

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I.B.

**Helene Peters**

**EXPRESSÃO DO RECK, UM INIBIDOR DE METALOPROTEINASES DE  
MATRIZ, NO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL E NA REGRESSÃO  
PROSTÁTICA PÓS-CASTRAÇÃO**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

HELENE PETERS

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Biologia Celular.

**Orientador: Prof.Dr. Hernandes Faustino de Carvalho**

**Campinas - 2005**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
DESENVOLVIMENTO  
COLEÇÃO  
UNICAMP**

UNIDADE BC  
 CHAMADA UNICAMP  
P442e  
 V EX  
 TOMBO BCI 66902  
 PROC. 16-123-06  
 C ☐ D ☒  
 PREÇO 11,00  
 DATA 09/02/06

2

Bibid 374899

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**P442e**

Peters, Helene

Expressão do Reck, um inibidor de metaloproteínas de matriz, no desenvolvimento pós-natal e na regressão prostática pós-castração / Helene Peters. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.  
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Reck. 3. Metaloproteínase. I. Carvalho, Hernandes Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Expression of Reck, an inhibitor of matrix metalloproteinases, in the prostatic postnatal development and involution after castration

**Palavras-chave em inglês:** Prostate, Reck, Metalloproteinase.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Hernandes Faustino de Carvalho, Sérgio Luis Felisbino, Carmen Veríssima Ferreira.

**Data da defesa:** 25/08/2005.

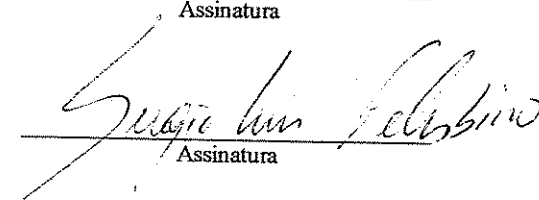
Campinas, 25 de agosto de 2005

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)

  
Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Luís Felisbino

  
Assinatura

Profa.Dra. Carmen Veríssima Ferreira

  
Assinatura

Prof.Dr. Sebastião Roberto Taboga

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa.Dra. Christine Hackel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

200604040

...“que em nome de Jesus Cristo, o nazareno, aquele a quem nós crucificamos e a quem Deus ressuscitou dentre os mortos... E em nenhum outro há salvação; porque debaixo do céu nenhum outro nome há, dado entre os homens, em que devamos ser salvos.” (At 4:10-12)  
“Porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”  
(Rm 11:36)

*E por isso Deus, entrego minha tese diante do teu altar. E toda honra, toda a glória e todo o louvor seja dado SOMENTE a Ti e ao Teu Glorioso,  
Bendito e Santificado Nome!*

## Agradecimentos

*Deus, meu Pai celestial Não tenho nem palavras para te agradecer por tamanha misericórdia com minha vida e que se renova a cada novo dia. Obrigada porque nunca me faltou nada e mesmo antes de pedir, o Senhor já conhecia as necessidades de meu coração. Obrigada por cada pessoa que o Senhor colocou em minha vida, porque sei que cada uma (mesmo sem eu entender) serviu para engrandecer e glorificar Seu Santo Nome em minha vida. Obrigada por nunca ter me abandonado e nem desistido de mim. É tão bom sentir e saber que Seu infinito amor me envolve e me protege em todos os caminhos que percorro. Tomara que um dia todas as pessoas aqui presentes possam também sentir e saber o que é esse Seu Amor incondicional que tantas vezes já me constrangeu a ponto de me deixar sem palavras. Eu te amo mais do que minha própria vida. Obrigada Paizinho!*

*Jesus Cristo, meu Senhor, Salvador e Noivo Lindo. Eu sei que aqui nessa Terra, nunca terei consciência do que foi ter meus pecados pregados naquela cruz e do que significa em sua plenitude o Seu Sangue derramado naquele dia pela minha vida. Por favor, nunca permita que meu coração deixe de ser grato por esse terrível e tremendo sacrifício. Ensina-me a cada dia te amar mais e mais, levando-me pra mais perto de Ti, onde posso contemplar Sua Majestade e Formosura e ser transformada pela Sua Santidade. Obrigada por estar sempre intercedendo por mim junto ao Pai, sendo também meu Advogado de defesa quando o acusador tenta me oprimir. Obrigada por ter me dado toda a autoridade nos céus e na Terra através do seu Santo Nome "Jesus". Obrigada Jesus!*

*É claro que não poderia me esquecer de você, meu companheiro, consolador e querido amigo Espírito Santo de Deus. Obrigada por fazer de minha vida e ter feito dela sua morada. Por me adotar e testemunhar com meu espírito que sou filha de Deus, capacitando-me a clamar: "Aba, Pai". Obrigada por toda a unção que tem derramado em minha vida nesses últimos anos e por nunca ter me abandonado. Por interceder tantas vezes pela minha vida com gemidos tão inexprimíveis, mas que*

*expressam exatamente o desejo e a necessidade de meu coração. Por me dar e me encher com uma paz que excede todo o entendimento humano. Serei eternamente grata pela sua paciência comigo, por todas as vezes que enxugou minhas lágrimas, que ergueu minha cabeça e me deu novo ânimo e força para continuar. Obrigada por falar comigo sempre de uma forma tão doce, mesmo quando estou me desviando de seus propósitos. Espírito Santo, você simplesmente é lindo e eu te amo. Obrigada por tudo!*

*Quero agradecer também todas as pessoas que estiveram comigo durante esses anos e em todos os outros de minha vida.*

*Começando com meus pais, por todo apoio, cuidado, carinho, amor, dedicação e por nunca terem desistido de minha vida. Obrigada também por todo apoio espiritual que vocês têm dedicado a mim. Com certeza isso faz e já fez grande diferença em tudo o que conquistei até aqui. Amo muito vocês!*

*À minha irmã HAAAAADEZINHA. Você é a irmã mais linda, querida e que eu mais amo, não poderia ter nenhuma outra irmã como você. Ich liebe dich soooooo schrecklich groß e nesses anos que estive fora de casa, senti muito por não poder estar ao seu lado e nem ter você ao meu lado. Ich habe so ein million de dólares saudades fühlte. ;o)*

*A todas as outras pessoas lá de Curitiba que também estiveram comigo em oração e torcendo por mim, como minhas avós, a Igreja Menonita Agape, toda minha família, a tia Juraci, minha avós que vieram para prestigiar minha defesa...*

*A você Hernandes, também tenho um agradecimento todo especial por todos esses anos que estive comigo. Obrigada por ter me aceitado já no meu primeiro ano e acreditado em minha capacidade. Ter me orientado, não só em questões acadêmicas, mas também em questões de minha vida e por ter feito parte de toda minha formação aqui na Unicamp. Obrigada também por ter tido grandes sonhos para minha vida e me perdoo porque sei que em muitos deles não superei suas expectativas. Sempre terei boas*

lembranças do período que passei em seu laboratório e com certeza sentirei muitas saudades. Obrigada por tudo!

Do meu grande amor, Augusto. São apenas um ano e onze meses que estamos juntos e nunca pensei que poderia amar e confiar em alguém assim como você. Agradeço a Deus por cumprir Suas promessas para minha vida e realmente ter escolhido um filho tão especial (como Ele havia me dito há quase cinco anos) para ser meu esposo. "...e quando a encontramos, vimos que valeu a pena toda espera...". Obrigada por todo o seu amor, carinho, respeito, confiança, companhia, não só pela minha vida, mas também pelo nosso relacionamento. É muito bom ter você ao meu lado e melhor ainda é saber que ainda temos uma vida inteira para ficarmos juntos. Você é lindo e não esquece que eu te amo!

A todas as pessoas que estiveram comigo no laboratório, seja ensinando, compartilhando alegrias, tristezas, decepções com experimentos que não deram certo, brincadeiras e outras questões da vida, afinal de contas, em que outro laboratório poderia aprender a técnica do *Imunocitokeratoblóting Reverso*? Sei que com alguns de vocês sempre terei uma grande amizade. Com certeza vou sentir muita falta de vocês. Obrigada Sérgio, Dani, Pety, Silvia, Jussara, Celó, Manuel, Eliane, Renata, Iscaife, Guilherme, Mariana, Taíze, Alexandre, Danizinha, Davi, Justulin, Esdras, Marcio, Fabiana, Rafael, Henrique, Adriana, Adrianinha... por tudo! (espero não ter esquecido de ninguém).

Obrigada a todos os laboratórios e técnicos que cederam seu tempo, ajuda, espaço, equipamentos e material para a realização de alguns experimentos.

Liliani, muito obrigada por ter me ajudado, com tanta eficiência, com toda a burocracia. Também não posso deixar de agradecer pela amizade e preocupação que você demonstrou pela minha vida durante esses anos.

Também quero deixar um agradecimento a todas as pessoas que estiveram comigo durante esses anos que estive aqui em Campinas, ajudando com descontração e alegrias em momentos de tanto estresse.

*Obrigada pela turma 98 noturno, por amizades que nunca esquecerei. Luli, Fer, Carol, Fá, Ju... vocês são muito especiais pra mim. Não posso esquecer de todas as outras pessoas que estiveram torcendo por mim, fazendo companhia ou muitas vezes me apoiando em oração, como a Igreja Menonita aqui de Campinas, a INSEJEC, ao Chico e a todas as pessoas que conheci da natação aqui da Unicamp (acharam que eu iria esquecer da USS, né?).*

*Aos professores que se dispuseram na leitura e nas correções necessárias para que essa tese fosse aperfeiçoada. Com certeza suas colocações e discussões tiveram bastante importância na complementação da mesma, não só nesses momentos finais, mas também em conversas informais que tivemos ao longo desses anos durante almoços, aulas, congressos... Obrigada professor Sebastião, professor Sérgio e professora Carmen.*

*Bem, espero não ter esquecido de ninguém!*

*Muito Obrigada!!*



## SUMÁRIO

<b><u>1.A. RESUMO</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>1.B. ABSTRACT</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>2. INTRODUÇÃO</u></b>	<b><u>12</u></b>
2.1. INTERAÇÕES ENTRE EPITÉLIO E ESTROMA	12
2.2. MODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR	12
2.3. A PRÓSTATA	13
A. A MATRIZ EXTRACELULAR DA PRÓSTATA	17
B. DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO	17
C. A DEPENDÊNCIA HORMONAL DA PRÓSTATA NA FASE ADULTA	20
2.4. AS METALOPROTEINASES DE MATRIZ	23
2.5. RECK	26
<b><u>3. OBJETIVOS</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b><u>4. ARTIGOS</u></b>	<b><u>30</u></b>
RECK EXPRESSION IS NEGATIVELY CORRELATED WITH MMP-9 BUT NOT WITH MMP-2 ACTIVATION DURING POST NATAL DEVELOPMENT OF THE RAT VENTRAL PROSTATE	31
DISTINCT EXPRESSION OF <i>RECK</i> IN THE RAT VENTRAL PROSTATE	49
<b><u>5. CONCLUSÕES GERAIS</u></b>	<b><u>59</u></b>
<b><u>6. REFERÊNCIAS</u></b>	<b><u>60</u></b>

## 1.a. RESUMO

A próstata tem merecido crescente atenção devido à maior incidência de câncer prostático e outras afecções do órgão, que resultam do aumento na longevidade dos indivíduos do sexo masculino em todo o mundo. Além disto, o desenvolvimento e crescimento prostático normal apresenta regulação androgênica e está sujeito a uma série de disruptores endócrinos que afetam o seu crescimento e função, assim como predis põem ao desenvolvimento tumoral. Nosso interesse reside principalmente na remodelação prostática seguida à castração e nas interações epitélio estroma que ocorrem neste órgão. Neste trabalho, investigamos a expressão do inibidor de metaloproteinases (MMPs) *RECK*, em nível de RNAm, procurando correlacioná-lo com o desenvolvimento pós-natal e com a regressão prostática seguida à castração. Para isto, foram utilizadas técnicas de RT-PCR semiquantitativo, Real time RT-PCR e de hibridação *in situ*, pareados sempre que possível com a expressão do RNAm e com a atividade de algumas MMPs. Os resultados demonstram que o gene *RECK* é expresso na próstata ventral de ratos, que existe uma significativa redução na sua expressão ao longo do desenvolvimento pós-natal, que há mecanismos diferenciados controlando a expressão dos pares *RECK/MMP-2* e *MMP-7/MMP-14*. Foi observado também um crescente acúmulo da forma ativa da MMP-9, conforme o animal se aproxima da idade adulta. Utilizando RT-PCR semiquantitativo, pudemos determinar que o conteúdo relativo do RNAm para o *RECK* após a castração não muda, embora haja uma inversão no balanço entre a expressão epitelial (células epiteliais) e estromal (células musculares lisas e fibroblastos), nesta situação. No conjunto, os resultados sugerem que o *RECK* é expresso por diferentes tipos celulares da próstata ventral de ratos, com mecanismos de regulação complexos provavelmente oriundos da existência de diferentes compartimentos no órgão, ao contrário do que se observa para células isoladas.

### 1.b. ABSTRACT

The prostate has deserved increasingly attention due to the growing incidence of prostatic cancer and other prostatic diseases, which can be related to the longevity increase of men around the world. Besides, the normal prostatic development is under androgen regulation and as so is subject to a series of endocrine disruptors which affect its growth and function and predisposes to prostate cancer. Our interest resides on the prostatic remodelling following castration and on the epithelial-stromal relationships known to occur in the organ. In this work, we have investigated the expression of the matrix metalloproteinase inhibitor RECK, at the mRNA level, trying to correlate its expression with the post natal prostatic development and regression after castration, using semiquantitative RT-PCR, Real time RT-PCR and *in situ* hybridization, paralleled with the determination of some MMPs expression and activity. The results demonstrate that *RECK* is expressed in the rat ventral prostate, that there is a significative reduction in its expression during the post natal development, which is paralleled by the expression of some MMPs and that the mechanisms controlling the pairs RECK/MMP-2 and MMP-7/MMP-14 are different. It was also observed an increased proportion of the active form of MMP-9, as the animal approaches adulthood. Using semiquantitative RT-PCR, we could determine that the relative content of RECK mRNA remains unchanged by castration, spite detecting an inversion in the balance between the epithelial (epithelial cells) and stromal (smooth muscle cells and fibroblasts) in this situation. Taken together, the results indicate that RECK is expressed by different cell types of the rat ventral prostate, with regulatory mechanisms appearing more complex, likely resulting from the existence of different compartments in the organ opposing what was seen for isolated cells.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. Interações entre epitélio e estroma

As interações entre o estroma e o epitélio exercem papéis importantes desde o desenvolvimento embrionário, em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação, até na manutenção do estado diferenciado e na função geral dos epitélios já na vida adulta. A ação de células mesenquimais e/ou a participação de vários componentes da matriz extracelular (MEC) na diferenciação e na manutenção do estado diferenciado das células foram demonstradas em vários sistemas, como em células mamárias de camundongos, hepatócitos de ratos e queratinócitos humanos (HALL, 1978; HAY, 1981; TRESLTAD, 1987; HAY, 1993; LIN e BISSEL, 1993). Hoje, sabe-se que a MEC exerce um papel crucial nesses processos e que os seus ciclos regulados de síntese, deposição e degradação de seus componentes são extremamente necessários para mediar esses processos.

### 2.2. Modelamento da matriz extracelular

A MEC é composta por componentes protéicos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas que interagem de uma forma bastante complexa. Além de proporcionar um suporte mecânico para células e tecidos, ela pode também regular uma ampla variedade de processos celulares através da atuação conjunta desses componentes (PUPA et al., 2002).

