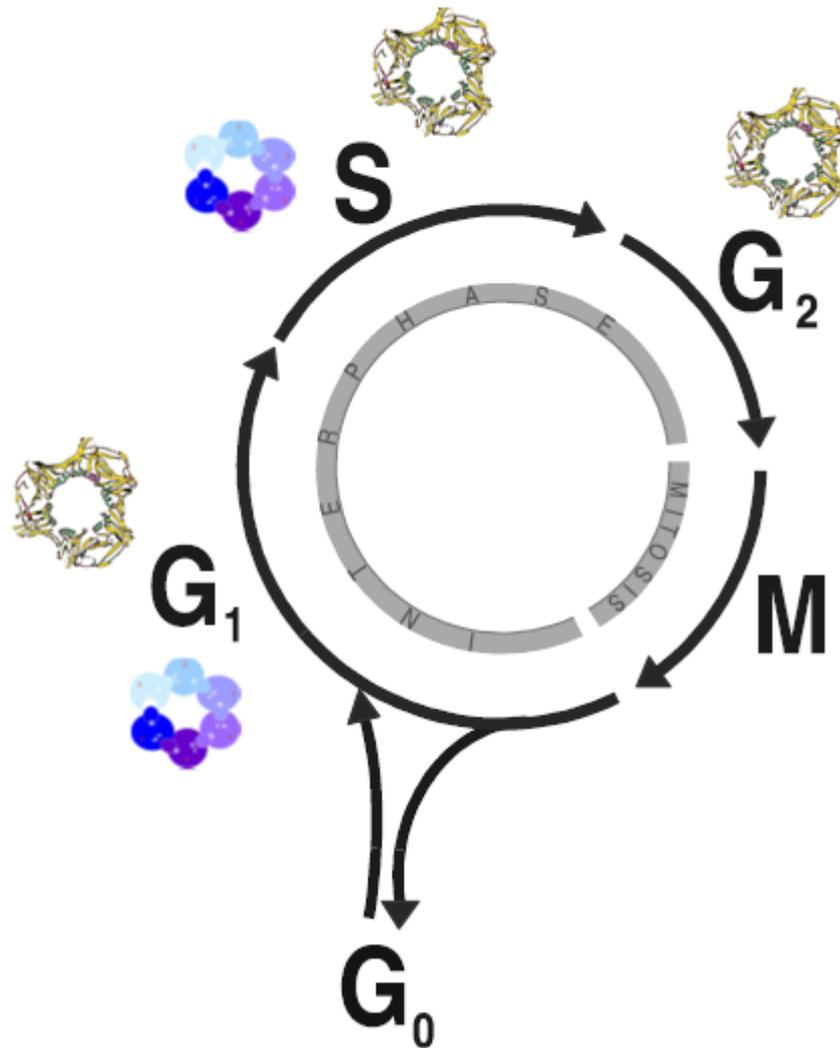


Figura 3: Etapas do ciclo celular, indicando os pontos de ação das proteínas MCM7 (●) e PCNA (⊙). G₀ = Gap 0; G₁ = Gap 1; G₂ = Gap 2; M = Mitose; S = Síntese. Adaptado de Vermeulen *et al.*, 2003.

Na fase de mitose, ocorre a replicação do DNA, um processo complexo que requer ações coordenadas e altamente reguladas que envolvem uma ampla maquinaria molecular (Kelly & Brown, 2000). Para dar início a esse processo, é necessário um sítio de origem de replicação para ligação de certos fatores que irão iniciar esse processo, sendo eles o complexo de origem de replicação (ORC) e proteínas iniciadoras, como Cdt1 (Licenciamento da cromatina e fator de replicação do DNA 1) e Cdc6 (*Cell Division Cycle 6*) (Bell & Dutta, 2002; Lei, 2005; Moldovan *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2011). Quando o ORC se liga ao DNA durante a fase G₁, ocorre o recrutamento de

diversos fatores de replicação, dentre eles o complexo MCM (*Minichromosome Maintenance*), sendo que na fase S, esse complexo é ativado, dando início à replicação do DNA (Lei & Tye, 2001; Lei, 2005; Chang *et al.*, 2011).

Em cada origem de replicação, a replicação deve ser iniciada somente uma vez por ciclo celular para prevenir instabilidades genômicas e para isso, alguns desses fatores de replicação podem permanecer inativos ou serem degradados (Moldovan *et al.*, 2007). Esse controle do ciclo celular se dá, principalmente, através de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e suas vias relacionadas, onde estas são ativadas por ligação de ciclinas específicas em determinadas fases do ciclo, seguidas de fosforilação em suas proteínas alvo (Ferretti *et al.*, 2013; Kitagawa *et al.*, 2013).

4.1 MCM7 (*Minichromosome Maintenance 7*)

O complexo MCM2-7, identificado primeiramente em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, é formado por seis proteínas (MCM2/BM28, MCM3/P1, MCM4/Cdc21, MCM5/Cdc46, MCM6/Mis5 e MCM7/Cdc47) altamente conservadas na filogênese animal, as quais se encontram dispostas em forma de anel hexamérico (Tye, 1999; Kelly & Brown, 2000) (Fig. 4). Todas essas seis proteínas partilham semelhança em sua estrutura de 200 resíduos de aminoácidos, além de domínios de ATPase e de ligação de zinco (Lei, 2005).

MCM2-7 faz parte do complexo pré-replicativo (Pre-RC) que licencia a replicação do DNA em todas as células eucariotas e é essencial para o controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S, principalmente para iniciação e alongamento de forquilhas de replicação (Tye, 1999; Padmanabhan *et al.*, 2004; Lei, 2005; Luo, 2011). O complexo associa-se à cromatina para início da replicação durante a fase G1 e dissocia-se durante a fase S, sendo que esse processo necessita de uma sincronização precisa. Esse processo é imprescindível, uma vez que assegura a restrição da síntese de DNA uma vez por célula a cada ciclo celular (Suzuki *et al.*, 1998; Tye, 1999; Padmanabhan *et al.*, 2004).

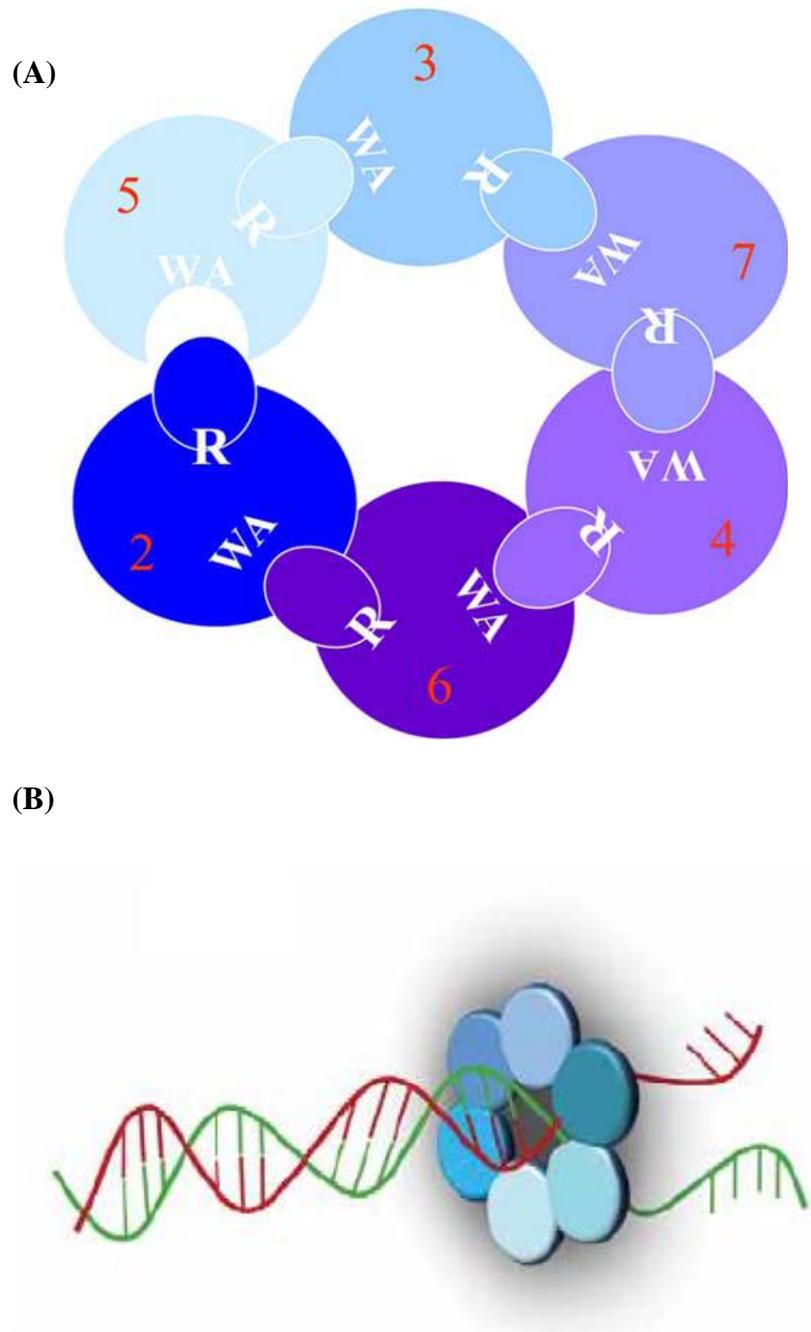


Figura 4: (A) Modelo estrutural do anel hexamérico do complexo MCM, onde WA (Walker A) corresponde ao domínio de ligação de ATP e R a um domínio catalítico de arginina. Reproduzido de Lei, 2005. (B) Complexo MCM2-7 atuando como helicase na fita de DNA. Adaptado de Aparicio *et al.*, 2006.

Inicialmente, ORC se liga a uma região específica do genoma com consequente ligação de dois fatores de replicação: Cdt1 e Cdc6. Esse complexo ORC-Cdt1-Cdc6

recruta o complexo MCM para a origem, formando o complexo pré-replicativo, sendo este o fato que determina o início da replicação. Esses eventos ocorrem durante o final da fase M e G1 (Fig. 5) (Labib *et al.*, 2001; Lei, 2005).

Dando sequência ao ciclo celular, na fase S, os quatro componentes do complexo pré-replicativo (MCM2-7, Cdt1, Cdc6 e ORC) são fosforilados por CDKs e essa fosforilação estimula a associação de Cdc45 ao Pré-RC com consequente interação direta com o complexo MCM2-7 (Edwards *et al.*, 2002; Lei, 2005). Essa interação de Cdc45 faz com que o complexo seja agora uma helicase ativa com a função de desespiralizar o DNA, iniciando de fato a replicação. Já no final da fase S, a helicase abre a dupla fita de DNA levando ao recrutamento da DNA polimerase que finaliza essa separação da fita dupla (Lei, 2005).

