

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESDRAS LAUNI OLIVEIRA ESCOBAR



**ÁCIDOS GRAXOS COM DIFERENTES CARACTERÍSTICAS
AFETAM O CRESCIMENTO PROSTÁTICO E A EXPRESSÃO
DOS RECEPTORES DE ANDRÓGENO (AR) E DOS ATIVADORES
DA PROLIFERAÇÃO DOS PEROXISSOMOS γ (PPAR γ).**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Esdras Launi Oliveira Escobar</i> 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
Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Es18a

Escobar, Esdras Launi Oliveira

Ácidos graxos com diferentes características afetam o crescimento prostático e a expressão dos receptores de andrógeno (AR) e dos ativadores da proliferação dos peroxissomos γ (PPAR γ) / Esdras Launi Oliveira Escobar. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Receptores de andrógenos. 2. PPAR gama. 3. Dieta. 4. Ácidos graxos. 5. Próstata. I. Carvalho, Hernandes Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Dietary fatty acids regulate AR and PPAR γ levels and prostate growth.

Palavras-chave em inglês: Androgens receptors; PPAR gamma; Diet; Fatty acids; Prostate.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Hernandes Faustino de Carvalho, Antônio Carlos Boschero, Miguel Arcanjo Áreas.

Data da defesa: 31/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

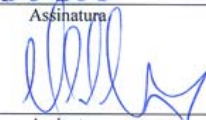
Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero


Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas


Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
Capítulo 1	
I – Introdução.....	10
1. A Glândula Prostática Humana.....	10
1.1 Relações Anatômicas.....	10
1.2 Vascularização.....	11
1.3 Inervação.....	11
1.3.1 O Componente Parassimpático (Crânio-Sacral).....	11
1.3.2 O Componente Simpático (Tóraco-Lombar).....	11
1.4 Embriogênese.....	12
1.5 Organização Histológica.....	14
1.6 A Secreção Prostática.....	15
1.7 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas-Próstata.....	16
2. A Estrutura da Próstata Ventral de Ratos.....	18
3. Receptores Nucleares e a Glândula Prostática.....	20
3.1 O Receptor de Andrógeno (AR).....	20
3.2 O Receptor dos Ativadores da Proliferação dos Peroxissomos γ (PPAR γ).....	20
3.2.1 Estrutura e isoformas.....	21
3.2.2 Mecanismo de ativação transcricional.....	22
3.2.3 PPAR γ e sua função celular.....	23
3.2.4 Regulação da expressão e modulação da atividade.....	23
3.2.5 PPAR γ e Câncer.....	24
4. Fatores Nutricionais Envolvidos Na Patogênese Prostática – O Papel Da Dieta.....	25
II – Justificativa.....	27
III – Objetivos.....	27

IV – Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo 2	
Artigo: Dietary fatty acids regulate AR and PPARγ levels and prostate growth	36
CONCLUSÕES GERAIS.....	60

AGRADECIMENTOS

Primeiramente Deus, acima de tudo.

Especialmente a minha família, por todo o apoio, incentivo e dedicação a mim dispensado.

Ao Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, orientador dessa tese.

Aos alunos de pós graduação/iniciação científica do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas.

A Lílian Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Aos amigos (os verdadeiros) que fiz aqui em Campinas, e que me ajudaram a suportar a tudo e a todos.

Aos professores que ajudaram na correção deste trabalho, desde a pré-banca até a banca.

Em especial aos professores da Universidade de Passo Fundo, Carmen Sílvia Busin (Departamento de Biologia Celular), e a Vera da Rosa Haas, Maristela Pretto Siviero e Heitor Verardi (Departamento de Histologia), que muito contribuíram para a minha formação teórico-didática.

A Fapesp e CNPq, pelo apoio financeiro.

“Aqueles a quem tu fazes feliz diga:
Não a bem quem para sempre dure,
Aqueles que a ti fazem mal lembra-lhes:
Não há mal que nunca acabe”
Maquiavel

RESUMO

A próstata é uma glândula acessória do trato reprodutor masculino. Muitos são os fatores envolvidos no carcinogênese prostática. Os nutricionais são usualmente associados com a etiopatogenia do câncer de próstata, sendo que os ácidos graxos estão entre os mais importantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos ácidos graxos presentes na dieta sobre o crescimento da próstata ventral de ratos, sobre a organização do tecido e sobre a expressão do receptor de andrógeno (AR) e do receptor dos ativadores da proliferação dos peroxissomos γ (PPAR γ). Ratos Wistar machos foram utilizados, divididos em 5 grupos que receberam dietas isocalóricas por 10 semanas após o desmame. O grupo I foi tratado com dieta cuja porção lipídica continha óleo de soja. O grupo II recebeu óleo de soja e óleo de linhaça (1:1). O grupo III foi alimentado com óleo de linhaça. O grupo IV teve na dieta óleo de soja e banha de porco (1:1). O grupo V foi tratado com banha de porco. Ao fim do tratamento, as próstatas foram removidas e processadas para imunohistoquímica ou congeladas para análises bioquímicas. Os níveis circulantes de testosterona e do estradiol foram medidos. Os ensaios demonstraram que a banha de porco e o óleo de linhaça causaram efeitos opostos em relação ao crescimento prostático. Enquanto o primeiro promoveu um aumento no peso prostático, o outro causou uma significativa diminuição no órgão. A análise histológica revelou nítida hiperplasia epitelial, que foi confirmada pela análise estereológica, em resposta ao tratamento com dieta contendo apenas banha de porco como componente lipídico. Esta estrutura epitelial está associada a um aumento na taxa de proliferação epitelial, como demonstrado pela quantificação de células em proliferação, com o uso do antígeno Ki67. Experimentos de imunohistoquímica e Western blotting demonstraram um aumento na expressão de AR e PPAR γ nos grupos que receberam banha de porco na dieta, enquanto o óleo de linhaça (contido) promoveu uma diminuição nos níveis de ambas as proteínas nucleares. Estes resultados sugerem que o crescimento prostático é influenciado por ácidos graxos presentes na dieta, e que esta influência pode ocorrer através de um aumento da expressão de AR e de PPAR γ . Estes dados sugerem que PPAR γ pode representar o elo de ligação entre a dieta e a predisposição ao câncer do próstata, sendo que a expressão e a função do AR podem ser alvos de regulação pelo PPAR γ . Como os níveis circulantes de testosterona mostraram-se alterados é também possível que as alterações prostáticas sejam secundárias aos efeitos sistêmicos da dieta.

ABSTRACT

The prostate is an accessory gland of the male reproductive tract. Many factors are involved in prostate carcinogenesis. Nutritional factors are usually associated with the etiopathogenesis of the prostate cancer and fatty acids are among the most important ones. The objective of this work was to evaluate the effect of dietary fatty acid on the rat ventral prostate growth, tissue organization, and expression of androgen receptor (AR) and peroxisome proliferation-activator receptor γ (PPAR γ). Male Wistar rats were used and divided in 5 groups that received isocaloric diets for 10 weeks after weaning. Group I was treated with soybean oil. Group II received soybean oil and linseed oil (1:1). Group III was fed on linseed oil. Group IV had soybean oil and rendered pork fat (1:1). Group V was treated with rendered pork fat. At the end of treatment, the prostates were removed and processed for immunohistochemistry or frozen for biochemical analyses. Circulating levels of testosterone and estradiol were measured. Experiments demonstrated that lard and linseed oil caused opposite effects on prostatic growth. While the former promoted an increase in prostatic weight, the latter resulted in a significantly lighter organ. Epithelial hyperplasia was observed by histological inspection and confirmed by stereology as the major tissue response to the rendered pork fat diet. This aspect was associated with higher proliferative rates as demonstrated by counting proliferating cell expressing the KI-67 antigen. Immunohistochemistry and Western blotting demonstrated increased expression of AR and PPAR γ in groups receiving lard as the source of fatty acids, while linseed oil promotes a decrease on the protein levels of both nuclear receptors. These results suggest that prostate growth is influenced by dietary fatty acids and that this influence might occur via enhanced expression of PPAR γ and AR. One suggests that PPAR γ might represent the link between diet and predisposition to prostate cancer and that AR expression and function could be targeted by PPAR γ activation. Since the levels of circulating testosterone were altered it is also possible that prostatic changes are secondary to systemic effects of the diet.

I – INTRODUÇÃO

1. A Glândula Prostática Humana

1.1 Relações Anatômicas

A próstata, anatomicamente apresenta (Moore & Dalley 2001) uma:

Base intimamente relacionada com o colo da bexiga urinária. Um ápice que está em contato com a fáscia na face superior dos músculos esfíncter da uretra e transverso profundo do períneo; uma face anterior muscular, com fibras musculares orientadas transversalmente e que são contínuas interiormente, com o músculo esfíncter da uretra que, por sua vez, é separado da sínfise púbica por gordura retroperitoneal situada no espaço retropúbico; uma face posterior que está relacionada com a ampola do reto e faces ínfero-laterais que estão relacionadas com o músculo elevador do ânus.

Embora não sejam claramente distintos anatomicamente, a próstata apresenta quatro lobos.

O lobo anterior, ou istmo, situa-se anteriormente à uretra. Ele é fibromuscular, com as fibras musculares representando uma continuação superior do músculo esfíncter da uretra, contendo pouco tecido glandular;

O lobo posterior situa-se atrás da uretra e abaixo dos dutos ejaculatórios, sendo prontamente palpável através do exame retal digital;

Os lobos laterais em ambos os lados da uretra, que formam a parte principal da próstata.

O lobo médio (mediano) situa-se entre a uretra e os dutos ejaculatórios e está intimamente relacionado com o colo da bexiga urinária.

1.2 Vascularização

As artérias prostáticas são os ramos principais da artéria ilíaca interna, especialmente das artérias vesicais inferiores, mas também das artérias pudenda interna e retal média. As veias unem-se para formar um plexo em torno dos lados e da base da próstata. Este plexo venoso, localizado entre a cápsula fibrosa da próstata e a “bainha prostática”, drena para as veias ilíacas internas. Este plexo é contínuo, superiormente, com

o *plexo venoso vertebral interno*. Os vasos linfáticos terminam principalmente nos *linfonodos ilíacos internos e sacrais* (Moore & Dalley 2001).

1.3 Inervação Prostática

A abundância de receptores muscarínicos e adrenérgicos, e fibras nervosas do sistema nervoso autônomo (SNA), indicam significativo papel do sistema nervoso no crescimento, maturação e nas funções secretoras da próstata (McVary et al. 1998; Nadelhaft, 2003). A distribuição segmentar na localização dos centros autonômicos na medula espinhal possibilita suprimento nervoso a todas as estruturas pélvicas. Fibras simpáticas pré-ganglionares nascem dos segmentos lombares da medula e encaminham-se na direção pélvica, via nervo hipogástrico, fazendo sinapse no gânglio hipogástrico, de onde partem fibras nervosas pós-ganglionares que inervarão as estruturas da pelve, inclusive a próstata. A inervação parassimpática da região pélvica é proveniente do nervo pélvico, composto por axônios pré-ganglionares originados na região sacral da medula espinhal (McVary et al. 1998; Kihara et al. 1998).

1.3.1 O Componente Parassimpático (Crânio-Sacral)

O ramo parassimpático é responsável pelo controle secretomotor das glândulas prostáticas (Wang et al. 1991). Receptores muscarínicos são encontrados no epitélio prostático que compõem os ácinos. A ativação desses receptores provoca secreção glandular (Pennefather et al. 2000). As fibras colinérgicas suprem ainda os tecidos pré e periprostáticos (Keast 1995; Schafer et al. 1998); havendo evidências da existência de alguns receptores colinérgicos no estroma prostático (Hedlund et al. 1985; James et al. 1989). Dail (1993) sugere que terminações colinérgicas possam atuar na regulação da contração (mediada pelo SNA) das células musculares lisas prostáticas.

1.3.2 O Componente Simpático (Tóraco-Lombar)

A inervação simpática inerva as células musculares lisas capsulares e estromais (McVary et al. 1998). O rico suprimento simpático da próstata humana atua via receptores adrenérgicos α_1 e β_2 (Kawabe et al. 1990, Chapple et al. 1994). Os receptores β_2 prostáticos são em parte responsáveis pela regulação da síntese protéica, expressão de mRNA, da

secreção e pela manutenção da histoarquitetura do órgão. Além disso, catecolaminas como a norepinefrina, também exercem efeitos mitogênicos em células do compartimento estromal. Estes ligantes sozinhos ou em conjunto com andrógenos podem atuar como importantes reguladores da fisiologia prostática (Thompson et al. 1987, Lefkowitz & Caron 1988; McVary et al. 1998). Contudo, a presença de receptores adrenérgicos, sua regulação por andrógenos e o efeito mitogênico direto de algumas catecolaminas sugerem que estes receptores possam desempenhar um papel fundamental na modulação fisiológica e no crescimento prostático. Estudos demonstraram aumento nos níveis de apoptose em células prostáticas de homens tratados com antagonistas α_1 -adrenérgicos (Litvak et al. 1997, McVary et al. 1998).

1.4 Embriogênese

Durante seu desenvolvimento, a próstata passa por etapas distintas até a sua maturação tecidual completa tanto do parênquima como do estroma (Moore, 2004). Os primeiros indícios embriológicos da formação da próstata aparecem entre a 9ª e a 10ª semana de gestação em humanos. A morfogênese prostática inicia-se pelo brotamento de botões epiteliais que surgem a partir do seio urogenital e avançam em direção ao mesênquima circundante (Figura 1). Enquanto o epitélio prostático é derivado da camada endodérmica, as estruturas de Wolff, assim como as vesículas seminais, os dutos deferentes e o epidídimo são derivadas do mesoderma. Embora estes tecidos tenham em comum sua dependência androgênica, a sua origem diferenciada pode ter importância nos seus crescimento e fisiologia.