Essa regulação é possível pela capacidade que a MEC possui de funcionar como um reservatório de fatores solúveis (como fatores de crescimento), seqüestrando e liberando esses fatores para o meio onde essas células estão inseridas (ROBERTS et al. 1988; MASSAGUÉ, 1991). Além disso, a composição multicelular dos tecidos, a forma celular e a organização tecidual também podem influenciar a resposta celular a esses fatores solúveis, pois os diversos tipos celulares possuem receptores específicos para os componentes da MEC, respondendo de formas diferentes conforme a interação entre esses receptores e a MEC (LIN e BISSEL, 1993). Por isso, a modulação da composição e do rearranjo da MEC é essencial para regular o comportamento celular em vários níveis, já que a modificação física do substrato onde as células estão apoiadas pode indicar qual comportamento que a célula deve tomar através da transmissão de sinais bioquímicos e

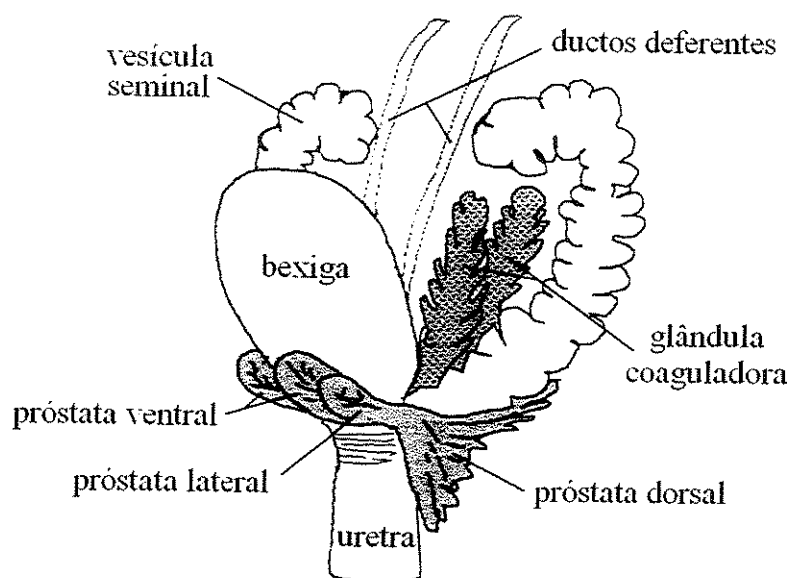
biofísicos que as direcionem para a migração, proliferação, continuarem sobrevivendo ou modificarem seu padrão de expressão gênica. Assim, as perturbações na secreção e renovação da MEC junto com a perda da propriedade de resposta das células a esses sinais extracelulares estão associadas com estados patológicos tais como osteoporose, artrite reumatóide e câncer (RADISKY et al., 2001, WERB, 1997).

Muitas proteinases, que degradam componentes da MEC, são requeridas para processos como o desenvolvimento e manutenção do estado diferenciado e funcional do tecido, ou até mesmo relacionadas com algumas doenças. A habilidade de degradar proteínas extracelulares é essencial para muitos seres unicelulares, promovendo a interação com o meio que os circundam, e para que os organismos multicelulares se desenvolvam e funcionem normalmente. Isso já era sabido bem antes de ser demonstrada a capacidade que enzimas produzidas por fragmentos de cauda de girino durante a involução têm de degradar gel de colágeno (GROSS e LAPIERE, 1962). Desde então, uma família de enzimas tem sido identificada em várias espécies (desde hidra até humanos) e denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs).

### 2.3. A Próstata

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino e está presente em todos os mamíferos (PRICE, 1963). Ela é responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático, excretado juntamente com os demais componentes do sêmen durante a ejaculação. Esse líquido contribui no aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides, assim como na neutralização da acidez da vagina, assumindo um papel importante no processo da fertilização (GUYTON, 1984). A próstata é constituída por estruturas glandulares e não glandulares que se encontram reunidas sob uma mesma cápsula (McNEAL, 1992). As estruturas glandulares (túbulo-alveolares ramificadas) estão imersas em um estroma denso altamente irrigado e entremeado por fibras musculares lisas (HAM e CORMACK, 1991).

A próstata tem sido foco de muitos estudos por poder originar diversas doenças no homem, dentre elas destacando-se o câncer da próstata, a hiperplasia prostática e as prostatites. No homem, a próstata é do tamanho de uma castanha e envolve a uretra na base da bexiga (HAM e CORMACK, 1991).



### Camundongo Adulto (vista lateral)

*Figura 1: Ilustração esquemática da anatomia da próstata de camundongo (CUNHA et al., 1987).*

Semelhante à próstata de camundongos (Figura 1), a próstata de rato é formada por três pares de lobos: ventral, dorsal e lateral (HAYASHI et al., 1991). A próstata anterior hoje é denominada glândula coaguladora. A próstata ventral é dividida em dois lobos, que são compostos por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares no qual as células epiteliais encontram-se envolvidas por um estroma (AUMULLER, 1979). Cada lobo origina-se a partir da uretra como um sistema de oito conjuntos de ductos que se ramificam distalmente. Esses ductos podem ser arbitrariamente divididos, conforme a distância relativa das suas regiões com relação à uretra, em três segmentos: proximal, intermediário e distal (LEE et al., 1990, NEMETH E LEE, 1996).

A região distal é composta por células colunares altas, capazes de produzir os componentes da secreção prostática e com atividade proliferativa. As células musculares lisas (CML) apresentam-se como uma camada esparsa e descontínua associadas a um grande número de fibroblastos. Essa distribuição das células estromais pode estar associada ao crescimento da população de células epiteliais (LEE et al., 1990, NEMETH e LEE, 1996, PRINS et al., 1991).

As células epiteliais na região intermediária possuem características morfológicas e funcionais semelhantes à porção distal. Essas células têm função secretora, entretanto são menos

proliferativas. Já as CMLs formam uma camada fina e contínua. Em ambas essas regiões, foram observadas poucas células em apoptose (LEE et al., 1990, NEMETH e LEE, 1996).

Já a região proximal apresenta células epiteliais cúbicas e baixas com alto índice de apoptose. Nessa região, as CMLs estão dispostas em uma camada espessa. Tanto nessa região como na intermediária, o tecido fibroso localiza-se nos espaços entre os ductos e ocasionalmente entre as camadas de células musculares lisas. O arranjo dessas células estromais nesta região proximal pode estar associado com a apoptose das células epiteliais e a camada mais espessa de CML pode estar ativamente ajudando na ejeção da secreção prostática durante a ejaculação (ICHIHARA et al., 1978, LEE et al., 1990, NEMETH e LEE, 1996).

As células que compõem as estruturas túbulo-alveolares, representadas na figura 2, ainda podem ser classificadas em quatro tipos celulares diferentes:

- *células epiteliais luminais*: são células diferenciadas, cilíndricas e altas, com capacidade secretora (ICHIHARA et al., 1978; HUDSON et al., 2001).

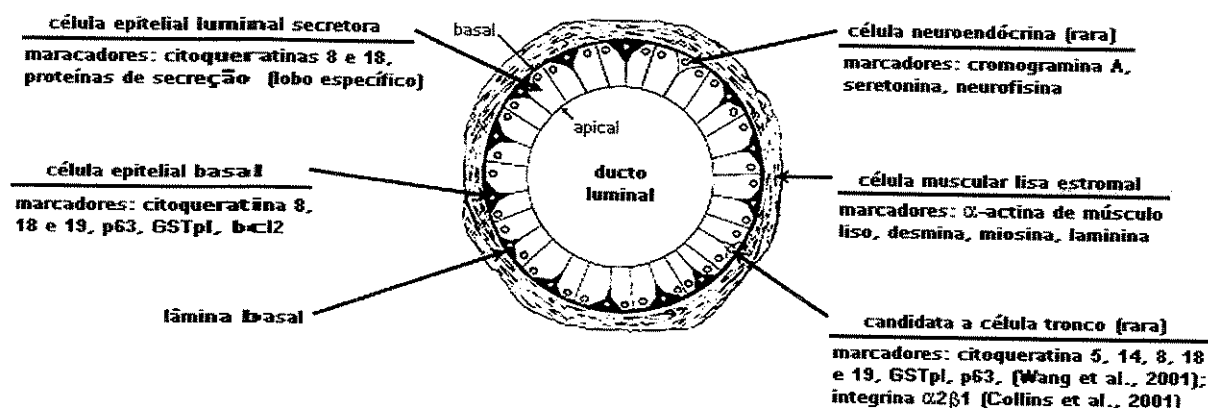
- *células epiteliais basais*: são células menores, achatadas (ou arredondadas), sendo células de reposição (células tronco), que podem dar origem tanto a células epiteliais luminais quanto a células neuroendócrinas (ICHIHARA et al., 1978; HUDSON et al., 2001; FLÓREZ e CARVALHO, 2005).

- *células neuroendócrinas*: podem ser diferenciadas pela reação histoquímica de impregnação pela prata. São células raras e encontram-se dentro da camada epitelial da glândula prostática, podendo ter uma atuação local tanto no crescimento e na diferenciação prostática, como nos processos secretores exócrinos. Essas células ainda podem estar relacionadas com processos patológicos como câncer e hiperplasia benigna prostática (ANGELSEN et al., 1997). Na próstata ventral de ratos, esse tipo celular possui uma expressão diferenciada de marcadores quando comparadas a humanos e provavelmente pode regular a contratibilidade dos ductos periuretais (RODRIGUEZ et al., 2003).

- *células tronco epiteliais*: acredita-se que essas células são as principais responsáveis pela reposição celular epitelial basal na glândula prostática em regeneração, estando localizadas preferencialmente na região proximal (TSUJIMURA et al., 2002; FLÓREZ e CARVALHO, 2005).

Existem algumas células epiteliais que apresentam características intermediárias entre células epiteliais basais e luminais, denominadas células intermediárias em trânsito. Essas células que antecedem a diferenciação terminal em células luminais secretoras, ainda apresentam capacidade proliferativa e simultaneamente alguns marcadores tanto para células basais como para

células luminais (FLÓREZ e CARVALHO, 2005). A importância de se entender melhor essa dinâmica de transição, é que em algumas lesões inflamatórias prostáticas, essas células intermediárias são as mais afetadas (VAN LEENDERS et al., 2003).



**Figura 2.** Diagrama de um corte transversal de um ducto prostático, destacando os principais tipos celulares, incluindo as células epiteliais luminais e basais, células neuroendócrinas, células musculares lisas estromais e candidatas a células tronco. Abaixo da indicação de cada tipo celular está descrito uma lista de marcadores utilizados para diferenciar esses tipos celulares. No caso das candidatas a células tronco, dois estudos têm associado a expressão de alguns marcadores incluindo as citoqueratinas 5, 14, 8, 18 e 19, GSTpi e p63 (WANG et al., 2001) ou uma alta expressão da integrina  $\alpha 2 \beta 1$  (COLLINS et al., 2001). Ainda não está totalmente claro se esses tipos celulares nos dois estudos são idênticos. Esquema proposto por MARKER e colaboradores (2003).

Além dos fibroblastos e CMLs, os mastócitos, as células endoteliais e os pericitos são outras células que juntamente com as terminações nervosas e os gânglios sensitivos compõem o estroma prostático. Cada uma dessas células e estruturas age de uma forma específica e em conjunto na manutenção da função secretora da próstata. Como já mencionado, até mesmo as diferenças fenotípicas das células epiteliais encontradas ao longo dos dutos prostáticos parecem estar relacionadas com a distribuição diferenciada do tecido fibroso e muscular liso (PRINS, 1991; LEE, 1990; SENSIBAR et al., 1991; NEMETH e LEE, 1996).



#### a. A Matriz Extracelular da Próstata

A MEC na próstata é composta de colágeno, elastina, proteoglicanos, fibronectina, laminina e outras proteínas não colagênicas (LABAT-ROBERT et al., 1990). As microfibrilas de colágeno tipo VI e fibras do sistema elástico parecem estar envolvidas no controle de alguns aspectos do comportamento celular e em desempenhar um papel estrutural para a manutenção da integridade do órgão, apresentando modificações durante a involução prostática (CARVALHO e LINE, 1996; CARVALHO et al., 1997a; 1997b). A MEC também é composta por fibras de colágeno tipo I e tipo III. Esses componentes sofrem um extenso rearranjo na próstata em regressão caracterizado por um aspecto pregueado das fibras ao redor dos ductos. Esse rearranjo pode estar intimamente associado às funções assumidas pelas células mesenquimais lisas após a castração (VILAMAIOR, 1998).

A membrana basal, que está localizada entre as células epiteliais e o estroma, é composta principalmente por proteoglicanos, laminina e colágeno tipo IV. Essa estrutura é essencial no controle das atividades celulares e na manutenção do fenótipo diferenciado e secretor das células epiteliais glandulares (HAYWARD et al., 1998; LABAT-ROBERT et al., 1990). ILIO e colaboradores (2000) observaram através de técnicas de imunocitoquímica que a laminina está localizada ao longo do sistema de dutos prostáticos enquanto o colágeno tipo IV é eventualmente encontrado na membrana basal na região distal e intermediária, porém está quase ausente na região proximal e não é detectado após a castração. Acredita-se, entretanto, que esses resultados diferenciados do colágeno tipo IV são devidos a uma organização diferenciada da estrutura desse colágeno na membrana basal ao longo dos ductos prostáticos e não a uma diminuição ou ausência do mesmo nas diferentes regiões após a castração. Na próstata humana normal e com diferentes graus de diferenciação tumoral foram encontrados os principais componentes da membrana basal, com exceção do colágeno tipo VII, que está ausente nos ductos neoplásicos (KNOX et al., 1994).

#### b. Desenvolvimento Prostático

O crescimento e a diferenciação celular da glândula prostática são altamente dependentes de fatores de sinalização extracelular. Durante o processo de desenvolvimento da próstata, o epitélio e o mesênquima interagem, sob o controle de andrógenos testiculares, para formar um órgão excretor organizado. As células, em resposta aos andrógenos, invaginam a partir da uretra (na base da bexiga) para dentro do mesênquima do sino urogenital (TIMMS, 1994). Esse tecido induz as formações dos ductos e suas ramificações, a proliferação epitelial, a expressão de receptores de

andrógenos e a secreção de proteínas específicas da próstata (CUNHA et al., 1987; CUNHA et al., 1992; HAYWARD et al., 1997). Na idade adulta, a manutenção da fisiologia da próstata continua dependente de andrógenos e das interações epitélio-estroma.

O desenvolvimento da próstata é determinado pela exposição de andrógenos (produzidos pelos testículos fetais) e não pelo sexo genético, pois tanto os seios urogenitais de machos quanto de fêmeas podem formar um tecido prostático funcional, se no período adequado forem estimulados por andrógenos (TAKEDA et al., 1986).

No início da morfogênese, a ação de andrógenos parece ser indireta através do mesênquima, já que parte significativa do crescimento epitelial e da ramificação dos ductos, que é dependente do estímulo androgênico, ocorre na fase em que as células epiteliais não apresentam receptores de andrógenos funcionais (DONJACOUR e CUNHA, 1988).

Sabe-se que fibroblastos têm ação no estímulo ao tecido mesenquimal que ocorre por intermédio de sinais químicos liberados pelas células mesenquimais (estímulo parácrino) (KABALIN et al. 1989). Uma densa rede de inter-relações de diferentes fatores de crescimento tem sido proposta, já que foi demonstrada a ação desses diferentes fatores produzidos por células estromais prostáticas que, isolados ou em combinações, são capazes de estimular o epitélio de forma autócrina e parácrina (STORY et al. 1989; DAVIES e EATON, 1991; SUTKOWSKI et al. 1992; KASSEN et al. 1996). A interação parácrina entre as células estromais e epiteliais é essencial para regulação androgênica, morfogênese, proliferação e a secreção diferenciada das células epiteliais (KIM et al., 1999).

Tanto as células epiteliais quanto as CMLs prostáticas dependem umas das outras para se desenvolverem, sendo que o epitélio em desenvolvimento pode direcionar os padrões de diferenciação do músculo liso encontrado nas diferentes regiões prostáticas (HAYWARD et al., 1997; HAYWARD e CUNHA, 2000).