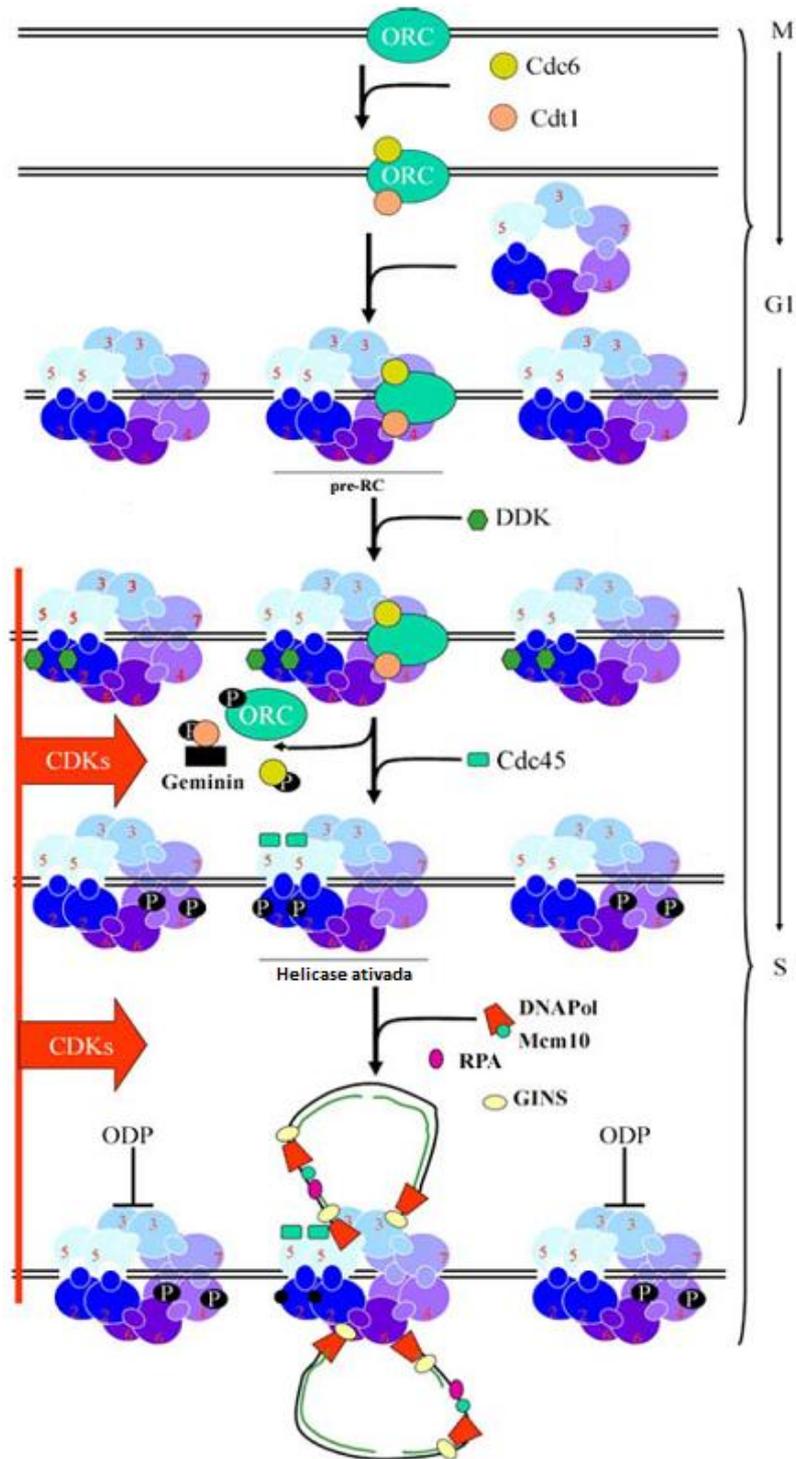


Figura 5: Modelo de atuação do complexo MCM no licenciamento da replicação do DNA. CDC6 = *Cell Division Cycle 6*; CDC45 = *Cell Division Cycle 45*; CDK = Quinase ciclina dependente; CDT-1 = Licenciamento da cromatina e fator de replicação do DNA 1; DDK = Proteína quinase Dbf4-dependente; DNAPol = DNA polimerase; GINS = Go, Ichi, Nii e San; MCM10 = *Minichromosome maintenance 10*; ODP = Ponto de determinação da origem; ORC = Complexo origem de replicação; Pré-RC = Complexo pré-replicativo; RPA = Proteína de replicação A. Adaptado de Lei, 2005.

Sendo assim, o uso do complexo MCM2-7 é uma importante ferramenta para avaliação do potencial proliferativo das células (Blow & Hodgson, 2002). Nesse sentido, o uso de MCM7 tem revelado resultados bastante satisfatórios quando usado para a detecção de proliferação em câncer de próstata (Padmanabhan *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012), além de apresentar sensibilidade para discriminar patologias prostáticas benignas de malignas, como HBP do câncer de próstata (Levesque *et al.*, 2007). De forma similar, o aumento da expressão de MCM7 é comum em vários tipos de câncer em humanos, como carcinoma de ovário, câncer colorretal, neuroblastoma, adenocarcinoma de pulmão entre outros (Fujioka *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

4.2 PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)

O PCNA é uma proteína nuclear com formato anelar (Fig. 6), de 34-36 kDa, pertencente à família DNA-*sliding clamp*, que são estruturalmente e funcionalmente conservadas (Maga & Hubscher, 2003; Lee *et al.*, 2012; Mahler *et al.*, 2012). Essa proteína é um componente essencial da maquinaria de replicação do DNA, porém também há evidências de sua participação no reparo de DNA por excisão de bases e nucleotídeos, regulação e controle do ciclo celular, montagem e remodelamento da cromatina (Kelman, 1997; Maga & Hubscher, 2003; Moldovan *et al.*, 2007; Ghosal *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). As proteínas pertencentes a essa família, adotam uma estrutura de anel com espaço suficiente para acomodar a dupla hélice de DNA e assim deslizar bidirecionalmente ao longo da dupla hélice, tendo o poro central 34Å de diâmetro (Krishna *et al.*, 1994; Kelman, 1997; Moldovan *et al.*, 2007; Winter & Bunting, 2012).

Muitas proteínas que se ligam ao PCNA possuem em comum um domínio PIP (PCNA-*Interacting Protein*) ou PIP-box, que é uma sequência específica dessas proteínas que se ligam a uma região do PCNA para exercer suas funções, tais como as polimerases ϵ e δ , que quando interagem com o PCNA auxiliam no reparo e replicação do DNA (Maga & Hubscher, 2003; Prives & Gottifredi, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Outras importantes proteínas são as ciclinas e a p21, que juntamente com o PCNA, ajudam no controle do ciclo celular, mais especificamente nos pontos de checagem, que estão presentes para conferência em algumas fases do ciclo onde os erros constatados podem ser deletados, reparados ou mesmo induzirem as células à apoptose (Maga & Hubscher, 2003; Prives & Gottifredi, 2008).

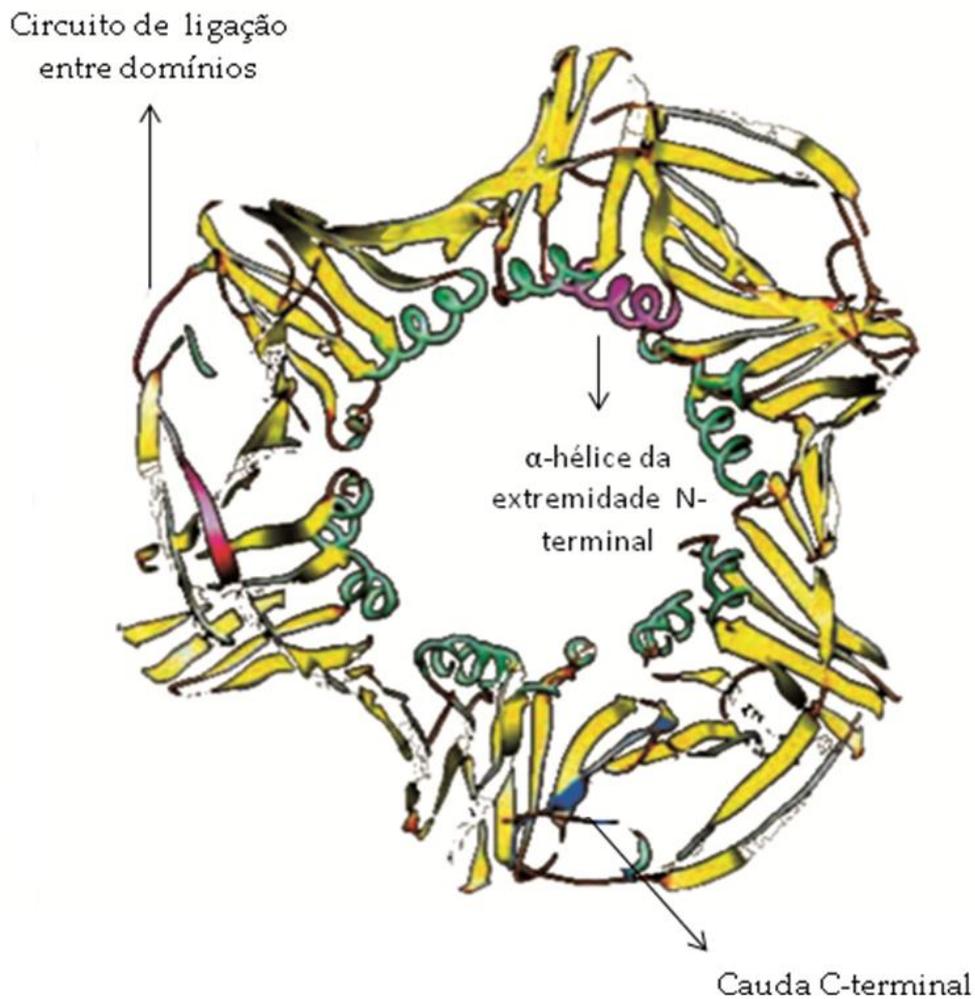


Figura 6: Modelo estrutural do PCNA. Adaptado de Maga & Hübscher, 2003.

II. JUSTIFICATIVA

II. JUSTIFICATIVA

Apesar das diferenças anatômicas entre as próstatas de homens e ratos, estes últimos são extensamente utilizados como modelo de estudo para a fisiologia da próstata e sua comparação com a próstata humana, devido ao fato de ambas apresentarem semelhanças no desenvolvimento fetal (Taylor *et al.*, 2006). Quanto ao desenvolvimento de patologias, semelhante à zona periférica da próstata humana, os lobos dorsais e laterais da próstata de ratos são acometidos por hiperplasia e neoplasia prostática, tanto de forma espontânea relacionada com idade como induzida quimicamente (Pollard, 1973; Danielpour *et al.*, 1994; Ittmann *et al.*, 2013).

A homeostase tecidual é dependente de um balanço entre proliferação, diferenciação e morte celular, e o distúrbio nesse balanço acarretará em alterações neoplásicas comuns na próstata (Banerjee *et al.*, 1998; Bologna-Molina *et al.*, 2013). O controle da proliferação celular é completamente desregulado em neoplasias e a avaliação da atividade de proliferação celular em tumores tornou-se uma ferramenta comum para fornecer informações úteis para avaliar o diagnóstico, conduta clínica e a terapêutica (Bologna-Molina *et al.*, 2013).

Estudos do nosso grupo revelaram que existe redução na imunomarcagem para ER β no epitélio prostático, que é restrita a locais com alterações histopatológicas como atrofia epitelial e áreas proliferativas (PIN e adenomas), a partir dos 12 meses de idade (Santos, 2011). Considerando que ER β possui função anti-proliferativa, pró-diferenciação e pró-apoptótica, essa redução em áreas específicas, que caracterizam condições pré-malignas, assinala para uma potencial desordem na via mediada por esse receptor (Santos, 2011).

Dessa forma, considerando o possível efeito protetor de ER β , com seu papel antiproliferativo, pró-apoptótico e pró-diferenciação, o presente estudo pretende examinar se existe relação entre essa redução de ER β e o perfil de proliferação no tecido prostático de ratos em envelhecimento, com ênfase no lobo dorsal. A escolha desse lobo se deve ao fato do mesmo ser o principal alvo de distúrbios de proliferação em próstata de ratos (Pollard, 1973; Ittmann *et al.*, 2013).



III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar as possíveis alterações no perfil de proliferação celular no epitélio da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento e correlacionar essas alterações com a expressão de ER β previamente descrita (Santos, 2011).

2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos compreendem:

- Determinar o peso corporal e da próstata dorsal dos ratos nas diferentes idades;
- Comparar a morfologia da próstata dorsal de ratos de diferentes idades;
- Avaliar possíveis variações no perfil de proliferação celular na próstata dorsal de ratos de diferentes idades;
- Realizar estudo quantitativo das células em proliferação;
- Correlacionar o perfil de proliferação celular e a expressão de ER β local.