Aproximadamente na 18ª semana de gestação, já é possível observar os tipos celulares basais e luminais. As células epiteliais prostáticas maduras expressam as citoqueratinas (CK) 8 e 18, no caso das células luminais, e a maioria das células basais, expressa as CK 5 e 14. As células basais do seio urogenital expressam ampla gama de marcadores (CK8, CK18, CK14, CK5, CK19 e p63), os quais decrescem progressivamente durante o desenvolvimento. A segunda fase do desenvolvimento prostático, ocorre ainda durante a vida intra-uterina, entre o 8º mês de gestação e o 2º mês de vida pós-natal, caracterizando-se por ser um período de morfogênese epitelial e mesenquimal. A terceira fase (infantil) é uma fase de repouso, que se estende do segundo mês pós-natal até por volta

de 10 a 12 anos, dependendo do indivíduo. Embora esse período seja considerado de repouso, nele acontecem eventos subcelulares (principalmente moleculares e *imprinting* genético) que determinam os fenótipos futuros de grupos individuais no parênquima e, possivelmente, também no estroma. A quarta fase corresponde à maturação puberal, que ocorre entre os 12 e 18 anos, quando ocorre aumento da proliferação celular, diferenciação e morfogênese tecidual (McNeal 1997; Bonkhoff & Remberger 1998; Marker et al. 2003).

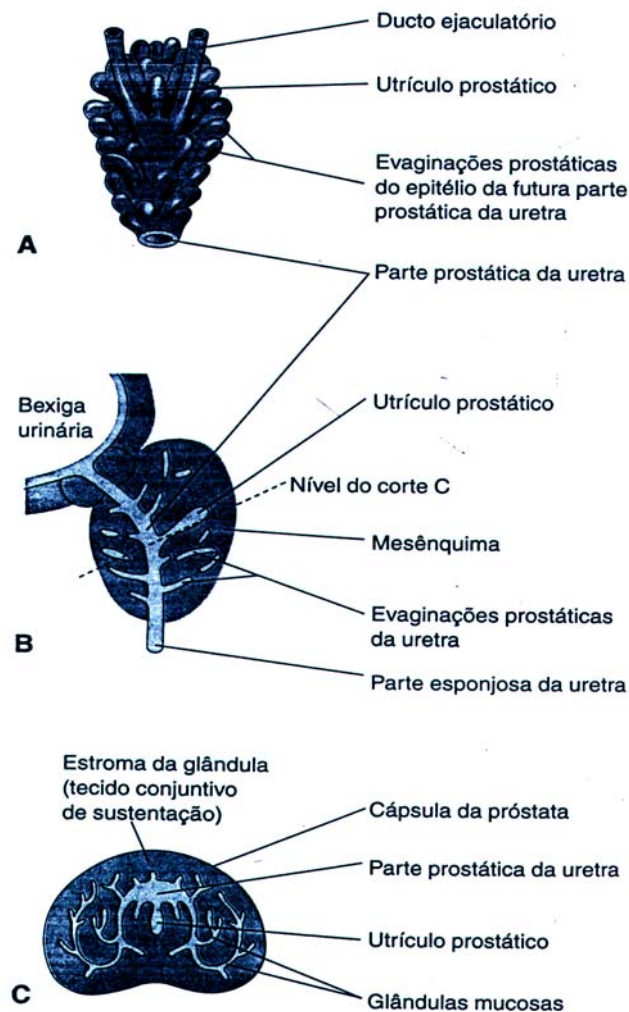


Fig. 1 – Etapas do desenvolvimento prostático, durante a embriogênese (Moore & Persaud 2004).

A partir dos 20 anos até a idade avançada, os compartimentos prostáticos não são estáticos, já que as células estão envolvidas em contínua seqüência de eventos que incluem proliferação e diferenciação celular, variações nos níveis de atividade decorrentes de alterações hormonais e apoptose (McNeal, 1997; Garcia-Flórez *et al.*, 2005).

1.5 Organização Histológica

A próstata é envolvida externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso não-modelado, ricamente vascularizado, com fibras musculares e fibras colágenas do tipo I, orientadas transversalmente. A próstata é uma glândula composta. Seu parênquima é formado por um aglomerado de 30 a 50 glândulas túbulos-alveolares compostas, individuais, dispostas em três discretas camadas concêntricas: mucosa, submucosa e principal (Figura 2). Cada glândula túbulo-alveolar possui seu próprio duto, que transfere o produto de secreção da unidade secretora para a uretra prostática. As glândulas mucosas situam-se próximas à uretra, sendo as menores glândulas. As glândulas submucosas localizam-se perifericamente às glândulas mucosas, sendo conseqüentemente maiores que estas. As maiores e as mais numerosas são as glândulas principais, mais periféricas, que compõem o corpo da próstata (Gartner & Hiatt 1999; Junqueira & Carneiro 2004; Kierszenbaum, 2004).

As glândulas prostáticas são formadas por epitélio que varia de células epiteliais, cúbicas ou cilíndricas (epitélio pseudoestratificado), chamadas células epiteliais luminiais, que são responsáveis pela atividade secretora. Existem ainda células epiteliais basais que apresentam capacidade proliferativa. Além destas, são também encontradas células neuroendócrinas (Ichihara *et al.*, 1978; Zaviacic, 1999; Santos *et al.*, 2003; Kierszenbaum, 2004). A luz das glândulas prostáticas freqüentemente exibe concreções (*corpora amylacea*), redondas ou ovais, compostas de glicoproteínas calcificadas, cuja quantidade aumenta de acordo com a idade do indivíduo.

O compartimento estromal prostático, além de abundante vascularização, terminações nervosas eferentes e gânglios sensitivos, compõe-se também de populações de fibroblastos, macrófagos e células musculares lisas, dentre outras, imersas em uma matriz extracelular (MEC) composta por colágeno I, III e VI, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas (Carvalho *et al.*, 1996; Izumiya e Nakada, 1997; Tuxhorn *et al.*, 2001; Della-Colleta, 2005).

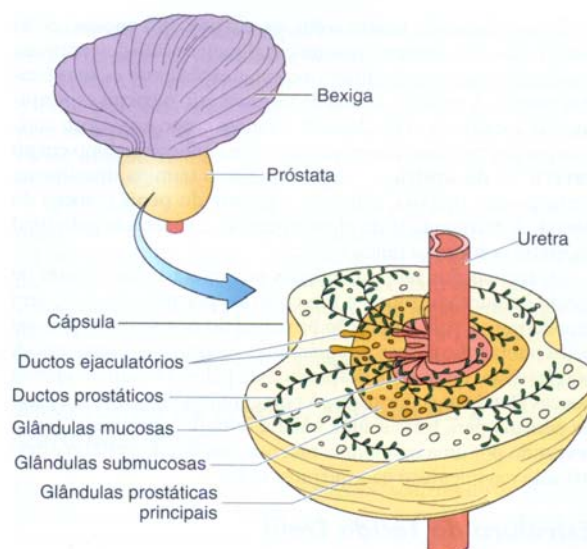


Fig. 2 – Diagrama da próstata humana, indicando suas regiões e organização (Gartner & Hiatt 1999).

Segregando o epitélio do estroma há uma lâmina basal contínua, que auxilia no controle da atividade epitelial (Hayward *et al.*, 1998). Composta por colágeno IV, proteoglicanos (perlecan e biglican) e glicoproteínas adesivas (laminina e entactina), a lâmina basal é de suma importância no que se refere à manutenção do fenótipo diferenciado e secretor do epitélio glandular (Labat-Robert *et al.*, 1990). Apesar de separados topologicamente, epitélio e estroma apresentam íntima interação funcional, essencial na regulação e manutenção da atividade do órgão (Cunha *et al.*, 1996; Lee 1996; Lin e Bissel 1993).

1.6 A Secreção Prostática

A contribuição prostática ao ejaculado (3,5 mL) usualmente é de 0,5 a 1,0 mL. O fluido tem como característica um alto conteúdo de enzimas proteolíticas, como o antígeno específico da próstata (PSA), o ativador de plasminogênio e a fosfatase ácida específica da próstata (PAP), além de espermina e espermidina, zinco e citrato dentre outros íons, e colina. As funções destes compostos são desconhecidas, mas a função antimicrobiana do zinco pode ser mencionada. Além disso, há várias formas de secreção, sendo que grande variedade de proteínas é produzida e secretada. Além dos compostos solúveis, a glândula prostática secreta partículas definidas, chamadas de prostassomos. As células epiteliais

acinares são responsáveis pela atividade secretora; duas diferentes formas de liberação de material têm sido observadas nas células epiteliais. Na primeira, do tipo *merócrina* são formados grânulos secretores que são transferidos ao pólo apical da célula onde ocorre a fusão da membrana do grânulo com a membrana plasmática, de forma que o conteúdo seja liberado. As unidades secretoras básicas são grânulos prostáticos secretores (PSGs), estruturas citoplasmáticas de caráter eosinofílico, de aproximadamente 1 µm de diâmetro. Elas se concentram no terço apical da célula epitelial luminal, atuando como reservatório enzimático. Na secreção *apócrina* há a liberação de parte do conteúdo citoplasmático que corresponde ao material de secreção, sem o envolvimento de grânulos. As proteínas secretadas são sintetizadas em ribossomos livres no citoplasma. Aparentemente esse mecanismo de secreção contribui muito para o aumento da viscosidade da secreção (Guyton 2004; Junqueira & Carneiro 2004; Kierszenbaum 2004; Garcia-Flórez & Carvalho 2005).

1.7 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas-Próstata

O controle neuroendócrino do metabolismo, do crescimento e de certos aspectos da reprodução é mediado por uma combinação de sistemas neurais e endócrinos centrados no eixo hipotálamo-hipófise (Klonoff e Karam, 1995).

A hipófise é constituída pelo lobo anterior (adeno-hipófise), lobo intermediário e lobo posterior (neuro-hipófise). A secreção de gonadotrofinas (hormônios luteinizante – LH e folículo-estimulante – FSH) pela adeno-hipófise é regulada pelo hipotálamo, através do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Klonoff e Karam, 1995).

O LH é uma glicoproteína que estimula a oogênese na fêmea e a espermatogênese no macho. Neste último, a sua principal ação ocorre através do estímulo da produção de testosterona pelas células de Leydig, (Klonoff e Karam, 1995).

Os andrógenos são requeridos para o crescimento normal e atividades funcionais da próstata (Figura 3). No homem, os principais andrógenos circulantes são a testosterona (T) e a 5α-diidrotestosterona (DHT). A primeira é produzida, na sua maior parte (cerca de 95%), pelos testículos. As glândulas adrenais contribuem com menos de 5% da produção dos esteróides sexuais (Coffey, 1992), sendo regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Nos dois tecidos existem pelo menos duas vias biossintéticas a partir da

pregnenolona. A via predominante é a δ -5, que resulta na produção de androstenediona e testosterona. Já a via δ -4, menos proeminente, leva à síntese de deidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediol. Uma vez sintetizada, a maior parte da DHEA é inativada via sulfatação, enquanto uma pequena fração é convertida em androstenediona e a seguir em T, nos tecidos periféricos e na próstata (Cheng *et al.*, 1993).

Em homens saudáveis, os andrógenos adrenais contribuem discretamente na função prostática normal, embora em estados tumorais prostáticos a contribuição da adrenal pode ser suficiente para promover o crescimento prostático, principalmente após orquiectomia (Geller *et al.*, 1984).

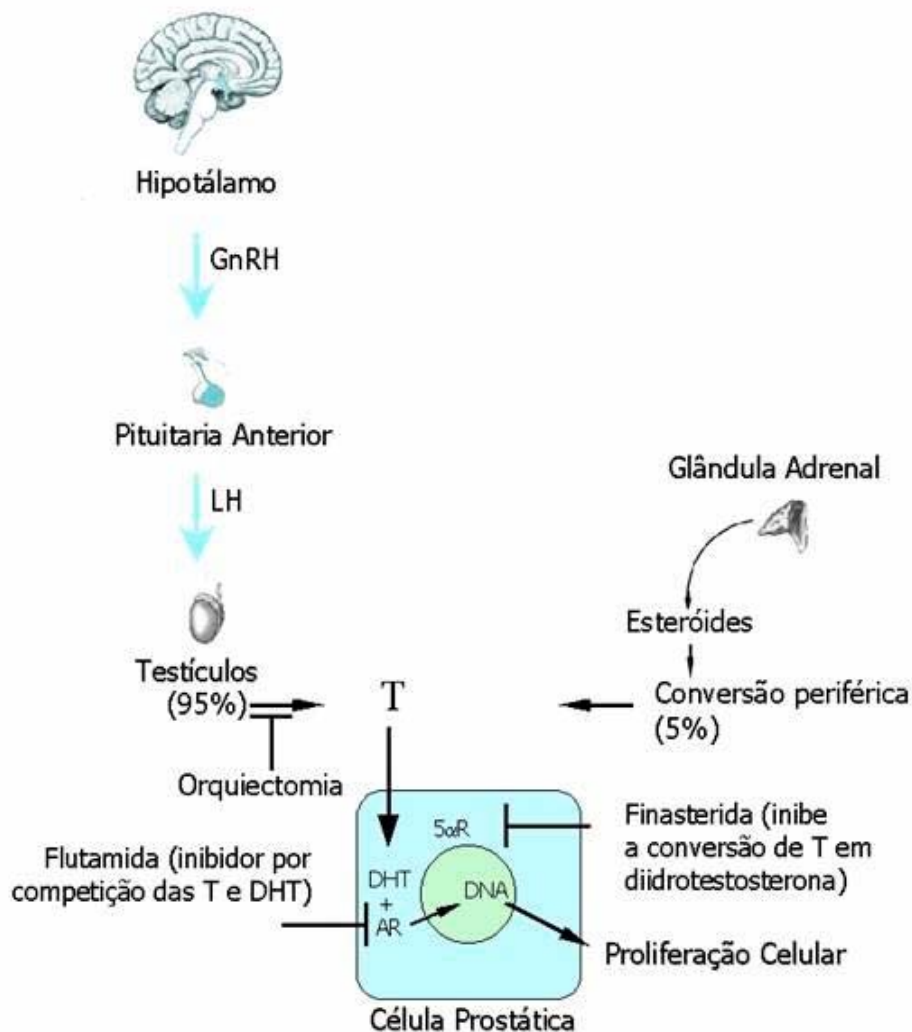


Fig. 3 – Esquema demonstrando as relações encontradas na regulação hormonal da glândula prostática (Cheng *et al.*, 1993).