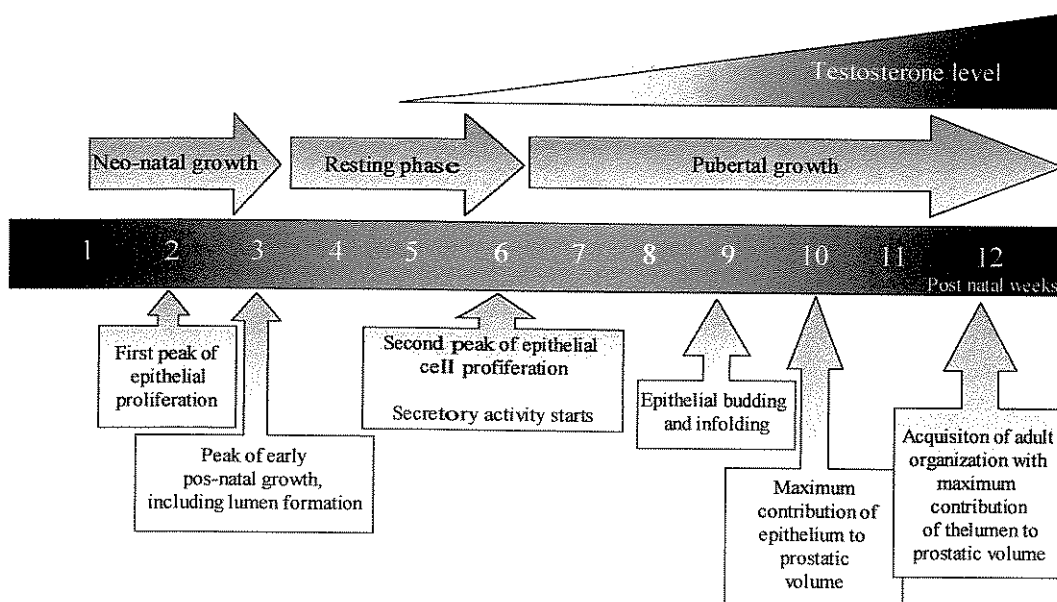
A insulina e outros hormônios somatotróficos como a prolactina e o hormônio de crescimento também modulam diretamente o desenvolvimento e o funcionamento prostático (WEBBER, 1981), tornando bastante complexo o mecanismo da regulação da fisiologia prostática.

O suprimento vascular e a angiogênese na glândula prostática também exerce um papel importante na organogênese e na manutenção funcional da glândula (RISAU e FLAMME, 1995). A alta densidade vascular e angiogênese estão associadas com o crescimento excessivo da glândula prostática (BOSTWICK et al., 1996), metástase (WAKUI et al., 1992; O'BRIEN e HARRIS, 1995), desenvolvimento de doenças (BRAWER et al., 1994; McNEAL et al., 1996) e com a sobrevivência de tumores (FRANCK-LISSBRANT et al., 1997).

O desenvolvimento da próstata ventral no período pós-natal continua sendo dependente de andrógenos, já que em ratos castrados logo após o nascimento, o crescimento e desenvolvimento da glândula são inibidos durante a puberdade, sendo que a administração de testosterona exógena pode reverter essa situação (CUNHA et al., 1987; CORBIER et al., 1995).

Foi observado que existe uma clara correlação entre os níveis de testosterona sérica e os eventos relacionados com o desenvolvimento pós-natal (VILAMAIOR, 2003). O início do crescimento prostático aparece na puberdade (exposição a níveis mais altos de andrógenos), onde existe um maior aumento no peso seco da próstata e no número de ramificações dos ductos (SUGIMURA et al. 1986a). Isso sugere que a próstata é mais sensível a baixos níveis de testosterona quando está se desenvolvendo (surgimento das ramificações dos ductos). Já quando é exposta a maior concentração de andrógenos (período da puberdade), a próstata responde de uma maneira diferente da anterior incrementando seu peso seco (HAYWARD e CUNHA, 2000).

VILAMAIOR (2003) observou e propôs um esquema representando os diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos, da primeira até a décima segunda semana de vida (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema do desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos da 1ª à 12ª semana do desenvolvimento, destacando os principais eventos de cada fase do desenvolvimento (VILAMAIOR., 2003).

Na segunda e sexta semanas de vida, foram encontrados os dois principais picos de proliferação celular. O primeiro pico parece estar associado com a formação da luz, (que ocorre durante as três primeiras semanas) e o segundo com o aumento da atividade secretora (evento marcante nas sexta e décima segunda semanas de desenvolvimento pós-natal). Entre a primeira e segunda semana existe uma clara alteração do epitélio e do estroma para a formação do lúmen. Na terceira semana já pode se observar uma alteração nas células epiteliais, em que a região de Golgi se torna mais visível e existe um acúmulo de secreção no lúmen. Entre a quarta e sexta semana, não foram observados eventos marcantes, considerando-se esse segundo período como uma fase de repouso. O primeiro aumento dos níveis de testosterona sérica foi observado na sexta semana (puberdade), que atingiu os níveis mais altos (adulto) a partir da nona semana.

Outra importante observação foi a formação de brotamentos de células epiteliais envolvidas por estruturas em forma de cesta formadas por fibras de reticulina. Esses brotamentos refletem os eventos de crescimento epitelial e ocupação do estroma (mais notável a partir da sétima semana), diminuindo o volume do estroma enquanto aumenta-se o volume epitelial. Nesse processo de ocupação do estroma pelo brotamento epitelial, parece não haver uma degradação desses componentes reticulares, mas apenas foi observado alguns sinais de degradação de colágeno em locais adjacentes aos pontos de brotamento epitelial. Essas alterações na MEC provavelmente são resultados da atividade das células estromais em resposta à interação epitélio-stroma, com um possível envolvimento das MMPs, já observado em glândulas mamárias (WISEMAN e WERB, 2002) e na morfogênese inicial da próstata (MARKER et al., 2002).

O primeiro pico de proliferação das células epiteliais foi encontrado na segunda semana de vida, já na terceira semana ocorre um crescimento da glândula. O segundo pico de proliferação de células epiteliais e atividade de secreção foram encontrados na sexta semana de desenvolvimento. Na décima segunda semana, já entrando na fase adulta onde os níveis de testosterona já atingiram seus níveis máximos, existe a aquisição da forma adulta da próstata, com um aumento do lúmen e acúmulo de secreção (VILAMAIOR, 2003).

#### c. A dependência hormonal da próstata na fase adulta

Na próstata ventral de ratos adultos, acredita-se que os andrógenos atuem nas células musculares lisas para manter a diferenciação epitelial e que as células epiteliais atuem na manutenção do estado diferenciado das células musculares lisas, sendo que a manutenção da

integridade da próstata adulta está ligada a uma interação recíproca entre o epitélio e o tecido conjuntivo (HAYWARD et al., 1997).

Muitos trabalhos têm mostrado os efeitos da castração na próstata, caracterizado principalmente por uma significativa diminuição do tamanho e peso da glândula. Este quadro origina-se da parada na síntese dos produtos de secreção e aumento na velocidade de eliminação dos produtos glandulares, da perda de células epiteliais por apoptose e de mecanismos de autofagocitose, resultando em lóbulos menores formados por um epitélio cúbico baixo (BRANDES, 1966; KERR e SEARLE, 1973; BRÄNDSTRÖM et al. 1994; HU et al. 1998). Nesse caso, a apoptose das células epiteliais pode estar associada com a expressão de vários componentes como o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (FREEMAN et al., 1990) e a catepsina D, sendo que essa última provavelmente exerce um papel importante na fagocitose dos corpos apoptóticos e na formação dos mesmos (SENSIBAR et al., 1990; WILSON et al., 1991).

O efeito da castração sobre a próstata também inclui uma diminuição de vacúolos secretores (HEYNS, 1990), um aumento dos níveis de enzimas degradativas como ribonucleases (ENGEL et al., 1980), alterações no sistema elástico (CARVALHO et al., 1997b), no colágeno VI e outros componentes fibrilares (CARVALHO et al., 1997a) e na membrana basal (CARVALHO e LINE, 1996).

Durante a regressão prostática, existe um aparente aumento na área seccional ocupada por matriz extracelular e células estromais (KERR e SEARLE, 1973). Dentre estas últimas, as mais proeminentes são as células musculares lisas ao redor das estruturas epiteliais (lóbulos e ductos), que assumem um fenótipo mais sintético, com uma fração miofibrilar reduzida (ZHAO et al., 1992; VILAMAIOR et al., 2000; ANTONIOLI et al., 2004).

Embora um aumento na quantidade de colágeno tenha sido sugerido pela quantificação de hidroxiprolina (KERR e SEARLE, 1973), e que estas alterações possam ocorrer sem a síntese de colágeno, a síntese de outros componentes e a reorganização do estroma prostático devem ser destacadas como funções das células do estroma. Da mesma forma, a reativação da glândula pela aplicação de testosterona deve envolver remoção e/ou síntese *de novo* de componentes da matriz extracelular.

A diminuição do tamanho e do peso da próstata devido à privação de testosterona é antecedida pela diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido prostático (LEKAS et al., 1997). As células endoteliais e algumas estromais entram em apoptose 12 h após a orquiectomia, enquanto que as células epiteliais iniciam a apoptose somente depois de 24h (SHABSIGH et al., 1998). Esse adiantado início da apoptose em células endoteliais corresponde a algumas mudanças degenerativas

no sistema vascular da glândula, como um extravasamento não trombogênico das proteínas do plasma para as regiões periglandulares do tecido (SHABSIGH et al., 1999) e uma drástica vasoconstrição dos vasos revestidos por uma camada de células musculares lisas (HAYEK et al., 1999).

Como esse processo degenerativo do sistema vascular da glândula prostática precede ao início de apoptose em células epiteliais, é provável que a diminuição do fluxo sanguíneo da glândula seja uma das bases da subsequente perda das células epiteliais e do processo regressivo da glândula prostática induzido pela castração (BUTTYAN et al., 1999; SHABSIGH et al., 1998; SHABSIGH et al., 1999).

Com relação às diferentes regiões da próstata ventral de ratos, quatro dias após a castração existe um aumento das células epiteliais da região distal marcadas positivamente para catepsina D, já na região proximal existe uma diminuição no número dessas células, demonstrando uma inversão na distribuição das células epiteliais em apoptose de animais adultos não castrados. Já sete dias após a castração, as células epiteliais da região proximal, embora atrofiadas, são destituídas de marcação para catepsina D (LEE et al., 1990).

Outros estudos observaram o comportamento da próstata em animais que tiveram uma privação e uma posterior reposição de testosterona. Nesses modelos, as células endoteliais proliferam, o volume vascular e o fluxo sanguíneo normalizam alguns dias antes da recuperação da próstata quando os animais castrados são submetidos a reposição hormonal (HÄGGSTRÖM et al., 1999). A função contrátil normal da próstata também parece ser recuperada em modelos experimentais semelhantes (HIB e MAGARINOS, 1989). Na próstata ventral de camundongo, a reposição androgênica após sete dias de castração, faz com que a glândula retorne ao seu tamanho original com uma leve distensão dos ductos (SUGIMURA et al., 1986 b).

Como existe uma grande resposta da próstata a variações hormonais, no caso de tumores em pacientes sem condições de serem submetidos à cirurgia, devido à idade, são tratados com terapia hormonal ou radiação. A terapia hormonal mais comum para o câncer de próstata é a privação androgênica. Isto se deve ao fato de que a maioria dos tumores de próstata origina-se nas células epiteliais glandulares da região periférica da próstata, as quais são dependentes de andrógenos para sobreviver e proliferar (CUNHA et al. 1987).

## 2.4. As metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz pertencem a uma família de enzimas que recebem esse nome pela dependência de íons metálicos (normalmente zinco ou cálcio) para se tornarem ativas e pela sua capacidade de degradar proteínas estruturais da MEC, como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos (STÖCKER et al., 1995; ALEXANDER e WERB, 1991; PARKS e MECHAM, 1998). As MMPs também podem clivar outras moléculas de superfície celular, atuando dessa forma na regulação do comportamento celular (STERNLICHT et al., 2000). Por possuírem uma ampla gama de atuação, as MMPs estão associadas a diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos de desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, cicatrização de feridas, doenças inflamatórias e câncer (NELSON et al., 2000; STERNLICHT et al., 2000; STERNLICHT e WERB, 2001).

No câncer, as células tumorais recrutam vasos sanguíneos para dentro do tumor (angiogênese tumoral) e migram dos seus locais de origem penetrando a lâmina basal e outras estruturas da MEC (invasão e metástase) (HANAHAHAN e FOLKMAN, 1996; STETLER-STEVENSON, 1999). Sabe-se que as MMPs exercem um papel importante em processos fisiológicos normais de vasculogênese e de angiogênese, atuando na degradação da membrana basal, que é substituída por uma matriz provisória de fibrina, a partir da qual as células endoteliais proliferam e invadem o tecido adjacente (FENG et al. 1999).

Uma correlação entre as propriedades de invasão tumoral e o crescimento normal das estruturas epiteliais foi estabelecida para a glândula mamária (WISEMAN e WERB, 2002) e para o pulmão (KHERADMAND et al. 2002), pelo menos no que se refere a um estado proliferativo aumentado do epitélio, à necessidade de degradação da matriz extracelular adjacente e à colonização de espaços anteriormente ocupados pelo estroma.

Até o momento, 25 MMPs já foram descritas (MATRISIAN, 1990; LLANO et al. 1997; GIAMBERNARDI et al. 1998; GRANT, 1999; VELASCO et al. 1999; LLANO et al. 1999; PARK et al. 2000; LOHI et al. 2000; MARCHENKO & STRONGIN, 2001), sendo divididas em 5 grupos principais:

- a. as colagenases intersticiais (MMPs 1, 8 e 13),
- b. as gelatinases (MMPs 2 e 9),
- c. as estromelisinases (MMPs 3, 10 e 11),
- d. as metaloproteinases transmembranas (MT-MMPs) (MMPs 14, 15, 16, 17, 24 e 25) e





A atuação dos TIMPs não se restringem apenas na atividade das MMPs. Já se sabe que o TIMP-3 pode impedir a ligação do VEGF (vascular endothelial growth factor) ao seu receptor-2 (VEGFR-2), diminuindo a proliferação de células endoteliais e a angiogênese (QI et al., 2003). Já o TIMP-2 pode suprimir a angiogênese ao se ligar a integrina  $\alpha_3\beta_1$  aumentando a expressão do gene *RECK* via rap-1, proteína membro da família Ras, que foi primeiramente identificada como uma proteína capaz de suprimir as transformações oncogênicas das células pelo *Ras* (KITAYAMA et al., 1989), que por sua vez impede a migração das células endoteliais por inibir a ação das MMPs (OH et al., 2004).

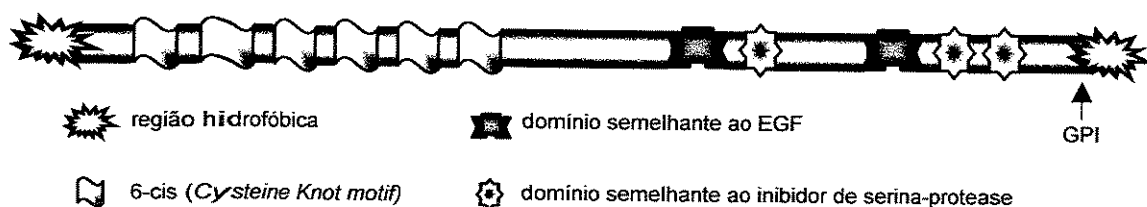
Alguns estudos verificaram que existe uma grande correlação entre a atividade de algumas MMPs (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) e a malignidade de tumores, demonstrando que essas MMPs estão potencialmente envolvidas na carcinogênese (DAVIES et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1996; KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1999; COUSSENS et al., 2000). Já em estudos pré-clínicos, inibidores sintéticos de MMPs tem sido relacionados com a inibição do crescimento tumoral e metástase (HIDALGO e ECKHARDT, 2001).

Existem outras pesquisas que demonstram uma associação entre o aumento da produção de MMPs (MMP-2, -3, -7 e -9, -14) e a progressão maligna do câncer de próstata (HASHIMOTO et al. 1998; UPADHYAY et al. 1999; NAGAKAWA et al. 2000). Também foi observada uma correlação direta entre a intensidade de expressão da MMP-2 e o grau de progressão tumoral segundo a classificação de Gleason (STEARNS e WANG, 1993; STERNS e STERNS, 1996). Nos tumores, as MMPs podem ser produzidas tanto por células estromais (POULSOM et al. 1992; PYKE et al. 1993; WOOD et al. 1997) como por células epiteliais (YOSHIMOTO et al. 1993), havendo sugestão de cooperação entre estes dois tipos celulares (OHTANI, 1998).

Com estas expressivas evidências quanto à participação das MMPs no caráter metastático dos tumores, a inibição da atividade das MMPs, por inibidores naturais ou sintéticos, pode ser um importante caminho para o tratamento do câncer de próstata independente de hormônios (WOESSNER, 1999; KUGLER, 1999; LOKESHWAR, 1999; HIDALGO e ECKHARDT, 2001).