IV. METODOLOGIA

IV. METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos com 3, 6, 12, 18, 24 meses de idade, sendo os animais de 18 e 24 meses subdivididos em saudáveis e caquéticos. Foram considerados caquéticos os ratos que apresentavam marcante queda do peso corporal, além de serem muito debilitados, sendo em geral acometidos por metástases cancerosas de origem não determinada, grave comprometimento pulmonar e testículos geralmente atróficos. Os animais foram adquiridos do 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, sendo submetidos a ciclos diários de luz (claro e escuro, 12 horas cada) e temperatura (22°C) constantes e recebendo água e ração peletizada *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG - protocolo 286/2008) e seguiram o protocolo publicado pela Universidade Federal de Minas Gerais (www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/).

2. Preparação dos tecidos

Após atingirem as respectivas idades de interesse, os animais foram pesados e posteriormente sacrificados por meio da administração de anestésico em concentração letal (pentobarbital sódico 50mg/Kg associado com cloridrato de quetamina 10mg/Kg), precedido de heparinização. Os animais destinados aos estudos histopatológicos e imunohistoquímicos foram perfundidos por via transcardíaca através da aorta, com solução de formalina neutra tamponada a 10%, precedida por perfusão com solução Ringer bicarbonato de sódio. Após realização da fixação, os lobos prostáticos foram dissecados, pesados e seccionados. Os fragmentos obtidos foram lavados em salina tampão fosfato (PBS), desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina

glicolmetacrilato (Technovit 7100 - Heraeus Kulzer, Alemanha), ou diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Histotec® Pastilles - Merck, Alemanha). Foram obtidos cortes de 3 e 5µm, respectivamente, em micrótomo semi-automático (Microm HM335E, EUA) e colocados em lâminas silanizadas para serem submetidas às colorações histológicas ou procedimentos imunohistoquímicos.

Para a realização do *Western blotting*, os animais foram perfundidos apenas com solução Ringer bicarbonato de sódio, também sendo dissecados em seguida, e os lobos prostáticos de interesse congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C até serem processados.

3. Histopatologia

Para avaliar possíveis alterações morfológicas e/ou patológicas na próstata dorsal de ratos, os fragmentos de tecidos incluídos em parafina ou em glicolmetacrilato foram seccionados e submetidos às colorações histológicas de rotina. Para tecidos incluídos em parafina, as secções dos tecidos (5µm) foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanol. Os mesmos foram corados com hematoxilina de Mayer seguidos pela eosina alcoólica (HE). Para os tecidos incluídos em glicolmetacrilato, as secções dos tecidos (3µm) foram coradas com PAS (*Periodic Acid-Schiff*), reagente de Feulgen ou HE. Os cortes destinados à coloração de PAS foram hidratados em água destilada, incubados em ácido periódico, seguido de incubação com reagente de Schiff, lavados em água sulfurosa e contracorados com azul de toluidina-borato de sódio. Para a coloração de Feulgen, as secções dos tecidos foram colocadas em solução de HCl 1N em temperatura de 60°, incubados com reagente de Schiff, lavados em água sulfurosa e contracorados com verde-luz. Para coloração de HE, as secções foram hidratadas em água destilada, corados com hematoxilina de Delafield seguido de eosina aquosa.

As descrições histopatológicas foram baseadas no Sistema de Classificação de Patologias Prostáticas, desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer de Modelos Murinos para Câncer Humano (Shappell *et al.*, 2004).

4. Imunohistoquímica

Com o objetivo de verificar possíveis alterações no padrão de expressão tecidual do MCM7 e PCNA, foi realizada a técnica de imunohistoquímica. Para isso, fragmentos da próstata dorsal de ratos nas diferentes idades estabelecidas foram incluídos em parafina e submetidos ao protocolo previamente padronizado (Oliveira *et al.*, 2007).

Inicialmente, os cortes de tecidos foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol, lavados em água corrente e em salina tampão fosfato (PBS), seguido de bloqueio da peroxidase endógena com solução 0,6% de peróxido de hidrogênio em metanol. A reação imunohistoquímica precedeu-se de recuperação antigênica, somente para imunomarcação com MCM7, que foi realizada com o aquecimento dos cortes mergulhado em tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em forno micro-ondas. Após o resfriamento e lavagem dos tecidos com PBS, realizou-se o bloqueio de avidina e biotina endógenas com uso de *kit* de bloqueio comercial (Vector Laboratories, EUA), para seguinte bloqueio de liga es inespecíficas com soro normal de cabra a 10%, por uma hora. Procedeu-se a etapa de incubac o dos tecidos com anticorpos primários monoclonais de camundongo anti-MCM7 (Thermo Scientific, EUA) ou anti-PCNA (Millipore, EUA) diluído em PBS a 1:300 e 1:500, respectivamente, durante 24 horas, a 4 C. Os controles negativos foram incubados apenas com PBS em substitui o aos anticorpos primários. Após lavagens em PBS, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotilado de cabra anti-camundongo (Dako, EUA) diluído 1:100 em PBS por uma hora. A imunorreac o foi visualizada usando-se soluço de 0,05% diaminobenzidina, contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 e interrompida por imersão em água destilada. Por fim, os cortes foram contracorados em hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados para análise. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5. Estudo quantitativo

Visando complementar os dados qualitativos, realizou-se uma estimativa quantitativa referente ao perfil de proliferação celular na próstata dorsal, utilizando imagem assistida por computador. Foram obtidas vinte fotos de cinco regiões distintas do tecido prostático (quatro regiões periféricas e uma região central) de cada animal. As fotos foram registradas em fotomicroscópico (Nikon Eclipse E200), em aumento de 40x. Foram então realizadas contagens de células positivas para os marcadores de proliferação celular MCM7 e PCNA e também células negativas compondo o epitélio normal. A contagem foi feita utilizando o programa *ImageJ* (University of Texas Health Sciences Center, TX). Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas.

Áreas de proliferação intraepitelial (PINs) foram também quantificadas através de morfometria, para ambos os marcadores. Para tanto, foram escolhidas cinco áreas distintas da próstata dorsal (quatro regiões periféricas e uma região central) e a contagem realizada com auxílio de gradícula (área = 0,06mm²) acoplada a fotomicroscópico (Nikon Eclipse E200), no aumento de 10x. Os resultados foram expressos em número de áreas de PIN/mm².

6. Western blotting

Possíveis alterações na expressão de MCM7 e PCNA na próstata dorsal de ratos em envelhecimento foram confirmadas pela técnica de *Western Blotting*. Sendo assim, as próstatas dorsais dos animais de diferentes idades (n = 3), congeladas em nitrogênio líquido, foram maceradas em gelo seco. Os tecidos macerados foram pesados (~100mg) e homogeneizados em 300µL de tampão ureia 8M, contendo Tris-HCl 20mM, pH 7,5, EDTA 0,5mM, pH 8,0, 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 rotações por minuto à temperatura de 4°C, para extração de proteínas totais, as quais se encontravam

na fração sobrenadante. Após, procedeu-se a sonicação do sobrenadante utilizando-se o aparelho *Sonics Vibra Cell* (*Sonics & Materials, Inc.*) e adicionou-se às amostras, na proporção de 1:1, tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, Tris-HCl 30mM, pH 6,8, β -mercaptoetanol, glicerol 12% e azul de bromofenol, seguido de fervura das mesmas por cinco minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese contínua usando SDS-PAGE 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida) para separação das proteínas, seguida de transferência rápida (durante 1h e 30 minutos a 100V) para a membrana de nitrocelulose. Depois do bloqueio da membrana com soro normal de cabra a 10%, realizou-se a incubação da mesma com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-MCM7 (*Thermo Scientific, EUA*) ou anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-PCNA (*Millipore, EUA*), diluídos a 1:500 e 1:300, respectivamente, em PBS, *overnight*. Seguida a lavagem da membrana em PBS-*tween* 0,05% (PBST) foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado, cabra anti-camundongo (*Dako, EUA*), diluído 1:1000 e 1:500, respectivamente, em PBS, por uma hora. Seguidas as lavagens com PBST, a membrana foi incubada por quarenta e cinco minutos com solução de complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (*Vector Laboratories, EUA*). Após várias lavagens, a revelação deu-se 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. Foram realizados ensaios em duplicata. β -Actina foi usada como controle interno dos ensaios.

As membranas obtidas foram escaneadas e as imagens salvas em formato TIFF. A seguir, as imagens foram convertidas para escala de cinza e depois invertidas utilizando-se o programa de imagem *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems, CA*) e, no programa *ImageJ* (*University of Texas Health Sciences Center, TX*), as bandas específicas foram delimitadas e medidas. A medida correspondente ao grupo de 3 meses foi tomada como 100%, para comparação com os demais grupos.

Tabela 1: Síntese dos anticorpos utilizados para realização de imunohistoquímica e *Western blotting*.

Anticorpo	Concentração do Anticorpo - Imunohistoquímica	Concentração do Anticorpo - <i>Western blotting</i>		Marca do Anticorpo
Anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-MCM7	1:300	1:500		Thermo Scientific (EUA)
Anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-PCNA	1:500	1:300		Millipore (EUA)
Anticorpo secundário biotilado cabra anti-camundongo	1:100	MCM7	PCNA	Dako (EUA)
		1:1000	1:500	

7. Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente através do programa *GraphPad Prisma 5* (*GraphPad Softwares, Inc, CA*), usando os testes de múltipla variância *One-Way ANOVA* e *Tukey* para comparação *post-hoc* entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.



V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Peso corporal e da próstata dorsal

A análise referente ao peso corporal mostrou aumento significativo dos 3 meses aos 6 meses de idade, permanecendo similar e significativamente maior até os 24 meses, nos animais saudáveis (Fig. 7). Nos animais caquéticos de 18 e 24 meses de idade, o peso corporal mostrou-se significativamente menor quando comparados com seus pares saudáveis, atingindo valores similares aos animais de 3 meses.

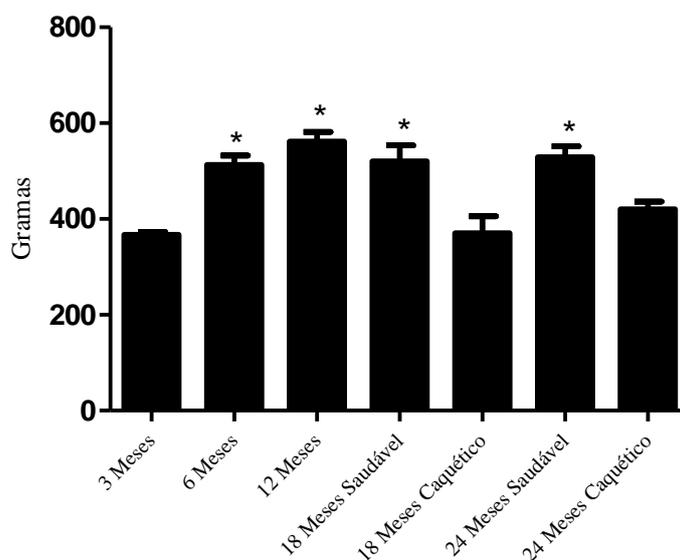


Figura 7: Peso corporal de ratos Wistar em diferentes idades. (*) = $p \leq 0,05$. Animais saudáveis $n = 5$. Animais caquéticos $n = 3$.

O peso relativo da próstata dorsal (Fig. 8) foi similar entre os grupos, exceto, nos animais caquéticos de 24 meses, nos quais o peso da glândula foi significativamente menor que nos demais.