Estima-se que apenas 2 a 3% da T encontram-se disponíveis em sua forma livre, sendo que o restante encontra-se ligado a proteínas séricas como a SHBG (do inglês, *sex hormone-binding globulin*), albumina e globulina de ligação com corticoesteróide (Vermeulen, 1973). Entre as três proteínas, a SHBG possui a maior afinidade pela testosterona.

A conversão de T em DHT, dá-se pela ação da enzima 5 α -redutase. Dois tipos de 5 α -redutases foram identificados. A 5 α -redutase tipo I encontra-se na maioria dos tecidos, enquanto a 5 α -redutase tipo II, que é codificada pelo gene SRD5A2, localizado no cromossomo 2p23 (Labrie *et al.*, 1992), predomina nos tecidos genitais, incluindo a próstata. Quando a finasterida, inibidor específico da 5 α -redutase tipo II, foi administrada a homens para o tratamento de hiperplasia prostática benigna (BPH), os níveis séricos de DHT diminuíram cerca 70%, enquanto os níveis prostáticos diminuíram de 85 a 90% (Bartsch et al., 2000). A quantidade remanescente de DHT na próstata pode ser atribuída à ação da enzima tipo I.

A DHT intracelular é rapidamente metabolizada em uma reação reversível para 3 α , 17 β -androstenediol (3 α -diol) ou para 3 β ,17 β -androstenediol (3 β Adiol). A enzima responsável por esta via de inativação é a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase Tipo II (3 β -HSD). O 3 β Adiol é finalmente convertido irreversivelmente em esteróides inativos hidrossolúveis, através da ação da 3 β adiol hidroxilase (CYP7B1) (Martin et al., 2001).

2. A Estrutura da Próstata Ventral de Ratos

A próstata é composta por um conjunto de estruturas epiteliais túbulo-alveolares, nas quais as estruturas epiteliais encontram-se envolvidas por um estroma (Aümuller et al., 1979). Na próstata ventral de rato, cada lobo prostático consiste de oito conjuntos de dutos que se originam, a partir da uretra, como estrutura tubular simples que se ramifica distalmente. Esse conjunto de dutos é dividido em três regiões morfológica e funcionalmente distintas, denominadas proximal, intermediária e distal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee et al., 1990; Shabsigh et al., 1999). Na região distal, são encontradas células epiteliais colunares altas com atividade proliferativa, circundada por

células musculares lisas que formam uma camada esparsa e descontínua, associada a um grande número de fibroblastos (Nemeth e Lee, 1996). Na região intermediária, as células epiteliais também são colunares altas, apresentando características de células secretoras, sem atividade proliferativa. Nesta região, a camada de células musculares lisas é fina e contínua. Na região proximal, as células epiteliais são cúbicas e baixas, sendo freqüentes células apoptóticas e as células musculares lisas formam uma camada espessa. Tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os dutos e, ocasionalmente, intercalando a camada de células musculares lisas.

Já na próstata ventral de ratos, as CML ocupam cerca de 5% do volume total da glândula e cerca de 14% do estroma (Antonioli *et al.*, 2003a). As CML têm um papel preponderante nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999) e, provavelmente, também sobre as demais células estromais.

Carvalho e Line (1996) descreveram as modificações associadas à membrana basal das células epiteliais e das células musculares lisas ocorridas após a privação de andrógenos, demonstrando que eventos apoptóticos seguem-se à perda de adesão da célula à membrana basal e que existe um retardo na absorção das membranas basais residuais, as quais se tornam extremamente pregueadas e laminadas e contêm moléculas intactas de laminina, mesmo após 21 dias de castração. Por outro lado, Ilio e colaboradores, (2000) observaram que a laminina está presente uniformemente na membrana basal ao longo do sistema de dutos prostáticos, enquanto o colágeno tipo IV é encontrado na membrana basal da região distal e intermediária, embora esteja praticamente ausente na região proximal. Eles também demonstraram que o processo de involução prostática inicia-se com a perda ou redução do colágeno tipo IV, nas diferentes regiões dos dutos, durante os primeiros dias após castração, enquanto a laminina permanece intacta. Após o período de pico de apoptose (3º e 4º dia após a castração), o colágeno tipo IV volta a ser encontrado na membrana basal dos dutos. Os autores sugerem uma associação direta entre aumento da apoptose e a perda de colágeno tipo IV.

3. Receptores Nucleares e a Glândula Prostática

3.1 O Receptor de Andrógeno (AR)

Os andrógenos influenciam a atividade prostática. Seus efeitos são mediados pelos receptores de andrógenos (AR), que influenciam as interações epitélio-estroma (Cunha et al. 2004). A expressão inicial da proteína do AR está exclusivamente restrita ao mesênquima. A expressão de AR nas células epiteliais ocorre através da indução pelas células estromais, simultaneamente aos processos de diferenciação e de maturação mesenquimal. O estroma prostático do adulto é composto de grande quantidade de músculo liso, que expressa AR, bem como de fibroblastos na região interacinar (Cunha 1996; Farnsworth 1999). O AR é membro da superfamília dos receptores nucleares. Ele age como um fator da transcrição, mediando não somente o crescimento dependente do andrógeno, mas também o crescimento andrógeno independente, no caso das células tumorais prostáticas (Haag et al. 2005).

O AR, assim que é sintetizado, localiza-se no citoplasma da célula associado com um complexo de múltiplas proteínas (chaperonas) em conformação que previne a ligação com o DNA (Feldman e Feldman, 2001). Assim que o receptor se liga ao ligante (T ou DHT), ele sofre mudança conformacional e é translocado para o núcleo onde irá ativar a transcrição de genes específicos. As mudanças conformacionais induzidas pela interação com o ligante forma um homodímero que pode então se ligar aos elementos da resposta aos andrógenos (AREs) nas regiões promotoras de genes alvos (Feldman e Feldman, 2001; Papakonstanti, 2003).

3.2 O Receptor dos Ativadores da Proliferação dos Peroxissomos γ (PPAR γ)

Os organismos dispõem de eficientes mecanismos que permitem adaptar as respostas metabólicas e funcionais a sinais extracelulares como hormônios e fatores nutricionais. Ácidos graxos (AG) são macronutrientes importantes na dieta de todos os animais. Sua ingestão provê o organismo de energia e de componentes necessários à síntese de lipídios complexos. Certos AG podem se ligar covalentemente a proteínas, outros são precursores de moléculas sinalizadoras como eicosanóides. Entretanto, os AG podem ainda

afetar a expressão gênica causando alterações significativas no metabolismo, na diferenciação e no crescimento celulares. Os efeitos dos AG sobre a expressão gênica refletem em ajuste do organismo à quantidade e à composição dos mesmos na dieta. Este ajuste pode ocorrer através de receptores que reconhecem e se ligam à moléculas específicas. Fatores de transcrição, cuja atividade é regulada por AG, foram identificados em bactérias, anfíbios e mamíferos. Particularmente em mamíferos, destaca-se, entre outros, o receptor dos ativadores da proliferação dos peroxissomos (*PPAR*) (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) (Curi, et al. 2002).

3.2.1 Estrutura e isoformas

Clonados como membros de uma subfamília por Issemann e Green (1990), os PPARs são membros da superfamília dos receptores nucleares, que apresentam uma única cadeia polipeptídica com 5 domínios (Figura 4). O domínio A/B, localizado na região N-terminal, é pouco conservado entre as três isoformas de PPARs e é responsável pela função de transativação independente de ligante – AF-1 (Schoonjans, et al. 1996). O estado de fosforilação deste domínio contribui para a modulação da atividade do PPAR α e γ (Shalev et al. 1997; Adams et al. 1997). O domínio central (domínio C) é altamente conservado e corresponde à região de ligação ao DNA, sendo também conhecido como domínio de ligação ao DNA (DBD – do inglês, *DNA binding domain*). Este domínio apresenta duas regiões denominadas “*zinc fingers*”, ou seja, dois arranjos protéicos constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central. Esta estrutura confere ao receptor maior estabilidade, para que este se ajuste na fenda maior da dupla hélice do DNA e forme associações firmes com as regiões regulatórias dos genes-alvo (Schoonjans, et al. 1996; Beato M, 1995). O domínio de ligação aos ligantes (LDB - do inglês, *ligand binding domain*) ou E/F é a porção do receptor que se liga ao ligante/ativador, sendo responsável pela função de transativação dependente de ligante (AF-2)(Schoonjans K, et al. 1996; Dowell et al. 1997). Na Figura 1 está apresentada a estrutura geral dos PPARs. Três isoformas de PPAR foram identificadas (α , β e γ). Elas são codificadas por genes distintos com padrão distinto de expressão em humanos (Schoonjans K, et al. 1996; Kersten et al. 2000; Bishop-Bailey 2000).

3.2.2 Mecanismo de ativação transcricional

A função dos PPARs, como fatores de transcrição, é ligante-dependente. Quando ativados por ligantes, os PPARs modulam a expressão de genes pela ligação com o elemento responsivo ao PPAR (PPRE, do inglês, *Peroxisome Proliferator Response Element*) que são seqüências repetidas diretas de hexanucleotídeos, separadas por uma base (DR1) e localizadas na região reguladora (promotor) dos genes que estão sob seu controle transcricional. Para se ligar ao PPRE com alta afinidade e para a efetiva transcrição, o PPAR requer um outro fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR) (Gearing et al. 1993). Kliewer et al. (1992) demonstraram por co-imunoprecipitação, que o PPAR e RXR formam um heterodímero e que este complexo ativa a transcrição da acil-CoA oxidase em resposta ao ácido clofíbrico (ligante do PPAR) ou ácido 9-*cis* retinóico (ligante do RXR). A exposição simultânea de ambos os ativadores revelou que existe um sinergismo na indução da expressão de genes-alvo por estes fatores de transcrição.

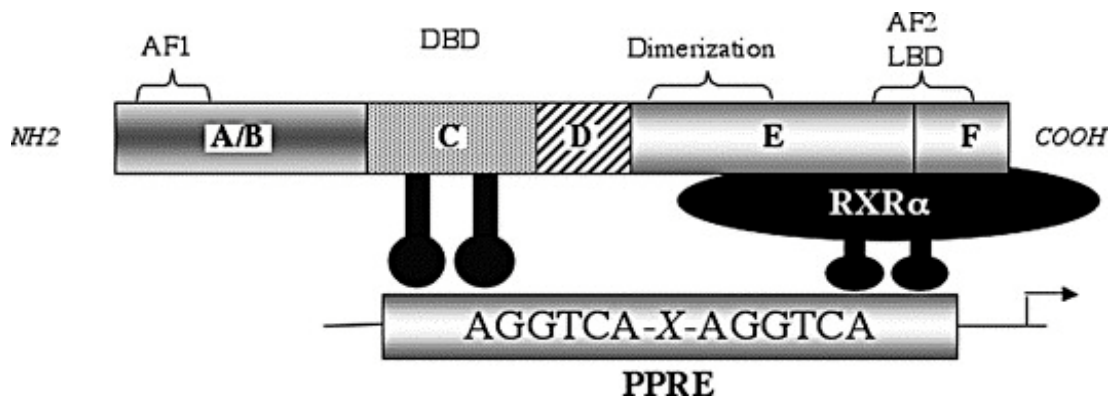


Fig. 4 – Estrutura e ativação do PPAR (Diradourian *et al.*, 2005).

Em estudos recentes foram identificadas proteínas co-repressoras e co-ativadoras que interagem com os PPAR, desempenhando papel importante na atividade transcricional destes receptores. A interação dos PPARs com os ligantes gera alterações conformacionais do receptor, que permite o recrutamento de co-ativadores (como o SRC-1 e o complexo CBP/p300) e a liberação de co-repressores (como o NcoR) (Dowell et al. 1999; DiRenzo et al. 1997).

3.2.3 PPAR γ e sua função celular

O PPAR γ influencia a estocagem de AG no tecido adiposo e contribui para a diferenciação de adipócitos (Schhoojans et al. 1996; Rosen, 1999). A maior parte dos genes-alvo do PPAR γ em adipócitos está diretamente implicada na lipogênese, incluindo a lipoproteína lipase (LPL), proteína que se liga a AG em adipócitos (aP2 ou A-FABP), a acil-CoA sintase e a proteína transportadora de AG (FATP) (Schhoojans et al. 1996; Rosen, 1999; Tontonoz et al. 1995, Kahn & Flier 2000). O PPAR γ expresso em monócitos e macrófagos vem sendo considerado como o regulador de algumas funções destas células. Em macrófagos, por exemplo, o PPAR γ regula negativamente a transcrição de interleucina 1 β (IL-1 β), IL6, fator de necrose tumoral α (TNF α), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) (Ricote et al. 1998; Tontonoz et al. 1998).