## 2.5. RECK

A proteína RECK foi descrita como um novo inibidor endógeno da atividade das MMPs (Figura 4). O gene *RECK* e seu produto foram identificados a partir de uma biblioteca de expressão gênica dada a sua capacidade de recuperar o fenótipo achatado de células NIH 3T3 transformadas v-Ki-ras (NODA et al., 1989; KITAYAMA et al., 1989; TAKAHASHI et al., 1996) e por ser capaz de inibir a atividade de algumas MMPs. A expressão do *RECK* pode ser negativamente regulada por alguns oncogenes, como *myc*, *ras*, *fos* e *src*, o que garante também a definição do gene *RECK* como um supressor de tumores (SASAHARA et al., 1999; WELM et al., 2002).



**Figura 5.** Estrutura modular da proteína RECK.

O produto do gene *RECK* é uma glicoproteína de 110 kDa que está associada à membrana plasmática através de uma âncora de glicosilfosfatidil-inositol (GPI). A proteína apresenta dois domínios hidrofóbicos, um em cada extremidade da molécula. Aquele no N-terminal corresponde ao peptídeo sinal e aquele no C-terminal corresponde ao sinal de ligação à âncora de GPI. No meio da sequência primária há três domínios semelhantes ao inibidor de serina-proteases, sendo que o primeiro deles é idêntico ao motivo *kazal* (C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>6</sub>-Y-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2,3</sub>-C). Há também duas regiões de fraca homologia com o fator de crescimento epidermal (EGF) (TAKAHASHI et al., 1998). A Figura 5 apresenta um diagrama da estrutura modular da proteína RECK.

Foi demonstrado que a proteína RECK pode inibir a ação da MMP-9 através da supressão da secreção dessa MMP ou pela inibição direta da sua atividade proteolítica (TAKAHASHI et al., 1998). Também é conhecido que a RECK pode inibir diretamente a atividade da MT1-MMP (MMP-14) da MMP-2 (OH et al. 2001).

A obtenção de um camundongo *knockout* para o *RECK* (OH et al. 2001) demonstrou a importância deste gene para o desenvolvimento, uma vez que os embriões morrem no 10,5º dia de desenvolvimento, com defeitos nas fibrilas de colágeno, na membrana basal e com uma série de defeitos no desenvolvimento vascular. Esse fenótipo pode ser parcialmente recuperado em

camundongos duplo mutantes para *RECK* e *MMP-2*, sugerindo que essa MMP é uma das muitas moléculas afetadas pelo *RECK in vivo* e o aumento na atividade da *MMP-2* é grandemente responsável pelo defeito nas fibrilas de colágeno I encontrado nos camundongos *knockout* para o *RECK*. Já a perda da expressão do *MT1-MMP* nesses camundongos falha em recuperar o fenótipo do animal selvagem. Além disto, no mesmo estudo foi também demonstrada uma ação direta sobre a *MMP2* e uma inibição do brotamento de capilares em tumores induzidos por células de fibrosarcoma (OH et al., 2001).

A diferença crítica entre a proteína *RECK* e as *TIMPs* está na localização: *RECK* está localizada na membrana plasmática das células, onde se encontram as *MT-MMPs*, enquanto as *TIMPs* são secretadas. Essa ancoragem com a membrana citoplasmática, permite à *RECK* regular eficazmente eventos proteolíticos locais na superfície celular, intimamente relacionados à invasão celular e onde ocorrem os processamento proteolíticos das *MMPs* (WERB, 1997). Em adição a isso, enquanto a deficiência do gene *RECK* é letal para embriões de camundongos, a deficiência para os genes do *TIMP-1* e *TIMP-2* tem pouco efeito durante o desenvolvimento (NOTHNICK et al., 1997; WANG et al., 2000; CATERINA et al. 2000), sugerindo que pelo menos nesse estágio inicial, a *RECK* compartilha poucos pontos funcionais semelhantes aos *TIMPs*.

Enquanto o gene *RECK* é amplamente expresso em vários órgãos humanos, sua expressão é baixa, ou não detectável em muitas linhagens celulares derivadas de tumor. Quando a expressão do gene *RECK* foi restaurada artificialmente nessas linhagens, a quantidade de pró-MMP-9 extracelular produzida por essas células foi reduzida e seus potenciais invasivos e metastáticos foram anuladas (TAKAHASHI et al., 1998), sugerindo um papel importante da *RECK* na regulação da *MMP-9* e da malignidade tumoral. Existe também uma correlação entre a alta quantidade da expressão do *RECK* em amostras de hepatomas com a maior sobrevivência de pacientes (FURUMOTO et al., 2001).

Recentemente foi demonstrado que existe uma correlação negativa da expressão do gene *RECK* com a progressão do carcinoma prostático relacionado com a classificação de Gleason, assim como os inibidores teciduais de *MMPs*: *TIMP-3* e *TIMP-4*, sendo que esses genes possuem uma expressão predominante em células estromais (RIDDICK et al., 2005).

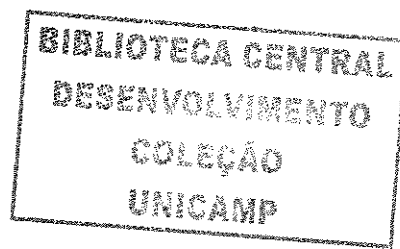
Devido a grande importância do balanço entre a expressão e atividade das *MMPs* e seus inibidores, como a *RECK*, em processos fisiológicos normais e patológicos, torna-se relevante conhecer melhor a expressão e atividade dessas moléculas em vários modelos biológicos experimentais. A próstata é considerada um bom modelo experimental, pois responde rapidamente às modulações hormonais, havendo uma grande remodelação da MEC para acompanhar essas

mudanças, além disso grande atenção tem sido dada ultimamente a essa glândula principalmente por ser um alvo de doenças, como câncer e hiperplasia benigna, associada com a idade do homem. Como essas doenças e o desenvolvimento são influenciados pelo comportamento e modelamento da MEC, esse trabalho torna-se interessante, pois procura caracterizar melhor a associação da atividade das MMPs com a expressão do *RECK*, em processos de crescimento pós-natal e de regressão e reorganização prostática em animais adultos castrados e submetidos a reposição hormonal.

### 3. OBJETIVOS

A remodelação da matriz extracelular requer a participação de uma forma organizada e balanceada entre várias enzimas, como as MMPs, e seus inibidores. Portanto, utilizando como modelo experimental a próstata, o objetivo desse trabalho foi:

- a) caracterizar a expressão do gene *RECK* durante o desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos e na regressão prostática pós-castração;
- b) avaliar a atividade das MMPs nessas condições;
- c) analisar a expressão das *MMPs*;
- d) correlacionar a expressão do gene *RECK* com a expressão e a atividade das MMPs.



#### 4. ARTIGOS

Os experimentos desenvolvidos nesta tese serão apresentados na forma de dois artigos:

**RECK expression is negatively correlated with MMP-9 but not with MMP-2 activation during post natal development of the rat ventral prostate**

Helene Peters, Márcio Lorencini and Hernandes F Carvalho

e

**Distinct expression of *RECK* in the rat ventral prostate**

Helene Peters and Hernandes F Carvalho

**RECK expression is negatively correlated with MMP-9 but not with MMP-2  
activation during post natal development of the rat ventral prostate**

Helene Peters, Márcio Lorencini and Hernandes F Carvalho

Dept. Cell Biology – State University of Campinas (UNICAMP)  
Campinas SP, Brazil

**Running title:** RECK expression during developing prostate

**Corresponding author:** Hernandes F Carvalho

Dept. Cell Biology – UNICAMP

CP6109

13083-863 Campinas SP, Brazil

Tel. 55 19 3788 6118

Fax 55 19 3788 6111

E-mail [hern@unicamp.br](mailto:hern@unicamp.br)

### Abstract

*RECK* expression was examined during the post natal development of the rat ventral prostate of Wistar rats at the mRNA level in comparison with the expression of MMP-2, -7 and -14 (MT1-MMP) mRNAs using quantitative Real time PCR and with the active forms of MMP-2 and -9 using gelatin zymography. RNA and protein extracts were obtained from the ventral prostate of 2, 3, 6 and 12 weeks old rats. The results demonstrate a progressive decrease in the expression of *RECK*, MMP-2, -7 and -14 mRNA during the post natal development. On the other hand, zymography has shown a progressive activation of MMP-9, as opposed to a sustained level of MMP-2 activation. Since *RECK* is known to regulate MMP-2, -9 and -14, it is proposed that *RECK* and MMP-9 occupy the same prostate compartment, while MMP-2 and -14 seems to be located somewhere else, with no inhibition by *RECK*. Furthermore, it seems that initial stages of development requires increased expression of MMPs and their inhibitors, both classes being less necessary as the prostate reaches its adult size and activity.

**Key words:** development, MMP, prostate, Real time PCR, *RECK*



## INTRODUCTION

RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kasal motif) is a 110kDa glycoprotein anchored to the cell membrane through a carboxy-terminal glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-modification (Takahashi et al., 1998). The gene *RECK* was first isolated by an expression cloning strategy designed to isolate genes that induced flat morphology when expressed in *v*-Ki-*ras*-transformed NIH3T3 cells (Noda et al., 1989; Kitayama et al., 1989; Takahashi et al., 1996). *RECK* is widely expressed in normal tissues and its expression is low or undetectable in many tumor derived cell lines. Several oncogenes like *ras* can downregulated *RECK* expression. When *RECK* expression is artificially restored in many tumor derived cell lines, their invasive and metastatic potentials were suppressed, coincident with the reduction of the amount of extracellular pro-matrix metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) produced by these cells (Takahashi et al., 1998). MMP-2 and MMP-14 are also related with tumor invasion and are known to be inhibited or suppressed by RECK (Oh et al., 2001). These MMPs are zinc dependent enzymes belonging to the MMP superfamily of proteinases which process or degrade numerous pericellular substrate including extracellular matrix (ECM) components and participate in several normal and abnormal physiological process such as embryonic development, wound healing, inflammatory diseases and cancer (Nelson et al., 2000; Sternlicht and Werb., 2001). MMP functions on such diverse phenomena take place through influencing the behavior of other proteinases, proteinase inhibitors, clotting factors, chemotactic molecules, latent growth factors, growth factor-binding proteins, cell surface receptors, cell-cell adhesion molecules and several structural ECM proteins.

MMP-2 and MMP-9 are known to degrade mainly type IV collagen (a component of basement membrane) and their activities are associated with tumor metastasis and human cancer progression (Uhm et al., 1996; Callejas et al., 2001).

Because of the large incidence of age related human prostatic illnesses, the prostate gland has received special attention from the researchers mainly with respect to cancer development. Like head and neck, colorectal, urothelial and breast cancer, prostate cancer invasion is widely correlated with high MMP-2 and MMP-9 expression and activity and their expression is related with tumor differentiation. It was demonstrated that patients with hepatocellular carcinoma and colorectal cancer have a better survival when these tumoral tissues exhibit high RECK mRNA expression, because they have a weak capacity for invasion and metastase (Takeushi et al., 2004; Furumoto et al., 2001).

MMP-7, also known as matrilysin, has been shown to degrade mainly fibronectin and other nonmatrix proteins such as casein, insulin and transferrin (Woessner and Taplin, 1988). The overexpression of MMP7 accelerates mammary cancer development in mice carrying a mammary-targeted *Her2/neu* transgene (Rudolph-Owen et al., 1998), whereas its absence in mice carrying the *Apcmin* mutation slows the formation of intestinal adenomas (Wilson et al., 1997). Powell et al. (1993) also showed that when DU-145 cells (a nonmetastatic prostate tumor cell line) were transfected with matrilysin cDNA, the cells were significantly more invasive in a cell invasion *in vivo* model.

Due to the need of understanding the normal functioning and physiology of the prostate for future comparison with pathological states, this study was undertaken to check the expression of *RECK* gene compared with the expression and biological activity of MMP-2, -7, -9 and -14 during the post natal development of the rat ventral prostate.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

Two, three, six and twelve weeks old male Wistar rats were purchased from CEMIB-UNICAMP. All rats were sacrificed by cervical dislocation and had their ventral prostate dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until used. Five animals from each group were utilized for RNA and protein extractions.

### RNA EXTRACTION AND REVERSE TRANSCRIPTION

Total RNA extraction was performed using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). Samples were homogenized in 1 mL of Trizol using a Polytron homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) and the subsequent procedures were carried out according to manufacturer. The RNA integrity was analyzed by electrophoresis in 1.2% denaturing agarose gel and RNA concentration was quantified by spectrophotometry using a Ultraspec 2100 pro equipment (Amersham

Biosciences São Paulo SP, Brazil). Five µg of total RNA samples was reverse transcribed with 200 U SuperScript III (Invitrogen Life Technologies, São Paulo SP, Brazil) and Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen Life Technologies) according to the supplier's instructions. The cDNA was quantified by spectrophotometry as above.

#### REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Real-time PCR were assayed using the SYBER Green method, that is based on the direct detection of the PCR product monitored by measuring the increase in fluorescence caused by the binding of SYBER Green dye to double-stranded DNA. Fifty ng and 25 ng of the cDNA was utilized for RECK and MMPs expression analyses, respectively. The assay was carried out using an ABI PRISM 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). Synthetic oligonucleotide primers to amplify and quantify *RECK*, *MMP-2*, *MMP-14*, *MMP-7* (target genes) and *β-actin* (endogenous control) were determined and designed using the Primer Express software (Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen, as showing in Table I. All amplifications result in 151bp long fragments.

**Table I.** Genes evaluated and nucleotide sequences of the primers used for Real-Time PCR

Gene	Primer sequence	
<i>β-actin</i>	forward	5' - TCCTGTGGCATCCATGAAACTA - 3'
	reverse	5' - CCAGGGCAGTAATCTCCTTCTG - 3'
<i>RECK</i>	forward	5' - AGAGGTCAGGCTTTAAACCAC - 3'
	reverse	5' - GAACGGAAGCATGGCTAACAC - 3'
<i>MMP-2</i>	forward	5' - TGCCTTTTCTCGAATCCAT - 3'
	reverse	5' - AAGTGAGAATCTCCCCAACAC - 3'
<i>MMP-14</i>	forward	5' - CTGTCCCAGATAAGCCCAGA - 3'
	reverse	5' - GGGTATCCGTCCATCACTTG - 3'
<i>MMP-7</i>	forward	5' - AAGTGGCATTCCAGAACTGCA - 3'
	reverse	5' - CTGCAGTCCCCCAACTAACC - 3'
<i>MMP-9</i>	forward	5' - TCTCTGGGCGCAAATGTG - 3'
	reverse	5' - ATACGTTCCCGGCTGATCAG - 3'

All samples were assayed in triplicate and performed in a 25  $\mu$ l volume containing 50 ng cDNA for RECK or 25 ng cDNA for MMPs reactions, 12.5  $\mu$ l SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems) and 400 nM each primer. An appropriate negative control containing no template cDNA was also subjected to the same procedure to exclude or detect any possible contamination or carry over. The endogenous control  $\beta$ -actin was used to normalize the samples for differences in the amounts and quality of cDNA added to each reaction mixture. The PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 50°C for 2 min; 10 min at 95°C; and 40 cycles, with 1 cycle consisting of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. The results were normalized by using the Ct (threshold cycle) values obtained for the endogenous control present in the same plate. Ct is defined as the first amplification cycle at which fluorescence indicating PCR products is detectable above the threshold (background fluorescence). For normalization, we utilized the equation:  $\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(endogenous\ control)}$ . To quantify gene expression in the rat ventral prostate on different weeks old, the mathematical model:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , using calibration data was used. The  $\Delta\Delta Ct$  is determined by the equation:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(sample)} - \Delta Ct_{(calibrator)}$ , which the calibrator is the value obtained for the control group (12 weeks old rats). The PCR efficiency of all primers was calculated according to the equation:  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ , where all values were between 0.98 and 1.10.

### *MMPs EXTRACTION*

The frozen tissues were homogenized in 50mM Tris-HCl pH 7.4; 0.2M NaCl; 0.1% Triton X-100; 10mM CaCl<sub>2</sub> and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical Co, Saint Louis MO, USA) using a Polytron homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland). The homogenates were incubated for 2 hours at 4°C and centrifuged 4,000xRPM for 20 min at 4°C. The supernatants were removed and the pellets resuspended in the same solution as above, heated at 60°C for 5 min, centrifuged 4,000xRPM for 20 min at 4°C and the supernatants pooled with the first supernatant. Protein quantification was performed using the Bradford dye binding assay kit (BioAgency, São Paulo SP, Brazil), according to manufacturer.