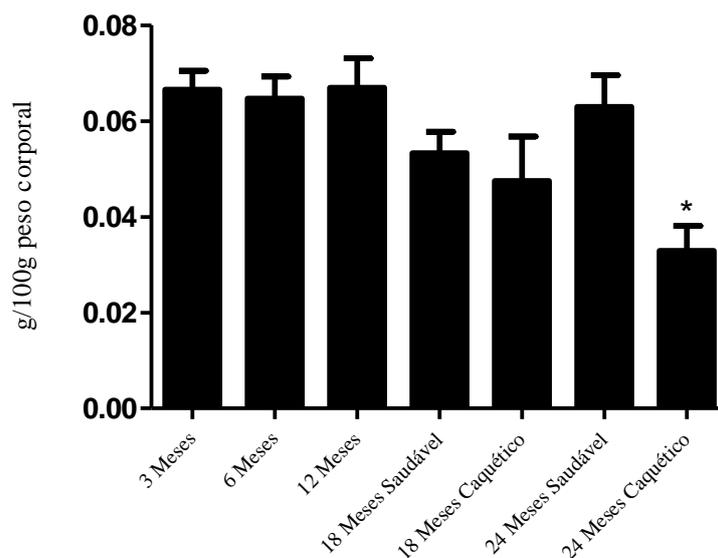


Figura 8: Peso relativo da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades. (*) = $p \leq 0,05$. Animais saudáveis $n = 5$. Animais caquéticos $n = 3$.

2. Histopatologia da próstata dorsal

Conforme observado em animais adultos de 3 e 6 meses de idade, a próstata dorsal de ratos é formada por adenômeros túbulo-alveolares, onde o epitélio glandular é do tipo pseudoestratificado prismático a cúbico contendo abundantes células secretoras e escassas células basais. O epitélio apresenta-se homogêneo, com rara ocorrência de pregueamentos. Os adenômeros contêm lúmen dilatado, repleto de secreção homogênea, eosinofílica e PAS positiva. Células apoptóticas e descamação de células epiteliais são raras nessa idade (Fig. 9A e B). Externamente, os adenômeros são circundados por duas a três camadas de células musculares lisas.

Aos 12 meses de idade, iniciam-se as alterações morfológicas na próstata dorsal, relacionadas ao envelhecimento. Há aumento no pregueamento epitelial sugestivo de hiperplasia e também maior ocorrência de células descamadas no interior dos adenômeros. A camada muscular lisa torna-se mais espessa (Fig. 9C).

Nos animais de 18 e 24 meses de idade, intensifica-se o pregueamento epitelial, caracterizando focos hiperplásicos, com diminuição do lúmen dos adenômeros e do seu

conteúdo. Ocorre também aumento de células descamadas e espessamento da camada muscular lisa em algumas regiões (Fig. 9D e E).

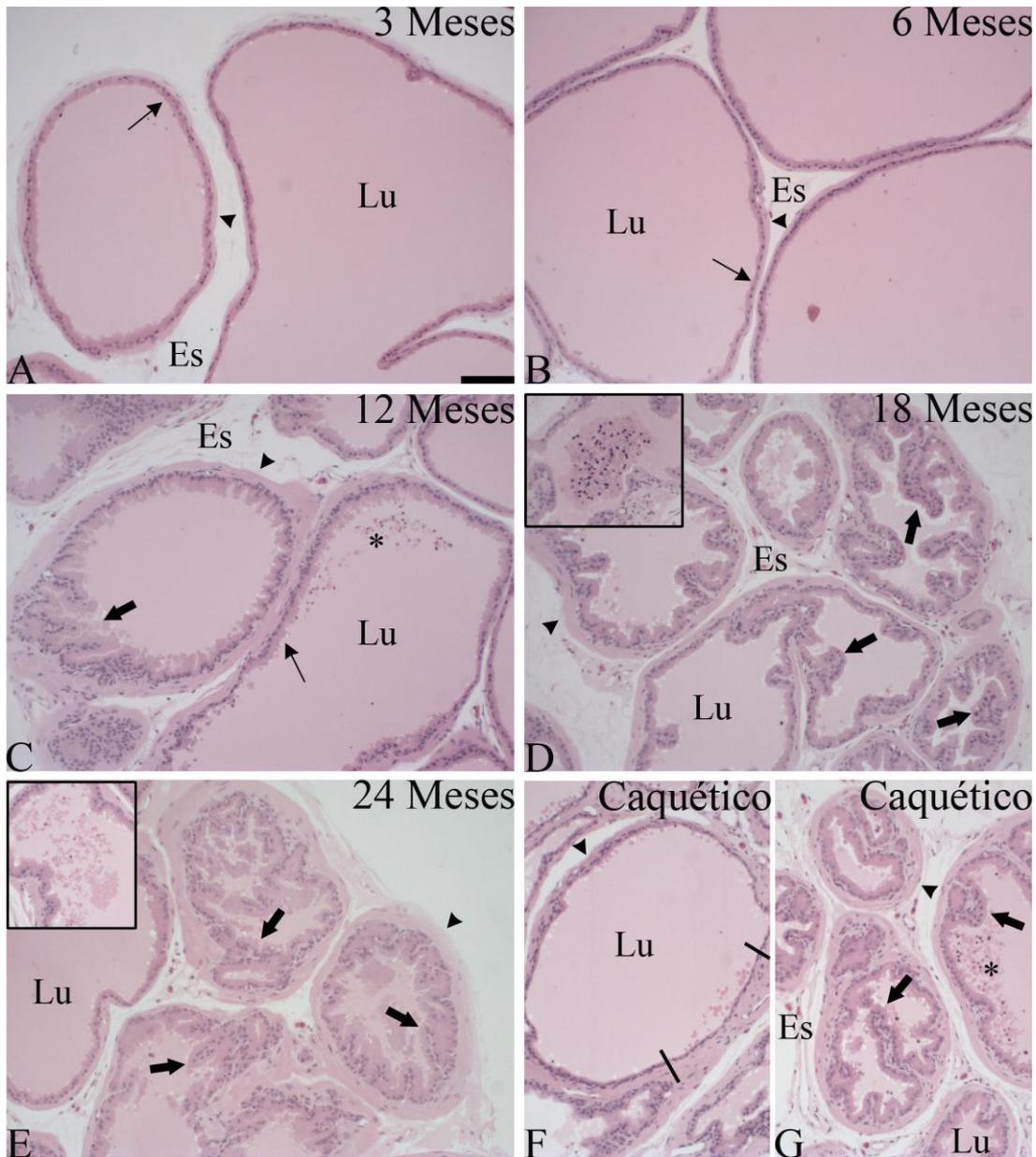


Figura 9: Histopatologia da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades. Em C, D, F e G destaca-se intenso pregueamento epitelial, sugestivo de hiperplasia. Inseto em D e E = células descamadas. Seta fina = epitélio pseudoestratificado; cabeça de seta = camada muscular lisa; seta grossa = focos hiperplásicos; Lu = lúmen; Es = estroma; Barras em F = delimitam área de epitélio pavimentoso; * = células descamadas. Barra em A = 100 μ m.

As próstatas de animais de 12 a 24 meses de idade foram ainda caracterizadas pela presença de estratificação pontual do epitélio glandular, com preservação da membrana basal, característico de neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN). Também foi evidente a presença de células apoptóticas que foram identificadas pelas características morfológicas de condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, presentes especialmente nos animais de 18 e 24 meses de idade saudáveis (Fig. 10).

Nos animais caquéticos (18 e 24 meses), de forma similar aos seus pares saudáveis, há intenso pregueamento epitelial, sugestivo de hiperplasia, espessamento da camada muscular lisa em alguns adenômeros, presença de células descamadas intraluminais, bem como figuras de células apoptóticas (Fig. 9 e 10). A presença de PIN foi infrequente. A particularidade mais marcante foi a ocorrência de adenômeros císticos, caracterizados pela expansão luminal e pavimentação do epitélio (Fig. 9F). Essa pavimentação é gradual, sendo possível notar transição de epitélio cuboide para epitélio pavimentoso em alguns dos adenômeros. Há de se destacar que tanto em animais caquéticos quanto em animais saudáveis são observados adenômeros de aspecto normal em associação com adenômeros alterados nas mesmas secções da próstata.

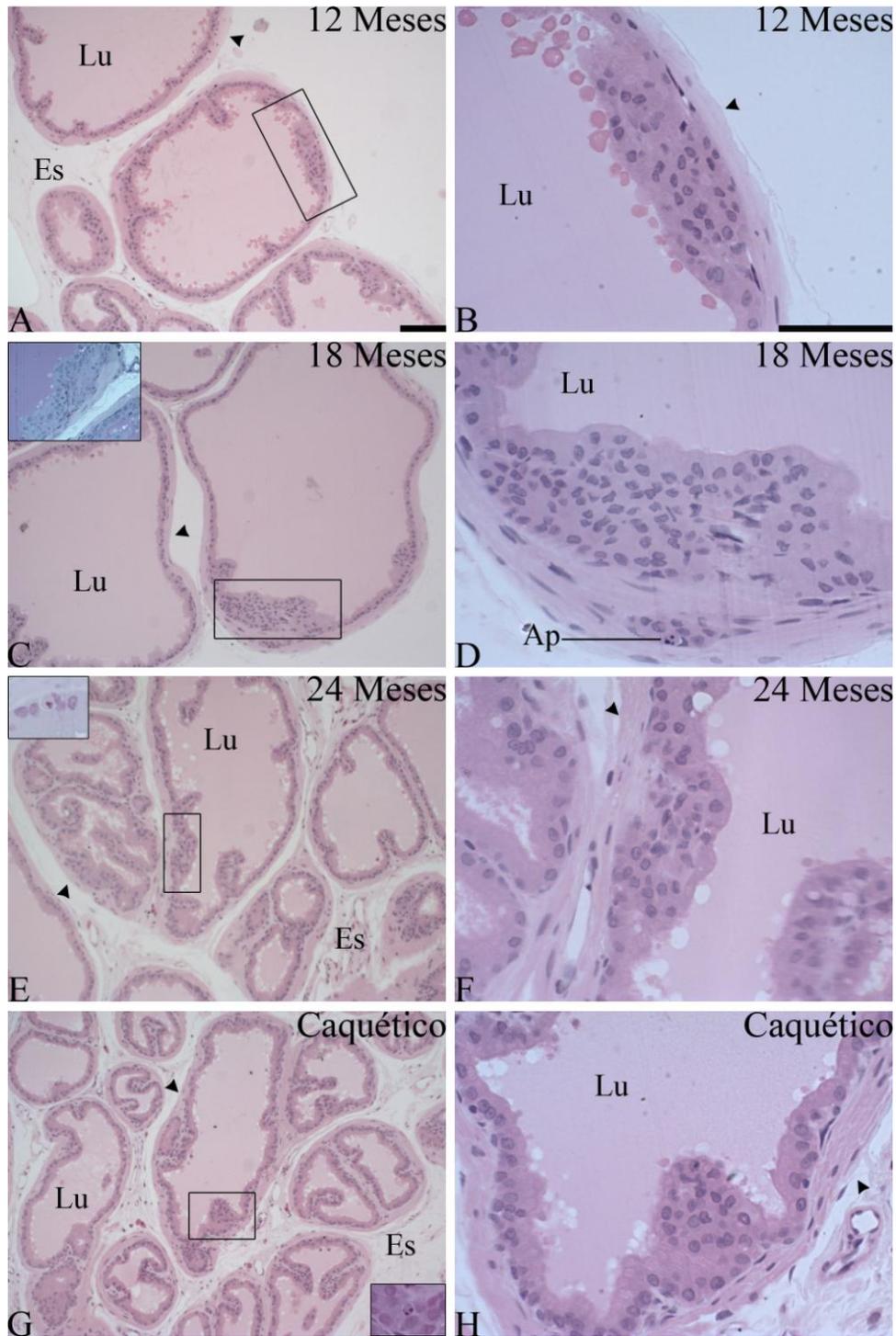


Figura 10: Neoplasias intraepiteliais (PIN) da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. Em **A**, **C**, **E** e **G** destacam-se áreas de PIN, e em **B**, **D**, **F** e **H** os respectivos aumentos. Inseto em **C** = PIN de secção corada por PAS. Insetos em **E** e **G** = célula apoptótica de secções coradas por Feulgen. Cabeça de seta = camada muscular lisa; retângulos = delimitação de PIN a ser ampliado em **B**, **D**, **F** e **H**, respectivamente; Ap = célula apoptótica; Lu = lúmen; Es = estroma. Barra em **B** = 100µm, referente a **B**, **D**, **F** e **H**. Barra em **A** = 25µm, referente a **A**, **C**, **E** e **G**.