3.2.4 Regulação da expressão e modulação da atividade

São poucas as informações a respeito da expressão dos genes que codificam os PPARs e da modulação de sua atividade transcricional. Todavia, alguns estudos sugerem que a expressão dos PPARs esteja sob o controle hormonal, de AG e de citocinas.

PPAR γ é encontrado sob 3 isoformas e apresenta distribuição mais restrita que os demais (Schoonjans et al. 1996, Kersten et al. 2000, Michalik & Wahli 1999) PPAR γ 1 é encontrado em uma ampla gama de tecidos; ao passo que o PPAR γ 2 é restrito ao tecido adiposo; PPAR γ 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco (Fajas et al. 1998; Braissant et al. 1996, Kota et al. 2005). PPAR γ 1 e 2 diferem entre si por apenas 30 aminoácidos na extremidade N-terminal, codificados por um único exon. As duas isoformas, γ 1 e γ 2, são transcritas por diferentes promotores do mesmo gene e resultam de “splicing” alternativo do mRNA (Zhu 1995). O mRNA do PPAR γ 3 é traduzido em uma proteína diferente daquela do subtipo 1 (Curi, et al. 2002). Foi demonstrado que os tecidos prostáticos, normais e neoplásicos, expressam PPAR γ (Li et al. 2000; Segawa et al. 2002).

O fator de necrose tumoral (TNF α), as IL-1 α , IL-1 β e IL-6 e o fator inibidor de leucemia diminuem a expressão gênica do PPAR γ . Peróxido de hidrogênio, lipopolissacarídeos (LPS) e ésteres de forbol (PMA) também diminuem a expressão do PPAR γ (Tanaka et al. 1999). A regulação da atividade dos PPARs por mecanismo

independente de ligantes também é objeto de investigação. Este mecanismo envolve modificação do receptor por fosforilação e ação de co-ativadores e co-repressores. Zhang et al. (1996) demonstraram que o PPAR γ pode ser ativado por fosforilação em resposta à insulina. Este hormônio estimula não só a fosforilação mas também a atividade transcricional do PPAR γ via MAP quinase (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*). Em 1997, Adams e colaboradores confirmaram que o domínio amino-terminal A/B do receptor PPAR γ apresenta uma sequência de aminoácidos, sítio de reconhecimento para a MAP quinase, nas isoformas 1 e 2. Experimentos *in vivo* com ortofosfato marcado com ^{32}P demonstraram que o PPAR γ 1 é também fosforilado por MAP quinase sob estímulo de EGF (fator de crescimento epidermal). O PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), o EGF (Camp & Tafuri 1997) e a prostaglandina PGF2 α diminuem a atividade transcricional do PPAR γ , bloqueando a sua atividade por fosforilação deste receptor via MAP quinase (Reginato et al. 1998).

3.2.5 PPAR γ e câncer

Os ácidos graxos são conhecidos como moduladores dos processos carcinogênicos. Tanto os PPARs como os AG estão implicados na regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (Rosen & Spiegelman 2001, Curi et al. 2002). A observação de que PPAR γ é expresso em carcinomas de cólon, de próstata, e de mamas, nos quais dietas ricas em gorduras são fatores de risco, sugere que eles desempenhem papel importante na regulação do crescimento desses tipos tumorais (Mueller et al. 2000; Buyukbabani et al. 2000; Segawa et al. 2002). Tontonoz et al. (1997) demonstraram o efeito dos agonistas do PPAR γ na indução da diferenciação de células de lipossarcoma, sugerindo mais uma vez o envolvimento deste receptor na regulação do crescimento dos carcinomas. A expressão do PPAR γ é significativamente maior em células tumorais do epitélio de cólon e mama, quando comparadas com as células normais (Ricote et al. 1999, Sarraf et al. 1998, Heuvel 1999). Acreditava-se inicialmente que a expressão do PPAR γ estava quase que restrita aos carcinomas prostáticos (Kubota et al., 1998). Porém, Li et al., (2000) e Segawa et al., (2002), em estudos pormenorizados, concluíram que a expressão deste receptor, no tecido prostático, não se restringe apenas aos tecidos malignos, sendo expresso também em tecidos normais.

Além disso, as propriedades na indução de apoptose e de diferenciação celular do PPAR γ propiciam efeitos benéficos importantes nos tratamentos de diferentes tumores, incluindo carcinomas de mama, cólon, próstata, pâncreas, das vias biliares, hipófise e gástricos, tanto nos tratamentos *in vivo* como *in vitro* (Koeffler, 2003, Heaney, 2003).

4. Fatores Nutricionais Envolvidos Na Patogênese Prostática – O Papel Da Dieta

Estudos epidemiológicos apontam complexa relação entre dieta rica em gordura de origem animal, rica em ácidos graxos saturados, com o aumento do risco de câncer de próstata (Kolonel *et al.*, 1998), tornando evidente a associação com a progressão (mas não com a iniciação) do tumor. Dados sugerem que a ingestão prolongada de dieta com altas concentrações de ácidos graxos saturados e monoinsaturados está associada com progressão dos adenocarcinomas prostáticos para estágios mais avançados (Bairati *et al.*, 1998; Giovannucci *et al.*, 1993). Esta exposição prolongada à gordura saturada pode provocar alterações (através de complexas vias hormonais e imunológicas) sobre a proliferação celular e a adesão celular, assim como pode influenciar a invasão tecidual e, por fim, a metastatização (Rose e Connolly, 1999; Swinnen e Verhoeven, 1998). Estas observações sugerem que os ácidos graxos são possíveis reguladores da carcinogênese prostática.

Discute-se, ainda, o envolvimento de receptores de esteróides em tecido prostático humano ou em células prostáticas em cultura, pois esses teriam enorme importância na resposta à dieta lipídica em casos de câncer de mama e próstata (Meshner e Klotz 1999). Desta forma, surgem questões referentes à relação existente entre dieta, regulação hormonal do crescimento prostático e desenvolvimento tumoral. Com relação a este aspecto foram realizados estudos na tentativa de elucidar o papel dos ácidos graxos sobre a expressão do AR e dos ERs em células DU145, visto que a terapia hormonal segue modelo padrão no tratamento de tumores prostáticos localizados, bem como dos metastáticos. A conclusão principal foi que os ácidos graxos afetariam a fluidez de membrana e conseqüente permeabilidade aos hormônios esteróides (Hahnfeld e Monn, 1999). De acordo com Prinslee & Aswegen (2002), os ácidos graxos são capazes de provocar profundas alterações nas propriedades físicas da membrana plasmática e, conseqüentemente, na sua permeabilidade. Esta pode ser esta uma explicação plausível para as variações na capacidade cinética dos

receptores de esteróides em células DU145, na presença de ácidos graxos, elevando ou diminuindo a permeabilidade da membrana a andrógenos e a estrógenos, o que reforça a hipótese de Hahnfeld e Monn (1999).

Contudo há necessidade de compreender o envolvimento de elementos da dieta, como as gorduras saturadas, tão consumidos por determinadas populações, com os elementos de controle da proliferação de células do tecido prostático, procurando investigar a possível transativação de outros receptores nucleares como o AR e os ERs, ambos envolvidos nas situações de normalidade bem como nas alterações da glândula prostática.

II – JUSTIFICATIVA

O consumo de gordura na dieta cresce em determinadas populações dispersas em todo o mundo, concentrando-se em populações de países do hemisfério norte. A ingestão de grande quantidade de ácidos graxos saturados tem demonstrado cada vez maior relação com o desenvolvimento de neoplasias, em especial os carcinomas prostáticos. As diferentes células prostáticas apresentam mecanismos reguladores do crescimento tecidual, que incluem a expressão de fatores de transcrição, que em determinados níveis de expressão/ativação coordenam eventos celulares relacionados ao controle da proliferação celular prostática. Dessa forma, este estudo justificou-se pela necessidade de compreensão da fisiologia prostática em condições experimentais controladas, principalmente tendo em vista a incidência e gravidade dos carcinomas prostáticos, que são a segunda causa de morte não acidental em indivíduos do sexo masculino. Justifica-se ainda pela necessidade de compreensão das relações existentes entre alguns aspectos nutricionais e a regulação da fisiologia da glândula prostática.

III – OBJETIVOS

- Avaliar o efeito de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na dieta sobre o crescimento prostático pós-natal, em ratos Wistar machos
- Investigar a correlação entre variações no crescimento prostático e variações nos níveis de expressão dos PPAR γ e do receptor de andrógeno (AR).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor is inhibited by phosphorylation at consensus mitogen-activated protein kinase site. *J. Biol. Chem.* 272: 5128-5132, 1997.
- Antonioli E, Della Colleta HHM, Carvalho HF. Characterization of the prostatic smooth muscle cells in castrated rats. *J Androl.* 25: 50-56, 2003.
- Aümüller 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
- Bairati I, Meyer F, Fradet Y, Moore L. Dietary fat and advanced prostate cancer. *J. Urol.* 159: 1271-1275, 1998.
- Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H. Dihydrotestosterone and the concept of 5 α -reductive inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *Eur. Urol.* 37: 367-380, 2000.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: Many actors in Search of a plot. *Cell*, 83: 851-857, 1995.
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 129: 823-834, 2000.
- Bonkhoff H, Remberger K. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch.* 433: 195-202, 1998.
- Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*, 137: 354-366, 1996.
- Buyukbabani N, Mitchell SH, Tindall DJ, Young CYF. Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand, 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₁₂. *Cell Growth Differ.* 11: 49-61, 2000.
- Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 10811-10816, 1997.
- Carvalho HF, Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.* 29: 809-819, 1996.

- Chapple CR, Burt RP, Andersson, PO, Greegrass P, Wyllie M, Marshall I. Alpha 1-adrenoceptor subtypes in the human prostate. *Br. J. Urol.* 74: 585-589, 1994.
- Cheng E, Lee C, Aaronson AS, Grayhack J. Endocrinology of the prostate. In: Lepor H, Lawson RE, eds. *Prostate disease*. W.B. Saunders Co. p. 57-71, 1993.
- Coffey DS. The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughn JED, eds. *Campbell's urology*, ed 6. W. B. Saunders Co. p. 1381-1428, 1992.
- Cunha GR, Hayard SW, Dahiya R, Foster BA. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat.* 155: 63-72, 1996.
- Cunha GR, Rieke W, Thomson A, Marker P.C, Risbridger G, Hayward S. W, Wang Y.Z, Donjacour A.A, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 92: 221-236, 2004.
- Curi R. *Entendendo as gorduras – Os ácido graxos*. São Paulo. Manole. 2002
- Dail WG. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In Maggi CA (ed): "Nervous Control of the Urogenital System" Switzerland: harwood Academic Publishers. p. 69-101, 1993.
- Della-Colleta HHM. Conteúdo, biossíntese e degradação de ácido hialurônico na próstata ventral de ratos: Efeito da castração e papel das células musculares lisas. Tese de Doutorado. Unicamp, Campinas. 2005.
- DiRenzo J, Soderstrom M, Kurokawa *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoic acid receptor X receptor heterodimers with ligands, coactivators and corepressors. *Mol. Cell Biol.* 17: 2166-2176, 1997.
- Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ. p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 272: 33435-33443, 1997.
- Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Identification of a nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274: 15901-15907, 1999.
- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPAR- γ -3 mRNA: a distinct PPAR- γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, 438: 55-60, 1998.

- Farnsworth WE. Prostate stroma: Physiology. *Prostate*. 38: 60-72, 1999
- Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Cancer*. 1(1): 34-35, 2001.
- Garcia-Flórez M, Carvalho HF. Células Epiteliais Prostáticas. *In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. Células: uma abordagem multidisciplinar. Manole, Campinas. 2005.*
- Gartner LP, Hiatt JL. Tratado de Histologia. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 1999.
- Gearing KL, Göttlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JÁ. Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. USA* 90: 1440-1444, 1993.
- Geller J, de la Veja DJ, Albert JD, Nacchtsheim DA. Tissue dihydrotestosterone levels and clinical response to hormonal therapy in patients with advanced prostate cancer. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 58: 36-40, 1984.
- Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 311, 1993.
- Guyton, AC. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. 10^a ed. 2004.
- Haag P, Bektic J, Bartsch G, Klocker H, Eder IE. Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 96: 251-258, 2005.
- Hanfeld LE, Moon TD. Prostate cancer. *Med Clin North Am.* 83:1231-1245, 1999.
- Hayward SW, Haughney PC, Rosen MA, Greulich KM, Weier HU, Dahiya R, Cunha GR. Interactions between adult human prostatic epithelium and tar urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. *Differentiation*. 63: 131-140, 1998.
- Heaney AP. Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Cedars – Sinai Research Institute. Division of Endocrinology. Pituitary*, 6: 153-159. 2004
- Hedlund H, Andersson K-E, Larsson B. Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostatic. *J. Urol.* 134: 1291-1298, 1985.
- Heuvel JPV. Peroxisome proliferator-activated receptors: A critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J. Nutr.* 128: 575S-580S, 1999.