### GELATIN ZYMOGRAPHY

Twenty  $\mu\text{g}$  of protein in the extracts were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel with 0.1% gelatin (used as protein substrate) at  $4^{\circ}\text{C}$  under nonreducing conditions. After electrophoresis, the gel was washed with gentle shaking at room temperature with 2.5% Triton X-100 (2 changes) for 30 min to remove SDS and with 50mM Tris-HCl, pH 8.4 (2 changes) for 10 min to remove Triton X-100. The gel was incubated overnight in 50mM Tris-HCl, pH 8.4 containing 5mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$ . The gel was then stained with Coomassie brilliant blue (0.5% dye in 20% ethanol and 10% acetic acid) for 1 hour, unstained bands corresponding to the gelatinolytic activity could be seen after washes with 30% methanol and 10% acetic acid. The intensity of the bands was determined using the Scion Image for Windows software (Scion Corporation, Frederick MA, USA).

### STATISTICS

Differences were determined statistically by using the Student's *t*-test and significance is indicated at the  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *RECK, MMP-2, -7 and -14 mRNA expression*

Figure 1 shows the Real time RT-PCR results for *RECK*, *MMP-2*, *-7* and *-14*. There was a progressive decrease in the amount of mRNA for each *MMP* species and its inhibitor *RECK*. However, while the reduction was significant for *MMP-7* and *14* already at the third week of post natal life, the decreases observed for *RECK* and *MMP-2* were more subtle, reaching significance only after puberty.

Figure 1E superimposes the results for the three *MMPs* and *RECK*, for the sake of comparison of the stepness in the observed reduction. It is evident that *MMP-7* and *MMP-14* show the most marked reduction within the three first weeks of post natal life.

We were unsuccessful in obtaining Real time RT-PCR results for *MMP-9*, probably because its expression was minimal, since we have detected *MMP-9* expression in the same conditions of Real Time PCR with gingival samples (data not shown).

#### *MMP-2 and 9 activation and gelatinolytic activity*

A representative zimograph is shown in Figure 2. MMP-2 and MMP-9 activities were identified by their gelatinolytic activity, molecular mass and band pattern. The divalent cation dependence of the observed gelatinolytic activity was demonstrated by its inactivity after EDTA treatment (not shown). The relative proportion between the active and inactive precursor forms for both MMPs is shown in Figure 3. Figure 3a demonstrates that the relative constancy in the proportion between the inactive and active forms of MMP-2. On the other hand, a progressive increment in the relative proportion of active MMP-9 was detected, varying from about equivalent amounts at 3 weeks to more than 60% at the twelfth week (adulthood).

## DISCUSSION

The rat ventral prostate development takes place at three different periods. Embryonic development involves prostatic induction, with budding of the urethral epithelium into the urogenital sinus mesenchyme. This process is regulated by androgens and involves the urethral smooth muscle cells (Thomson et al. 2002).

The second phase takes place at the early post natal days and is due to a testosterone surge occurring around birth. This phase is characterized by the active proliferation of the epithelium, with associated branching, epithelial differentiation and canalization (i.e. lumen formation) (Weihs et al. 2002; Marker et al. 2003). The third phase occurs during puberty, following the testicular production of testosterone. We have recently showed that this pubertal growth is characterized by a sequence of events: (1.) epithelial cell proliferation; (2.) infolding and budding of the epithelial structures and (3.) the accumulation of secretory material in the lumen (Vilamaior et al. 2005).

Epithelial growth depends on stromal (and/or ECM) deformability up to a certain limit. After this threshold, ECM degradation and tissue remodelling is mandatory. Increased MMP activity was described for the epithelial growth in both developing lung and mammary gland (Wiseman and Werb, 2002). Mützing (1980) have early predicted collagen as an inhibitor of epithelial growth. The decreased expression of MMPs at the mRNA levels observed in this work suggests that post natal growth is progressively less dependent on stromal modification and ECM degradation, with most dramatic changes taking place during early development, when epithelial branching morphogenesis and budding takes place. On the other hand, the reason for the increase in the active form of MMP-9 is unknown. It is probable that MMP-9 activity is associated with a little evident or unknown phenomenon in the adult prostate or may be confined in an as yet unidentified prostatic compartment. One such possibility is that it takes place to accommodate an increasingly larger volume occupied by the secretory products in the lumen (Vilamaior et al. 2005), and is involved with epithelial as well as basement membrane distension. Whatever the explanation is, the present results reveal a distinct activation mechanism for MMP-9 as compared to MMP-2, at least with respect to RECK activity. The existence of different cell types and different compartments in the organ may be the primary cause for such distinction, while the presence (or absence) of other MMP inhibitors such as TIMPs (Handsley and Edwards, 2005) and KiSS (Yan et al. 2001), may play additional roles to RECK.

Still et al. (2000) demonstrated a close association between MMP-2/TIMP-2 expression in the human prostate and local tumor invasion. Both genes were expressed mainly in epithelial cells both in tumor and benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue samples. In BPH or low-grade tumor, the ratio of MMP-2 and TIMP-2 was less than one and this ratio increased significantly in high-grade and –stage tumor, coinciding with an enhanced tissue degradation (due to an increase in proteolytic activity) and a more invasive phenotype.

Another reason for the lack of association of MMP-2 activity with RECK expression could be the fact that the MMP extraction was carried out from the total prostate and not differentiated for the prostate secretion or tissue. Since the prostate secretion also presents a gelatinolytic activity of 63kDa and 58kDa metalloproteinases in pubertal and adulthood rats (Wilson et al., 1991), our results may superimpose both stromal and secretory activities.

The temporal differences in the reduction of MMP and RECK expression reduction (i.e. MMP-7 and MMP-14 expression dropping by the third post natal week and MMP-2 and RECK expression dropping after the sixth post natal week) may reflect the existence of different regulatory mechanisms. The kinetics observed in the present work suggests that the two latter seem to be

down regulated by androgen. However, this seems not to be case in human prostate cancer cells, which showed increased *MMP-2* expression in the presence of androgen, while MT1-MMP (*MMP-14*) seemed not to be affected (Liao et al. 2003). However, the discrepancies may be attributable to the tumoral origin of the studied cells (LNCaP and LAPC-4 cells) and to the fact that LNCaP cells have a mutated androgen receptor (Feldman and Feldman, 2001). Besides this suggestion on the regulation of *MMP-2* by androgens, *MMP-2* has been shown to be up regulated by p53, activator protein-1, Ets-1, CCAAT/enhancer-binding protein, CREB (cAMP response element binding protein) and activator protein-2 (Bian and Sun, 1997; Qin et al. 1999; Hasan and Nakajima, 1999), while down regulated by retinoic acid (Nakajima et al. 1989), PMA (Brown et al. 1990), long exposure to  $\alpha$ - and  $\gamma$ -interferons (Hujanen et al. 1994) and inhibitors of calcium influx (Kohn et al. 1994).

The present results also demonstrated a progressive reduction in the levels of *MMP-7* mRNA. This is compatible the results of Powell et al. (1996), who showed the *MMP-7* mRNA to be undetectable by Northern blotting in the rat ventral prostate of adult individuals, and Wilson et al. (1992), who studied the caseinolytic activity of a 27kDa metalloproteinase in prostatic complex of 2-3 week-old rats. In spite of using different methodology, our results and those by Powell et al. (1996) confirm very low levels of *MMP-7* mRNA in the adult prostate. It is interesting to note, though, that *MMP-7* expression in inversely correlated to the epithelial differentiation, since pre-pubertal individuals (this work) and castrated ones (Powell et al. 1996; Justulin et al. 2005) showed increased prostatic expression of *MMP-7*, suggesting that the *MMP-7* gene may be inhibited by androgen. An inverse correlation between epithelial cell differentiation is further supported by the fact that tumor invasion is favored by *MMP-7* expression, through cleavage of E-cadherin, with anti-sense oligonucleotide blocking of *MMP-7* resulting in a less invasive phenotype (Davies et al. 2001).

We have also been able to show that *MMP-7* is found by immunocytochemistry at the apical epithelium in the normal prostate, but is also found at the epithelial base in contact with the basement membrane after castration (Justulin et al. 2005), implicating *MMP-7* in the remodelling of the basement membrane, as described before (Carvalho and Line, 1996) and with potentiation of epithelial cell apoptosis by generating soluble Fas-ligand after castration (Powell et al. 1999).

The location of RECK and the MMPs studied in this work in the rat ventral prostate is mandatory for a best understanding of its function and dynamics, what will certainly deserve attention in the early future.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted with Luis A. Justulin Jr for the help with the zymography experiments and to Dr. Marcos Antônio Machado, Dra. Alessandra Alves de Souza and Dr. Marco Aurélio Takita for the help and free access to the Real time-PCR equipment.

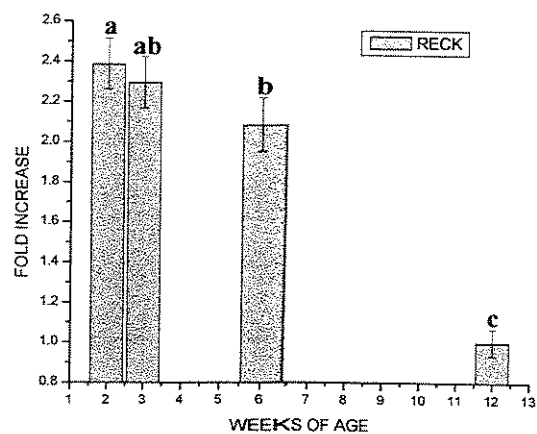
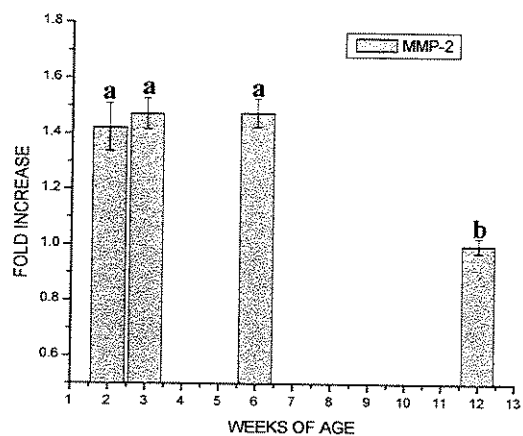
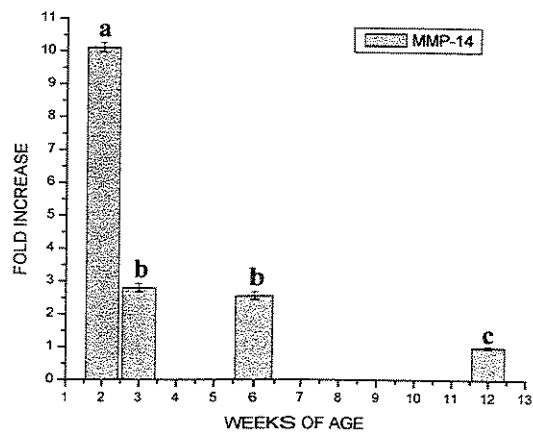
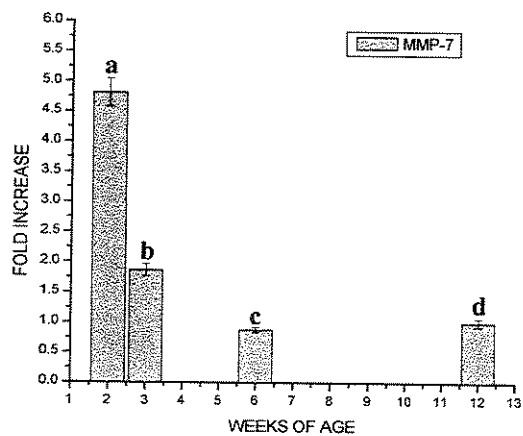
## REFERENCES

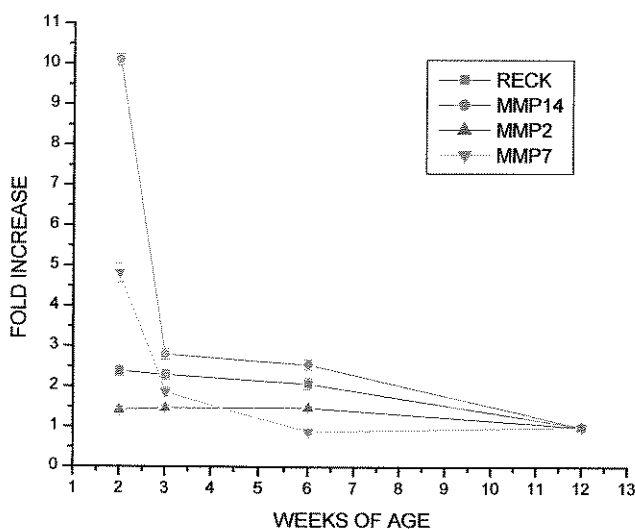
- BIAN J, SUN Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. **Mol Cell Biol** 17: 6330-6338, 1997.
- BROWN PD, LEVY AT, MARGULIES IM, LIOTTA LA, STETLER-STEVENSON WG. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. **Cancer Res** 50: 6184-6191, 1990.
- CALLEJAS NA, CASADO M, DIAZ-GUERRA MJ, BOSCA L, MARTIN-SANZ P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. **Hepatology** 33: 860-7, 2001.
- CARVALHO HF, LINE SRP. Basement membrane-associated changes in the rat ventral prostate following castration. **Cell Biol Int** 20: 809-819, 1996.
- DAVIES G, JIANG WG, MASON MD. Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. **Clin Cancer Res.** 7: 3289-97, 2001.
- FELDMAN BJ, FELDMAN D. The development of androgen independent prostate cancer. **Nat Rev Cancer** 1: 34-45, 2001.
- FURUMOTO K, ARII S, MORI A, FURUYAMA H, GORRIN RIVAS MJ, NAKAO T, ISOBE N, MURATA T, TAKAHASHI C, NODA M, IMAMURA M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology** 33: 189-195, 2001.
- HANDSLEY MM, EDWARDS DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int J Cancer** 115: 849-860, 2005.

- HASAN S, NAKAJIMA M. Retinoic acid synergizes with cyclic AMP to enhance MMP-2 basal promoter activity. **Biochem Biophys Res Commun** 258: 663-667, 1999.
- HUJANEN ES, VAISANEN A, ZHENG A, TRYGGVASON K, TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Modulation of M(r) 72,000 and M(r) 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. **Int J Cancer** 58: 582-586, 1994.
- JUSTULIN JR LA, CARDOSO AB, PETERS H, TABOGA SR, CARVALHO HF, FELISBINO SL. The involvement of MMP-7 on the stromal remodeling in the rat ventral prostate involution after androgen deprivation. Submitted, 2005.
- KITAYAMA H, SUGIMOTO Y, MATSUZAKI T, IKAWA Y, NODA M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell** 56: 77-84, 1989.
- KOHN EC, JACOBS W, KIM YS, ALESSANDRO R, STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA. Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). **J Biol Chem** 269: 21505-21511, 1994.
- LIAO X, THRASHER JB, PELLING J, HOLZBEIERLEIN J, SANG QX, LI B. Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. **Endocrinology**. 144: 1656-63, 2003
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol** 253: 165-174, 2003.
- MÜNTZING J. Androgen and collagen as growth regulators of the rat ventral prostate. **Prostate** 1: 71-78, 1980.
- NAKAJIMA M, LOTAN D, BAIG MM, CARRALERO RM, WOOD WR, HENDRIX MJ, LOTAN R. Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. **Cancer Res** 49: 1698-1706, 1989.
- NELSON AR, FINGLETON B, ROTHENBERG ML, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J Clin Oncol** 18: 1135-1149, 2000.
- NODA M, KITAYAMA H, MATSUZAKI T, SUGIMOTO Y, OKAYAMA H, BASSIN RH, IKAWA Y. Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86: 162-166, 1989.

- OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA R, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE C, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S-I, ITOH Y, SIEKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI C, NODA M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800, 2001.
- POWELL WC, KNOX JD, NAVRE M, GROGAN TM, KITTELSON J, NAGLE RB, BOWDEN GT. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 53: 417-422, 1993.
- POWELL WC, DOMANN JR FE, MITCHEN JM, MATRISIAN LM, NAGLE RB, BOWDEN GT. Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 29: 159-168, 1996.
- POWELL WC, FINGLETON B, WILSON CL, BOOTHBY M, MATRISIAN LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9: 1441-1447, 1999.
- QIN H, SUN Y, BENVENISTE EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274: 29130-29137, 1999.
- RUDOLPH-OWEN LA, CHAN R, MULLER WJ, MATRISIAN LM. The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 58: 5500-6, 1998.
- STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516, 2001.
- STILL K, ROBSON CN, AUTZEN P, ROBINSON MC, HAMDY FC. Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human and malignant prostatic tissue. *The Prostate* 42: 18-25, 2000.
- TAKAHASHI C, AKIYAMA N, MATSUZAKI T, TAKAI S, KITAYAMA H, NODA M. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. *Oncogene* 12: 2137-2146, 1996.
- TAKAHASHI C, SHENG Z, HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K, KITAURA Y, TAKAI S, SASAHARA RM, HORIMOTO A, IKAWA Y, RATZKIN BJ, ARAKAWA T, NODA M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *PNAS* 95: 13221-13226, 1998.
- TAKEUCHI T, HISANAGA M, NAGAO M, IKEDA N, FUJII H, KOYAMA F, MUKOGAWA T, MATSUMOTO H, KONDO S, TAKAHASHI C, NODA M, NAKAJIMA Y. The membrane-

- anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 10: 5572-9, 2004.
- UHM JH, DOOLEY NP, VILLEMURE JG, YONG VW. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloproteinase-2 and protein kinase C. **Clin Exp Metastasis** 14: 421-33, 1996.
- WEIHUA Z, LATHE R, WARNER M, GUSTAFSSON JA. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 99: 13589-13594, 2002.
- WILSON CL, HEPPNER KJ, LABOSKY PA, HOGAN BL, MATRISIAN LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 1402-7, 1997.
- WILSON MJ, STRASSER M, VOGEL MM, SINHA AA. Calcium-dependent and calcium-independent gelatinolytic proteinase activities of the rat ventral prostate and its secretion: characterization and effect of castration and testosterone treatment. **Bio Reprod.** 44: 776-785, 1991.
- WILSON MJ, GARCIA B, WOODSON M, SINHA AA. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. **Biol Reprod.** 47: 683-91, 1992.
- WISEMAN BS, WERB Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science** 296: 1046-1049, 2002.
- WOESSNER JR JF, TAPLIN C. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. **J Biol Chem** 263: 16918-16925, 1988.
- THOMSON AA, TIMMS BG, BARTON L, CUNHA GR, GRACE OC. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. **Development** 129: 1905-1912, 2002.
- VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, CARVALHO HF. Alternating proliferative and secretory activity in response to androgen are responsible for the postnatal growth of the rat ventral prostate. Submitted, 2005.
- YAN C, WANG H, BOYD DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. **J Biol Chem** 276: 1164-1172, 2001.

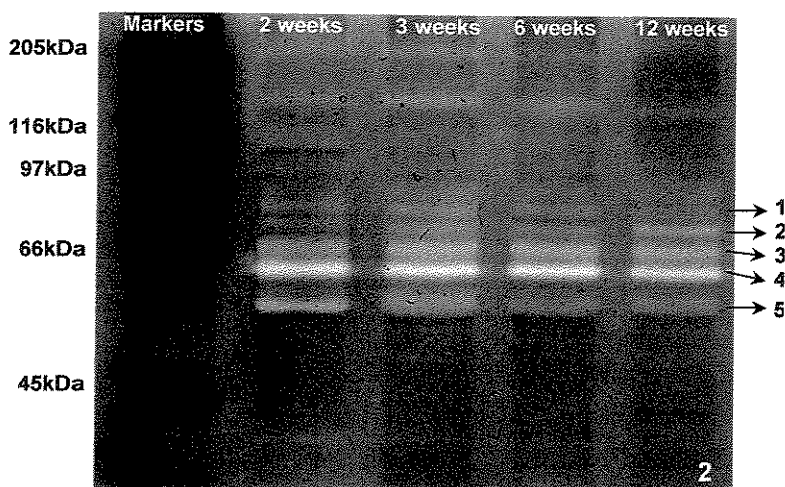
**Figure 1****1a****1b****1c****1d**



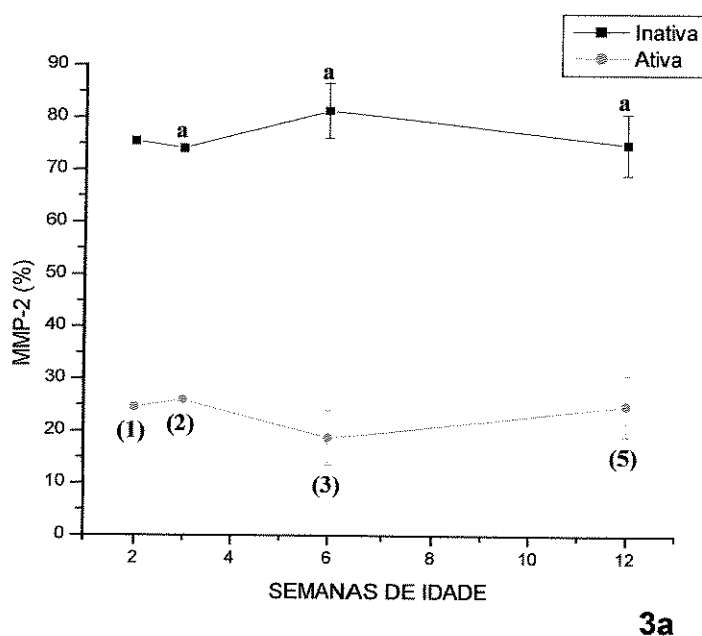
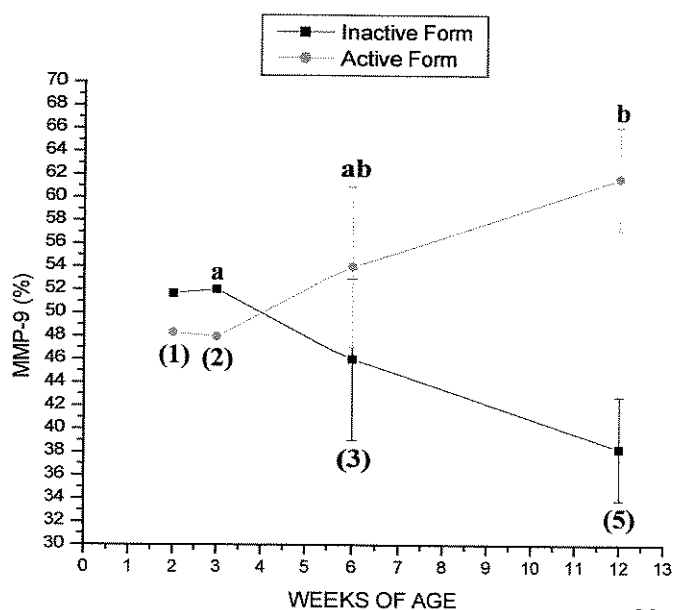
**1e**

**Figure 1:** Relative quantitation of *RECK*, *MMP-2*, *MMP-14* and *MMP-7* genes expression in Real time quantitative PCR in the rat ventral prostate with 2, 3, 6 and 12 weeks old animals. cDNAs were prepared from the samples and used for Real-Time PCR. Measurements were normalized with  $\beta$ -actin amplification. The values represent the fold increase in gene expression compared with values obtained for 12 weeks old animals (calibrator). **1a**, *RECK* expression; **1b** *MMP-2* expression; **1c** *MMP-14* expression; **1d** *MMP-7* expression; **1e** superimposition of the fold increase values obtained for the different MMPs and *RECK*. Differences were investigated using the Student's *t* test and are indicated by different letters

Figure 2



**Figure 2:** Representative gelatin zymography gel. The effect of post natal development on gelatinolytic protease activities in the rat ventral prostate. Animals with 2, 3, 6 and 12 weeks of age were employed in this assay. Aliquots containing 25 $\mu$ g protein were electrophoresed in 10% SDS-polyacrilamide gels containing 0.1% gelatin. The gels were incubated in 50mM Tris-HCl (pH 7.4) with 5mM CaCl<sub>2</sub> as described in Materials and Methods. 1: pró-MMP9; 2: MMP9; 3: pró-MMP2; 4: intermediate-MMP2; 5: MMP-2.

**Figure 3****3a****3b**

**Figure 3:** Relative mean related to total MMP-2 and MMP-9 inactive and active forms activities in the rat ventral prostate detected by gelatin zymography of young animals, with different 2, 3, 6 and 12 weeks of age. **3a:** Relative mean related to total MMP-2; **3b:** Relative mean related to total MMP-9. Differences were investigated using the Student's *t* test and are indicated by different letters. Numbers between parenthesis refer to the number of measurements (*n*).



## SHORT COMMUNICATION

### **Distinct expression of *RECK* in the rat ventral prostate**

Helene Peters and Hernandes F Carvalho

Dept. Cell Biology – State University of Campinas (UNICAMP)  
Campinas SP, Brazil

**Running title:** Invariable amount but distinct location of RECK mRNA

**Corresponding author:** Hernandes F Carvalho~

Dept. Cell Biology – UNICAMP  
CP6109  
13083-863 Campinas SP, Brazil  
Tel. 55 19 3788 6118  
Fax 55 19 3788 6111  
E-mail [hern@unicamp.br](mailto:hern@unicamp.br)

### ABSTRACT

We have investigated the effect of castration and testosterone reposition on the expression of *RECK* mRNA, using semi-quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. The results demonstrate an invariable amount of mRNA in the organ but ISH showed a transition from a mostly epithelial to a mostly stromal expression of this MMP inhibitor after castration. Testosterone administration restored the non-castrated pattern of *RECK* expression. Since MMPs have been involved not only in the stromal reorganization of the prostate following castration but also in inducing epithelial apoptosis, its is probable that complimentary patterns of *RECK* expression will cause epithelial cell death but preserve stromal cells in the androgen deprived environment. Furthermore, it is also possible that stromal cells need to exert a more stringent control of MMP activity in the pericellular environment in the castrates, and do so by up regulating *RECK*.

**Key words:** castration, prostate, RT-PCR, *RECK*

## INTRODUCTION

The androgen dependence of the prostate gland makes it a unique system for the study of both epithelial cell apoptosis and stromal/extracellular matrix remodelling, since androgen ablation by surgical or chemical castration results in marked prostate atrophy (Isaacs 1994). Furthermore, it has become clear that epithelial stromal interactions are key regulatory elements in prostate development, growth and function (Cunha et al. 2004). The involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in the stromal remodelling after castration has also long been demonstrated. More recently, it was demonstrated that MMP-7 expression is down regulated by androgen and castration results in an transient increased expression of this MMP (Powell et al. 1996), what was followed by the demonstration that MMP cleaves Fas ligand (FasL) and contributes to the induction of epithelial cell apoptosis (Powell et al. 1999) and to tumor cell dissociation (Davies et al. 2001)

Considering that MMPs have a series of inhibitors and that a recently described inhibitor RECK protein was shown to be important in determining tumor aggressivity and to reduce angiogenesis (Oh et al. 2001), we have decided to investigate whether *RECK* is expressed in the rat ventral prostate and how it is affected by castration, and used in situ hybridization to determine which cells express *RECK* mRNA. This work then describes that *RECK* mRNA is expressed in the rat ventral prostate, that the mRNA levels are relatively constant after castration and testosterone reposition and that a balance between the expression of RECK warrants constant levels in control and castrated situations.

## MATERIAL AND METHODS

### *ANIMALS*

Three months old male Wistar rats were purchased from CEMIB-UNICAMP. The rats were maintained in barrier facilities with access to food and water *ad libitum*. The animals were divided in five different groups, one control, three castrated (7, 14 and 21 days) and a one castrated and testosterone treated (5 mg testosterone ciprionate /kg, 12-12h for 48h after a period of 14 days of castration). Castration was attained by bilateral orchiectomy through scrotal incision under ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) anesthesia. All rats were sacrificed by cervical dislocation and the ventral prostate dissected, frozen in liquid nitrogen and stored -70° C until used.

### *RNA EXTRACTION AND REVERSE TRANSCRIPTION*

Total RNA extraction was performed using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). Samples were homogenized in 1 mL of Trizol using a Polytron homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) and the subsequent procedures were carried out according to manufacturer. The RNA integrity was analyzed by electrophoresis in 1.2% denaturing agarose gel and RNA concentration was quantified by spectrophotometry using a Ultraspec 2100 pro equipment (Amersham). Five µg of total RNA samples was reverse transcribed with 200 U SuperScript III and Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, USA) according to the supplier's instructions. The cDNA was quantified by spectrophotometry as above.

### *POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR*

RT-PCR were assayed for *RECK* gene expression.

*β-actin* was utilized as internal control for *RECK* PCR analyses. *β-actin* synthetic oligonucleotide primers were determined and designed using both programs: Primer3 ([www.genome.wi.mit.edu/cgi\\_bin/primer/primer3\\_www](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi_bin/primer/primer3_www)) and Gene Runner 3.05 (Hastings Software. Inc.). All primers, including RECKmod (based on Furumoto et al, 2001) primers, were synthesized by Invitrogen Life Technologies (São Paulo, SP, Brazil), as showing in Table I:

**Table I.** Genes evaluated and nucleotide sequences of the primers used for PCR

Gene	Primers sequence	
<i><math>\beta</math>-actin</i>	forward	5' - TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA - 3'
	reverse	5' - CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG - 3'
<i>RECK</i>	forward	5' - CCTCAGTGAGCACAGTTCAGA - 3'
	reverse	5' - GCAGCGCACACACTGCTGTA - 3'

For *RECK*, PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C – 1 min, 60°C – 1 min, 74°C – 1 min 30 sec, and a final cycle of 7 minutes at 74°C. It was performed in a 13  $\mu$ l final volume containing 78ng cDNA, 0.39 U Taq DNA Polymerase (Promega, Madison WI, USA), 2,0mM MgCl<sub>2</sub> and 400nM of  $\beta$ -actin and *RECK* primers in the same reaction tube, according to the protocol suggested by Marone et al., 2001.

All samples were assayed in triplicate, electrophoresis in a 2% agarose gel and stained with ethidium Bromide solution. Gel image was captured with a Kodak DC120 Camara using the Kodak Digital Science 1.0 software (Eastman Kodak Company). Gel analyzes were performed using the Scion Image Beta 4.0.2 for Windows (Scion Corporation, Frederick MA, USA).

The results obtained were compared using ANOVA.

#### *RECK* IN SITU HYBRIDIZATION

For *RECK* RNAm localization all solutions and materials utilized were RNase free. The *RECK* probe were determined and designed using both programs: Primer3 ([www.genome.wi.mit.edu/cgi\\_bin/primer/primer3\\_www](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi_bin/primer/primer3_www)) and Gene Runner 3.05 (Hastings Software. Inc.) The probe was synthesized by Invitrogen Life Technologies (Carlsbad CA, USA) as follows:

5' - FITC - GTTCTGTTGGCCTGTTGTAAAGTTTGTAC - 3'

Frozen sections were air dried for 30 minutes, fixed using ice cold 4% paraformaldehyde in PBS for 5 minutes, air dried for 30 minutes and washed with TEA

buffer (1.34% triethanolamine) for 2 minutes. The sections were incubated under magnetic stirring with 0.25% acetic anhydride in TEA buffer for 10 minutes, washed with SSC 2x, dehydrated with ethanol solution, incubated for 5 minutes with chloroform, 2 minutes ethanol 100% and ethanol 95% and air dried before probe incubation. The probe incubation solution was composed by a hybridization mix (4 parts) and a probe mix (1 part). The hybridization mix was 31.25% formamide, 12.5% Dextran, 375 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1.12 mM EDTA, Denhardt's solution (1.25X final concentration) and 0.01M dl-Dithiothreitol. The probe mix was composed by 2 pmol of probe ( $2/4$  volume), tRNA ( $1/4$  volume) and T7ED ( $1/4$  volume). The mixture was placed over the sections and incubated at 55°C overnight in a humidified chamber. After hybridization, the sections were washed twice with SSC 2x buffer for 30 minutes each wash. The detection of the hybridization product was done using ISH Detection Kit NCL-ISH-D (NovoCastra Laboratories, Benton Lane, Newcastle, UK), based on alkaline phosphatase precipitated, according to the procedures of manufacturer. The slides were counterstained with methyl green for 3 min, washed and mounted in 90% glycerin and 10% PBS.