3. Imunohistoquímica

3.1 MCM7

As análises imunohistoquímicas para o marcador de proliferação celular MCM7 revelaram núcleos de células epiteliais imunopositivos no epitélio da próstata dorsal de ratos em todas as idades examinadas, tanto em animais saudáveis quanto caquéticos (Fig. 11). A análise quantitativa, no entanto, revelou que com o envelhecimento, a proporção de células positivas foi reduzida, sendo a redução significativa nos animais caquéticos de 18 e 24 meses de idade (Fig. 12A). No entanto, um fato de destaque foi que embora a contagem de células positivas no epitélio normal tenha sido menor com o avançar da idade, a quantidade de áreas proliferativas intraepiteliais (PIN), com aglomerado de células positivas para MCM7, foi maior nos animais de 18 e 24 meses de idade saudáveis (Fig. 12B).

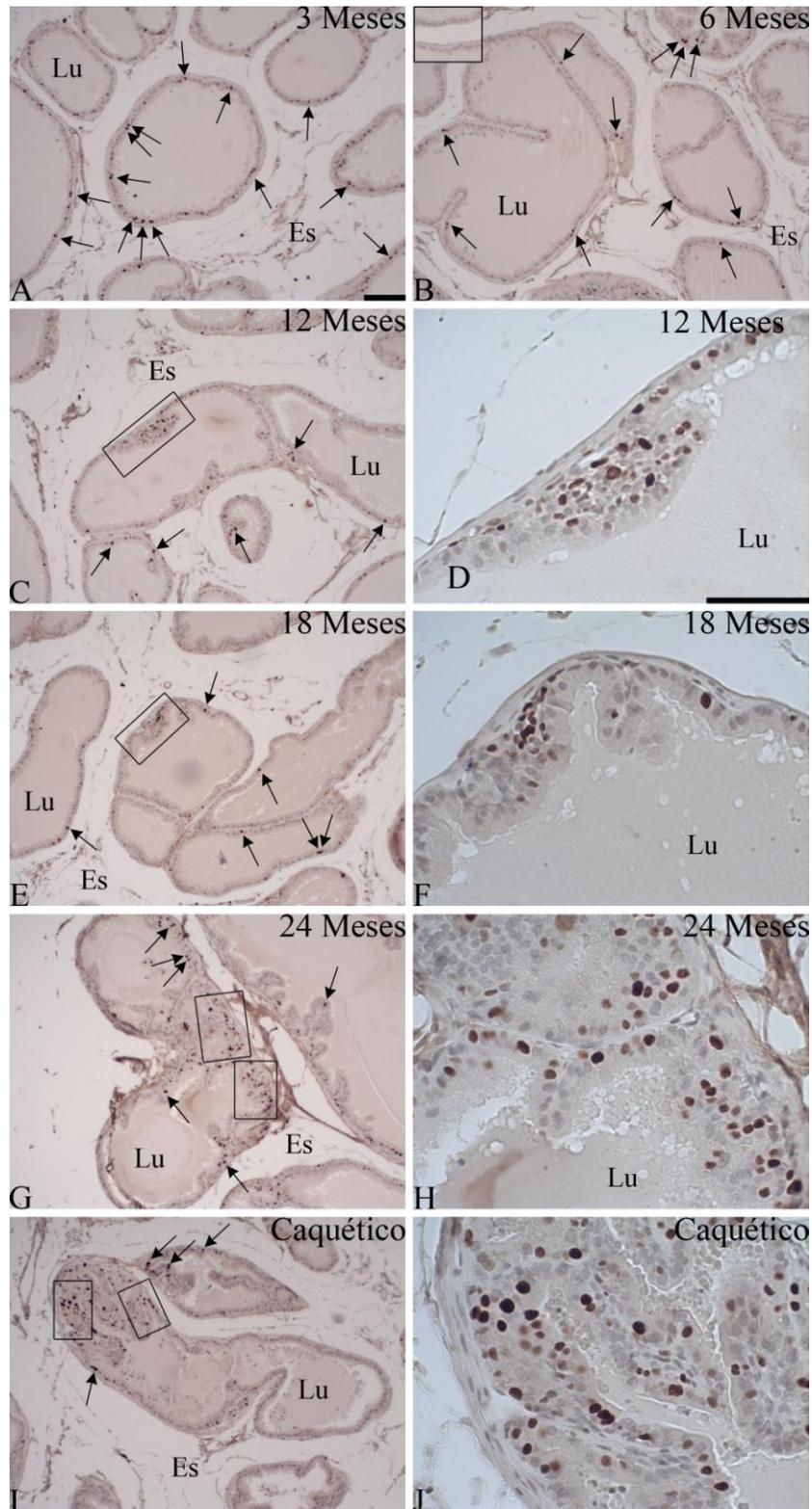


Figura 11: Detecção de MCM7 na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. Em **D, F, H e J** visualiza-se em maior aumento as áreas de PINs indicadas por retângulo em **C, E, G e I**. Inseto em **B** = controle negativo. Seta fina = células positivas; Lu = lúmen; Es = estroma. Contracoloração com hematoxilina. Barra em **A** = 100 μ m, referente a **A, B, C, E, G e I**. Barra em **D** = 25 μ m, referente a **D, F, H e J**.

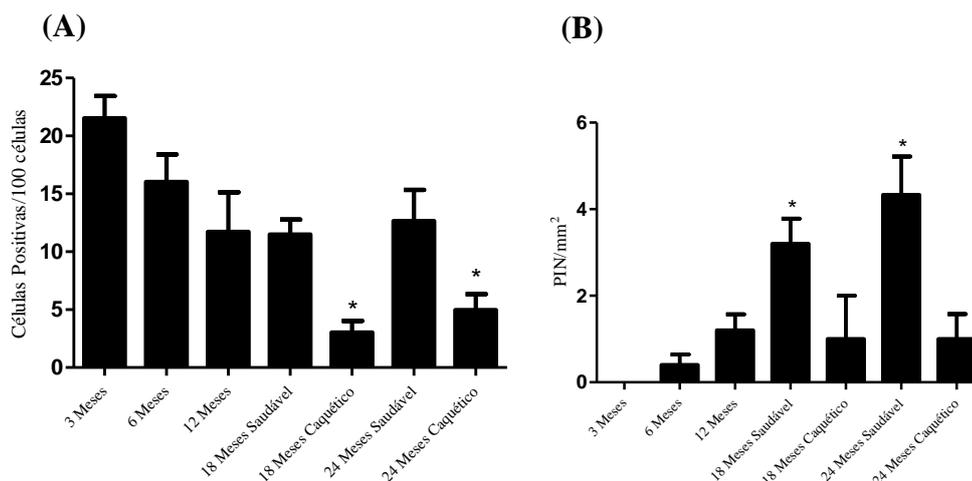


Figura 12: Índices de células imunopositivas para MCM7 **(A)** e índices de áreas de PINs imunomarcadas para MCM7 **(B)** no epitélio da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. (*) = $p \leq 0,05$. Animais saudáveis $n = 5$. Animais caquéticos $n = 3$.

Visando correlacionar o perfil de proliferação celular e a expressão de ER β , foram feitas algumas tentativas de colocalização de ER β e MCM7, por imunofluorescência, no entanto, não obtivemos sucesso, porque o anticorpo importado para esse fim revelou-se não reativo, possivelmente devido às más condições de preservação ao longo do período de importação. No entanto, a análise comparativa dos preparados imunohistoquímicos para ambas as proteínas nos permite dizer que áreas de maior concentração de células marcadas para MCM7 correspondem exatamente às áreas de proliferação celular intraepiteliais, previamente descritas por Morais-Santos (2012) como sendo as áreas de redução pontual na expressão de ER β (Fig. 13).

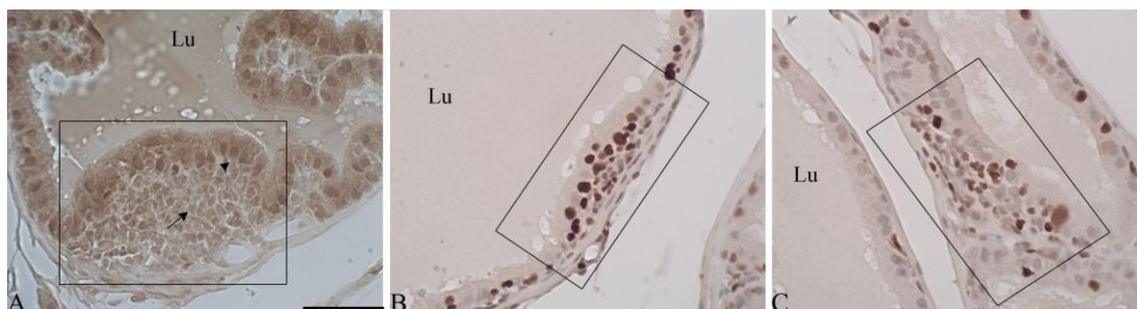


Figura 13: Áreas de PIN na próstata dorsal de ratos Wistar idosos imunomarcadas com ER β (A) e MCM7 (B e C). Seta fina = célula fracamente positiva para ER β ; cabeça de seta = célula fortemente positiva para ER β ; retângulo = delimitação de PIN. A figura A foi obtida de Morais-Santos (2012). Contracoloração com hematoxilina. Barra em A = 25 μ m, referente a A, B e C.

3.2 PCNA

As análises imunohistoquímicas do marcador de proliferação celular PCNA revelaram padrão similar com o marcador anterior, onde houve esporádica marcação epitelial na próstata dorsal de ratos Wistar em todas as idades examinadas, tanto em animais saudáveis quanto caquéticos (Fig. 14). Entretanto, a quantidade de células imunomarcadas foi menor em todos os grupos, quando comparado com a marcação para MCM7 (Fig. 14A). A análise quantitativa revelou ainda que após 12 meses de idade há uma drástica e significativa redução no número de células positivas para PCNA no epitélio normal quando comparado com os animais de 3 a 6 meses de idade (Fig. 15A).

Foi realizada também contagem de PIN imunomarcados por PCNA, porém, diferentemente do MCM7, foram detectados PINs imunopositivos e negativos para o PCNA. A quantificação de áreas de PIN revelou aumento das mesmas nas idades de 18 e 24 meses, mas a maioria dos PINs encontrados estavam negativos para o marcador de proliferação celular PCNA (Fig. 15B).