- Ichihara I, Kallio M, Pelliniemi LJ. Light and microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tiss. Res.* 192: 381-390, 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.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347: 645-650, 1990.
- Izumaya K, Nakada T. Inhibitors of collagen synthesis and hypophysectomy: effects on androgen induced growth of ventral prostate in rats. *Arch. Androl.* 38: 231-241, 1997.
- James S, Chapple CR, Philips ML, Greensgrans PM, *et al.* Autoradiographic analysis of alpha-adrenoreceptors and muscarinic cholinergic receptors in the hyperplastic human prostate. *J. Urol.* 142: 438-444. 1989.
- Junqueira LC, Carneiro J. *et al.* *Histologia Básica*. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 10^a ed. 2004.
- Kahn BB, Flier IS. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(4): 473-481, 2000.
- Kawabe K, Moriyama N, Hamada K, Ishima T. Density and localization of alpha 1-adrenoceptors in hypertrophied prostate. *J. Urol.* 143: 592-595, 1990.
- Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion. *Neuroscience*. 66: 655-662, 1995.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Role of PPAR in health and disease. *Nature*, 405: 421-424, 2000.
- Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia*. Elsevier. São Paulo. 1^a ed. 2004.
- Kihara K, Sato K, Ishizaka K, Oshima H. Preservation of ejaculatory function by reconstruction of the canine hypogastric nerve. *J. Neurosurg.* 88: 726-733, 1998.
- Kliwer AS, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 358: 771-774, 1992.

- Klonoff DC, Karam JH. Hormônios Hipotalâmicos e Hipofisiários. *In* Farmacologia Básica e Clínica. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 10^a ed. Bertram G. Katzung. . 1995.
- Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. *Clin. Cancer Res.* 9: 1-9, 2003.
- Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 414-428, 1998.
- Kubota T, Koshizuka K, Williamsom IA. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (troglitazone) has potent anti tumor effects against human prostate cancer both, in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 58: 3344-3352, 1998.
- Labat-Robert J, Bihari-varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett.* 268: 386-393. 1990.
- Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology.* 131: 1571-1573, 1992.
- Lee C. Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epithelial interaction. *Prostate.* 6: 52-56, 1996.
- Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors: Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 4993-4996, 1988.
- Lin CQ, Bissel MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB. J.* 7: 737-743, 1993.
- Litvak JP, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprienou N. Induction of prostate apoptosis by doxazosin: Targeting α 1 blockade in benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.:* 157-163, 1997.
- Marker PC. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253: 165-174, 2003.
- Martin C, Bean R, Rose K, Habib F, Seckl J. Cyp7b1 catalyses the 7 α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in the rat prostate. *Biochem. J.* 355: 509-515, 2001
- McNeal JE. Prostate – In Histology for pathologists. Lippincott-Raven Publishers. Second edition, p. 997-1017. 1997.
- McVary KT, McKenna KE, Lee C. Prostate Innervation. *Prostate Supplement.* 8: 2-13, 1998.

- Meschner NE, Klotz LH. Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metast.* 17: 325-330, 1999.
- Michalik L, Wahli W. peroxisome proliferator-activated receptor: three isotypes amultiple of functions. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 564-570, 1999.
- Moore KL, Dalley AF. *Anatomia orientada para a clínica.* Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 4^a ed. 2001.
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica.* Elsevier. São Paulo. 7^a ed. 2004.
- Mueller E, Smith M, Sarraf P. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10990-10995, 2000.
- Nadelhaft I. Cholinergic axons in the rat prostate and neurons in the pelvic ganglion. *Brain Research.* 989: 52-57, 2003.
- Nemeth H, Lee C (1996) Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *Prostate* 28: 124-128, 1996.
- Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stournaras C. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 17: 870-881, 2003
- Pennefather JN, Lau WAK, Mitchelson F, Ventura S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J. Auton. Pharmacol.* 20: 193-206, 2000.
- Prinslee SE, van Aswegen CH. Effect of fatty acids on estradiol and testosterone binding to whole DU-145 prostate cells. *Prostagl. Leukotr. Essent. Fatty Acids.* 66: 419-425, 2002.
- Reginato MJ, Krakow SL, Bailey Ley ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through apposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.* 273: 1855-1858, 1998.
- Ricote M, Li AC, Wilson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391: 79-82, 1998.

- Ricote M, Li AC, Wilson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J. Leukoc. Biol.* 66: 733-739, 1999.
- Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 83: 217, 1999.
- Rosen ED. PPAR is a required for differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4: 611-717, 1999.
- Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276: 37731-37734, 2001
- Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue e Cell*.2003.
- Sarraf P, Mueller F, Jones D, Kling FJ. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nature Med.* 4: 1046-1052, 1998.
- Schaeffer MKH, Eiden LE, Weihe E. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter II. The peripheral nervous system. *Neuroscience.* 84: 361-376, 1998.
- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, *et al.*, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate.* 51: 108-116, 2002.
- Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R. Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 256: 403-411, 1999.
- Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137: 4499-4502, 1996.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37: 907-925, 1996.
- Swinnen JV, Verhoeven G. Androgens and the control of lipid metabolism in human prostate cancer cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65: 191, 1998.

- Tanaka T, Itok H, Doi K. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 42: 702-710, 1999.
- Thompson TC, Zhau H, Chung LWK. Catecholamines are involved in the growth and expression of prostate binding protein by rat ventral prostatic tissues. In: Coffey DS, Bruchovsky N, Gardner WA, Resnick MI, Karr JP. (eds). *Current Concepts and Approaches to the Study of Prostate Cancer*. New York: Alan R. Liss, Inc. p. 239-248, 1987.
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxikinase gene. *Mol Cell Biol.* 15: 351-357, 1995.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252, 1998.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 166: 2472-2483, 2001.
- Vermeulen A. The physical state of testosterone in plasma. In James VHT, Serio M, Maratini L, eds. *The endocrine function of the testis*. New York: Academic Press; 157-170, 1973.
- Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 271: 31771- 31774, 1996.
- Zaviacic M. *The Female Prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to Woman's functional prostate*. Slovak Academic Bratislava, Slovakia. 1999.
- Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPARgamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7921-7925, 1995.
- Wang J-M, McKenna KE, Lee C. Determination of prostatic secretion in rats: Effect of neurotransmitters and testosterone. *Prostate.* 18: 289-301, 1991.

Dietary fatty acids regulate Androgen Receptor (AR) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) levels and prostate growth in rats Wistar

Esdras Launi Oliveira Escobar and Hernandes F. Carvalho

Department of Cell Biology - Institute of Biology – State University of Campinas
(UNICAMP), Campinas SP, Brazil

Key words: androgen receptor, diet, fatty acids, linseed oil, lard, PPAR γ , prostate

Corresponding author: Hernandes F Carvalho
Department of Cell Biology – UNICAMP
CP6109
13083-863 Campinas SP, Brazil
Tel: +55 - 19 3521 6118
Fax: +55 - 19 3521 6111
E-mail: hern@unicamp.br

ABSTRACT

The prostate is an accessory gland of the male reproductive tract. Many factors are involved in prostatic carcinogenesis. Fatty acids are among the most important nutritional factors associated with the etiopathogenesis of prostate cancer. The objective of this work was to evaluate the effect of dietary fatty acid on the rat ventral prostate growth, tissue organization, and expression of androgen receptor (AR) and peroxisome proliferation-activator receptor γ (PPAR γ). Male Wistar rats were used and divided in 5 groups that received isocaloric diets for 10 weeks after weaning. Group I was treated with soybean oil. Group II received soybean oil and linseed oil (1:1). Group III was fed on linseed oil. Group IV had soybean oil and rendered pork fat (1:1). Group V was treated with rendered pork fat. At the end of treatment, the prostates were dissected out, weighed and processed for histology and immunohistochemistry or frozen for biochemical analyses. Circulating levels of testosterone and estradiol were measured. Experiments demonstrated that lard and linseed oil caused opposite effects on prostatic growth. While the former promoted an increase in prostatic weight, the latter resulted in a significantly lighter organ. Epithelial hyperplasia was observed by histological inspection and confirmed by stereology, and consisted in the major tissue response to the rendered pork fat diet. Immunohistochemistry and Western blotting demonstrated increased expression of AR and PPAR γ in groups receiving lard as the source of fatty acids, while linseed oil promoted a decrease on the protein levels of both nuclear receptors. These results suggest that prostatic growth is influenced by dietary fatty acids and that this influence might occur via enhanced expression of AR and PPAR γ . One suggests that PPAR γ might represent the link between diet and predisposition to prostate cancer and that AR expression and function could be affected by PPAR γ activation. Since the levels of testosterone was altered it is also possible that prostatic changes are secondary to systemic effects of the diet.

Running Title: Fatty acids affects expression nuclear receptor and prostatic growth

INTRODUCTION

Carcinoma of the prostate is one of the most prevalent cancer in humans (Dhom, 1983) and is the second leading cause of male cancer deaths in the United States. Besides malignancy, benign hyperplasia of the prostate is also common in elderly males, affecting the majority of males past age of 80 (Chaudry *et al.* 1991; Rowley & Mason 1997; Mamalakis *et al.* 2002). In 2003 it was estimated that 150.000 American men would be diagnosed with prostatic carcinoma, and that 35.000 to 40.000 were expected to die of this disease (Hankey *et al.* 1999, Fleshner *et al.* 2004). Although the etiology and pathogenesis of prostate cancer (PC) is as yet unknown, there is evidence of a genetic basis to the disease. Hereditary variants of PC are characterized by an early onset, aggressive nature and insensitivity to environmental factors (Chaudry *et al.* 1991, Rowley & Mason 1997; Mamalakis *et al.* 2002). On the other hand, various epidemiological and case-controlled studies have shown that dietary fat has been implicated as one of the potential environmental factors associated with the progression of latent prostatic carcinoma (Shennan & Bishop 1974; Blair & Fraumeni 1978, Fleshner *et al.* 2004). So, for several years, considerable interest has been devoted to the relationship between fat metabolism and PC. The most consistent finding was the demonstration of a relationship between dietary fat intakes, not only the amount of fat but also, and perhaps even more importantly, the quality of fat and PC risk. Various population studies indicated an increased PC risk with increasing animal and saturated fat intake in diet (Carrol & Khor 1975; Kolonel *et al.* 1999; Myers & Ghosh 1999; Fleshner *et al.* 2004). However, how dietary fat affects the prostate function is unclear. A potential mechanism is through the regulation of nuclear receptors, such as the androgen receptor (AR) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ).

Testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) are the major natural potent androgens in mammals including humans (Zhu *et al.* 1998). Their action through AR is essential for prostate development, growth, and functioning and are also required for the initiation and progression of prostate cancer (Cunha *et al.* 1987; Ross e Henderson 1994; Dorgan *et al.* 1996; Fleshner *et al.* 2004).

PPARs are members of the nuclear hormone receptor superfamily that function as ligand-activated transcriptional factors in the regulation of lipid metabolism and other

functions (Issemann & Green 1990; Zhang *et al.* 1992; Krey *et al.* 1997). PPARs promote transcription by forming heterodimers with members of the retinoic acid X receptor (RXR) family of steroid receptors and binding to specific DNA motifs termed PPAR-response elements (PPREs) (Segawa *et al.* 2002). These receptors are activated by dietary factors such as fatty acids and their metabolites (Wilson *et al.* 2001), and may also be involved in controlling genes relevant to the process of carcinogenesis (Sporn *et al.* 2001). There are three PPARs subtypes. While PPAR α regulates fatty acids metabolism and down regulates inflammatory responses, and PPAR β plays a central role in the control of fatty acid oxidation, PPAR γ is a key determinant for adipogenesis and a proliferation-differentiation factor for adipocytes (Rosen & Spiegelman 2001; Segawa *et al.* 2002).

Up regulation of PPAR γ expression is frequent in a variety of different malignant tumors. PPAR γ has equally been shown to be expressed in a number of human tumor cell lines from brain, breast, colon and prostate (Mueller *et al.* 2000; Buyukbabani *et al.* 2000; Segawa *et al.* 2002). Physiological activation of PPAR γ decreases the production of glucose in the liver, and increases the efflux of cholesterol (Wilson *et al.* 2001). PPAR γ has been implicated in the progression of human prostate cancer, since both normal and malignant prostatic tissues have been shown to express PPAR γ (Li *et al.* 2000; Segawa *et al.* 2002).

In this study, we have fed rats with isocaloric diets containing a gradient from mostly saturated to mostly polyunsaturated fatty acids and examined their effects on prostatic growth, tissue structure and expression of AR and PPAR γ , searching for a molecular correlate between diet and PC propensity. The results show that prostatic growth and tissue organization are affected by dietary fatty acid, and that their effects are likely mediated by PPAR γ and AR. Together, the results allowed the conclusion that PPAR γ is a strong candidate to chain the gap between diet, androgen regulation and propensity to prostatic cancer.

MATERIALS AND METHODS

Animal and Diets

Fourty Wistar (21-day-old) post-weaning rats were used. Animals were divided in five groups with 8 animals each. Each experimental group received a different type of isocaloric diet prepared according to the AIN-93G (American Institute of Nutrition-1993) (Table I), and which has been widely used in nutritional studies (Kondo *et al.* 1994; Wang *et al.* 1995) for 10 weeks. The lipid component of the diet varied as follow. Group I (control) was treated with soybean oil. Group II received soybean oil and linseed oil (1:1). Group III was fed on linseed oil. Group IV had soybean oil and rendered pork fat (1:1). Group V was treated with rendered pork fat.

Procedures

Animal body weight was recorded weekly. After 10 weeks on the diet they were sacrificed by cervical dislocation. Blood samples from some of them were collected for serological analysis. The ventral prostate was removed, weighed, and immediately fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 hours, or frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. The testes were also collected and weighed. Fixed prostates were then washed dehydrated, cleared in xylene and embedded in Paraplast Plus embeddedding medium for morphological, stereological and immunohistochemical analyses. Animal handling and experiments were done according to the ethical guidelines of the State University of Campinas, following the *Guide for Care and Use of Laboratoy Animals*, after approval by the local Committee.