## RESULTS AND DISCUSSION

RECK was demonstrated to control MMP expression at the protein and mRNA levels, as well as to inhibit MMP-2 and MMP-9 activation (Oh et al. 2001). Since we have been interested in the stromal remodelling taking place in the rat ventral prostate after castration, we hypothesized that RECK could be involved in the regulation of MMPs in this organ and then decided to investigate its expression at the mRNA level, using semi-quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. The semi-quantitative analysis of *RECK* expression, using  $\beta$ -actin as an internal control showed a constant level of *RECK* mRNA expression in control, castrated and castrated rats that received testosterone (Figure 1). This was a surprising result, since we are aware that different MMPs are activated by castration and are involved not only with ECM processing during tumor invasion (Wilson et al. 1991; Powell et al. 1996; Jung et al. 1998), but also with epithelial cell apoptosis (Powell et al. 1999), and the invariable expression of *RECK* may reflect its function in compartments not so evident as

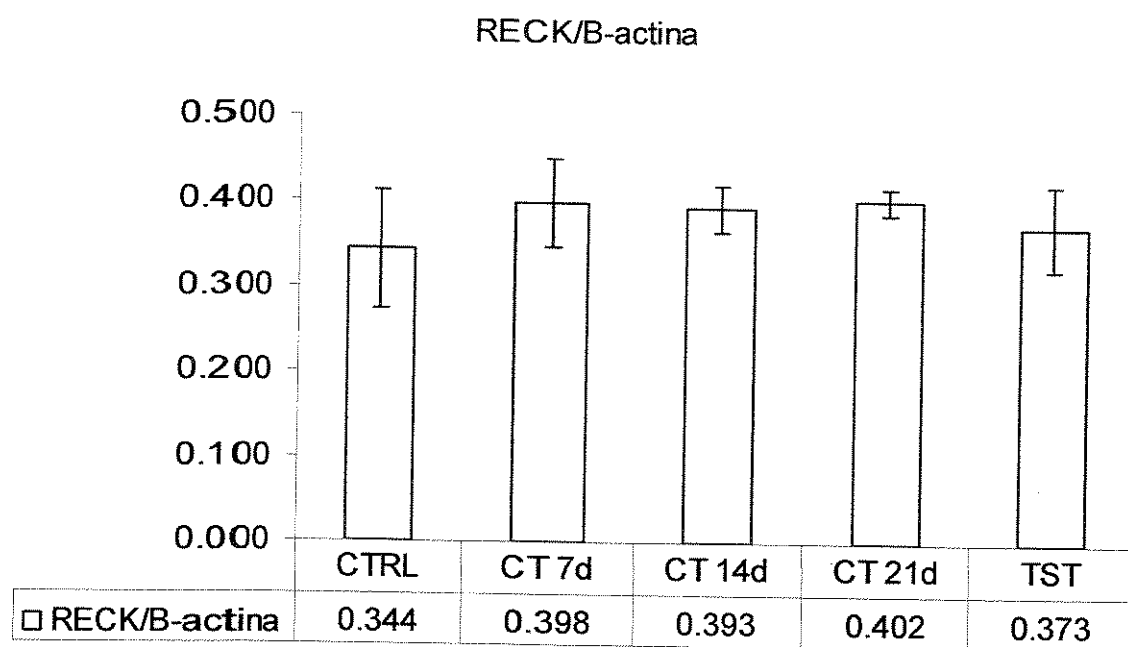
the the regressing epithelium or that a pos-transcriptional mechanism is involved with down regulating RECK protein, which was not investigated in the present work. However, by using in situ hybridization, we could observe that *RECK* mRNA is expressed in epithelial cells of the prostate in both control, castrated and testosterone treated castrated rats (Fig. 2). It was evident though, that not only was the amount of *RECK* mRNA restricted in epithelial cells as was its total amount in the epithelium, as judged by the marked decrease in the epithelial compartment of castrated rats. Surprisingly, in castrated rats, an evident increase in the reaction product was observed in both fibroblasts and smooth muscle cells. Testosterone treatment of castrated rats restored the aspects observed in non-castrated rats, with respect to *RECK* mRNA distribution (Fig. 2D). This balance between the expression of *RECK* by epithelial and stromal cell in control and castrated rats indicate that *RECK* is differentially regulated in these cells with respect to androgen stimulation. Since epithelial cell death is at least in part dependent on MMP activity (Powell et al. 1999), as it is the case of the mammary gland (Wiseman and Werb, 2002), its is reasonably to accept a downregulation of RECK, and MMP inhibitor in these cells. On the other hand, given the marked remodelling of the stromal compartment taking place after castration, it is also reasonable to expect that stromal cells upregulate *RECK* expression to exert a more refined regulation of the ECM changes in the stroma. Taking together these results demonstrate that the rat ventral prostate regression after castration is a complex phenomena, involving the coordinated action of both epithelial and stromal cells.

## REFERENCES

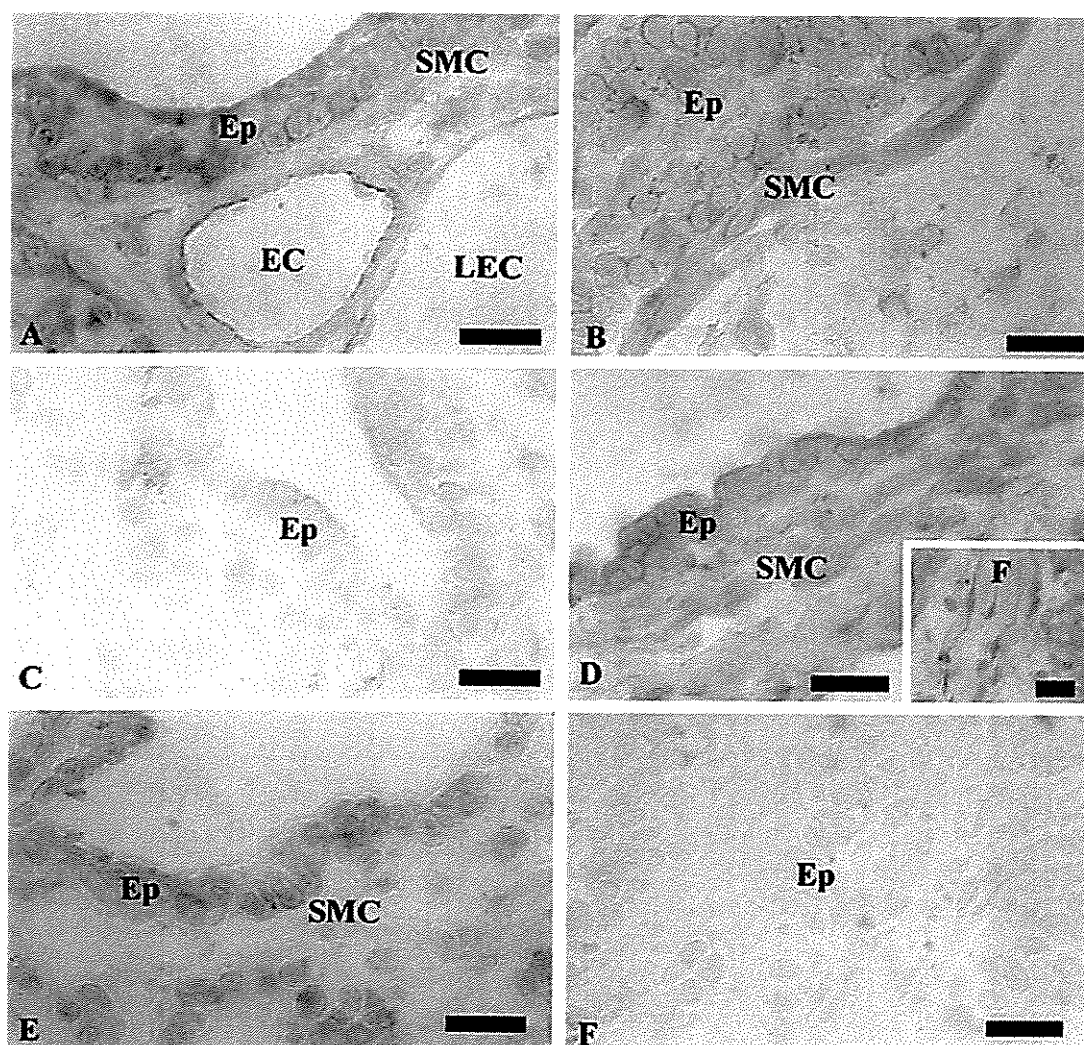
- CUNHA GR, COOKE PS, KURITA T. Role of stroma-epithelial interaction in hormonal responses. **Arch. Histol. Cytol** 67: 417-434, 2004.
- DAVIES G, JIANG WG, MASON MD. Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-caderin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. **Clin Cancer Res** 7: 3289-3297, 2001.

- ISAACS JT. Role of androgens in prostatic cancer. **Vitamins Hormones** 49: 433-502, 1994.
- JUNG K, NOWAK L, LEIN M, PRIEM F, SCHNORR D, LOENING SA. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and the compress metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. **Int J Cancer** 74: 220-223, 1998.
- JUNG K, KRELL HW, ORTEL B, HASAN T, ROMER A, SCHNORR D, LOENING SA, LEIN N. Plasma matrix metalloproteinase 9 as biomarker of prostate cancer progression in Dunning (Copenhagen) rats. **Prostate** 54: 206-211, 2003.
- MARONE M, MOZETTI S, DE RITIS D, PIERELLI L, SCAMBIA G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online** 3: 19-25, 2001.
- OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA R, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE C, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S-I, ITOH Y, SIEKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI C, NODA M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell** 107: 789-800, 2001.
- POWELL WC, DOMANN JR FE, MITCHEN JM, MATRISIAN LM, NAGLE RB, BOWDEN GT. Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. **Prostate** 29: 159-168, 1996.
- POWELL WC, FINGLETON B, WILSON CL, BOOTHBY M, MATRISIAN LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. **Curr Biol** 9: 1441-1447, 1999.
- WILSON MJ, STRASSER M, VOGEL, MM, SINHA AA. Calcium-dependent and calcium independent gelatinolytic proteinase activities of the rat ventral prostate and its secretion: characterization and effect of castration and testosterone treatment. **Biol Reprod** 44: 776-785, 1991.
- WISEMAN BS, WERB Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science** 296: 1046-1049, 2002.





**Figure 1.** Relative expression of RECK mRNA in the rat ventral prostate in control, castrated and testosterone-treated castrated rats as determined by RT-PCR using  $\beta$ -actin as an internal control in single tube reaction. Statistics using ANOVA showed no significative difference between the results.



**Figure 2.** ISH for RECK mRNA in the rat ventral prostate. Fig. 2A. Control, non castrated rats. Intense reaction for RECK mRNA was found in the epithelial cells (Ep), occupying the perinuclear and apical cytoplasmic region. Little reaction was also observed in the cell nucleus. Stromal cell showed comparatively weaker reaction. Endothelial cells (EC) as well as lymphatic endothelial cells (LEC) were negative for RECK mRNA. A non-specific reaction was observed over elastin around the blood vessels and in thin elastic fibers in the stroma. Castration for 7, 14 and 21 days (Figs. 2B-D, respectively), resulted in epithelial cell atrophy but did not result in total inhibition of RECK mRNA expression. It was restricted to a small perinuclear region. On the other hand, comparatively stronger reaction was observed over smooth muscle cells (SMC) after castration. More intense reaction was also observed in the fibroblasts (Fig. 2D, inset). Forty eight hour testosterone treatment partially restored the epithelial polarity after 14 days of androgen ablation, as well as RECK mRNA expression. Inversely, the stromal cell expression was reduced (Fig. 2E). Fig. 2F shows a negative control, using a sense oligonucleotide probe.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Há um declínio nos níveis de expressão dos mRNA das MMP-2, -7 e -14 e do RECK ao longo de desenvolvimento pós natal de ratos.
2. Ao contrário da proporção constante entre as formas ativa e inativa da MMP-2, existe um aumento nesta proporção para a MMP-9, o que leva a crer que RECK e MMP-9 possam ocupar o mesmo compartimento no órgão, enquanto a MMP-2 estaria em outro local, considerando o controle exercido pelo RECK na ativação de ambas MMPs.
3. A expressão relativa do mRNA do RECK não varia após castração e reposição androgênica, considerado o padrão interno  $\beta$ -actina.
4. Foi encontrado um balanço entre a expressão epitelial e estromal de RECK, após castração, com diminuída expressão no epitélio e aumentada expressão nas células musculares lisas e fibroblastos, o que parece ser responsável pela manutenção dos níveis totais de mRNA no órgão durante a privação androgênica. A reposição por testosterona restaura a distribuição observada nos controles.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER CM, WERB Z. Extracellular Matrix Degradation. In Hay ED. **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Plenum Press, New York. p. 225-302, 1991.
- ANGELSEN A, MECSEI R, SANDVIK AK, WALDUM HL. Neuroendocrine cells in the prostate of the rat, guinea pig, cat, and dog. **Prostate** 33: 18-25, 1997.
- ANTONIOLI E, DELLA-COLLETA HH, CARVALHO HF. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. **J Androl** 25: 50-6, 2004.
- AUMULLER G. Prostate gland and seminal vesicles. In: **Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen**. Edited by A. Okche and L. Vollrath. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, vol. VII/6,p.1, 1979.
- BOSTWICK DG, WHEELER TM, BLUTE M, BARRETT DM, MACLENNAN GT, SEBO TJ, SCARDINO PT, HUMPHREY PA, HUDSON MA, FRADET Y, MILLER GJ, CRAWFORD ED, BLUMENSTEIN BA, MAHRAN HE, MILES BJ. Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. **Urology** 48: 47-57, 1996.
- BRANDES D. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. **Int Rev Cytol** 20: 207-76, 1966.
- BRANDSTROM A, WESTIN P, BERGH A, CAJANDER S, DAMBER JE. Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in an androgen-sensitive prostatic adenocarcinoma in the rat. **Cancer Res** 54: 3594-601, 1994.
- BRAWER MK, DEERING RE, BROWN M, PRESTON SD, BIGLER SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. **Cancer** 73: 678-87, 1994.
- BUTTYAN R, SHABSIGH A, PERLMAN H, COLOMBEL M. Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. **Trends Endocrinol Metab** 10: 47-54, 1999.
- CARVALHO HF, LINE SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. **Cell Biol Int** 20: 809-819, 1996.
- CARVALHO HF, TABOGA SR, VILAMAIOR PSL. Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. **Tissue Cell** 29: 163-170, 1997a.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR. The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. **Prostate** 32: 27-34, 1997b.

- CATERINA JJ, YAMADA S, CATERINA NC, LONGENECKER G, HOLMBACK K, SHI J, YERMOVSKY AE, ENGLER JA, BIRKEDAL-HANSEN H. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem* 275: 26416-26422, 2000.
- CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11: S37-43, 2001.
- COLLINS AT, HABIB FK, MAITLAND NJ, NEAL DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci.* 114: 3865-72, 2001.
- CORBIER P, MARTIKAINEN P, PESTIS J, HARKONEN P. Experimental research on the morphofunctional differentiation of the rat ventral prostate: roles of the gonads at birth. *Arch Physiol Biochem* 103: 699-714, 1995.
- COUSSENS LM, TINKLE CL, HANAHAN D, WERB Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490, 2000.
- CUNHA GR, DONJACOUR AA, COOKE PS, MEE S, BIGSBY RM, HIGGINS SJ, SUGIMURA Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8: 338-62, 1987.
- CUNHA GR, ALARID ET, TURNER T, DONJACOUR AA, BOUTIN EL, FOSTER BA. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl* 13: 465-75, 1992.
- DAVIES B, WAXMAN J, WASAN H, ABEL P, WILLIAMS G, KRAUSZ T, NEAL D, THOMAS D, HANBY A, BALKWILL F. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 53: 5365-9, 1993.
- DAVIES P, EATON CL. Regulation of prostate growth. *J Endocrinol* 131: 5-17, 1991.
- DONJACOUR AA, CUNHA GR. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* 128: 1-14, 1988.
- ENGEL G, LEE C, GRAYHACK JT. Acid ribonuclease in rat prostate during castration-induced involution. *Biol Reprod* 22: 827-31, 1980.
- FENG X, CLARK RA, GALANAKIS D, TONNESEN MG. Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alpha v/beta 3 mRNA by fibrin 1. *J Invest Dermatol* 113: 913-9, 1999.
- FLÓREZ MG, CARVALHO HF. Célula Epitelial Prostática. In: **Células: Uma Abordagem Multidisciplinar**. Edited by Carvalho HF and Collares-Buzato. Manole, Barueri-SP. p. 335-338, 2005.

- FRANK-LISSBRANT, I.; STATTIN, P.; DAMBER, J.E.; BERGH, A. Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. **Prostate** 33: 38-45, 1997.
- FREEMAN SN, RENNIE PS, CHAO J, LUND LR, ANDREASEN PA. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators are suppressed by cortisol in the involuting prostate of castrated rats. **Biochem J** 269: 189-93, 1990.
- FURUMOTO K, ARII S, MORI A, FURUYAMA H, GORRIN RIVAS MJ, NAKAO T, ISOBE N, MURATA T, TAKAHASHI C, NODA M, IMAMURA M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology** 33: 189-195, 2001.
- GIAMBERNARDI TA, GRANT GM, TAYLOR GP, HAY RJ, MAHER VM, MCCORMICK JJ, KLEBE RJ. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. **Matrix Biol** 16: 483-496, 1998.
- GRANT GM, GIAMBERNARDI TA, GRANT AM, KLEBE RJ. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. **Matrix Biol** 18: 145-148, 1999.
- GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A** 48: 1014-1022, 1962.
- GUYTON AC. **Tratado de Fisiologia Médica**. 6ªed. Interamericana. Rio de Janeiro, p.926, 1984.
- HAGGSTROM S, LISSBRANT IF, BERGH A, DAMBER JE. Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. **J Urol** 161: 1620-5, 1999.
- HALL BR. **Developmental and Cellular Skeletal Biology**. Academic, New York, 1978.
- HAM A, CORMACK DH. **Histologia**. Guanabara / Koogan, 9ªed. RJ, 570p, 1991.
- HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell** 86: 353-364, 1996.
- HASHIMOTO K, KIHIRA Y, MATUO Y, USUI T. Expression of matrix metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate. **J Urol** 160: 1872-19876, 1998.
- HAY ED. **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Plenum, New York, 1981.
- HAY ED. Extracellular matrix alters epithelial differentiation. **Curr Biol** 5: 1029-1035, 1983.
- HAYASHI N, SUGIMURA Y, KAWAMURA J, DONJACOUR AA, CUNHA GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biol Reprod** 45: 308-21, 1991.

- HAYEK OR, SHABSIGH A, KAPLAN SA, KISS AJ, CHEN MW, BURCHARDT T, BURCHARDT M, OLSSON CA, BUTTYAN R. Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. **J Urol** 162: 1527-31, 1999.
- HAYWARD SW, CUNHA GR. The prostate: development and physiology. **Radiol Clin North Am** 38: 1-14, 2000.
- HAYWARD SW, HAUGHNEY PC, ROSEN MA, GREULICH KM, WEIER HU, DAHIYA R, CUNHA GR. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. **Differentiation** 63: 131-40, 1998.
- HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **Brit J Urol** 79 Suppl 2: 18-26, 1997.
- HEYNS W. Androgen-regulated proteins in the rat ventral prostate. **Andrologia** 22 Suppl 1: 67-73, 1990.
- HIB J, MAGARINOS GA. Effects of castration, androgen replacement and flutamide treatment on the contractile function of the rat prostate. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam** 39: 281-7, 1989.
- HIDALGO M, ECKHARDT SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J Natl Cancer Inst** 93: 178-193, 2001.
- HU Z, ITO T, YURI K, XIE C, OZAWA H, KAWATA M. In vivo time course of morphological changes and DNA degradation during the degeneration of castration-induced apoptotic prostate cells. **Cell Tissue Res** 294: 153-60, 1998.
- HUDSON DL, GUY AT, FRY P, O'HARE MJ, WATT FM, MASTERS JR. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. **J Histochem Cytochem** 49: 271-8, 2001.
- ICHIHARA I, KALLIO M, PELLINIEMI LJ. Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. **Cell Tissue Res** 192: 381-90, 1978.
- ILIO KY, NEMETH JA, SENSIBAR JA, LANG S, LEE C. Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. **Prostate** 43: 3-10, 2000.
- KABALIN JN, PEEHL DM, STAMEY TA. Clonal growth of human prostatic epithelial cells is stimulated by fibroblasts. **Prostate** 14: 251-263, 1989.
- KAHARI VM, SAARIALHO-KERE U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Ann Med** 31: 34-45, 1999.

- KASSEN A, SUTKOWSKI DM, AHN H, SENSIBAR JA, KOSLOWSKI JM, LEE C. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. **Prostate** 128: 89-97, 1996.
- KERR JF, SEARLE J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. **Virchows Arch B Cell Pathol** 13: 87-102, 1973.
- KHERADMAND F, RISHI K, WERB Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. **J Cell Sci** 115: 839-48, 2002.
- KIM HG, KASSIS J, SOUTO JC, TURNER T, WELLS A. EGF receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. **Histol Histopathol** 14: 1175-82, 1999.
- KITAYAMA H, SUGIMOTO Y, MATSUZAKI T, IKAWA Y, NODA M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. **Cell** 56: 77-84, 1989.
- KNOX JD, CRESS AE, CLARK V, MANRIQUEZ L, AFFINITO KS, DALKIN BL, NAGLE RB. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. **Am J Pathol** 145: 167-74, 1994.
- KUGLER A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Anticancer Res** 19:1589-1592, 1999.
- LABAT-ROBERT J, BIHARI-VARGA M, ROBERT L. Extracellular matrix. **FEBS Lett** 268: 386-93, 1990.
- LEE C, SENSIBAR JA, DUDEK SM, HIIPAKKA RA, LIAO ST. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. **Biol Reprod** 43: 1079-86, 1990.
- LEKAS E, JOHANSSON M, WIDMARK A, BERGH A, DAMBER JE. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. **Urol Res** 25: 309-14, 1997.
- LIN CQ, BISSELL MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB J** 7: 737-43, 1993.
- LLANO E, PENDAS AM, FREIJE JP, NAKANO A, KNAUPER V, MURPHY G, LOPEZ-OTIN C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. **Cancer Res** 59: 2570-6, 1999.
- LLANO E, PENDAS AM, KNAUPER V, SORSA T, SALO T, SALIDO E, MURPHY G, SIMMER JP, BARTLETT JD, LOPEZ-OTIN C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). **Biochemistry** 36: 15101-15108, 1997.
- LOHI J, LEHTI K, VALTANEN H, PARKS WC, KESKI-OJA J. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. **Gene** 242: 75-86, 2000.



- LOKESHWAR BL. MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 878: 271-289, 1999.
- MARCHENKO GN, STRONGIN AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 265: 87-93, 2001.
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* 253: 165-174, 2003.
- MASSAGUÉ J. A helping hand from proteoglycans. *Current Biol* 1: 117-119, 1991.
- MATRISIAN LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 6: 121-125, 1990.
- McNEAL JE. In: **Histology for Pathologists**. Ed. by S. S. Stenberg Ravan Press., New York., p-749-763, 1992.
- NAGAKAWA O, MURAKAMI K, YAMAURA T, FUJIUCHI Y, MURATA J, FUSE H, SAIKI I. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. *Cancer Lett* 155: 173-179, 2000.
- NELSON AR, FINGLETON B, ROTHENBERG ML, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149, 2000.
- NEMETH JA, LEE C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stroma organization. *Prostate* 28: 124-128, 1996.
- NODA M, KITAYAMA H, MATSUZAKI T, SUGIMOTO Y, OKAYAMA H, BASSIN RH, IKAWA Y. Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 162-166, 1989.
- NOTHNICK WB, SOLOWAY P, CURRY TE JR. Assessment of the role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) during the periovulatory period in female mice lacking a functional TIMP-1 gene. *Biol Reprod* 56: 1181-1188, 1997.
- O'BRIEN TS, HARRIS AL. Angiogenesis in urological malignancy. *Br J Urol* 76: 675-82, 1995.
- OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA RM, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE C, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, ITOH Y, SEIKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI C, NODA M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800, 2001.
- OH J, SEO DW, DIAZ T, WEI B, WARD Y, RAY JM, MORIOKA Y, SHI S, KITAYAMA H, TAKAHASHI C, NODA M, STETLER-STEVENSON WG. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK.

- Cancer Res** 64: 9062-9, 2004.
- OHTANI H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. **Pathol Int** 48: 1-9, 1998.
- PARK HI, NI J, GERKEMA FE, LIU D, BELOZEROV VE, SANG QX. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. **J Biol Chem** 275: 20540-20544, 2000.
- PARKS WC, MECHAM RP. **Matrix Metalloproteinases**. Academic Press, San Diego, 1998.
- POULSOM RM, PIGNATELLI WG, STETLER-STEVENSON ET AL. Stromal expression of 72 Kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. **Am J Pathol** 141: 389-394, 1992.
- PRICE D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Natl. Cancer Inst Monogr** 12: 1-27, 1963.
- PRINS GS, BIRCH L, GREENE GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. **Endocrinology** 129: 3187-99, 1991.
- PUPA SM, MENARD S, FORTI S, TAGLIABUE E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **J Cell Physiol** 192: 259-67, 2002.
- PYKE C, RALFKIAER E, TRYGGVASON K, DANO K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. **Am J Pathol** 142: 59-365, 1993.
- QI JH, EBRAHEM Q, MOORE N, MURPHY G, CLAEISSON-WELSH L, BOND M, BAKER A, ANAND-APTE B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nat Med** 9: 407-15, 2003.
- RADISKY D, HAGIOS C, BISSELL MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. **Semin Cancer Biol** 11: 87-95, 2001.
- RIDDICK AC, SHUKLA CJ, PENNINGTON CJ, BASS R, NUTTALL RK, HOGAN A, SETHIA KK, ELLIS V, COLLINS AT, MAITLAND NJ, BALL RY, EDWARDS DR. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. **Br J Cancer** 92: 2171-80, 2005.
- RISAU W, FLAMME I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 11: 73-91, 1995.
- ROBERTS R, GALLAGHER J, SPOONER E, ALLEN TD, BLOOMFIELD F, DEXTER TM. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stroma cell mediated haemopoiesis. **Nature** 332: 376-378, 1988.

- RODRIGUEZ R, POZUELO JM, MARTIN R, HENRIQUES-GIL N, HARO M, ARRIAZU R, SANTAMARIA L. Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. **Prostate** 57: 176-85, 2003.
- SASAHARA RM, TAKAHASHI C, SOGAYAR MC, NODA M. Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Braz J Med Biol Res** 32: 891-895, 1999.
- SENSIBAR JA, LIU XX, PATAI B, ALGER B, LEE C. Characterization of castration-induced cell death in the rat prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. **Prostate** 16: 263-76, 1990.
- SENSIBAR JA, GRISWOLD MD, SYLVESTER SR, BUTTYAN R, BARDIN CW, CHENG CY, DUDEK S, LEE C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in localization of an androgen-repressed gene product, sulfated glycoprotein-2. **Endocrinology** 128: 2091-102, 1991.
- SHABSIGH A, CHANG DT, HEITJAN DF, KISS A, OLSSON CA, PUCHNER PJ, BUTTYAN R. Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival. **Prostate** 36: 201-6, 1998.
- SHABSIGH A, TANJI N, D'AGATI V, BURCHARDT M, RUBIN M, GOLUBOFF ET, HEITJAN D, KISS A, BUTTYAN R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. **Endocrinology** 140: 1920-6, 1999.
- STEARNS M, STEARNS ME. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. **Oncol Res** 8: 69-75, 1996.
- STEARNS ME, WANG M. Type IV collagenase (M(r) 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. **Cancer Res** 53: 878-883, 1993.
- STERNLICHT MD, BISSELL MJ, WERB Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene** 19: 1102-13, 2000.
- STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol** 17: 463-516, 2001.
- STETLER-STEVENSON WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J Clin Invest** 103: 1237-1241, 1999.
- STOCKER W, GRAMS F, BAUMANN U, REINEMER P, GOMIS-RUTH FX, MCKAY DB, BODE W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins,

- adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci** 4: 823-840, 1995.
- STORY MT, LIVINGSTON B, BAETEN L, SWARTZ SJ, JACOBS SC, BEGUN FP, LAWSON RK. Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. **Prostate** 15: 355-365, 1989.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biol Reprod** 34: 961-71, 1986 a.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. **Biol Reprod** 34: 973-83, 1986 b.
- SUTKOWSKI DM, FONG JC, SENSIBAR JA, RADEMAKER AW, SHERWOOD ER, KOSLOWSKI JM, LEE C. Interaction of epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human epithelial cells in culture. **Prostate** 21: 133-143, 1992.
- TAKAHASHI C, AKIYAMA N, MATSUZAKI T, TAKAI S, KITAYAMA H, NODA M. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. **Oncogene** 12: 2137-2146, 1996.
- TAKAHASHI C, SHENG Z, HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K, KITaura Y, TAKAI S, SASAHARA RM, HORIMOTO A, IKAWA Y, RATZKIN BJ, ARAKAWA T, NODA M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **PNAS** 95: 13221-13226, 1998.
- TAKEDA I, LASNITZKI I, MIZUNO T. Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. **J Endocrinol** 110: 467-470, 1986.
- TIMMS BG, MOHS TJ, DIDIO LJ. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **J Urol** 151: 1427-32, 1994.
- TRESLTAD R. **Developmental Biology of the Extracellular Matrix**. Allan Liss, New York, 1987.
- TSUJIMURA A, KOIKAWA Y, SALM S, TAKAO T, COETZEE S, MOSCATELLI D, SHAPIRO E, LEPOR H, SUN TT, WILSON EL. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. **The J Cell Biol** 7: 1257-1265, 2002.
- UPADHYAY J, SHEKARRIZ B, NEMETH JA, DONG Z, CUMMINGS GD, FRIDMAN R, SAKR W, GRIGNON DJ, CHER ML. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human prostate: change in cellular localization

- associated with a high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Clin Cancer Res** 5: 4105-4110, 1999.
- VAN LEENDERS GJ, GAGE WR, HICKS JL, VAN BALKEN B, AALDERS TW, SCHALKEN JA, DE MARZO AM. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. **Am J Pathol** 162: 1529-37, 2003.
- VELASCO G, PENDAS AM, FUEYO A, KNAUPER V, MURPHY G, LOPEZ-OTIN C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. **J Biol Chem** 274: 4570-4576, 1999.
- VILAMAIOR PSL. **Estudo de Alguns componentes macromoleculares do estroma da próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP. 61p., 1998.
- VILAMAIOR PS, FELISBINO SL, TABOGA SR, CARVALHO HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate** 45: 253-8, 2000.
- VILAMAIOR PS. **Regulação hormonal e interações células-matriz extracelular na próstata ventral de ratos**. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP. 91p., 2003.
- WAKUI S, FURUSATO M, ITOH T, SASAKI H, AKIYAMA A, KINOSHITA I, ASANO K, TOKUDA T, AIZAWA S, USHIGOME S. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. **J Pathol** 168: 257-62, 1992.
- WANG Y, HAYWARD S, CAO M, THAYER K, CUNHA G. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation** 68: 270-9, 2001.
- WANG Z, JUTTERMAN R, SOLOWAY PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. **J Biol Chem** 275: 26411-26415, 2000.
- WEBBER MM. Polypeptide hormones and the prostate. **Prog Clin Biol Res** 75B: 63-88, 1981.
- WELM B, MOTT J, WERB Z. Vasculogenesis is a wreck without RECK. **Curr Biol** 12: R209-R211, 2002.
- WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell** 91: 439-442, 1997.
- WILSON MJ, WHITAKER JN, SINHA AA. Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat ventral prostate: evidence for castration-induced expression of cathepsin D in basal cells. **Anat Rec** 229: 321-33, 1991.
- WISEMAN BS, WERB Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science** 296: 1046-1049, 2002.

- WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 878: 388-403, 1999.
- WOOD M, FUDGE K, MOHLER JL, FROST AR, GARCIA F, WANG M, STEARNS ME. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 15: 246-258, 1997.
- YAMAMOTO M, MOHANAM S, SAWAYA R, FULLER GN, SEIKI M, SATO H, GOKASLAN ZL, LIOTTA LA, NICOLSON GL, RAO JS. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res* 56: 384-392, 1996.
- YOSHIMOTO M, ITOH F, YAMAMOTO H, HINODA Y, IMAI K, YACHI A. Expression of MMP-7 (PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 54: 614-618, 1993.
- ZHAO GQ, HOLTERHUS PM, DAMMSHÄUSER I, HOFFBAUER G, AUMÜLLER G. Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21: 183-199, 1992.