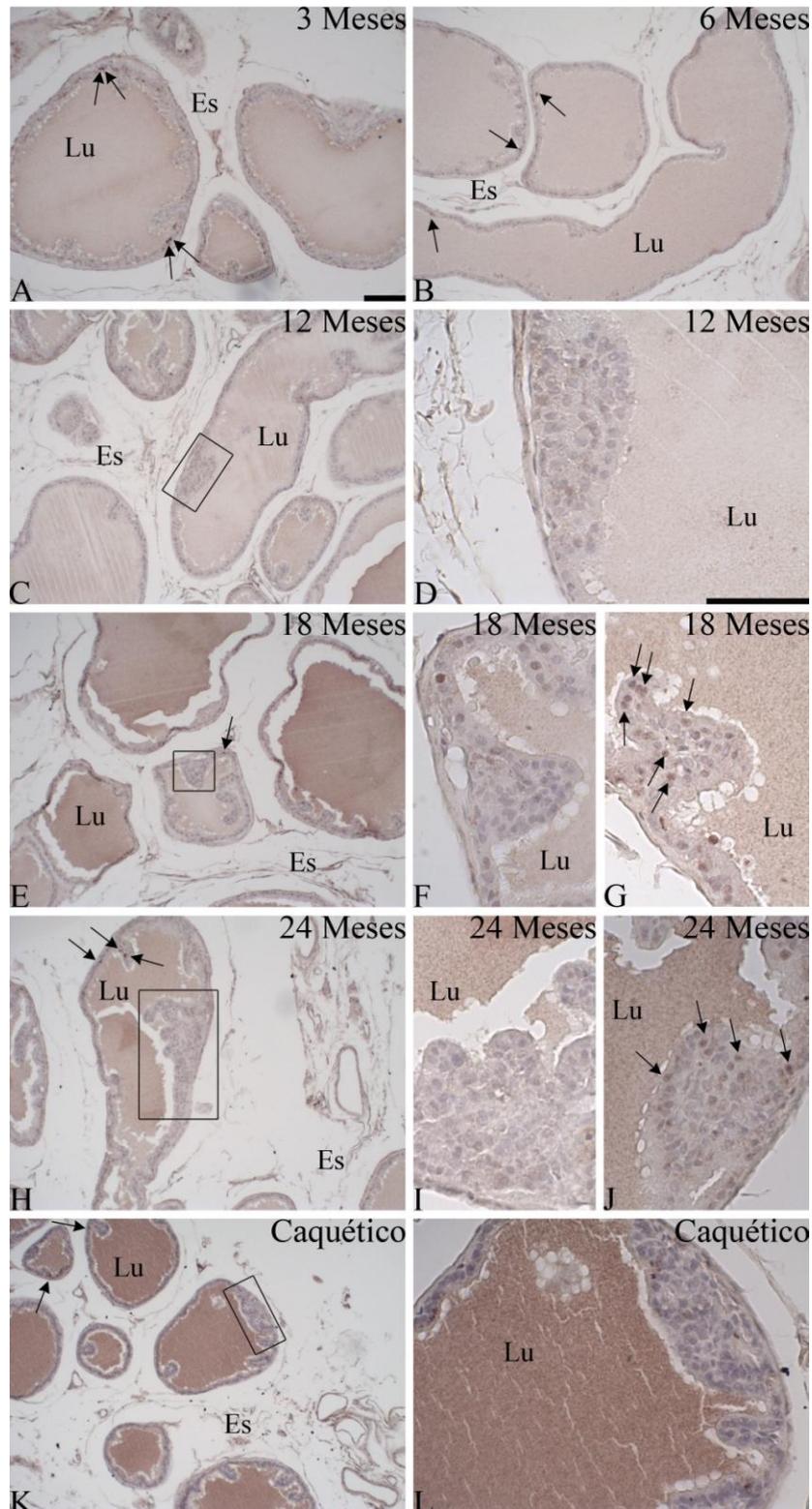


Figura 14: Detecção de PCNA na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. **D, F, I e L** = ampliação das áreas de PINs indicadas por retângulo em **C, E, H e K**. Inseto em **B** = controle negativo. Seta fina = células positivas; Lu = lúmen; Es = estroma. Contracoloração com hematoxilina. Barra em **A** = 100µm, referente a **A, B, C, E, H e K**. Barra em **D** = 25µm, referente a **D, F, G, I, J e L**.

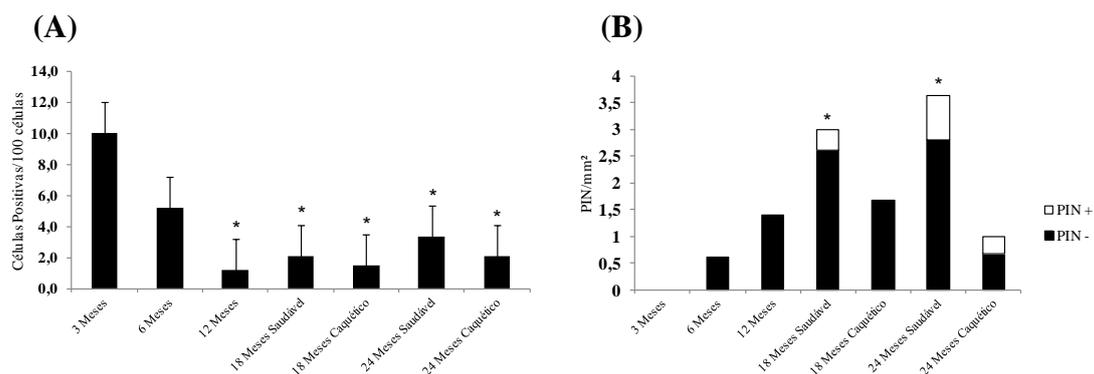


Figura 15: Índices de células imunopositivas para PCNA (A) e índices de áreas de PINs imunomarcadas para PCNA (B) no epitélio da próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. (*) = $p \leq 0,05$. Animais saudáveis $n = 5$. Animais caquéticos $n = 3$.

4. Western blotting

A especificidade dos anticorpos utilizados foi comprovada pela detecção de bandas de 80 kDa e 36 kDa, compatíveis, respectivamente, com o peso molecular descrito para MCM7 e PCNA em roedores (Fig. 16A) (Bravo *et al.*, 1987; Tye, 1999; Forsburg, 2004; Strzalka & Ziemienowicz, 2011). A intensidade média de *pixels* não revelou diferença significativa na expressão de MCM7 nem de PCNA em extrato de proteína total dos lobos dorsais da próstata de ratos nas diferentes idades, exceto pelo aumento de PCNA aos 24 meses (Fig. 16B).

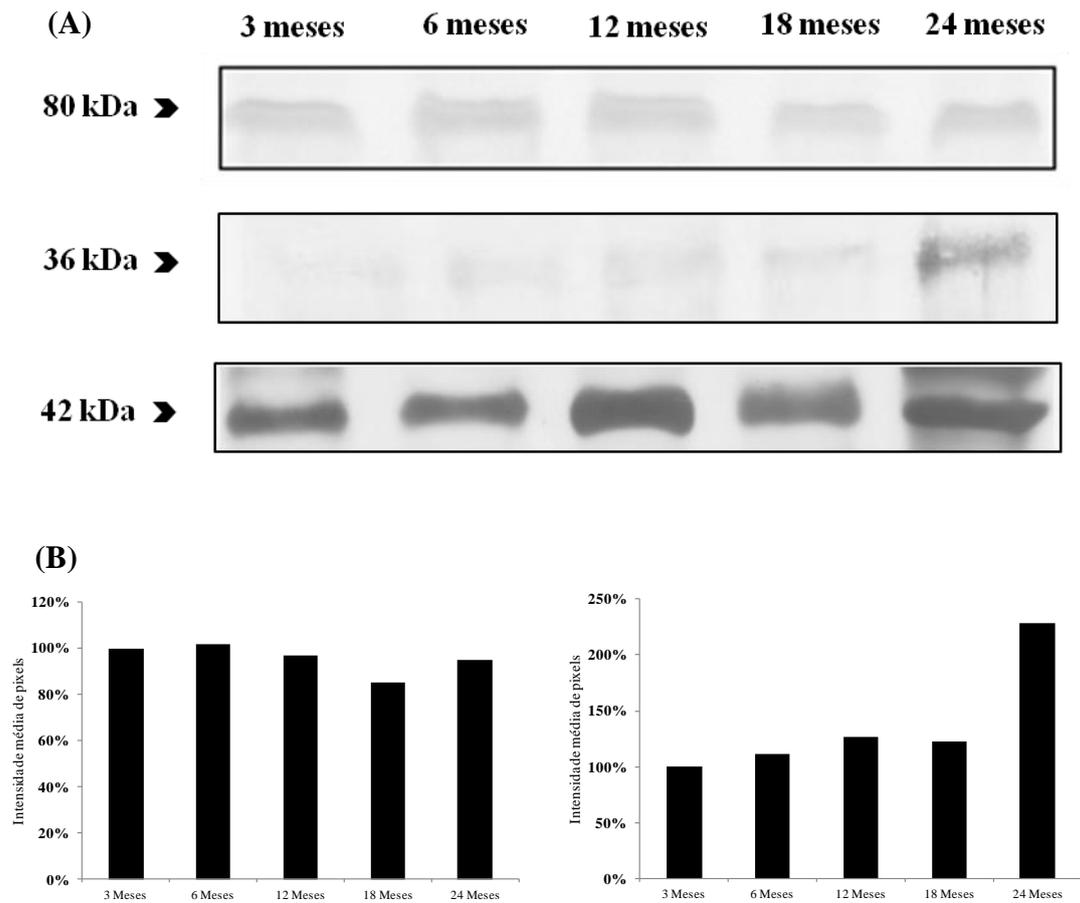


Figura 16: (A) *Western blotting* para MCM7 e PCNA extraídos da próstata dorsal de ratos Wistar em diferentes idades. β -actina foi utilizada como controle do ensaio. (B) Representação gráfica da análise densitométrica das bandas de 80 e 36 kDa. n = 3 animais.



VI. DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que, além da escassa proliferação que ocorre para a manutenção da próstata adulta, com o envelhecimento houve redução de proliferação no epitélio prostático normal, mas marcante aumento de proliferação em áreas específicas com características compatíveis com PIN. Essas áreas são também caracterizadas pela redução de expressão de receptores de estrógenos ER β , conforme previamente descrito por Santos (2011), sugerindo que esse pode ser um fator favorável ao desequilíbrio na homeostase tecidual local, desde que dentre as funções de ER β destaca-se seu papel anti-proliferativo.

O peso corporal dos animais avaliados aumentou significativamente entre os 3 e 6 meses de idade, permanecendo estável até os 24 meses nos animais saudáveis. Em contraste, o peso relativo da próstata dorsal manteve-se regular dos 3 aos 24 meses de idade, exceto nos animais caquéticos onde houve redução do peso da glândula. Esse resultado difere do lobo ventral do mesmo grupo de animais, o qual só estabiliza o peso da glândula com 6 meses de idade (Santos, 2011; Gonzaga, 2013), revelando diferença no padrão de crescimento dos lobos prostáticos de ratos Wistar. Poucos estudos acompanham o desenvolvimento prostático além do período de atividade reprodutiva, dificultando a comparação de resultados. Uma exceção é a linhagem de ratos Brown Norway, considerada modelo para alterações hiperplásicas espontâneas e idade-específica na próstata (Bethel *et al.*, 2009). Não obstante, mesmo essa sendo a linhagem melhor estudada sobre o tema, os dados são conflitantes. As primeiras evidências indicaram que o peso dos lobos prostáticos não muda com a idade em ratos Brown Norway (6 e 24 meses), coincidindo com invariável conteúdo de proteínas e DNA, o que reflete o número de células do tecido (Banerjee *et al.*, 1994). Esse mesmo grupo de pesquisadores em trabalhos posteriores descreve exatamente o contrário, indicando que os lobos dorsais e laterais, mas não os ventrais, sofrem alterações com a idade, incluindo aumento do peso e do conteúdo de proteínas e DNA, coincidente com o desenvolvimento de hiperplasia espontânea (Banerjee *et al.*, 1998). Em ratos Wistar também foram observados focos hiperplásicos em alguns adenômeros, mas ao mesmo

tempo outros apresentaram redução de diâmetro e conteúdo luminal, o que pode ter contrabalançado o peso do órgão.

As análises histológicas da próstata dorsal dos animais adultos jovens (3 e 6 meses de idade) foram condizentes com os dados da literatura (Jesik *et al.*, 1982; Hayashi *et al.*, 1991). A partir dos 12 meses de idade observou-se o início das alterações morfológicas as quais foram intensificando-se nos animais ao longo do envelhecimento (18 e 24 meses de idade). Dentre as alterações destacaram-se hiperplasias e áreas de estratificação desordenada do epitélio, sugestivos de PIN. Essas alterações histopatológicas espontâneas observadas na próstata dorsal de ratos Wistar corroboram dados da literatura que descrevem lesões proliferativas espontâneas na próstata de diversas linhagens de ratos (Lobund-Wistar isentos de germes - Pollard, 1973; ACI/seg - Ward *et al.*, 1980 e Isaacs, 1984; Noble - Leav *et al.*, 1988; Fisher 344 - Mitsumori & Elwell, 1988; Brown Norway - Banerjee *et al.*, 1998). No entanto, para a maioria dessas linhagens, os animais apresentam longos períodos de vida (Lobund Wistar isentos de germes - 40 meses; ACI/seg - 40 meses; Fisher 344 - 31 meses; Brown Norway - 34 a 30 meses), que contrastam com os Wistar aqui descritos, cuja longevidade dificilmente ultrapassa 24 meses. O progresso no estudo da carcinogênese prostática é grandemente limitado pela indisponibilidade de um modelo animal apropriado, uma vez que é rara a ocorrência de câncer prostático espontâneo em mamíferos, exceto humanos. Dessa forma, a ocorrência de lesões pré-malignas na próstata de ratos de linhagem com menor longevidade, como o Wistar, representa um fator positivo, favorecendo seu uso como modelo experimental para investigações sobre alterações patológicas do tecido.

Tendo detectado alterações histopatológicas da próstata dorsal de ratos Wistar, similares às previamente descritas para próstata ventral (Santos, 2011; Gonzaga, 2013), interessou-nos então determinar se essas estão relacionadas com redução do potencial apoptótico ou aumento da capacidade de sobrevivência das células. Dados preliminares indicam que alteração nos níveis de apoptose não parece ser o caso para justificar a ocorrência de alterações histopatológicas na próstata de ratos Wistar em envelhecimento (Gonzaga, 2013). Quanto à proliferação celular, os resultados encontrados para os marcadores MCM7 e PCNA revelaram que a próstata dorsal é um órgão normalmente pouco proliferativo nos animais adultos jovens (3 e 6 meses de idade). A proliferação celular foi detectada em adenômeros com morfologia dentro do padrão esperado,

sugerindo um processo de crescimento normal e controlado do órgão, para que a glândula possa desempenhar suas funções na vida adulta (Tucker, 1997; Chen *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). No entanto, conforme detectado pela expressão de MCM7, ao longo do envelhecimento, que ocorre nos animais de 12 a 24 meses de idade, o padrão de proliferação altera-se, tornando mais intenso em áreas com perda da organização epitelial normal, como áreas de PIN, sugerindo um processo de crescimento descontrolado (Shappell *et al.*, 2004; Ittmann *et al.*, 2013).

Esses dados corroboram estudos prévios, onde observou-se que ao longo da idade, há uma redução na expressão de ER β principalmente nos locais de alterações histopatológicas, como PIN, mas não em áreas de hiperplasia benigna (Santos, 2011). Sabe-se que os ER β possuem propriedades pró-apoptóticas e anti-proliferativas (Weihua *et al.*, 2001; Weihua *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Imamov *et al.*, 2004; McPherson *et al.*, 2007; Pravettoni *et al.*, 2007), de forma que sua redução pontual com a idade pode estar correlacionada com o aumento na atividade proliferativa também localizada. Esse dado se reveste de importância, considerando dados sobre a próstata de humanos, nos quais a expressão de ER β é altamente reduzida em tecido pré-maligno (PIN) e maligno (adenocarcinomas), alcançando níveis indetectáveis com a progressão do tumor, mas prevalece em tecido hiperplásico (Leav *et al.*, 2001; Horvath *et al.*, 2001; Pasquali *et al.*, 2001b; Pasquali *et al.*, 2001a; Tsurusaki *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007; Asgari & Morakabati, 2011).

Similar aos resultados encontrados em próstata de ratos, também em humanos uma proporção consistentemente maior de células marcadas por MCM7 foi detectada em comparação com outros marcadores de proliferação celular (Ki67) em células malignas e pré-malignas, como PIN, em contraste com células benignas (Padmanabhan *et al.*, 2004). Acredita-se que o desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplas etapas, progredindo sequencialmente do epitélio normal, para o PIN e finalmente para a neoplasia invasiva. Há evidências de que PIN e focos microscópicos de câncer são comumente detectados em homens a partir da segunda e terceira década de vida, bem antes das lesões carcinogênicas clinicamente detectadas que são mais comuns a partir dos 50 anos de idade (Sakr *et al.*, 1993; Prezioso *et al.*, 2007). Dessa forma, os dados obtidos podem ser interessantes para futuros estudos sobre a possibilidade de uso de MCM7 como marcador histológico para detecção da fase pré-maligna, favorecendo o

tratamento precoce da doença. Corroborando esse ponto de vista, estudo em tecido humano normal e com alterações benignas e malignas, também apontou a sensibilidade do MCM7 como potencial marcador de valor diagnóstico e prognóstico para doenças prostáticas, uma vez que sua expressão aumentou concomitante com a severidade das lesões (Padmanabhan *et al.*, 2004; Levesque *et al.*, 2007; Laitinen *et al.*, 2008; Luo, 2011). Ilustrando a importância desses achados, iniciativas no sentido de utilização de MCM7 como alvo terapêutico já existem. Resultados promissores foram obtidos após introdução de vetores expressando siRNA específico para MCM7 em células cancerosas (PC3 e DU145), os quais reduziram a expressão desse marcador, resultando em parada na proliferação celular e redução do volume tumoral após implante xenográfico em camundongos (Shi *et al.*, 2010).

Quando analisados os grupos imunomarcados pela proteína PCNA, observou-se que, nos focos proliferativos intraepiteliais, a imunopositividade das células foi nitidamente menor em relação ao MCM7 ou essas se apresentaram totalmente negativas. Uma das explicações para esse fato deve-se às diferentes fases em que as proteínas se expressam no ciclo celular. Enquanto a PCNA está presente em todas as fases de intérfase, sendo especialmente abundante na fase S (Wyman & Botchan, 1995; Maga & Hubscher, 2003; Prives & Gottifredi, 2008), o MCM7 está presente na fase G1 do ciclo celular, licenciando o DNA para replicação e controlando a progressão para a fase S, sendo então dissipada nas fases S, G2 e M para evitar duplicação do DNA mais de uma vez por ciclo (Lei, 2005; Chang *et al.*, 2011). Como o PCNA não reconhece prioritariamente células na fase G1 do ciclo celular e sabe-se que essa fase é prolongada em muitas células cancerosas em proliferação, a sensibilidade desse marcador pode não ser a ideal (Lei, 2005). Em adição ao seu papel na replicação celular como polimerase deslizante, o PCNA também está envolvido como fator regulatório do ciclo celular e no reparo de DNA, podendo ser expresso em diversas fases do ciclo, comprometendo, assim, sua confiabilidade como marcador de proliferação celular (Kelman, 1997; Lei, 2005).



VII. CONCLUSÃO

VII. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados do presente trabalho mostram que normalmente existe proliferação celular na próstata dorsal de ratos jovens e idosos, no entanto, nos animais idosos há redução da proliferação celular no tecido em geral, mas aumenta a ocorrência de regiões específicas com distúrbios proliferativos epiteliais ou intraepiteliais, que se marcam intensamente pelo MCM7, mas não pelo PCNA, indicando a maior especificidade do primeiro marcador. As áreas proliferativas intraepiteliais são as mesmas que apresentam redução seletiva de ER β na próstata ventral, previamente descritos, corroborando uma possível inter-relação entre o silenciamento desse receptor com condições malignas ou pré-malignas da próstata.



VIII. PERSPECTIVAS

VIII. PERSPECTIVAS

Considerando que ocorre aumento da imunopositividade para MCM7 em áreas restritas de alterações histopatológicas na próstata dorsal de ratos em envelhecimento, e que este aumento está relacionado com áreas de diminuição da expressão de ER β , seria relevante investigar a expressão desse marcador de proliferação celular nos outros lobos do complexo prostático, para obter uma análise completa do perfil de proliferação celular.

Esforço deve ser feito para superar as dificuldades técnicas quanto ao ensaio de imunofluorescência para co-localização para MCM7 e ER β , o que permitirá uma análise mais profunda da relação destes no complexo prostático de ratos em envelhecimento.

Há evidências de que ER β na próstata de ratos é modulada pelo metabólito estrogênico de DHT, denominado 3 β -diol (Oliveira *et al.*, 2007). O papel de 3 β -diol, agindo via ER β , inclui ainda modulação da proliferação e diferenciação celular (Weihua *et al.*, 2002; Imamov *et al.*, 2004; Dondi *et al.*, 2010). Sabendo que os níveis de ER β reduzem em tecido prostático maligno (Horvath *et al.*; Pasquali *et al.*, 2001b; Yang *et al.*, 2007), bem como com o envelhecimento, coincidindo com a fase de maior incidência de alterações proliferativas no órgão (Santos, 2011 e presente trabalho), seria interessante investigar se a exposição a esse ligante indutor de expressão de ER β poderá reverter as alterações proliferativas detectadas em próstata de ratos.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 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. 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.
- ALCARAZ, A., HAMMERER, P., TUBARO, A., SCHRODER, F. H. & CASTRO, R. 2009. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol*, 55, 864-73.
- APARICIO, T., IBARRA, A. & MENDEZ, J. 2006. Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div*, 1, 18.
- ASGARI, M. & MORAKABATI, A. 2011. Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinoma. *Diagn Pathol*, 6, 61.
- AUMÜLLER, G. & ADLER, G. 1979. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res*, 198, 145-58.
- 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., DORSEY, R., ZIRKIN, B. R. & BROWN, T. R. 1994. Age- and lobe-specific responses of the brown Norway rat prostate to androgen. *Biol Reprod*, 51, 675-84.
- 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.
- 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.
- BELL, S. P. & DUTTA, A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 71, 333-74.
- BENTVELSEN, F. M., BRINKMANN, A. O., VAN DER SCHOOT, P., VAN DER LINDEN, J. E., VAN DER KWAST, T. H., BOERSMA, W. J., SCHRODER, F. H. & NIJMAN, J. M. 1995. Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Mol Cell Endocrinol*, 113, 245-53.
- BETHEL, C. R., CHAUDHARY, J., ANWAY, M. D. & BROWN, T. R. 2009. Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *Prostate*, 69, 838-50.
- BIANCO, J. J., HANDELSMAN, D. J., PEDERSEN, J. S. & RISBRIDGER, G. P. 2002. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, 143, 4922-33.

- BLOW, J. J. & HODGSON, B. 2002. Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol*, 12, 72-8.
- BOLOGNA-MOLINA, R., MOSQUEDA-TAYLOR, A., MOLINA-FRECHERO, N., MORI-ESTEVEZ, A. D. & SANCHEZ-ACUNA, G. 2013. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18, e174-9.
- BRAVO, R., FRANK, R., BLUNDELL, P. A. & MACDONALD-BRAVO, H. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326, 515-7.
- 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.
- CHANG, F., MAY, C. D., HOGGARD, T., MILLER, J., FOX, C. A. & WEINREICH, M. 2011. High-resolution analysis of four efficient yeast replication origins reveals new insights into the ORC and putative MCM binding elements. *Nucleic Acids Res*, 39, 6523-35.
- CHEN, M., TANNER, M., LEVINE, A. C., LEVINA, E., OHOUO, P. & BUTTYAN, R. 2009. Androgenic regulation of hedgehog signaling pathway components in prostate cancer cells. *Cell Cycle*, 8, 149-57.
- 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.
- DANIELPOUR, D., KADOMATSU, K., ANZANO, M. A., SMITH, J. M. & SPORN, M. B. 1994. Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer Res*, 54, 3413-21.
- DI SANT'AGNESE, P. A. 1992. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol*, 23, 287-96.
- DONDI, D., PICCOLELLA, M., BISERNI, A., DELLA TORRE, S., RAMACHANDRAN, B., LOCATELLI, A., RUSMINI, P., SAU, D., CARUSO, D., MAGGI, A., CIANA, P. & POLETTI, A. 2010. Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. *Endocr Relat Cancer*, 17, 731-42.
- EDWARDS, M. C., TUTTER, A. V., CVETIC, C., GILBERT, C. H., PROKHOROVA, T. A. & WALTER, J. C. 2002. MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem*, 277, 33049-57.
- 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. 2010. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 118, 246-51.
- ENMARK, E. & GUSTAFSSON, J. A. 1999. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*, 246, 133-8.
- FERRETTI, L. P., LAFRANCHI, L. & SARTORI, A. A. 2013. Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Front Genet*, 4, 99.
- FORSBURG, S. L. 2004. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 109-31.

- FUJIOKA, S., SHOMORI, K., NISHIHARA, K., YAMAGA, K., NOSAKA, K., ARAKI, K., HARUKI, T., TANIGUCHI, Y., NAKAMURA, H. & ITO, H. 2009. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer*, 65, 223-9.
- GHOSAL, G., LEUNG, J. W., NAIR, B. C., FONG, K. W. & CHEN, J. 2012. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *J Biol Chem*, 287, 34225-33.
- GONZAGA, A. C. R. 2013. Estudo comparativo do perfil apoptótico ativado pelas vias intrínseca e extrínseca na próstata ventral de ratos durante o envelhecimento. *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular - Universidade Federal de Minas Gerais*, 1 - 75.
- GROSSMANN, M. E., HUANG, H. & TINDALL, D. J. 2001. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93, 1687-97.
- HARMAN, S. M., METTER, E. J., TOBIN, J. D., PEARSON, J. & BLACKMAN, M. R. 2001. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 724-31.
- 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.
- 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.
- 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 2014. Incidência de Câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde*, <http://www.inca.gov.br>, 55 - 59.
- 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.
- ITTMANN, M., HUANG, J., RADAELLI, E., MARTIN, P., SIGNORETTI, S., SULLIVAN, R., SIMONS, B. W., WARD, J. M., ROBINSON, B. D., CHU, G. C., LODA, M., THOMAS, G., BOROWSKY, A. & CARDIFF, R. D. 2013. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*, 73, 2718-36.
- IZUMI, K., MIZOKAMI, A., LIN, W. J., LAI, K. P. & CHANG, C. 2013. Androgen receptor roles in the development of benign prostate hyperplasia. *Am J Pathol*, 182, 1942-9.

- 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.
- JESIK, C. J., HOLLAND, J. M. & LEE, C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, 3, 81-97.
- KELLY, T. J. & BROWN, G. W. 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, 69, 829-80.
- KELMAN, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14, 629-40.
- 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.
- KITAGAWA, M., KITAGAWA, K., KOTAKE, Y., NIIDA, H. & OHHATA, T. 2013. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci*, 70, 4785-94.
- KLOSE, R. J. & BIRD, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31, 89-97.
- KRISHNA, T. S., KONG, X. P., GARY, S., BURGERS, P. M. & KURIYAN, J. 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79, 1233-43.
- 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.
- LABIB, K., KEARSEY, S. E. & DIFFLEY, J. F. 2001. MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Mol Biol Cell*, 12, 3658-67.
- 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.
- LAITINEN, S., MARTIKAINEN, P. M., TOLONEN, T., ISOLA, J., TAMMELA, T. L. & VISAKORPI, T. 2008. EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *Int J Cancer*, 122, 595-602.
- LEAV, I., HO, S. M., OFNER, P., MERK, F. B., KWAN, P. W. & DAMASSA, D. 1988. Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst*, 80, 1045-53.
- LEAV, I., LAU, K. M., ADAMS, J. Y., MCNEAL, J. E., TAPLIN, M. E., WANG, J., SINGH, H. & HO, S. M. 2001. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol*, 159, 79-92.
- LEE, C. H., AKIN-OLUGBADE, O. & KIRSCHENBAUM, A. 2011. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 40, 565-75, viii-ix.
- LEE, M. Y., ZHANG, S., LIN, S. H., CHEA, J., WANG, X., LEROY, C., WONG, A., ZHANG, Z. & LEE, E. Y. 2012. Regulation of human DNA polymerase delta in the cellular responses to DNA damage. *Environ Mol Mutagen*, 53, 683-98.

- LEI, M. 2005. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 5, 365-80.
- LEI, M. & TYE, B. K. 2001. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*, 114, 1447-54.
- LEVESQUE, M. H., EL-ALFY, M., BERGER, L., LABRIE, F. & LABRIE, C. 2007. Evaluation of AIBZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases. *Urology*, 69, 196-201.
- LIU, Y. Z., JIANG, Y. Y., HAO, J. J., LU, S. S., ZHANG, T. T., SHANG, L., CAO, J., SONG, X., WANG, B. S., CAI, Y., ZHAN, Q. M. & WANG, M. R. 2012. Prognostic significance of MCM7 expression in the bronchial brushings of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 77, 176-82.
- LUND, T. D., MUNSON, D. J., ADLERCREUTZ, H., HANDA, R. J. & LEPHART, E. D. 2004. Androgen receptor expression in the rat prostate is down-regulated by dietary phytoestrogens. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 5.
- LUO, J. H. 2011. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. *World J Clin Oncol*, 2, 120-4.
- LUU-THE, V., BELANGER, A. & LABRIE, F. 2008. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 207-21.
- MAGA, G. & HUBSCHER, U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116, 3051-60.
- MAGGIOLINI, M., DONZE, O., JEANNIN, E., ANDO, S. & PICARD, D. 1999. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res*, 59, 4864-9.
- MAHLER, M., MIYACHI, K., PEEBLES, C. & FRITZLER, M. J. 2012. The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmun Rev*, 11, 771-5.
- 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*, 164, 109-16.
- 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. 1988. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 12, 619-33.
- 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.
- MITSUMORI, K. & ELWELL, M. R. 1988. Proliferative lesions in the male reproductive system of F344 rats and B6C3F1 mice: incidence and classification. *Environ Health Perspect*, 77, 11-21.
- MOLDOVAN, G. L., PFANDER, B. & JENTSCH, S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129, 665-79.

- MORAIS-SANTOS, M., REIS, R. P., GONZAGA, A. C. R., OLIVEIRA, A. G., MAHECHA, G. A. B., AVELLAR, M. C., OLIVEIRA, C. A. 2012. *Expression of the estrogen receptor ER β in the ventral and dorsal prostate of aging rats*. In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Annals of the 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012. p. 142.
- OLDRIDGE, E. E., PELLACANI, D., COLLINS, A. T. & MAITLAND, N. J. 2012. Prostate cancer stem cells: are they androgen-responsive? *Mol Cell Endocrinol*, 360, 14-24.
- OLIVEIRA, A. G., COELHO, P. H., GUEDES, F. D., MAHECHA, G. A., HESS, R. A. & OLIVEIRA, C. A. 2007. 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids*, 72, 914-22.
- PADMANABHAN, V., CALLAS, P., PHILIPS, G., TRAINER, T. D. & BEATTY, B. G. 2004. DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. *J Clin Pathol*, 57, 1057-62.
- PASQUALI, D., ROSSI, V., ESPOSITO, D., ABBONDANZA, C., PUCA, G. A., BELLASTELLA, A. & SINISI, A. A. 2001a. 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.
- PASQUALI, D., STAIBANO, S., PREZIOSO, D., FRANCO, R., ESPOSITO, D., NOTARO, A., DE ROSA, G., BELLASTELLA, A. & SINISI, A. A. 2001b. Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 178, 47-50.
- PELLETIER, G. 2008. Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 223-8.
- POLLARD, M. 1973. Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree Wistar rats. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1235-41.
- PRAVETTONI, A., MORNATI, O., MARTINI, P. G., MARINO, M., COLCIAGO, A., CELOTTI, F., MOTTA, M. & NEGRI-CESI, P. 2007. Estrogen receptor beta (ER β) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU145 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 263, 46-54.
- PREZIOSO, D., DENIS, L. J., KLOCKER, H., SCIARRA, A., REIS, M., NABER, K., LOBEL, B., PACIK, D. & GRIFFITHS, K. 2007. Estrogens and aspects of prostate disease. *Int J Urol*, 14, 1-16.
- 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.
- PRINS, G. S., BIRCH, L., HABERMANN, H., CHANG, W. Y., TEBEAU, C., PUTZ, O. & BIEBERICH, C. 2001. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*, 13, 241-52.
- PRINS, G. S. & KORACH, K. S. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73, 233-44.
- PRIVES, C. & GOTTIFREDI, V. 2008. The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle*, 7, 3840-6.
- 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., 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.
- RUSSELL, D. W. & WILSON, J. D. 1994. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 63, 25-61.
- SAKR, W. A., HAAS, G. P., CASSIN, B. F., PONTES, J. E. & CRISSMAN, J. D. 1993. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol*, 150, 379-85.
- SANTOS, M. M. 2011. Alterações na expressão dos receptores de estrógenos ER β na próstata ventral de ratos em envelhecimento. *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular - Universidade Federal de Minas Gerais*, 1 - 79.
- SCHAFER, K. A. 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 35, 461-78.
- 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.
- SHI, Y. K., YU, Y. P., TSENG, G. C. & LUO, J. H. 2010. Inhibition of prostate cancer growth and metastasis using small interference RNA specific for minichromosome complex maintenance component 7. *Cancer Gene Ther*, 17, 694-9.
- 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.
- STRZALKA, W. & ZIEMIENOWICZ, A. 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot*, 107, 1127-40.
- SUZUKI, S., ADACHI, A., HIRAIWA, A., OHASHI, M., ISHIBASHI, M. & KIYONO, T. 1998. Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene*, 216, 85-91.
- TAYLOR, R. A., COWIN, P., COUSE, J. F., KORACH, K. S. & RISBRIDGER, G. P. 2006. 17beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ERalpha or ERbeta. *Endocrinology*, 147, 191-200.
- 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.
- TUCKER, M. J. 1997. International classification of rodent tumours. Part I: The rat. 8. Male genital system. *IARC Sci Publ*, ix-x, 1-52.
- TYE, B. K. 1999. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 68, 649-86.

- VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R. & BERNEMAN, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, 131-49.
- WANG, K., SHI, Z., ZHANG, M. & CHENG, D. 2013. Structure of PCNA from *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69, 387-92.
- WARD, J. M., REZNIK, G., STINSON, S. F., LATTUADA, C. P., LONGFELLOW, D. G. & CAMERON, T. P. 1980. Histogenesis and morphology of naturally occurring prostatic carcinoma in the ACI/segHapBR rat. *Lab Invest*, 43, 517-22.
- 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.
- WILSON, J. D. 2011. The critical role of androgens in prostate development. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 40, 577-90, ix.
- WINTER, J. A. & BUNTING, K. A. 2012. Rings in the extreme: PCNA interactions and adaptations in the archaea. *Archaea*, 2012, 951010.
- WRIGHT, A. S., DOUGLAS, R. C., THOMAS, L. N., LAZIER, C. B. & RITTMASER, R. S. 1999. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, 140, 4509-15.
- 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.
- WYMAN, C. & BOTCHAN, M. 1995. DNA replication. A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr Biol*, 5, 334-7.
- YANG, X. Y., XIA, T. L., HE, Q., LI, W., WANG, J. H., SU, J. W., LI, J. & NA, Y. Q. 2007. [Incidence and pathological features of incidental prostate cancer and clinical significance thereof]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87, 2632-4.
- ZHOU, Y. M., ZHANG, X. F., CAO, L., LI, B., SUI, C. J., LI, Y. M. & YIN, Z. F. 2012. MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 32, 1505-9.