Total Plasma Testosterone and Estradiol levels

Circulating plasma testosterone and estradiol levels were determined by immunochemical assays. Blood was collected by cardiac puncture immediately before death. Serum was separated by centrifugation (5.000 RPM) and stored at -20°C for subsequent assays. The measurements were made using automated equipment from Vitros-ECi-Johnson for ultrasensitive chemiluminescence detection.

Stereological Analysis

The relative volume of the tissue compartments was determined using Weibel's 120-point grid test system, as applied to the rat male prostate by Garcia-Florez *et al.* (2005). The volume density was calculated after counting the number of points that coincided with each of the tissue compartments (epithelium, lumen and stroma). Absolute volume was calculated as before (Vilamaior *et al.* 2006).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were cut into 4 μm sections, mounted on silane-treated slides, dewaxed in xylene, and rehydrated in a graded series of ethanol solutions. The sections were boiled 3X5 min in a microwave oven in 10mM citrate buffer pH 6.0. The sections were blocked with 3% H_2O_2 for 10 min followed by 3% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline plus 0.2% Tween 20 (TBS-T) for 1h. The sections were incubated with a rabbit polyclonal anti-AR antibody (Cat. nr. sc-816; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:100, overnight. For PPAR γ detection, sections were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T for 1h, before incubation with a rabbit anti-PPAR γ polyclonal antibody (Cat. nr. 51655, Calbiochem Darmstadt, Germany) diluted 1:100, overnight. For Ki-67 immunolocalization a monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology diluted 1:200, overnight. The tissue-bound primary antibodies were detected with an ABC kit (NCL-ABCu, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, England) according to the manufacturer's instructions (for AR), or with a HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cat. nr. A-6154, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) diluted 1:500, for 1h (for PPAR γ). The sections were counterstained with methyl green.

Protein Extraction and Western Blotting

The samples were weighed and homogenized for 1 min with a Polytron homogenizer (Kinematica, Lucerne, Switzerland) in 500 $\mu\text{L}/\text{mg}$ of a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM Hepes, pH 7.6, 2 mM sodium vanadate, 0.2 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin (Fritz *et al.* 2002), and centrifuged at 10.000g for 10 minutes. Protein concentration in the supernatant was determined using the Bradford's reagent (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA) and 75 µg protein were resolved by SDS-PAGE using 10% gels under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL), which were subsequently blocked with TBS-T containing 5% non-fat milk and probed with the same antibodies as above diluted 1:500 in TBS-T containing 1% non-fat milk, followed by HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cat. nr. A-6154; Sigma Chemical Co.) and development using enhanced chemiluminescent substrate (Santa Cruz Biotechnology) and Kodak X-Omat films. The membranes were then striped and reacted with an anti-β actin antibody for normalization of the results. Quantitation of the bands was done by measuring the optical densities using a Kodak 1D 3.6 system.

Statistical Analyses

Results were checked for differences between groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the paired rank Tukey's test. Significance was achieved when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Body weight gain and prostate weight

Body weight gain was similar for all five groups, during the 10 weeks of treatment, with no differences between the groups at the end of treatment (Fig. 1A). Ventral prostate weight was similar for groups I, II and III, with a slight tendency for reduction in the group treated with linseed oil (Group III), but showed a significant increase in the animals treated only with rendered pork fat (Group V) (Fig. 1B).

Serum steroids hormone levels

The serum levels of testosterone (T) and estradiol are shown in Figure 2. Only the diet containing linseed oil (Group III) did not cause a significant change in the testosterone levels, as compared to the control group. There was an increase in the concentration of T in animals fed on a diet based on a mix of soybean oil and rendered pork fat, showing a tendency for elevation in serum levels of T in response to the intake of saturated fat. Such

increment was statistically significant, in comparison to group III, which received only linseed oil as the source of fatty acids. There was a high correlation ($r=0.97$) for the percentual of saturated fatty acids and the circulating testosterone levels, excluded the groups fed on linseed oil.

A significant decrease in the serum concentration of estradiol was also observed in the animals treated with linseed oil. Even a 1:1 mixture of linseed oil with soybean oil was enough to produce this decrease (Figure 2). In contrast, the diet based on rendered pork fat promoted a significant increase in the circulating levels of estradiol.

Volume density and absolute volume of tissue compartments

The stereological data obtained for the ventral prostate of control and treated rats are shown in the Figure 3. In the prostate of control animals, the epithelium occupied ~27% of the ventral prostate volume, the lumen ~49% and the stroma the remaining ~19%. The relative volume of the stroma showed very little variation among the treatments. The diet based on rendered pork fat caused a significant increase in the epithelium, which was counterbalanced by a decrease in the lumen. Histological inspection showed that most of the epithelial structures had abundant epithelial cells, in an arrangement very similar to the distal ductal region of the control prostate, indicating a hyperplastic gland (Fig. 3A). On the other hand, a decrease of the epithelial relative volume was observed in the prostate of animals that received linseed oil. The observed variations in the epithelial relative volume were statistically significant between groups III (linseed oil) and V (pork fat). It is important to mention that we have found a high positive correlation ($r=0.83$) between the percentual of saturated fat in the diet and the volume density of the epithelium, excluded the groups fed on linseed oil. It was also noticed that lard caused a significant increase in the volume density of the smooth muscle cells, while linseed oil had no effect on this compartment.

The determination of the absolute volume for the different compartments clearly showed the contribution of epithelium to the growth of the ventral prostate in animals fed on the diet based on rendered pork fat (Group V) (Fig. 4). It is worth mentioning that the 1:1 mixture of soybean oil and lard was enough to direct the decrease of the lumen. Likewise, lard caused an increment of the absolute volume of the smooth muscle cells. On

the other hand, linseed oil caused reductions in the absolute volume of the different tissue compartments.

Immunolocalization of PPAR γ and AR

PPAR γ was detected in the male rat prostate by immunohistochemistry. In the prostate of control animals, the reaction was concentrated in the cell nucleus and widely distributed throughout the epithelium (Figs. 5 A, F). In groups II and III (treated with a mix of soybean oil and linseed oil or linseed oil only, respectively), the immunohistochemical reaction was not as uniform as in the control group, with an apparent decrease in the staining for PPAR γ protein. The prostatic epithelium of animals from group V (treated with rendered pork fat) showed a more intense and conspicuous staining for PPAR γ (Fig. 5 J).

The immunohistochemical reaction for AR showed a predominantly nuclear staining in epithelial cells (Figs. 5A and B). The AR protein was more evidently stained in the prostate of animals with a diets containing rendered pork fat (groups IV and V) (Figs. 5D and E). In these groups, one observed a large number of the epithelial cells with AR-positive cell nucleus in the apical portion of the cytoplasm (Fig. 5E), indicating increased proliferative activity. On the contrary, the reaction for AR appeared weaker in the prostatic epithelium of animals which received a linseed oil based diet (Fig. 5C).

Proliferative rates

The counting of KI-67 positive cells (Fig. 6A and B), corresponding to proliferating cells, showed that the the epithelium of the prostate in animals which received rendered pork fat possess a significative increment in proliferation of luminal cells (Fig. 6C). No difference was found in the rate of basal cell proliferation (Fig. 6C).

Prostatic levels of AR and PPAR γ

AR and PPAR γ were expressed in the prostatic tissue of all experimental groups, as shown by Western blots (Fig. 7). Feeding linseed oil caused a significant decrease (more de 90% reduction), while lard promoted a significant increase (~45% increase) in AR protein amount in the ventral prostate (Fig. 7A). The amount of PPAR γ protein is significantly higher (~2.5-fold increase) in the prostate of animals fed on diet containing rendered pork fat. The 1:1 mixture of soybean oil and lard showed a tendency for accumulating PPAR γ .

In contrast, the diet based on linseed oil caused a significant decline on PPAR γ content, which was reduced to less than 10% of the amount found for the control group (Fig. 7B).

DISCUSSION

In the present study we have examined the influence of dietary fatty acids on the rat ventral prostate growth and tissue organization. Linseed oil and lard (rendered pork fat) were chosen because they represent extremes in fatty acid composition. Linseed oil has about 66.5% polyunsaturated fatty acids and about 12.8% linoleic acid, while animal fat presents predominantly (~88%) saturated fatty acids. Furthermore, fatty acids were implicated as risk factors for the incidence rate of prostate cancer (Giles & Ireland 1997). Elucidating the influences of these dietary components on the normal prostate will provide insights into the mechanisms by which these important macronutrients modulate the initiation and/or progression of prostate cancer.

We have demonstrated a statistically significant increase in ventral prostate weight in the rats fed on a diet with a predominance of saturated fatty acids for 10 weeks. This result is consistent with previous reports by others (Myers *et al.* 1999; Cai *et al.* 2001; 2005) demonstrating that a high-fat diet (using saturated fat) intake for 2, 4 e 10 weeks significantly increased the weight of the rat ventral prostate. On the other hand, linseed oil caused a reduction in prostate weight, also confirming previous results in the literature, on the existence of a negative correlation between the consumption of unsaturated fatty acids and prostatic growth and carcinogenesis. Those results are in agreement with epidemiologic and population studies conducted by Wahle and Heys (2002) and Bidoli *et al.* (2005). The stereological analyses performed here clearly shows though that a diet based on saturated fatty acid (lard) results in significant proliferation of the epithelium, which was similar to the epithelial hyperplasia, while that based on polyunsaturated fatty acids (linseed oil) had no effect on tissue structure. It is worth stressing that smooth muscle cells also showed increased absolute volume after feeding on lard, suggesting a possible compromising with future prostatic benign hyperplasia.

The mechanism through which dietary fatty acids influence prostate growth and prostate cancer are unclear. To explore the potential mechanism of dietary fat action on the

prostate, we have measured the steroids hormones levels in serum. It was observed that diet based mostly on saturated fatty acid caused a significant rise in circulating testosterone levels.

This event *per se* is important because it involves the AR signaling pathway in the tissue response to dietary fat, especially because prostatic growth is extremely dependent on androgen stimulation (Feldman e Feldman, 2001). On the other hand, linseed oil caused a reduction in circulating levels of estrogen.

In spite of this important finding, we decided to investigate whether local factors could contribute to the prostate response to dietary fatty acids. One possibility is that dietary fatty acids can modulate androgen action in the prostate through AR (Ross & Handerson 1994; Dorgan *et al.* 1996; Fleshner *et al.* 2004). The AR is the predominant factor in the ability of the prostate to respond to androgens during either normal and tumor development (Feldman e Feldman, 2001; Haag *et al.*, 2005). As a matter of fact, we have shown that AR expression is modulated either directly or indirectly by dietary fatty acids. It was though surprising that the growth effect promoted by rendered pork fat resulted from a significant 40% increase in the AR protein in the ventral prostate, while the reduction promoted by linseed oil was about 95%. This decrease correlated with decreased staining and the presence of unstained cells in the epithelium of prostates from linseed oil treated animals.

Our results confirm that PPAR γ is expressed in normal prostatic tissue (Li *et al.* 2000, Segawa *et al.* 2002). Moreover, the increase in PPAR γ expression caused by the predominance of saturated fatty acid in the diet (i.e. rendered pork fat) corresponds to a remarkable 2.5-fold increase of the control levels. PPARs are directly related with fat lipid metabolism, and fatty acids (endogenous or exogenous) are their natural ligands (Subbarayan *et al.* 2004; Kota *et al.* 2005). PPAR γ is a transcription factor mainly regulating adipogenesis but also implicated in cell cycle, differentiation and apoptosis (Rosen & Spiegelman 2001, Curi *et al.* 2002). The activation of this receptor by different fatty acids might provoke distinct responses on different cell types. In the light of the present results it likely that PPAR γ fills the gap between dietary fatty acids and prostatic growth. It remains to be determined whether polyunsaturated fatty acts as an antagonist of PPAR γ function, though the intensity of the down regulation suggests this to be the case.

Another important question arising from the present results is whether the AR is target of activated PPAR γ . This will certainly motivate further studies in our laboratory.

The variations demonstrated in expression of AR and PPAR γ , in each group, have shown that types of fatty acids in the diet can cause alterations on staining of expression these receptors. It was demonstrated for Western blotting and immunohistochemistry that the normal prostate expressed the PPAR γ , confirming the results previously (Mueller *et al.* 2000, Subbarayan *et al.* 2004) and that the unsaturated fat provokes decrease in the expression of AR and PPAR γ , and that saturated fat caused antagonist effects in prostate, with relation to these receptors. This increase of expression of AR and PPAR γ in was concomitant with increase of prostatic weight, which occurred for enhancement by relative epithelial area and decrease of relative luminal space.

In conclusion, it was demonstrated that different fatty acids influence the growth and tissue structure of the rat ventral prostate. It was also shown that this effect might result from either a systemic action of saturated fats causing increased testosterone levels and polyunsaturated fats causing reduced estrogen levels, or a direct effect on the expression levels of AR and PPAR γ , with resulting altered proliferative rates and hyperplastic epithelium. Finally, the results allow the suggestion that dietary saturated fatty acid predisposes the prostate gland to cancer by causing higher proliferation rate and hyperplastic epithelium, likely through modulating PPAR γ and AR expression and activation and that linseed oil might reduce the predisposition to prostatic cancer induced by other factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes for helping with defining and preparing the diets. This work has been done under financial support from FAPESP and CNPq. E.L.O.E. was recipient of a CNPq fellowship.

REFERENCES

- Blair A, Fraumni JF Jr. Geographic pattern of prostatic cancer in the USA. *J. Cancer Inst.* 61: 1379-1384, 1978.
- Buyukbabani N, Mitchell SH, Tindall DJ, Young CYF. Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand, 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₁₂. *Cell Growth Differ.* 11: 49-61, 2000.
- Carroll KK, Khor HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 10: 308-353, 1975.
- Chaudry A, McClinton S, Moffat LEF, Wahle KWJ. Essential fatty acids distribution in the plasma and tissue phospholipids of patients with benign and malignant prostatic disease. *Br. J. Cancer*, 64: 1157-1160, 1991.
- Cunha GR, Danjacobur AA, Cooke PS, *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* 8: 338-362, 1987.
- Dhom G. Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J. Cancer Res. Clin. Onc.* 106: 210, 1983.
- Dorgan JF, Judd JT, Loncope C, Brown C, Schatzkin A, *et al.* Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr.* 64: 850-855, 1996.
- Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. Dietary fat and prostate cancer. *J. Urology*, 171: 19-24, 2004.
- Fritz WA, Wang J, Eltoum I, Lamartiniere CA. Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol. Cell. Endocr.* 186: 89-99, 2002.
- Garcia-Flórez M, Oliveira CA, Carvalho HF. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 487-497, 2005.
- Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, *et al.* Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer – part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1017, 1999.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347: 645-650, 1990.

- Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 414-428, 1999.
- Kondo Y, Homma Y, Aso Y, Kakisoe T. Promotional effect of two-generation exposure to high-fat diet on prostate carcinogenesis in *aci/seg* rats. *Cancer Res.* 54: 6129-6132, 1994.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F et al., Fatty acids, eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11: 770-791, 1997.
- Li WD, Lee JH, Price RA. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2Pro12Ala mutation is associated with early onset extreme obesity and reduced fasting glucose. *Mol. Genet. Metab.* 70: 159-161, 2000.
- Mamalakis G, Kafatos A, Karagelopoulos N, Andrikolopoulos N, Daskalopoulos G, Kranidis A. Prostate cancer vs hiperplasia: relationships with prostatic and adipose tissue fatty acid composition. *Prostagl. Leukotr. Essent. Fatty Acids* 66: 467-477, 2002.
- Mueller E, Smith M, Sarraf P, *et al.* Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97: 10990-10995, 2000.
- Myers CE, Ghosh J. Lipoxygenase inhibition in prostate cancer. *Eur Urol.* 35: 395-398, 1999.
- Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *AM. Soc. Nutr. Sci.* 3166: 838S-841S, 1997.
- Rowley KH, Mason MD. The aetiology and patogenesis of prostate cancer. *Clin Oncol R Coll Radiol.* 9: 213-218, 1997.
- Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276: 37731-37734, 2001
- Ross RK, Henderson BE. Do diets and androgens alter prostate cancer risk via a common etiologic pathway? *J Natl Inst.* 86: 252-254, 1994.
- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate.* 51: 108-116, 2002.
- Shennan DH, Bishop OS. Diet and the mortality from malignant disease in 32 countries. *West Indian Med. J.* 23: 44-53, 1974.

- Sporn MB, Suth N, Mangelsdorf DJ. Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPAR-gamma modulators (SPARMs). *Trends Mol. Med.* 7: 395-400, 2001.
- Subbarayan V, Sabichi AL, Kim J, Llansa N, Logothetis CJ, Lippman SM, Menter DG. Differential peroxisome proliferator-activated receptor- γ isoform expression and agonist effects in normal and malignant prostate cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13: 1711-1716, 2004.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec* 288A: 885-892, 2006.
- Zhang BW, Marcus SL, Sajjadi FG *et al.*, Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase 3-hydroxyacyl-CoA Ddehydrogenase. *Proc. Natl. Acad.* 89: 7541-7545, 1992.
- Zhu YS, Katz MD, McGinley I. Lessons from human genetic models. *Bailleres Clin. Endocrinol. Metab.* 12: 83-113, 1998.
- Wang Y, Corr JG, Thaler HT, Tao Y, *et al.* Decreased growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice fed a low-fat diet. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 1456-1462. 1995.
- Wilson, TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 341-367, 2001.

LEGENDS

Figure 1. Body weight gain during the 10 weeks of diet administration (**A**). Prostatic weight at the end of treatment (**B**). Observe the significant increase in the ventral prostate weight of animals treated with rendered pork fat (Group V). Values are the mean $\pm$ SEM ($n = 8$).

Figure 2. Serum levels of total testosterone and estradiol. Note the increase in the concentration of T and E2 in animals fed on a diet based on saturated fatty acids. Note also that linseed oil caused a reduction in estradiol levels. Values are the mean $\pm$ SEM ($n = 6$).

Figure 3. Volume density variation of the epithelial (**A**), luminal (**B**), and stromal (**C**) compartments of the ventral prostate from animals fed on different diets, as determined by stereology. For see statistically differences consult the table. Values are the mean $\pm$ SEM ($n = 5$).

Figure 4. Absolute volume variation of the epithelial (**A**), luminal (**B**), and stromal (**C**) compartments of the ventral prostate from animals fed on different diets, as determined by stereology. Values are the mean $\pm$ SEM ($n = 5$).

Figure 5. Immunohistochemical identification of AR (**A – E**) and PPAR γ (**F – J**) in the prostate of animals from groups I (A, F), II (B, G), III (C, H), IV (D, I), and V (E, J). AR is preferential expressed in nucleus of epithelial cells (arrows). The same pattern was observed for PPAR γ . Androgen receptor was also detected in some stromal cells (arrowheads). Immunostaining for AR and PPAR γ differed for the prostates from animals fed on different diets. Note the increase of expression of the both receptors in the groups treated with rendered pork fat (Group V) and their relative decrease in the group treated with linseed oil (Group III). (x 1000). Ep, epithelium; L, lumen

Figure 6. Immunohistochemical identification of Ki67 antigen in proliferating cells in the prostate of an animal from the control group (A) and in an animal from the group treated

with rendered pork fat (B). (C) Percentual of proliferating luminal and basal cells in the different experimental groups. Only the luminal cells from the group receiving lard showed significative differences ($p \leq 0.05$) with respect to the controls. (x 1000)

Figure 7. Western blotting analysis of AR (A) and PPAR γ (B) protein in the prostate of animals from the different experimental groups. AR and PPAR γ were detected in the prostate of animals from the different groups. However, the amount of either receptor was distinct for each of them. AR and PPAR γ were down regulated in the prostate of animals fed on linseed oil. The opposite was seen in those treated with lard. β -actin was used as the loading control

Table I Composition of the diets used in this work, according to the AIN-93G. Vitamin and salt mixes were prepared as described by Reeves (1997). Soybean oil, linseed oil or rendered pork fat was added as fat components and divided according to the proportions described in the Material and Methods section.

Ingredients	g/Kg
Cornstarch	397.486
Casein	200.000
Dextrinized cornstarch	132.000
Sucrose	100.000
Fiber	50.000
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35.000
Vitamin mix (AING-93-VX)	10.000
L-Cystine	3.000
Choline bitartrate	2.500
tert-butylhydroquinone	0.014
Fat	70.000

Figure 1

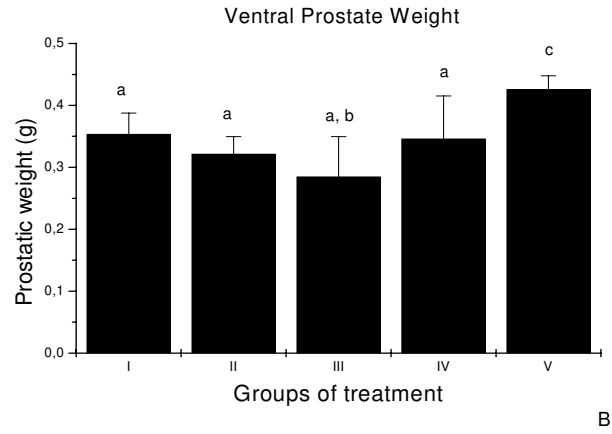
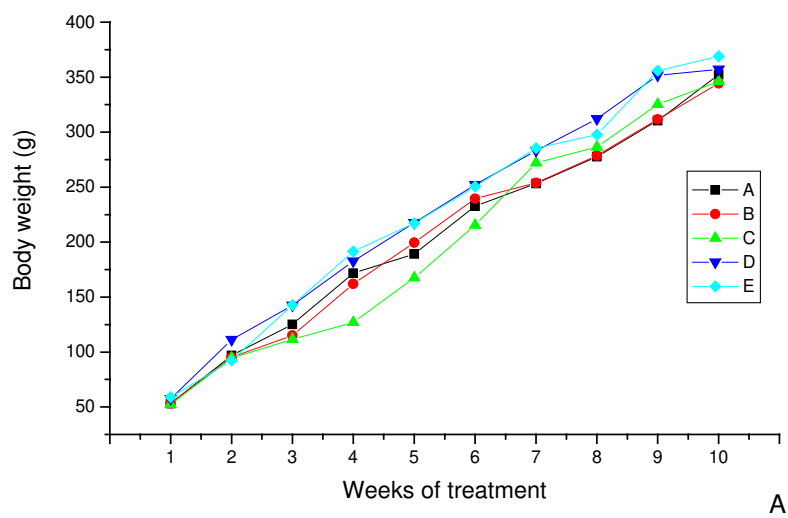


Figure 2

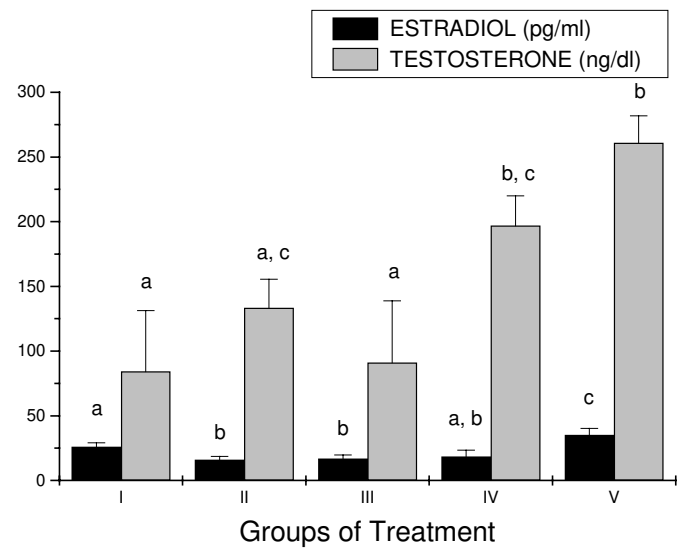


Figure 3

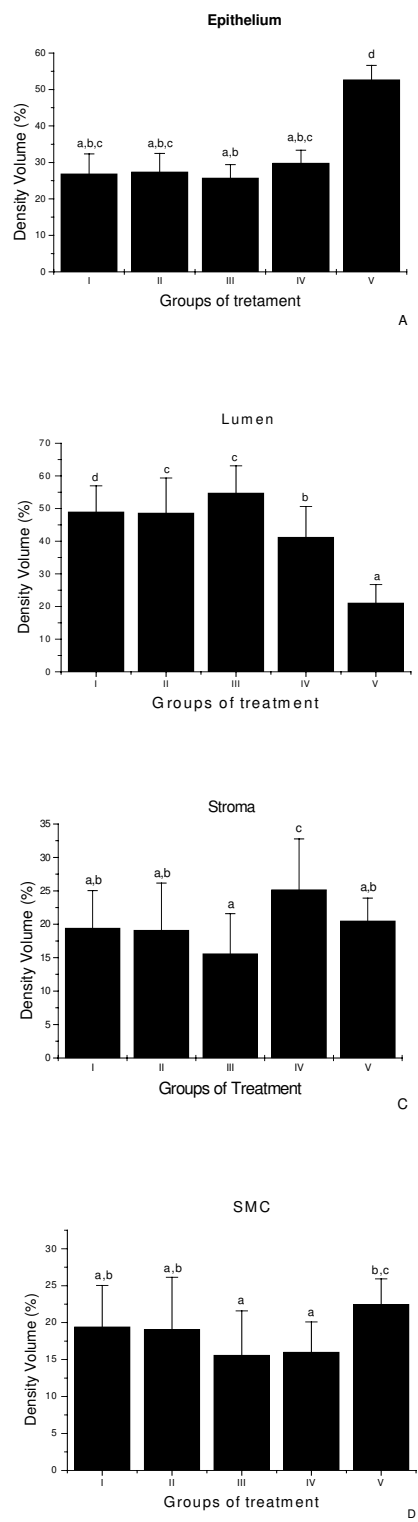


Figure 4

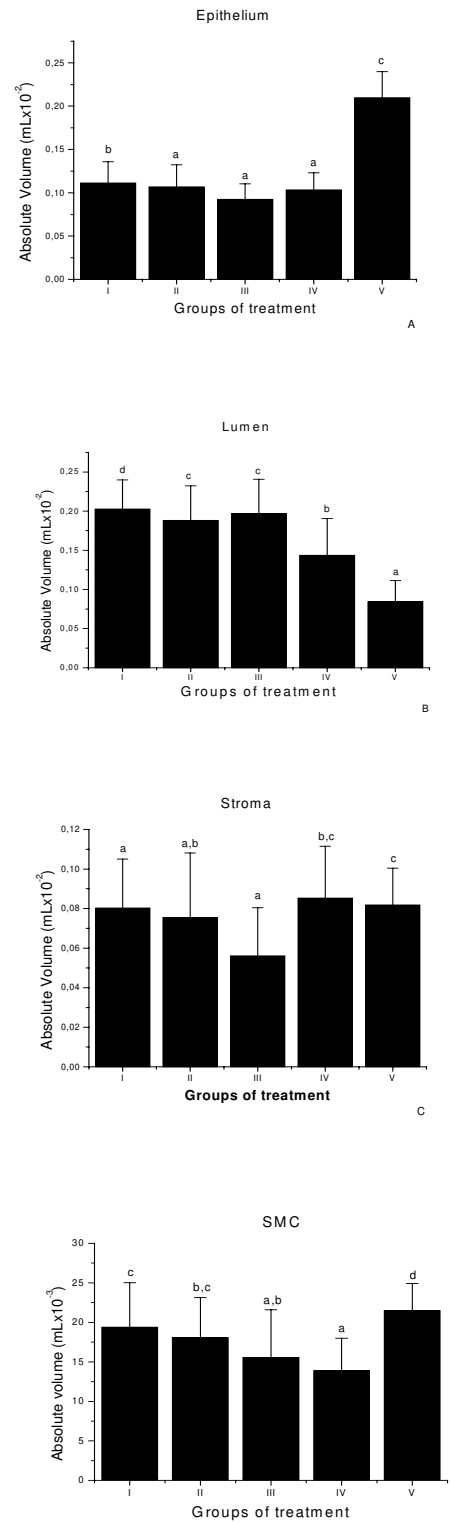


Figure 5

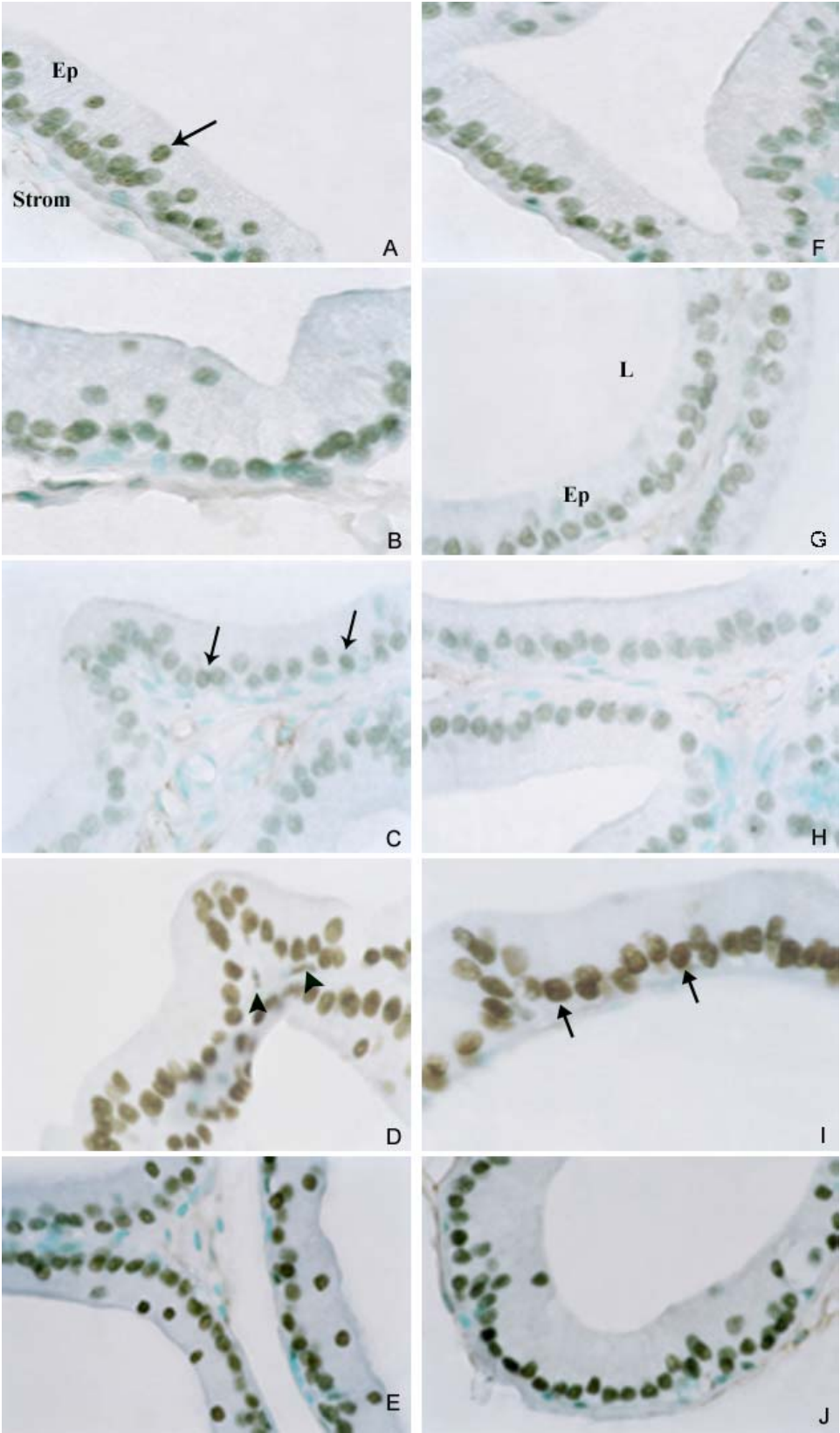


Figure 6

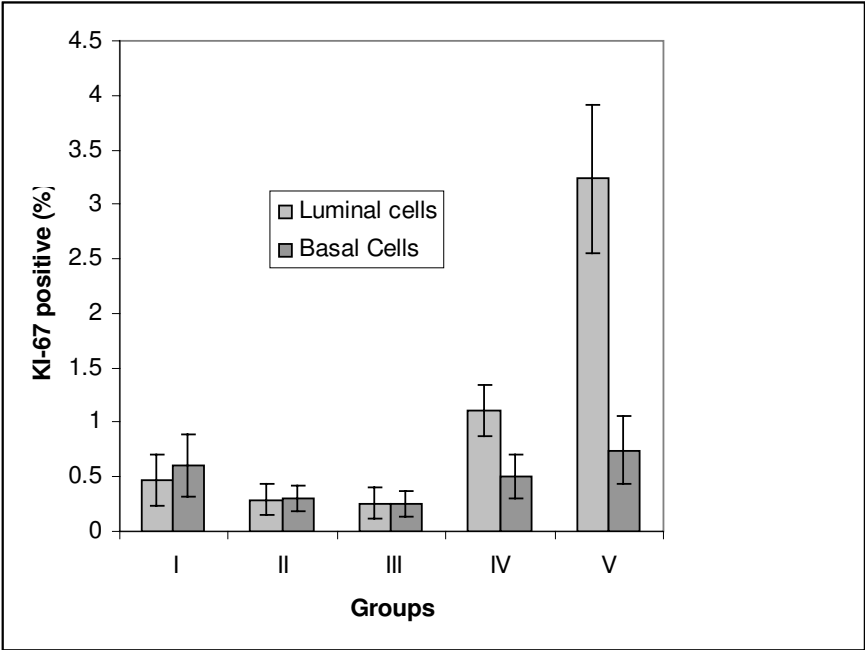
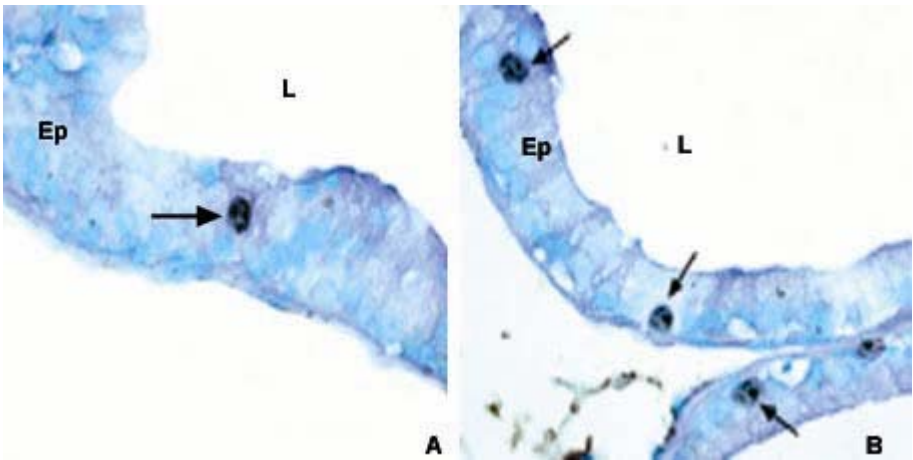
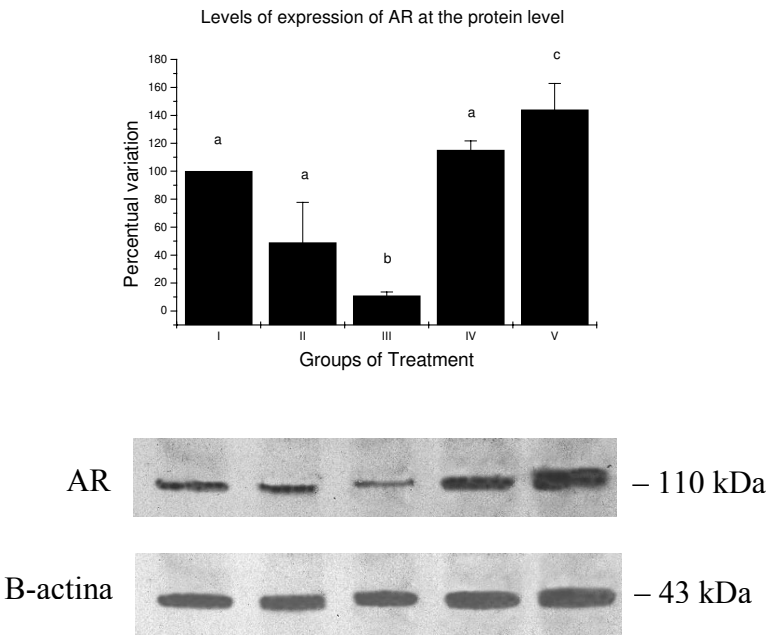
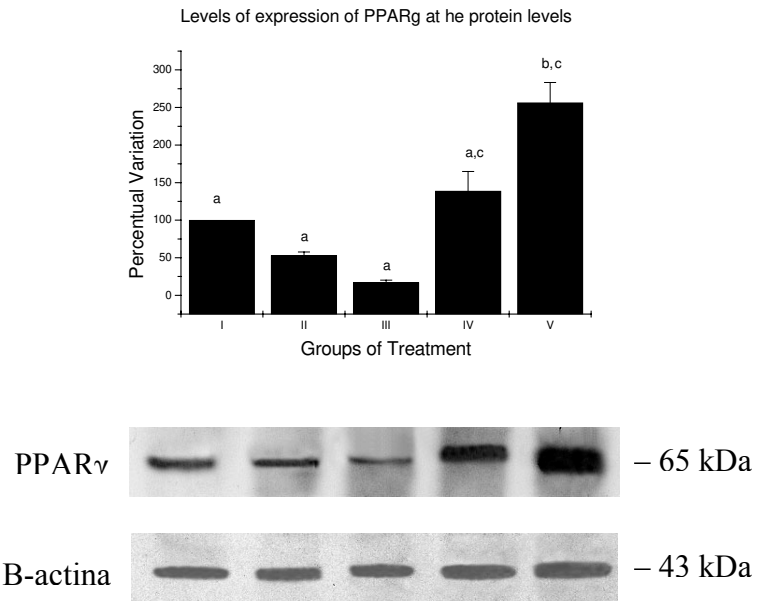


Figure 7



A



B

CONCLUSÕES GERAIS

- O crescimento da glândula prostática é fortemente influenciado pela gordura (saturada e insaturada) presente na dieta alimentar.
- Dieta com alto teor de gordura saturada promovem o crescimento prostático, bem como levam a um aumento do ganho de peso corporal, provavelmente através do acúmulo de tecido adiposo nas cavidades corporais.
- Inversamente à gordura saturada, a gordura insaturada na dieta, reduz o crescimento prostático, apresentando um possível efeito citoprotetor.
- Há um aumento nos níveis protéicos de receptor de andrógeno (AR) e de receptor ativado pelos proliferadores dos peroxissomos γ (PPAR γ), nas próstatas dos animais submetidos a dieta contendo gordura saturada, sendo este evento inversamente proporcional ao que ocorre em animais que receberam gordura insaturada na dieta.
- A gordura saturada presente na dieta, promoveu aumento na área epitelial, e diminuição da luz dos ácinos prostáticos, levando a um aumento do órgão.
- Houve um aumento significativo nas concentrações hormonais (estrogênio e testosterona) e uma diminuição destas, nos grupos tratados com gordura saturada e insaturada respectivamente.
- O mecanismo pelo qual a gordura presente na dieta provoca tais alterações pode ocorrer através da modulação da ação androgênica, na próstata.
- O óleo de linhaça parece exercer um efeito protetor na glândula prostática, causando declínio nos níveis séricos de andrógenos, diminuindo a expressão de AR, contribuindo para a manutenção do estado funcional da glândula, impedindo seu crescimento.

- Contrariamente a isso a banha de porco demonstra ser um fator fundamental na alteração do fenótipo prostático, elevando as concentrações de andrógenos, a expressão de AR, conseqüentemente provocando aumento da glândula prostática, especialmente a superfície epitelial.

DECLARAÇÃO

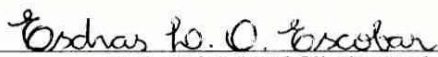
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada “Ácidos graxos com diferentes características afetam o crescimento prostático e a expressão dos receptores de andrógeno (AR) e dos ativadores da proliferação dos peroxissomos γ (PPAR γ)”:

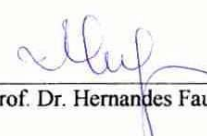
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1319-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluno: Esdras Launi Oliveira Escobar


Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP