

**RAÍSA MISTIERI LORENCINI**

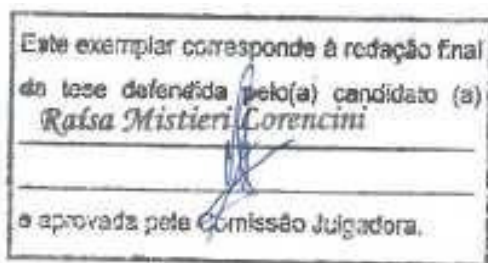
**“Diabetes e células-tronco prostáticas: caracterização e relevância biológica na próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos frente à terapia insulínica”**

**Campinas, 2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**RAÍSA MISTIERI LORENCINI**

**“Diabetes e células-tronco prostáticas: caracterização e relevância biológica na próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos frente à terapia insulínica”**



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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L886d	<p>Lorencini, Raísa Mistieri, 1989- Diabetes e células-tronco prostáticas: caracterização e relevância biológica na próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos frente à terapia insulínica / Raísa Mistieri Lorencini. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Valéria Helena Alves Quitete. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Diabetes. 2. Células-tronco. 3. Próstata. 4. Insulina. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Diabetes and prostatic stem cells: characterization and biological relevance in the ventral prostate of spontaneously diabetic mice submitted to insulin therapy

**Palavras-chave em Inglês:**

Diabetes

Stem cells

Prostate

Insulin

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Mestra em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Valéria Helena Alves Quitete [Orientador]

Marcelo Martinez

Silvana Martinez Baraldi Artoni


**Data da defesa:** 14-03-2013

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 14 de março de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete  
(Orientadora)



---

Assinatura

Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni



---

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez



---

Assinatura

Prof. Dra. Taize Augusto Machado

---

Assinatura

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

---

Assinatura

## Dedicatória

Aos meus pais

Dedico este trabalho a vocês, meus maiores exemplos. O maior valor passado por vocês, a meu ver, foi lealdade, a qual eu espero poder honrar. Por conta disso, compartilhamos todos os dias um pouco de nós, apesar da distância. A vocês, que se sacrificaram e não pouparam esforços pela nossa felicidade.

## Agradecimentos

À Deus, pela vida que me cabe e pelo amor, maior dos sentimentos. Também pelo discernimento e direcionamento sempre conseguido.

Aos meus pais, Sílvia e Álvaro, pela compreensão, presença em todos os momentos e, sobretudo, pelo amor incondicional, que é recíproco.

Ao meu irmão Adriano, por ser o meu maior presente. Por me fazer ser e querer ainda mais ser melhor, por tê-lo em minha vida.

Ao meu marido Erick, por ser meu companheiro no sentido literal da palavra, pelo encorajamento, paciência e principalmente por ter participado ativamente na elaboração deste trabalho. Esta tese é nossa.

À Profa. Valéria, por ter me convidado para fazer parte deste grupo, acreditando em mim e por der-me oportunidade de saber o que é um orientador presente.

Aos meus queridos amigos do Laboratório Biologia da Reprodução pela ajuda, apoio e postura diante das dificuldades. Por ser um grupo altruísta no meio científico, o que é raro e me faz orgulhosa por isso. À Amandinha pela paciência, sempre centrada e apaziguadora. Ao Bitus, pelo conhecimento compartilhado e por me fazer rir mesmo no pior dos dias. Ao Cândis, por ser uma das pessoas mais bondosas que conheci e por me ensinar a viver um dia de cada vez. À Lari, por ser a prova viva que as pessoas podem nos surpreender, pela confiança e cumplicidade.

Aos Professores Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Dra. Evanisi Teresa Palomari e Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos Docentes do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, pelo conhecimento compartilhado durante as disciplinas.

Aos Funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional pela contribuição direta ou indireta para a execução deste trabalho.

À Liliam Alves Senne Panagio, pela paciência e competência com que desenvolve seu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e à sua coordenação, pelo incentivo à pesquisa e ao aprimoramento acadêmico de seus alunos.

À FAPESP, CAPES/PROAP e FAEPEX pelo auxílio financeiro.

A todos meus amigos e familiares que acompanharam minha trajetória até aqui.

## Sumário

1 – ABSTRACT .....	1
2 – RESUMO.....	3
3 – INTRODUÇÃO.....	5
3.1 – Morfologia e Fisiologia da Próstata e Células-Tronco Prostáticas (CTP) .....	5
3.2 – Diabetes Mellitus e Próstata .....	11
4 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	17
5 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
5.1 – Animais e Procedimento Experimental .....	19
5.2 – Microscopia de Luz .....	20
5.3 – Imunohistoquímica para os Receptores de Andrógeno (AR), Insulina (IR) e IGF-1 (IGFR-1); Antígenos de Superfície CD44 e CD117, p63, vimentina e c-Myc. ....	21
5.4 – Western Blotting.....	22
5.5 – Análise Estatística .....	23
6 – RESULTADOS .....	24
6.1 – Microscopia de Luz .....	24
6.2 – Imunohistoquímica e Western Blotting.....	32
7 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	50
8- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	60
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO: DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	75



## 1 – ABSTRACT

Diabetes could be involved in morphological alterations in the prostate. The prostatic stem cells (CTP) can be considered important to prostate's dynamic. However, the relation between CTP and the prostatic disease inception is not clear as well as the association between the diabetes incidence and the CTP identification. Thus, the aim of this study was to characterize the CTP in the ventral prostate compartments from mice spontaneously diabetic with and without glycemetic control. Also, this study intends to establish the correlation between the occurrence of the CTP and the initial and late diabetes effects with and without insulin treatment. A total of 48 male mice (*NOD*, nonobese diabetic) and 16 control group mice BALB /c/Uni (16 to 20 weeks) were utilized during this study. The *NOD* mice presenting capillary glycemetic index  $\geq 300$  mg/dL were considered diabetic (*NOD*<sup>+</sup>), while those which have not presented this index in the same period were considered predisposed (*NOD*<sup>-</sup>). After that, the animals were divided in 8 experimental groups (8 animals each): Control Group 7 days (C1) and 20 days (C2) received subcutaneous injection of 0,9% physiologic saline (5 mL/Kg, s.c.) daily for 7 and 20, respectively; Diabetic groups 7 days (*NOD*<sup>+</sup> 1) and 20 days (*NOD*<sup>+</sup> 2) received similar treatment when compared to control groups; Insulin-diabetic Groups 7 days (*NOD*<sup>+</sup> 1 + I) and 20 days (*NOD*<sup>+</sup> 2 + I) received subcutaneous injection of insulin (4-5 UI, s.c.) daily for 7 and 20 days, respectively; diabetes predisposed group 7 days (*NOD*<sup>-</sup> 1) and 20 days (*NOD*<sup>-</sup> 2) received subcutaneous injections similar treatment to control and diabetic groups. After 7 and 20 days of treatment, the animals were sacrificed and samples of the prostate ventral lobe were collected and analyzed by light microscopy, immunohistochemical and protein quantification analyses. In the C1, *NOD*<sup>-</sup> 1, C2 e *NOD*<sup>-</sup> 2 groups, the ventral lobes presented alike results considering the immunoreactivity and morphological aspects which were characterized by eventual morphological alterations in the Diabetes Predisposed Groups in relation to Control Groups. Also, by and large the *NOD*<sup>+</sup>1, *NOD*<sup>+</sup> 2, *NOD*<sup>+</sup> 1 + I, *NOD*<sup>+</sup> 2 + I presented epithelial atrophy, stromal hypertrophy, presence of inflammatory cells and structural lesions, despite having different intensities and extension of the alterations according to the disease exposure period and insulin therapy. Eventual regions

showing adenocarcinoma disease at initial stage and adenosis occurred only in the *NOD*<sup>+</sup> 2. In general, the immunoreactivity and protein quantification of AR, IR, IGFR-1, p63, c-Myc, CD44, CD117, vimentin and ABCG2 presented alterations at the Diabetic Groups when compared to Control Groups and Diabetic Predisposed Group. However, in the Insulin-Diabetic Groups alterations with small frequency and intensities were verified in relation to Diabetic Groups. Also, strong alterations were observed in the *NOD*<sup>+</sup> 2, *NOD*<sup>+</sup>2 + I when compared to *NOD*<sup>+</sup> 1, *NOD*<sup>+</sup> 1 + I groups. This fact is related to the disease expression period. Diabetes led to activation of cellular proliferative processes involving basal cells, related to androgen decrease and to insulin action on the tissue. The damaged prostatic tissue during diabetes indicated occurrence of prostate malignance alterations, verified by c-Myc positive immunoreactivity and protein quantification increase of the ABCG2. The insulin therapy resulted in decrease of the prostate alterations, especially considering the occurrence of stem cell markers, indicating the positive effect on the tissue.

Key-words: diabetes, stem cells, prostate, insulin.

## 2 – RESUMO

Estudos demonstram que o diabetes provoca alterações morfofisiológicas na próstata. O conhecimento das células-tronco prostáticas (CTP) tem colaborado para o entendimento do complexo funcionamento dessa glândula. Além disso, a relação entre CTP e a origem das doenças prostáticas não é clara bem como a associação entre a ocorrência do diabetes e a caracterização dos nichos das CTP ainda não foi descrito na literatura especializada. Assim, os objetivos desse estudo foram caracterizar as CTP nos compartimentos epitelial e estromal da próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos com e sem controle glicêmico e em camundongos predispostos ao diabetes, bem como correlacionar a ocorrência dessas células aos efeitos iniciais e tardios do diabetes com e sem tratamento insulínico. Um total de 48 camundongos machos da linhagem *NOD* (diabético não obeso) e 16 camundongos controles BALB/c/ Uni (16 a 20 semanas de idade), foram utilizados no estudo. Os camundongos *NOD* que apresentaram glicemia capilar  $\geq 300$  mg/dL foram considerados diabéticos (*NOD*<sup>+</sup>), enquanto aqueles que não apresentaram diabetes durante o mesmo período foram considerados como predispostos (*NOD*<sup>-</sup>). Posteriormente, os animais foram divididos em oito grupos experimentais (8 animais cada): Grupos Controles 7 dias (C 1) e 20 dias (C 2) receberam injeções subcutâneas de soro fisiológico 0,9% (5 mL/kg, s.c.) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente; Grupos Diabéticos 7 dias (*NOD*<sup>+</sup> 1) e 20 dias (*NOD*<sup>+</sup> 2) receberam tratamentos similares aos dos grupos controles; Grupos Diabéticos-Insulina 7 dias (*NOD*<sup>+</sup> 1 + I) e 20 dias (*NOD*<sup>+</sup> 2 + I) receberam injeções subcutâneas de insulina (4-5UI, s.c.) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente; Grupos Predispostos ao Diabetes 7 dias (*NOD*<sup>-</sup> 1) e 20 dias (*NOD*<sup>-</sup> 2) receberam tratamentos similares aos dos grupos controles e diabéticos. Após 7 e 20 dias de tratamento, os animais experimentais foram sacrificados e amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas e submetidas às análises de microscopia de luz, imunohistoquímica e quantificação protéica. Nos Grupos C1, *NOD*<sup>-</sup> 1, C2 e *NOD*<sup>-</sup> 2 os lobos ventrais apresentaram imunorreatividade e morfologia semelhantes, sendo que eventuais alterações morfológicas foram identificadas nos Grupos Predispostos ao Diabetes em relação aos Grupos Controles. Já os Grupos *NOD*<sup>+</sup> 1, *NOD*<sup>+</sup> 2, *NOD*<sup>+</sup> 1+I e *NOD*<sup>+</sup> 2+I apresentaram atrofia epitelial, hipertrofia estromal,

presença de células inflamatórias e lesões estruturais, porém de diferentes intensidades e região de extensão conforme tempo de doença e terapia insulínica. Eventuais regiões com adenocarcinoma em estágio inicial e adenose ocorreram apenas no Grupo  $NOD^+$  2. De modo geral, as imunorreatividades e quantificações protéicas das moléculas AR, IR, IGFR-1, p63, c-Myc, CD44, CD117, vimentina e ABCG2 foram alteradas nos Grupos Diabéticos quando comparadas aos Grupos Controles e Predispostos ao Diabetes. No entanto, os Grupos Diabéticos-Insulina se mostraram menos alterados em relação aos Grupos Diabéticos. Além disso, verificou-se maior grau de alteração nos Grupos  $NOD^+$  2,  $NOD^+$  2+I quando comparados aos Grupos  $NOD^+$  1,  $NOD^+$  1+I, processo este que está intimamente relacionado ao tempo de expressão da doença. O diabetes resultou na ativação de um processo proliferativo celular que sensibilizou células basais, relacionada à diminuição do andrógeno e às ações de insulina no tecido. O desequilíbrio da próstata no diabetes por um maior tempo sugeriu a ocorrência de alterações malignas na próstata, com positiva imunorreatividade para c-Myc e aumento da quantificação protéica para ABCG2. A terapia com insulina resultou na diminuição nas alterações da próstata, especialmente considerando a ocorrência de marcadores de células-tronco, indicando o efeito positivo no tecido.

Palavras-chave: diabetes, células tronco, próstata, insulina.

## 3 – INTRODUÇÃO

### 3.1 – Morfologia e Fisiologia da Próstata e Células-Tronco Prostáticas (CTP)

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina andrógeno-dependente, sendo seus nutrientes componentes do líquido seminal (Taylor & Risbridger, 2008; Thomas & Knych, 1966). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática e exercem seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos (Toorians et al., 2003; Hsing et al., 2002). A DHT é resultante da conversão da testosterona através da enzima 5 $\alpha$ -redutase (Toorians et al., 2003; Prins et al., 1991). Além dos andrógenos, outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patológicas atuando sobre as funções prostáticas (Cunha et al., 2002; Weihua et al., 2002).

Nos roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal; de acordo com a localização ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Untergasser et al., 2005; Marker et al., 2003). De maneira geral, os lobos prostáticos são compostos por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares e apresentam epitélio secretor de revestimento simples envolvido por estroma fibromuscular (Aumüller & Adler, 1979). A membrana basal está localizada entre o epitélio e o estroma, tendo como seus principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (Knox et al., 1994).

A próstata é composta por diferentes tipos celulares, os quais podem ser distintos pela expressão diferencial de citoqueratinas e/ou a expressão de diferenciação conjunta dessas (Berry et al., 2008). O epitélio prostático simples é formado por três tipos celulares: luminal ou secretor, basal e neuroendócrino (De Marzo et al., 1999).

As células luminiais epiteliais representam o mais frequente tipo celular tanto no epitélio normal quanto em alterações estruturais formando o compartimento exócrino da

próstata, o qual secreta proteínas como o antígeno específico da próstata (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP) nos humanos (De Marzo et al., 1999) e prostateína e probasina no rato (Berry et al., 2008; Kinbara et al., 1996). As células luminiais expressam receptor androgênico (AR) e são andrógeno-responsivas e andrógeno-dependentes (Taylor & Risbridger, 2008). Biomarcadores para PSA, PAP e AR são utilizados frequentemente para identificar as células epiteliais luminiais (De Marzo et al., 1999). Já as células neuroendócrinas são identificadas pela expressão de neurofisina, cromogranina A, sinaptofisina, e calcitonina, mas não expressam PSA e/ou AR. (Berry et al., 2008; Abrahamsson et al., 2000). Estas populações de células diferenciadas podem tornar-se modificadas no câncer de próstata apresentando alterações de número, estrutura e função; sugerindo papel regulatório nessa lesão (Nelson et al., 2007; Ruscica et al., 2007). Em contraste, as células basais são relativamente indiferenciadas não apresentando atividade secretora, constituindo o compartimento basal da próstata (McNeal, 1988). As células basais são distintas por apresentarem morfologia variável, ocorrendo desde células pequenas e achatadas, com cromatina condensada e pequena quantidade de citoplasma, a células cúbicas com amplo citoplasma (McNeal, 1988). As células basais são andrógeno-independentes, mas andrógeno-responsivas, sendo que essas são independentes de andrógenos para sua manutenção e sobrevivência, crescimento e diferenciação, mas podem ser estimuladas por ação androgênica via fatores de crescimento estromais, os quais agem sobre as células basais para o repovoamento do compartimento celular luminal (Taylor & Risbridger, 2008; De Marzo et al., 1999). Com relação aos biomarcadores, as células basais são normalmente identificadas pela ausência da expressão de proteínas secretoras da próstata, como o PSA e a PAP (Wang et al., 2001; Van Leenders et al., 2000). O biomarcador p63 é o mais comum na identificação das células basais além de ser utilizado como diferenciador celular em tecido prostático com características benignas e neoplásicas (Farinola & Epstein, 2004). Ainda, é conhecido que expressão de AR em células basais é relativamente baixa se comparada às células luminiais (Leav et al., 1996; Bonkhoff & Remberger, 1993). Também, no compartimento basal sugere-se a localização de outro tipo celular conhecido como células-tronco epiteliais ou progenitoras (Taylor & Risbridger, 2008; Rizzo et al., 2005). As células-tronco têm a capacidade de auto-renovação e

regeneração durante a vida adulta, localizadas em um local específico no órgão de interesse (Takao & Tsujimura, 2008). O conceito de “células tronco cancerosas” (CTC) foi introduzido a mais de 50 anos quando foi reconhecido que apenas uma pequena proporção de células isoladas do tumor eram clonogênicas e extremamente proliferativas *in vitro* e *in vivo*, o que pode indicar que elas seriam CTC (Dennis et al., 1981).

O termo célula-tronco da próstata (CTP) é normalmente usado para se referir às células-tronco epiteliais. No entanto, a próstata contém nos compartimentos epitelial e estromal suas supostas populações de células progenitoras (Takao & Tsujimura, 2008).

Diversos modelos têm sido propostos para identificar e isolar as CTP. O nicho das CTP ainda não foi completamente caracterizado, devido às dificuldades para identificar tais células, uma vez que essas possuem um ciclo de auto-renovação muito lento (Takao & Tsujimura, 2008). Um dos modelos experimentais para tal identificação sugere que as CTP localizam-se no compartimento basal e geram células epiteliais luminais altamente diferenciadas (Collins & Maitland, 2006; Lam & Reiter, 2006). Outros estudos questionaram a idéia de que as CTP localizam-se unicamente no compartimento epitelial basal. Experimentos em camundongos onde as CTP foram identificadas por BrdU, sugeriram que as CTP não estão restritas ao compartimento basal, ocupando também a camada celular luminal como uma população de células de proliferação lenta na parte proximal dos ductos da próstata (Tsujimura et al., 2002). Outros estudos utilizando camundongos *Knockout* para o gene p63, o qual é considerado um biomarcador de células basais prostáticas, avaliaram o papel desse gene no desenvolvimento da próstata (Tsujimura et al., 2002). De acordo com esses estudos, o p63 foi essencial para o desenvolvimento da próstata e a perda de células basais p63 positivas resultou na agenesia prostática quando avaliada no final do período gestacional (Signoretti et al., 2005). No entanto, quando rudimentos do seio urogenital foram coletados de embriões de camundongos negativos para o gene p63 e cultivados por mais de um mês, evidenciou-se a formação de ductos ramificados, bem como a expressão de AR e proteínas secretoras na camada de células colunares secretoras desses ductos (Kurita et al., 2004). Ainda nesse mesmo experimento, células neuroendócrinas também se desenvolveram na ausência de células basais p63-positivas. Assim, sugeriu-se que as células-tronco são células multipotentes no

compartimento basal e que as células luminais e neuroendócrinas podem se diferenciar na ausência total de células basais. Assim sendo, o compartimento basal pode não ser o local exclusivo da ocorrência de CTP.

Antígenos de superfície celular como o CD44 e CD117 têm sido utilizados para identificar as CTP (Leong et al., 2008). CD44 está presente na população de células basais com potencial multipotência. No entanto, Yamamoto et al. (2012) defenderam que um único agente terapêutico visando células CD44<sup>+</sup> no câncer de próstata não seria alvo amplo para a maioria das células clonogênicas.

Outro potencial marcador de CTP é o CD117, também conhecido como c-Kit, é expressado predominantemente no compartimento epitelial basal da região prostática proximal à uretra (Leong et al., 2008). Contudo, uma subpopulação de células epiteliais luminais foi positiva para CD117 apontando que células positivas para esse marcador não são exclusivas do compartimento epitelial luminal ou do epitelial basal (Leong et al., 2008).

Já o estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Cunha & Matrisian, 2002; Tuxhorn et al., 2001). Ainda, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes constituem partes integrais do estroma (Tuxhorn, et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. Tuxhorn et al (2002) mostraram que o compartimento estromal prostático caracterizado como reativo, é composto de fibroblastos e mais de 50% de miofibroblastos (fenótipo de célula estromal ativada) que não é observado no estroma prostático normal. O miofibroblasto é descrito como um tipo celular intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, conforme a expressão de proteína do citoesqueleto e aspectos estruturais (Gabbiani et al., 1972). Fibroblastos no tecido lesado alteram seu fenótipo para o de miofibroblasto, o qual é identificado pela expressão da vimentina e da  $\alpha$ -actina (Tuxhorn et al., 2001). De acordo com Tuxhorn et al (2002), a substituição do estroma normal pelo estroma reativo pode influenciar as interações epitélio-estroma e afetar a progressão do câncer prostático.



A relação epitélio-estroma se mantém constante desde o nascimento até à idade adulta em glândulas não-hiperplásicas. Já na senescência, essa relação aumenta de 2:1 em condições normais e para 5:1 na hiperplasia benigna prostática (HBP) (Shapiro et al., 1997). Assim, devido à hiperatividade proliferativa do estroma estar relacionada ao desenvolvimento da HBP, acredita-se na existência de células-tronco adultas no estroma prostático em resposta a estímulos durante a patogênese da HBP (Lin et al., 2007).

Células-tronco mesenquimais ou células estromais multipotentes (CTEM) foram inicialmente isoladas a partir da medula óssea de indivíduos adultos, e identificadas no interior do tecido conjuntivo da maior parte dos órgãos (Phinney & Prockop, 2007). CTEM podem se diferenciar em tecidos mesenquimais como ossos, tecido adiposo, e cartilagem e contribuir para a regeneração de tecidos mesenquimais (Chamberlain et al., 2007). CTEM comumente expressam vários marcadores de superfície, incluindo CD29, CD44, CD49f, CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1 (Takao & Tsujimura, 2008). Lin et al. (2007) demonstraram em cultura de células estromais de pacientes com HBP, a ocorrência de diferentes marcadores para CTEM, incluindo CD30, CD34, CD44, CD54, CD133 (5% células).

Apesar da identificação das CTP ser de difícil caracterização, é preciso considerar o microambiente ou nicho ocupado por essas células (Knox et al., 1994). Assim, a proximidade física das CTP no compartimento basal adjacente à membrana basal implicaria em importante interação com proteínas da matriz extracelular, incluindo integrinas e proteínas juncionais que são conhecidas na regulação da diferenciação das células-tronco (Knox et al., 1994; Bonkhoff & Remberger, 1993).

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção devido às condições patológicas que atingem esse órgão (De Marzo et al., 2003). Dentre essas, podem-se destacar a hiperplasia benigna (HBP), a neoplasia intraepitelial (NIP) e o câncer prostático (CP) (De Marzo et al., 2003; Leav et al., 2001; Marcelli & Cunningham, 1999). A HBP caracteriza-se por predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). O CP é considerado uma doença epitelial e, frequentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Wong et al., 2000; Droller, 1997). De

acordo com Majumder et al. (2008), a NIP é clinicamente apontada como uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo e pode precedê-lo por até 10 anos, mas os mecanismos moleculares que suportam essa transição ainda não são conhecidos.

Mutações somáticas das células-tronco/progenitoras podem afetar genes envolvidos na regulação do crescimento, sinalização celular, diferenciação terminal e reparação, além de servirem como alvos para o início, progressão e metástase do CP (Bell & Van Zant, 2004; Reya et al., 2001). Como as células tumorais expressam características similares às de células luminais, células luminais mutadas foram consideradas como precursoras do adenocarcinoma (Mimeault et al., 2008; Zenzmaier et al., 2008). Portanto, a hipótese de que células de câncer de próstata podem ser derivadas a partir de células-tronco ou células de fenótipo intermediário é reforçada, pois as células-tronco possuem muitas características em comum com as células tumorais, incluindo a auto-renovação, pluripotência na diferenciação e alto potencial replicativo (Mimeault et al., 2008; Zenzmaier et al., 2008).

O oncogene Myc (c-Myc) tem sido amplamente investigado em muitos cânceres humanos (Nesbit et al., 1999) sendo suficiente para gerar fenótipos cancerosos em vários tecidos murinos quando expresso como transgene (Jensen et al., 2003; Zhang et al., 2000; Nesbit et al., 1999). A proteína MYC é um fator de transcrição que desempenha papel fundamental na regulação de vários processos celulares como progressão do ciclo celular, metabolismo, biogênese dos ribossomos, síntese de proteínas, função mitocondrial, e autorenovação de células tronco (Knoepfler et al., 2008). O c-Myc está superexpressado em diversos tipos de tumores, o que em muitos casos, está associado às alterações genéticas somáticas tais como: translocações e ampliações de genes (Nesbit et al., 1999). Em adição, numerosos estudos de câncer prostático humano têm demonstrado aumento de 30% do número de cópias do gene c-Myc nos tumores, até mesmo no estágio pré-neoplásico, apresentando aumento na taxa de transição de recido normal para alteração de baixo-grau de NIP, e deste para alteração de alto-grau de NIP (Koh et al., 2010; Nandana et al., 2010; Elwood-Yen et al., 2003; Nesbit et al., 1999; Sato et al., 1999).

Já o transportador de membrana do tipo *ATP Binding Cassette* (ABCG2) tem sido utilizado como possível marcador de CTP maligna e está associado ao desenvolvimento de multi-resistência aos fármacos (Kasper, 2009). ABCG2 foi identificado em células

mamárias cancerosas multirresistentes a drogas, sendo relacionado a mecanismo de efluxo de agentes quimioterapêuticos. Posteriormente, o ABCG2 foi associado à resistência a drogas em células leucêmicas, adenocarcinomas do endométrio gastrointestinais, carcinomas do pulmão e mieloma múltiplo (Doyle & Ross, 2003). Além de efluxo de agentes quimioterapêuticos, ABCG2 foi identificado como mediador no efluxo de toxinas e porfirinas, protegendo da morte celular provocada pelo acúmulo de porfirinas em ambiente hipóxico, e em resposta à radiação (Keith et al, 2007). Huss et al. (2005) identificaram uma subpopulação de células positivas para ABCG2 e negativas para receptor de andrógenos, na qual ABCG2 isolou uma possível linhagem de células-tronco malignas, sugerindo que este processo protege células tronco malignas da terapia de privação de andrógenos, hipóxia ou quimioterapia adjuvante. Zenzmaier et al. (2008) sugeriram que células prostáticas progenitoras estão localizadas no compartimento basal glandular e tem contato com a membrana basal, assim como com o compartimento basal e expressam citoqueratinas 5 e 14, altos níveis de integrinas, CD44, CD113 e ABCG2 e são AR negativas.

### **3.2 – Diabetes Mellitus e Próstata**

O diabetes mellitus é uma doença que promove alterações do metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura levando à hiperglicemia proveniente da deficiência insulínica (Conget, 2002; Mokdad, 2001). Essa doença é causada por deficiência na secreção pancreática de insulina e/ou incapacidade dos tecidos em responder eficientemente à insulina, gerando hiperglicemia e afetando todos os órgãos (Öztürk, 1996). Dois tipos de diabetes são descritos, o tipo I e o tipo II. O diabetes do tipo I (infanto-juvenil) ou Diabetes Mellitus Dependente de Insulina (IDDM) é uma doença crônica que se manifesta em crianças e adolescentes, caracterizada pela destruição das células beta do pâncreas produtora de insulina, resultando em severa ou absoluta falta de insulina, além de alta tendência a cetoses (Ritz, 2002). Os portadores deste tipo de diabetes necessitam de doses diárias de insulina para minimizar os efeitos sistemáticos da doença e promover melhorias significativas na qualidade de vida (Stefan, 1996). Já o diabetes do tipo II (adulto) ou

Diabetes Mellitus Não Dependente de Insulina (NIDDM), é caracterizado pela estabilidade e relativa insensibilidade à insulina com ausência de cetoses. A obesidade é uma das características marcantes do diabetes tipo II, levando a diminuição do número de receptores de insulina nas células alvo tornando a quantidade de insulina ineficiente (Ritz, 2002).

A incidência mundial do diabetes tem aumentado substancialmente nos últimos anos, com mais de 200 milhões de portadores, sendo a previsão de aproximadamente 380 milhões até 2025 (Ministério da Saúde, 2012). A última pesquisa que estima o percentual de brasileiros com a doença foi realizada em 2009 e aponta 11% dos mesmos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012). O diabetes é também uma doença que debilita os portadores levando-os a várias complicações como: deficiências vasculares, renais, oftálmicas, neurológicas, bem como perda de peso, problemas digestivos, alteração no processo de cicatrização de lesões, sendo que na maioria dos casos leva o indivíduo ao afastamento das atividades de trabalho (Ciardullo et al., 2004). Além disso, indivíduos diabéticos frequentemente apresentam síndrome metabólica; que constitui em grupo de fatores de risco para doenças cardiovasculares como resistência insulínica, dislipidemia, pressão arterial elevada, obesidade abdominal, e estágios pró-inflamatórios e pró-trombóticos (Kheterpal et al., 2012). A relação entre síndrome metabólica e carcinoma prostático não está definida, mas há hipóteses que essa síndrome é vista como fator de risco para essa lesão maligna (Kheterpal et al., 2012).

Apesar de se conhecer os efeitos nocivos provenientes do estado diabético, comumente são realizadas tentativas para determinar quais os efeitos deletérios nos sistemas orgânicos e, se esses podem ser revertidos através de tratamentos e/ ou dieta. Baseado nessas questões, a utilização de animais que expressem o diabetes, seja por indução química através de drogas ou por espontaneidade vem sendo frequente e de grande utilidade (Arcolino et al., 2010; Fávaro et al., 2009; Ribeiro et al., 2006; Cagnon et al., 2000). Para obtenção de um animal diabético por indução química são utilizadas drogas como estreptozotocina e aloxana, especificamente, diabetogênicas (Ravikumar & Anuradha, 1999; Yildirim et al., 1999). Alguns roedores, como camundongos da linhagem *NOD* (diabético não obeso) (Kikutani & Makino, 1992) e C57BL/Ksj homozigotos diabéticos (db/db), apresentam síndrome semelhante ao diabetes humano tipo I e II,

respectivamente. O camundongo *NOD* apresenta características fisiológicas muito semelhantes aos sintomas clínicos do diabetes tipo I como polidipsia, poliúria, polifagia, emaciação, retinopatas, nefropatas e distúrbios sexuais. Além disso, conforme ocorre em humanos, o diabetes desenvolvido nesses animais é uma consequência de um defeito genético no sistema imune sendo, portanto, uma doença autoimune (Homo-Delarche, 2001). O aparecimento de insulite nos camundongos *NOD* ocorre entre 4 e 5 semanas de idade, seguida de destruição subclínica das células beta do pâncreas e diminuição das concentrações circulantes de insulina (Atkinson & Leiter, 1999). A instalação do diabetes propriamente dito ocorre entre 12 – 30 semanas de idade (Atkinson & Leiter, 1999). Ao contrário do diabetes tipo I humano, a cetoacidose é relativamente leve e os animais afetados podem sobreviver por semanas sem a administração de insulina (Atkinson & Leiter, 1999).

Na próstata, diferentes estudos experimentais com a indução do diabetes tipo I quimicamente, ou com animais os quais desenvolveram espontaneamente esta doença demonstraram complicações como redução do peso glandular, atrofia das células epiteliais secretoras, hipertrofia estromal, processos inflamatórios, neoplasia intraepitelial prostática (NIP), dilatação das organelas envolvidas no processo secretor e aumento dos índices apoptóticos e da frequência de células p63 positivas (Arcolino et al., 2010; Fávaro et al., 2009; Ribeiro et al., 2006; Cagnon et al., 2000; Saito et al., 1996).

Outros estudos revelaram que o diabetes tipo I experimental prejudica a biossíntese de andrógenos pelas células de Leydig e reduz a absorção e retenção desse hormônio na próstata, com conseqüente redução dos níveis de receptores androgênicos nessa glândula (Ikeda et al., 2000; Tesone et al., 1980; Tesone et al., 1976). Ainda, a insulina pancreática tem ação sobre o testículo, logo queda de fertilidade é encontrada em indivíduos com diabetes do tipo I (Schoeller et al., 2012). O diabetes também pode reduzir a qualidade do esperma, já que parceiras de homens diabéticos possuem menor índice de gravidez (Schoeller et al., 2012).

Fávaro et al. (2009) verificaram diminuição dos níveis séricos de testosterona e elevação dos níveis de estradiol, caracterizando importante desbalanço hormonal em animais espontaneamente diabéticos.

O controle do nível glicêmico de animais diabéticos, através da administração exógena de insulina, minimiza os efeitos deletérios dessa doença sobre a próstata (Arcolino et al., 2010; Fávaro et al., 2009; Soudamani et al., 2005). Segundo Soudamani et al. (2005), roedores com diabetes tipo I apresentaram comprometimento no desenvolvimento e diferenciação da próstata ventral, sendo que a administração de insulina exógena minimizou parcialmente os efeitos dessa doença. Arcolino et al. (2010) demonstraram que o tratamento insulínico foi efetivo na prevenção do decréscimo de testosterona e dos aumentos dos índices apoptóticos e de células p63 positivas. No entanto, Fávaro et al. (2009) verificaram que o controle do nível glicêmico de camundongos espontaneamente diabéticos, através da administração de insulina, não restaurou a morfofisiologia da próstata. Contudo, os mesmos autores demonstraram que a utilização simultânea de testosterona, estrógeno e insulina nesses animais foi mais eficiente para recuperação morfofuncional dessa glândula.

A insulina é um hormônio peptídeo que está integralmente envolvido na regulação homeostática de glicose e no metabolismo energético, exercendo seus efeitos biológicos através de receptores localizados na membrana celular de tecidos insulino-responsivos como fígado, músculos e gordura (Argiles & Lopez-Soriano, 2001). A insulina exerce potentes efeitos mitogênicos em diversos tecidos, incluindo a próstata; que podem contribuir para o desenvolvimento da malignescência (Cox et al., 2009).

O risco de câncer de próstata pode ser influenciado pela insulina, a qual provoca mudanças no ambiente hormonal prostático (Nandeesha, 2009). A insulina pode influenciar a regulação da produção e metabolismo da testosterona e da globulina ligante dos hormônios sexuais (SHBG), aumentando a transcrição de genes envolvidos em seu metabolismo (Haffner, 2000). Kelley et al. (1996) demonstraram, através de um estudo *in vitro*, que a insulina suprime a síntese hepática de SHBG. Porém, estudos transversais mostraram uma correlação inversa entre os níveis de insulina e SHBG (Vettor et al., 1997; Haffner et al., 1990). A diminuição dos níveis de SHBG pode resultar no aumento dos níveis de testosterona livre que entra nas células prostáticas, que por sua vez pode aumentar o risco de câncer de próstata (Hautanen, 2000).

Além disso, a insulina pode modular o risco de câncer de próstata através do eixo do fator de crescimento homólogo a insulina (IGF) (Nandeesh, 2009). Os IGFs na próstata são produzidos pelas células estromais e atuam como fatores de crescimento parácrinos no epitélio prostático normal (Djavan et al., 2001). Existem dois tipos de receptores transmembrana de IGF na próstata; o receptor tipo 1 (IGFR-1), que é expresso nas células epiteliais e estromais prostáticas, e o receptor tipo 2 (IGFR-2) o qual não foi encontrado tanto nas células epiteliais quanto no estroma prostático (Djavan et al., 2001). Os efeitos proliferativos e mitogênicos dos IGF nas células prostáticas são modulados pelas proteínas ligantes de IGF (IGFBPs) (Takahashi et al., 2003). A expressão acentuada dos IGF e a diminuição das IGFBPs podem estimular a proliferação de células cancerosas e suas metástases (Denley et al., 2005; Neuvians et al., 2005). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a elevação dos níveis séricos de IGF-1 constitui um potente fator de risco para o início da hiperplasia benigna e da carcinogênese prostática (Pandini et al., 2005; Takahashi et al., 2003; Djavan et al., 2001). Uma vez que IR e IGFR-1 são estruturalmente homólogos, a insulina pode ligar-se ao IGFR-1 e ativar a via de sinalização do IGF, com consequente estimulação do crescimento prostático (Peehl et al., 1995). Barnard et al.(2002) relataram que a hiperinsulinemia aumenta a bioatividade de IGF-1 e suprime a produção de IGFBPs, aumentando assim o risco de câncer de próstata.

Na clínica, sugeriu-se que pacientes diabéticos têm poucas chances de desenvolver o câncer de próstata (Wedepass et al., 2002). Por outro lado, alguns autores apontaram o diabetes como possível fator etiológico para o desenvolvimento do câncer de próstata (Ilić et al., 1996).

Dados epidemiológicos demonstraram que indivíduos diabéticos por um período de cinco anos ou mais têm maior incidência de câncer prostático do que homens não diabéticos (Will et al., 1999). Somado a isso, foi sugerido que o rápido surgimento da HBP e sua progressividade em diabéticos é um fator de risco para o desenvolvimento clínico do câncer de próstata (Hammarsten & Högstedt, 2002). Além disso, estudos com homens apresentando câncer de próstata, os quais receberam terapia de privação androgênica, demonstraram alto risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e ocorrência de hiperglicemia (Basaria et al., 2006), assim como estudos com ratos castrados demonstraram

sensibilidade à insulina debilitada que foi corrigida com reposição de testosterona (Collier et al., 2012).



## 4 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A fundamental participação da próstata no processo reprodutivo masculino, associada a ocorrência de lesões sobre essa glândula vem estimulando estudos sobre a biologia celular, molecular e fisiologia desse órgão. A partir da literatura especializada é conhecido que a condição diabética causa alterações morfofisiológicas da próstata causando a deficiência funcional. Também, é conhecido que a administração de insulina em indivíduos que apresentam diabetes tipo I é terapia relevante para minimização dos efeitos sistêmicos da doença. Contudo, apesar do controle glicêmico ser efetivo em indivíduos com diabetes, os hormônios sexuais como andrógenos, apresentam-se alterados comprometendo a homeostase dos órgãos hormônio-dependentes, como a próstata.

Além disso, o conhecimento das CTP tem contribuído para o entendimento da dinâmica da próstata; além de indicar possíveis terapias, considerando-se o papel dessas tanto no desenvolvimento quanto na manutenção do funcionamento da próstata. A capacidade de regeneração e diferenciação das CTP tem sido analisada através de diversos biomarcadores.

Atualmente, a relação entre CTP e a origem das doenças prostáticas não está totalmente esclarecida, bem como a associação entre a ocorrência do diabetes e a caracterização das CTP na próstata de roedores não foi descrita na literatura especializada.

Desta forma, a caracterização das células-tronco na próstata de animais diabéticos, bem como as relações dessas células no desencadeamento de lesões prostáticas, certamente levará ao melhor entendimento dos efeitos do diabetes na próstata. Assim, os principais objetivos do presente estudo foram:

a) Identificar as CTP do lobo ventral da próstata por imunolocalização e análise quantitativa do nível protéico (*Western Blotting*) de diferentes biomarcadores como: p63, c-Myc, CD44, CD117, vimentina e ABCG2 em camundongos espontaneamente diabéticos com e sem controle glicêmico e em camundongos predispostos ao diabetes;

b) Imunolocalizar e realizar a quantificação protéica dos receptores androgênico (AR), insulínico (IR) e fator de crescimento homólogo a insulina (IGFR-1) na próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos com e sem controle glicêmico e em camundongos predispostos ao diabetes, bem como correlacionar a localização desses receptores com a caracterização das CTP epiteliais e estromais, apontando a viabilidade de um ou mais desses elementos como possíveis sinalizadores dessas células

c) Correlacionar os efeitos iniciais (curto período) e tardios (longo período) do diabetes com e sem controle glicêmico com a ocorrência das CTP em camundongos espontaneamente diabéticos.

## 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 – Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados 48 camundongos machos da linhagem *NOD* (diabético não obeso) e 16 camundongos controles BALB/c/ Uni, com 16 a 20 semanas de idade, obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP) e no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ). O nível de glicose no sangue foi aferido por glicemia capilar, utilizando aparelho *Optium Advanced Diabetes Management System (MediSense, Abingdon, United Kingdom)*, diariamente por 20 dias. Os camundongos *NOD* que apresentaram glicemia capilar  $\geq 300$  mg/dL (Shirai et al., 1998) entre 16 e 20 semanas de idade foram considerados diabéticos (*NOD*<sup>+</sup>). Por outro lado, os animais que não apresentaram diabetes durante o mesmo período foram considerados como predispostos ao diabetes (*NOD*<sup>-</sup>). Posteriormente, os animais foram divididos em oito grupos experimentais, com oito animais por grupo. O experimento está de acordo com o comitê de ética em experimentação animal Unicamp nº2447-1.

- a. **Grupo Controle (BALB/c/Uni)**: os animais controles foram divididos em dois subgrupos: **Grupo Controle 7 dias (C 1)** e **Grupo Controle 20 dias (C 2)**. Ambos, receberam injeções subcutâneas de 5 mL/kg de soro fisiológico 0,9% (*Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil*) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente;
  
- b. **Grupo Diabético (*NOD*<sup>+</sup>)**: os animais diabéticos foram divididos em dois subgrupos: **Grupo Diabético 7 dias (*NOD*<sup>+</sup> 1)** e **Grupo Diabético 20 dias (*NOD*<sup>+</sup> 2)**. Ambos receberam injeções subcutâneas de 5 mL/kg de soro fisiológico 0,9% (*Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil*) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente;

- c. **Grupo Diabético-Insulina:** os animais diabéticos foram divididos em dois subgrupos: **Grupo Diabético-Insulina 7 dias ( $NOD^+$  1+I)** e **Grupo Diabético-Insulina 20 dias ( $NOD^+$  2+I)**. Ambos receberam injeções subcutâneas de 4-5UI de insulina NPH - Neutral Protamine Hagedorn (*Biobrás, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil*) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente (Fávaro et al., 2008);
- d. **Grupo Predisposto ao Diabetes ( $NOD^-$ ):** os animais predispostos ao diabetes foram divididos em dois subgrupos: **Grupo Predisposto 7 dias ( $NOD^-$  1)** e **Grupo Predisposto 20 dias ( $NOD^-$  2)**. Ambos receberam injeções subcutâneas de 5 mL/kg de soro fisiológico 0,9% (*Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil*) diariamente por 7 e 20 dias, respectivamente.

Os animais dos oito grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, Paraná, Brasil*). Após 7 e 20 dias de tratamento, todos animais dos grupos experimentais foram anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg, i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e sacrificados. Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas dos animais de cada grupo experimental e submetidas às análises de microscopia de luz, imunohistoquímica e Western Blotting.

## 5.2 – Microscopia de Luz

Amostras do lobo ventral da próstata de 4 animais de cada grupo experimental foram coletadas e fixadas em solução de Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos

em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo Hyrax M60 (*Zeiss, Hamburgo, Alemanha*) com espessura de 5 micrômetros com posterior coloração em Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979) e fotografados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (*Nikon, Tóquio, Japão*).

### **5.3 – Imunohistoquímica para os Receptores de Andrógeno (AR), Insulina (IR) e IGF-1 (IGFR-1); Antígenos de Superfície CD44 e CD117, p63, vimentina e c-Myc.**

Amostras do lobo ventral da próstata de 4 animais de cada grupo experimental, as mesmas utilizadas para a microscopia de luz, foram utilizadas na técnica de imunohistoquímica. A seguir foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura no micrótomo Hyrax M60 (*Zeiss, Hamburgo, Alemanha*) e coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C em microondas e/ou proteinase K (*Promega, V3021*) O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% em metanol) por 15 minutos. Para diminuir as ligações inespecíficas proteína-proteína, os cortes foram incubados com 3% de albumina soro bovino (BSA) em tampão TBS-T por 1 hora. Posteriormente, os antígenos AR, IR, IGFR-1, CD44, CD117, p63, vimentina e c-Myc foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para AR, policlonal *rabbit* ab60946 (phospho Y1361) (*abcam, EUA*) para IR, policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para IGFR-1, monoclonal *mouse* p63 (4 A4) (sc-8431) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para p63, monoclonal *rabbit* (ab32072) (*abcam, EUA*) Y69 para c-Myc, policlonal *rabbit* ab41478 (*abcam, EUA*) para CD44, policlonal *rabbit* H-300 (sc-5535) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para CD117, monoclonal *mouse* ab8069 (*abcam, EUA*) para vimentina e monoclonal *rabbit* (ab32072) (*abcam, EUA*) Y69

para c-Myc diluídos (1:35-100) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O kit *Envision* Horseradish Peroxidase - HRP (K4006) (K4010) (*Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA*) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários HRP conjugados proveniente do *kit Envision* por 60 minutos e, a seguir revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes utilizou-se Hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (*Nikon, Tóquio, Japão*). Os cortes do lobo ventral da próstata dos animais de cada grupo experimental foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, indicando a imunorreatividade dos anticorpos, sendo avaliados 4 animais de cada grupo, 5 campos cada. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células epiteliais e/ou estromais positivas (Tomas & Krušlin, 2004; Tuxhorn et al, 2002).

#### **5.4 –Western Blotting**

Pares de lobos ventrais da próstata provenientes de 4 animais de cada grupo foram coletados e homogeneizadas em tampão de extração contendo 100 mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton X-100 and 10 µl/mL de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos obtidos por centrifugação foram submetidos à determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.,USA). O correspondente a 120 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 70 V por 3 horas. As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído por uma hora e

incubadas com os anticorpos primários policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (*Santa Cruz Biotchenology, EUA*) para AR, policlonal *rabbit* ab60946 (phospho Y1361) (*abcam, EUA*) para IR, policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (*Santa Cruz Biotchenology, EUA*) para IGFR-1, monoclonal *mouse* p63 (4 A4) (sc-8431) (*Santa Cruz Biotchenology, EUA*) para p63, policlonal *rabbit* ab41478 (*abcam, EUA*) para CD44, policlonal *rabbit* H-300 (sc-5535) (*Santa Cruz Biotchenology, EUA*) para CD117, monoclonal *mouse* ab8069 (*abcam, EUA*) para vimentina e policlonal *rabbit* B-25 (sc-130933) (*Santa Cruz Biotchenology, EUA*) para ABCG2 na faixa de diluição 1:250-500. Tecido prostático do camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata foi utilizado como controle positivo na reatividade do anticorpo para ABCG2. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit e anti-mouse* HRP conjugados na faixa de diluição de 1:1000-10000 (de acordo com a molécula) em 1% BSA. Após nova série de lavagens com TBS-T, para a detecção das bandas reativas, as membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 min e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). Anticorpo para  $\beta$  actina foi usado como controle endógeno e a intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria, através do programa de análise de imagem ImageJ: Image Processing and Analysis in Java (USA).

## 5.5 – Análise Estatística

O estudo da comparação entre grupos foi realizado para a análise de quantificação protéica das diferentes moléculas: AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

## 6 – RESULTADOS

### 6.1 – Microscopia de Luz

#### Grupos Controle (1 e 2)

Os animais dos Grupos Controles não apresentaram alterações na estrutura do lobo ventral da próstata, considerando-se os dois períodos experimentais. Assim, tais grupos serão descritos conjuntamente. Os ácinos prostáticos apresentaram tamanhos variados com mucosa pregueada. O epitélio secretor foi simples com células colunares, núcleo basal e nucléolo proeminente. As células epiteliais se apresentaram assentadas em íntegra e contínua membrana basal. Células basais foram verificadas entremeando as células epiteliais secretoras (Figuras 1a e 1b).

O estroma apresentou fibras colágenas e células musculares lisas ao redor do epitélio, distribuídas de forma concêntrica ao redor do ácino e homogênea por todo o estroma. Vasos sanguíneos também foram caracterizados (Figuras 2a e 2b).

#### Grupo *NOD*<sup>-1</sup>

Os animais do Grupo *NOD*<sup>-1</sup> apresentaram ácinos de tamanhos variados, com mucosa pregueada. O epitélio secretor apresentou-se simples, com células colunares de núcleo basal e nucléolo proeminente. Porém, apesar da estrutura do lobo ventral da próstata ser semelhante aos Grupos Controles 1 e 2, em eventuais pontos do epitélio glandular verificou-se ocorrência de neoplasia intraepitelial prostática (NIP), do tipo papilífera (Figura 1c). As células epiteliais se mostraram assentadas em membrana basal, com eventuais pontos de descontinuidade. Células basais foram verificadas entremeando as células epiteliais secretoras (Figura 1c –inset).

O estroma apresentou-se com ligeira hipertrofia se comparado aos animais dos Grupos Controles, evidenciando-se aumento de fibras colágenas e de células musculares



lisas ao redor do ácino glandular, distribuídas de forma homogênea pelo estroma. Eventuais pontos contendo células inflamatórias foram identificadas (Figura 2c).

#### Grupo $NOD^+$ 1

Os ácinos apresentaram-se de tamanhos variados, com mucosa levemente pregueada, formada por epitélio simples atrófico com células epiteliais tendendo à cúbicas, entremeadas à células basais, além da presença de eventuais microácinos (Figura 1e – inset). Pontos de descontinuidade da membrana basal foram verificados, assim como pontos de neoplasia intraepitelial prostática. Células basais foram evidenciadas entremeando células epiteliais secretoras, bem como células epiteliais dispersas no lúmen foram detectadas (Figura 1e – inset).

O estroma glandular apresentou hipertrofia e hiperplasia das células musculares, especialmente ao redor do ácino, assim como aumento dos elementos fibrilares como as fibras colágenas. Ocorrência de células inflamatórias foi evidenciada de forma pontual nesse grupo (Figura 2e). Além disso, em dois animais do grupo foram verificadas regiões glandulares com acentuada desorganização estrutural e com acúmulo de células inflamatórias, células epiteliais secretoras, adipócitos e vasos sanguíneos (Figura 2e – inset).

#### Grupo $NOD^+$ 1 + I

Os ácinos demonstraram tamanhos variados e eventuais regiões de pregueamento da mucosa. A ocorrência de eventuais pontos de NIP foi verificada. As células epiteliais secretoras foram colunares baixas com núcleo basal e nucléolo evidente, sendo algumas destas encontradas dispersas no lúmen. (Figura 1g e Figura 1g – iset).

O estroma apresentou hipertrofia dos elementos fibrilares e musculatura lisa. Houve diminuição dos pontos com presença de células inflamatórias em relação ao Grupo  $NOD^+$  1, sendo estes no Grupo  $NOD^+$  1 + I considerados eventuais (Figura 2g).

#### Grupo $NOD^- 2$

Os ácinos dos animais do Grupo  $NOD^- 2$  se apresentaram de variados tamanhos, com mucosa pregueada. O epitélio secretor foi simples com células colunares, núcleo basal e nucléolo evidente (Figura 1d). Eventuais pontos de NIP foram identificados. As células epiteliais se apresentaram assentadas em membrana basal com eventuais pontos de descontinuidade (Figura 2d).

O estroma apresentou-se hipertrófico quando comparado aos Grupos Controles (1 e 2) devido ao aumento de fibras colágenas e células musculares lisas, algumas dessas hipertróficas, ao redor do epitélio com regiões de espessamento desigual da camada muscular, ao redor dos ácinos e por todo o estroma. Ocorrência de pontos com células inflamatórias, similar ao Grupo  $NOD^- 1$ , foram verificados (Figura 2d).

#### Grupo $NOD^+ 2$

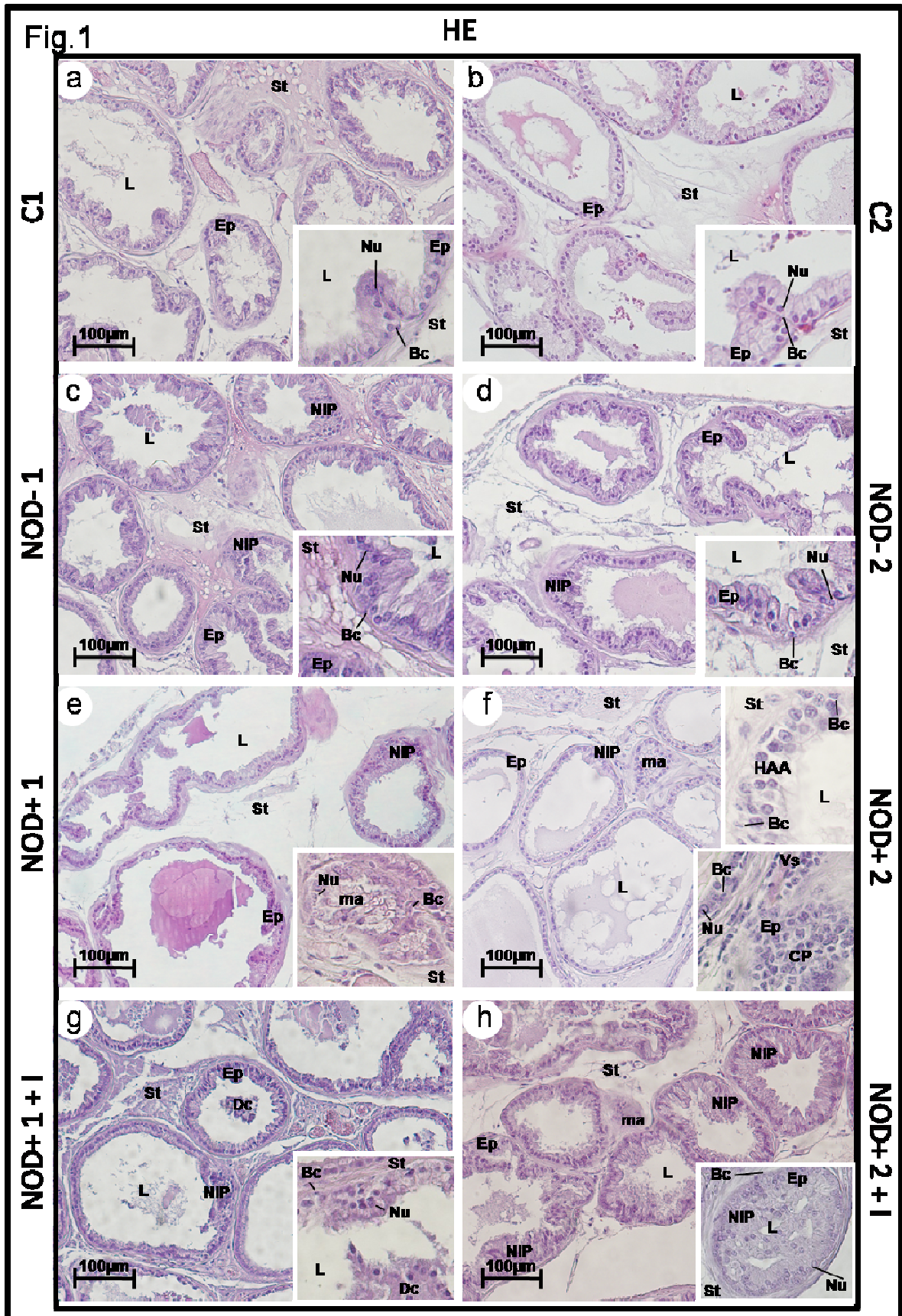
Os ácinos apresentaram-se revestido por epitélio simples atrófico, sem pregueamento da mucosa acinar. As células epiteliais apresentaram-se cúbicas, com núcleo evidente e pontos de descontinuidade da membrana basal. Lúmen acinar dilatados, frequentemente, foram caracterizados, além da ocorrência de microácinos e ocasionais focos de adenocarcinoma e adenose (Figura 1f – inset). Eventuais células epiteliais foram encontradas soltas no estroma glandular. Podem-se observar neoplasias intraepiteliais prostáticas do tipo plana e cribiforme de forma pontual (Figura 1f).

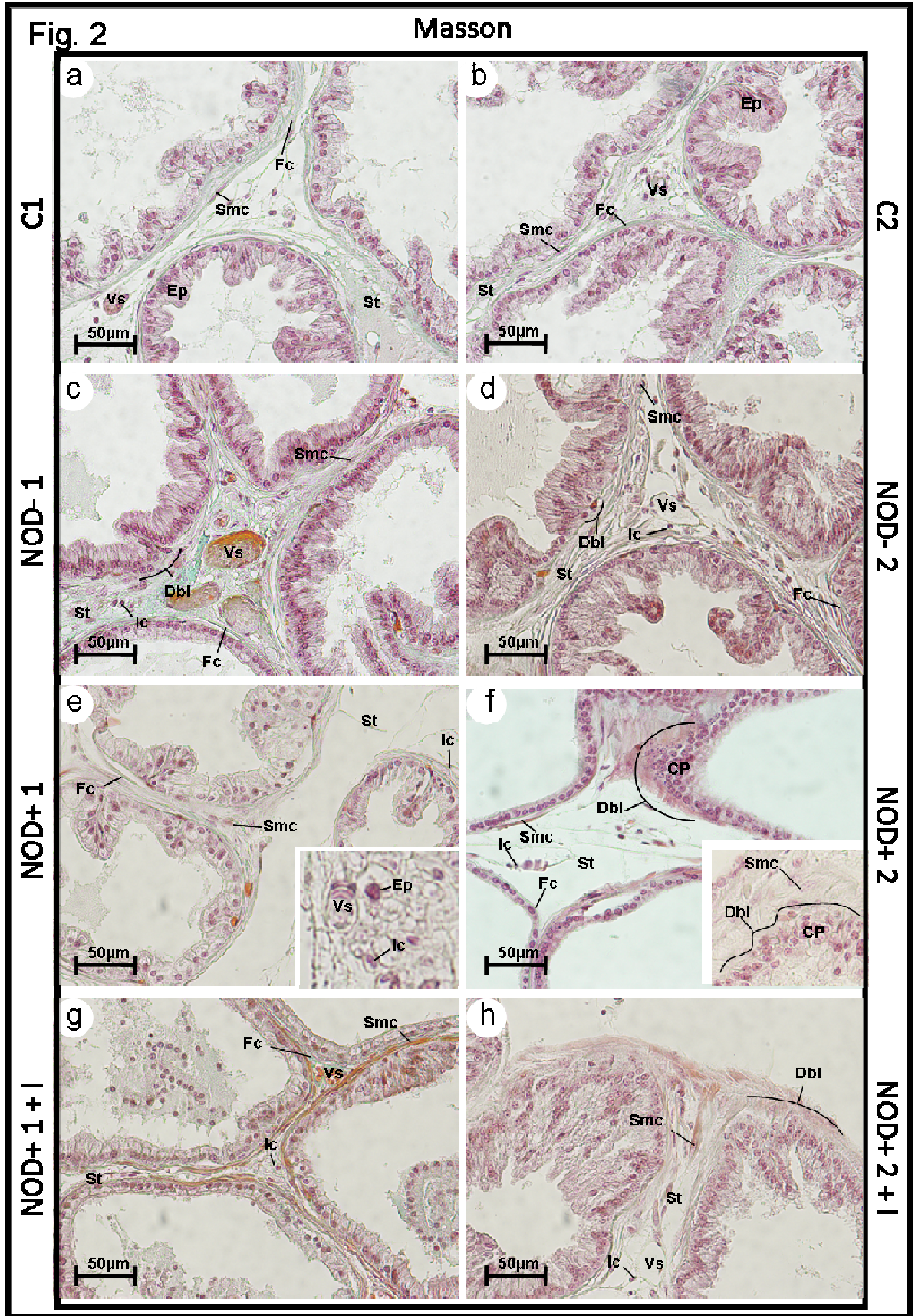
O estroma apresentou hipertrofia dos elementos fibrilares e da camada muscular, contendo células musculares lisas desorganizadas quanto à orientação. Regiões contendo células inflamatórias foram caracterizadas (Figura 2f).

#### Grupo $NOD^+ 2 + I$

Os ácinos desse grupo experimental apresentaram tamanhos variados, com mucosa pouco pregueada em relação ao animal controle. A mucosa foi revestida por células colunares baixas, com núcleo evidente. Além de microácinos, NIPs foram encontradas com menor frequência neste grupo comparado com grupo  $NOD^+ 2$  (Figura 1h; Figura 1h – iset).

O estroma apresentou hipertrofia e hiperplasia dos elementos fibrilares e musculatura lisa. Células musculares lisas se encontraram desorganizadas quanto à orientação e sua camada muscular foi disposta de forma heterogênea ao redor dos ácinos. Houve diminuição dos pontos de inflamação em relação ao Grupo *NOD*<sup>+</sup> 2 (Figura 2h).





## Legenda das figuras – 1 e 2

**Figura 1:** Fotomicrografias do epitélio secretor da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^{-} 1$ ,  $NOD^{-} 2$ ,  $NOD^{+} 1$ ,  $NOD^{+} 2$ ,  $NOD^{+} 1 + I$  e  $NOD^{+} 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a);(b)** Mucosa pregueada dos ácinos prostáticos, com epitélio colunar (Ep); inset: epitélio secretor composto por células colunares com nucléolos evidentes (Nu) e células basais (Bc). **(c);(d)** Mucosa pregueada dos ácinos prostáticos, com epitélio colunar (Ep) e pontos de Neoplasia Intraprostática (NIP); inset: epitélio secretor composto por células colunares com nucléolos evidentes (Nu) e células basais (Bc). **(e)** Mucosa levemente pregueada dos ácinos prostáticos, com epitélio atrófico. Pontos de Neoplasia Intraprostática (NIP); inset: microácino (ma) com epitélio secretor com nucléolos evidentes (Nu) e células basais (Bc). **(f)** Mucosa sem pregueamento dos ácinos prostáticos, com epitélio atrófico. Pontos de Neoplasia Intraprostática (NIP), microácinos (ma); inset: epitélio secretor com nucléolos evidentes (Nu) e poucas células basais (Bc), foco de adenocarcinoma prostático (CP) e adenose (HAA); inset1: adenose (HAA) com células basais (Bc) evidentes e inset2: adenocarcinoma prostático (CP) com infiltração do tecido epitelial no estroma. **(g)** Mucosa com eventuais pontos de pregueamento e Neoplasia Intraprostática (NIP); inset: células secretoras com nucléolos evidentes (Nu) e células basais (Bc), algumas células secretoras soltas no lúmen (Dc). **(h)** Mucosa pouco pregueada, com epitélio colunar baixo. Neoplasia Intraprostática (NIP) e microácinos (ma); inset: NIP cribiforme com células secretoras com nucléolos evidentes (Nu) e células basais (Bc).

Em a – h, Ep – epitélio secretor, L – lúmen, St – estroma e Vs – vasos sanguíneos.

Hematoxilina e Eosina.

Insets – 50 $\mu$ m  objetiva100x.

**Figura 2:** Fotomicrografias do epitélio secretor da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^{-} 1$ ,  $NOD^{-} 2$ ,  $NOD^{+} 1$ ,  $NOD^{+} 2$ ,  $NOD^{+} 1 + I$  e  $NOD^{+} 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a);(b)** Estroma composto por fibras colágenas (Fc) delgadas e curtas adjacentes ao epitélio (Ep) e entre as células musculares lisas (Smc) há vasos (Vs) dispostos no estroma (St). **(c);(d)** Estroma com hiperplasia de suas fibras musculares (Smc) e colágenas (Fc) com células inflamatórias (Ic) e vasos (Vs) encontrados no estroma (St). Eventuais pontos de

descontinuidade da membrana basal (Dlb). **(e)** Estroma com hiperplasia e hipertrofia de suas fibras musculares (Smc) e redução de fibras colágenas (Fc). Pontos com células inflamatórias (Ic) encontrados no estroma (St); inset - pontos com várias células inflamatórias (Ic), epitélio secretor (Ep) e vasos sanguíneos (Vs). **(f)** Estroma com aumento dos elementos estromais, fibras colágenas (Fc) e fibras musculares (Smc). Pontos com células inflamatórias (Ic) e vasos encontrados no estroma (St). Ponto de ruptura da membrana basal (Dlb) com invasão de células epiteliais no ambiente estromal, caracterizando adenocarcinoma prostático (CP); inset – CP circundado com ruptura da membrana basal (Dlb), com hipertrofia de células musculares (Smc) **(g)** Estroma com aumento de suas fibras musculares (Smc) e colágenas (Fc), vasos (Vs) encontrados no estroma (St) e células inflamatórias (Ic). **(h)** Estroma com hiperplasia de suas fibras musculares (Smc) e colágenas (Fc). Fibras musculares dispostas de forma desorganizada. Vasos (Vs) encontrados no estroma (St). Pontos de ruptura da membrana basal (Dlb).

Tricrômico de Masson.

Insets – 50µm  objetiva100x

## 6.2 – Imunohistoquímica e Western Blotting

### Grupos Controle (1 e 2)

Intensa imunolocalização para AR foi verificada no epitélio e moderado estromal do lobo ventral da próstata dos camundongos controles (Figuras 3a e 3b, Tabela 1). A reatividade do IR foi intensa no citoplasma de células epiteliais secretoras e moderada no estroma (Figuras 4a e 4b, Tabela 1). Para o IGFR-1, a reatividade foi fraca no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 5a e 5b, Tabela 1). A reatividade para p63 foi fraca nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figuras 6a e 6b, Tabela 1). A reatividade para a molécula de c-Myc foi ausente nesses grupos, tanto no epitélio quanto no estroma glandular (Figuras 7a e 7b, Tabela 1). Fraca imunolocalização para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8a e 8b, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi fraca no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9a e 9b, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi fraca no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10a e 10b, Tabela 1).

Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 150%; 120%; 70%; 140%; 60%; 66% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo Controle 1 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2) e 130%; 110%; 80% 150%; 64%; 60%; e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo Controle 2 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).

### Grupo $NOD^{-1}$ e $NOD^{-2}$

Intensa reatividade para AR foi verificada no epitélio e moderada no estroma do lobo ventral da próstata dos camundongos *NOD* negativos (Figuras 3c e 3d, Tabela 1). A reatividade do IR foi intensa no citoplasma de células epiteliais secretoras e moderada no estroma (Figuras 4c e 4d, Tabela 1). Fraca reatividade para IGFR-1 foi caracterizada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 5c e 5d, Tabela 1). A reatividade para p63 foi fraca nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figuras 6c e 6d, Tabela 1). A



imunoreatividade para a molécula de c-Myc foi ausente nesses grupos, tanto no compartimento epitelial quanto estromal (Figuras 7c e 7d, Tabela 1). Fraca imunolocalização para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8c e 8d, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi fraca no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9c e 9d, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi fraca no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10c e 10d, Tabela 1).

Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 130%; 120%; 80%; 140%; 70%; 67% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD- 1 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2). e 110%; 114%; 70%; 140%; 59%; 67% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD- 2 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).

#### Grupo *NOD*<sup>+</sup> 1

Moderada reatividade foi verificada para AR no epitélio e fraca no estroma do lobo ventral da próstata dos camundongos *NOD* positivos há 7 dias (Figura 3e, Tabela 1). A reatividade do IR foi fraca no citoplasma de células epiteliais secretoras tanto no estroma (Figura 4e, Tabela 1). Para o IGFR-1, a reatividade foi moderada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figura 5e, Tabela 1). A reatividade para p63 foi moderada nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figura 6e, Tabela 1). A reatividade para a molécula de c-Myc foi ausente nesses grupos, tanto no compartimento epitelial quanto estromal (Figura 7e, Tabela 1). Moderada imunolocalização para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8e, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi moderada no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9e, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi intensa no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10e, Tabela 1).

Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 68%;

100%; 260%; 150%; 122%; 280% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD+1 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).

#### Grupo *NOD*<sup>+</sup> 1 + I

Moderada reatividade para AR foi caracterizada no epitélio e fraca no estroma do lobo ventral da próstata dos camundongos *NOD* positivos com tratamento insulínico de 7 dias de duração (Figura 3g, Tabela 1). A reatividade do IR foi moderada no citoplasma de células epiteliais secretoras e também no estroma (Figura 4g, Tabela 1). Para o IGFR-1, a reatividade foi moderada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figura 5g, Tabela 1). A reatividade para p63 foi fraca nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figura 6g, Tabela 1). A imunoreatividade para a molécula de c-Myc foi ausente nesse grupos, tanto no epitélio quanto no estroma (Figura 7g, Tabela 1). Fraca imunolocalização para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8g, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi fraca no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9g, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi moderada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10g, Tabela 1).

Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63 e CD44, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 117%; 90%; 150%; 140%; 63%; 70% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD+1 + I (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).

#### Grupo *NOD*<sup>+</sup> 2

A imunolocalização para a molécula de AR foi fraca no epitélio e fraca no estroma do lobo ventral da próstata dos camundongos *NOD* positivos há 20 dias (Figura 3f, Tabela 1). A reatividade do IR foi fraca no citoplasma de células epiteliais secretoras e também no estroma (Figura 4f, Tabela 1). Para o IGFR-1, a reatividade foi intensa no estroma e ausente no epitélio glandular (Figura 5f, Tabela 1). A reatividade para p63 foi intensa nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figura 6f, Tabela 1). A imunomarcagem para a molécula de c-Myc foi fraca em algumas células de regiões com alterações morfológicas neste grupo, e ausente no estroma glandular (Figura 7f, Tabela 1). Intensa imunolocalização

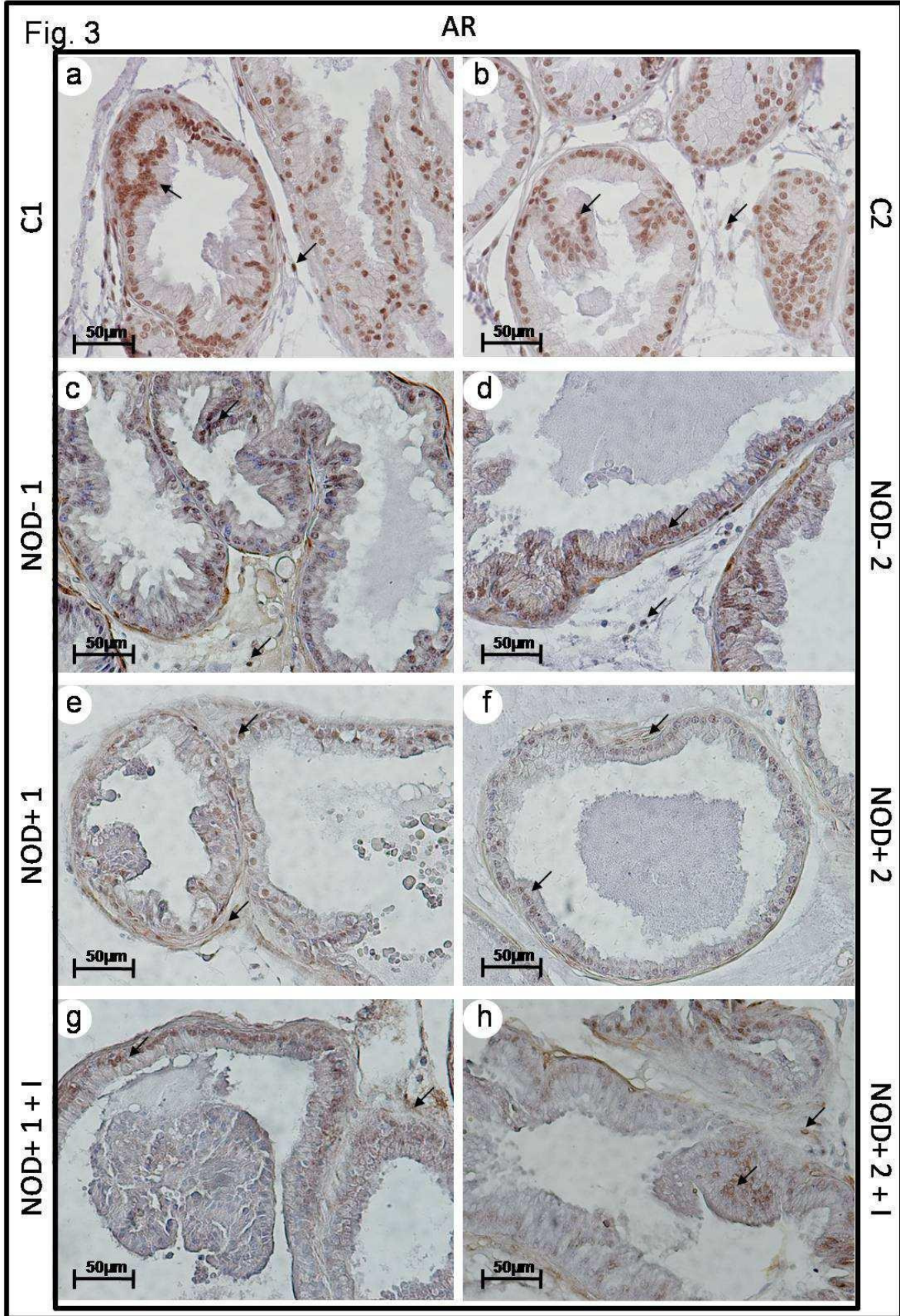
para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8f, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi intensa no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9f, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi moderada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10f, Tabela 1).

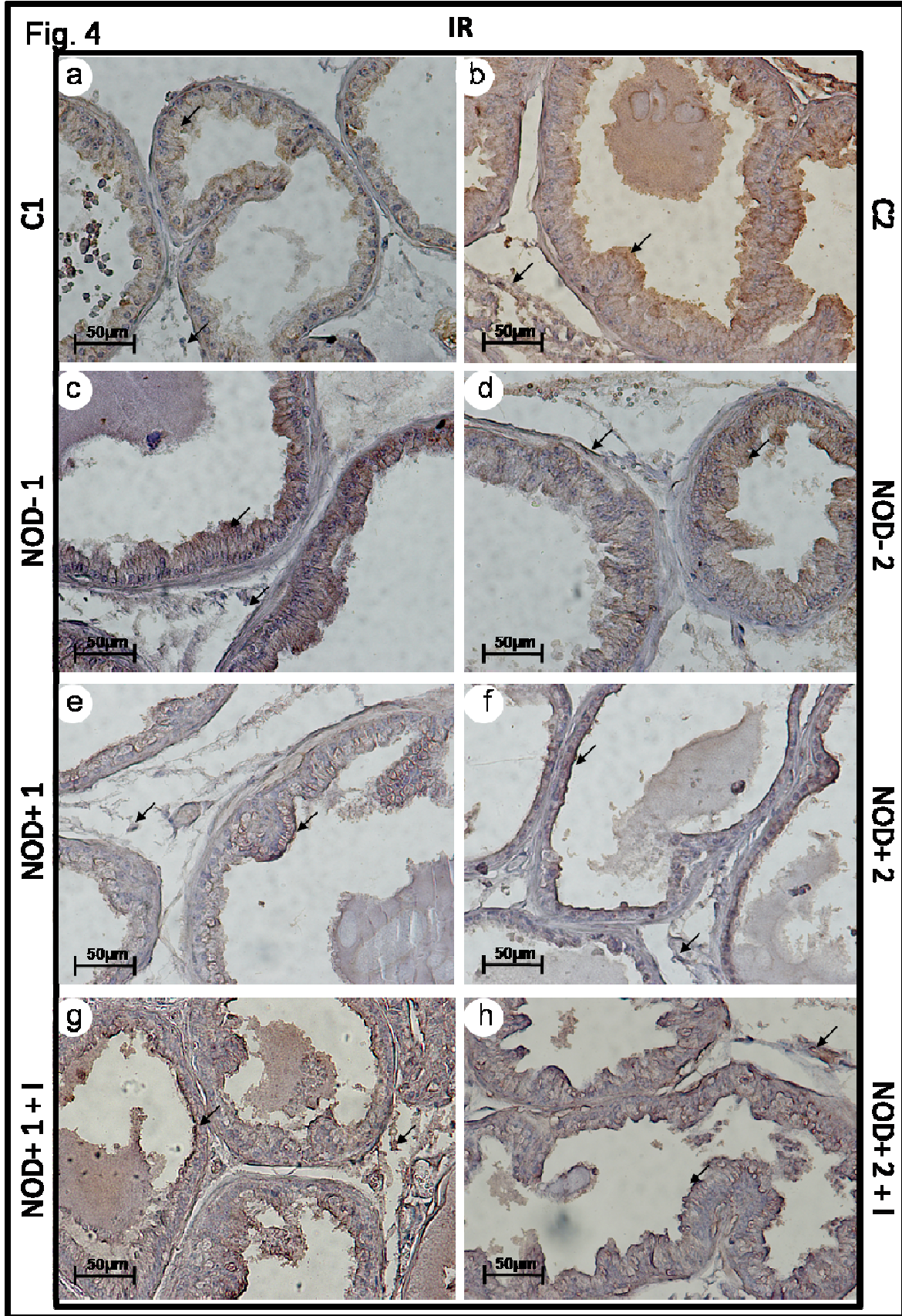
Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 16%; 60%; 370%; 210%; 186%; 190% e 120% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD+2 (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).

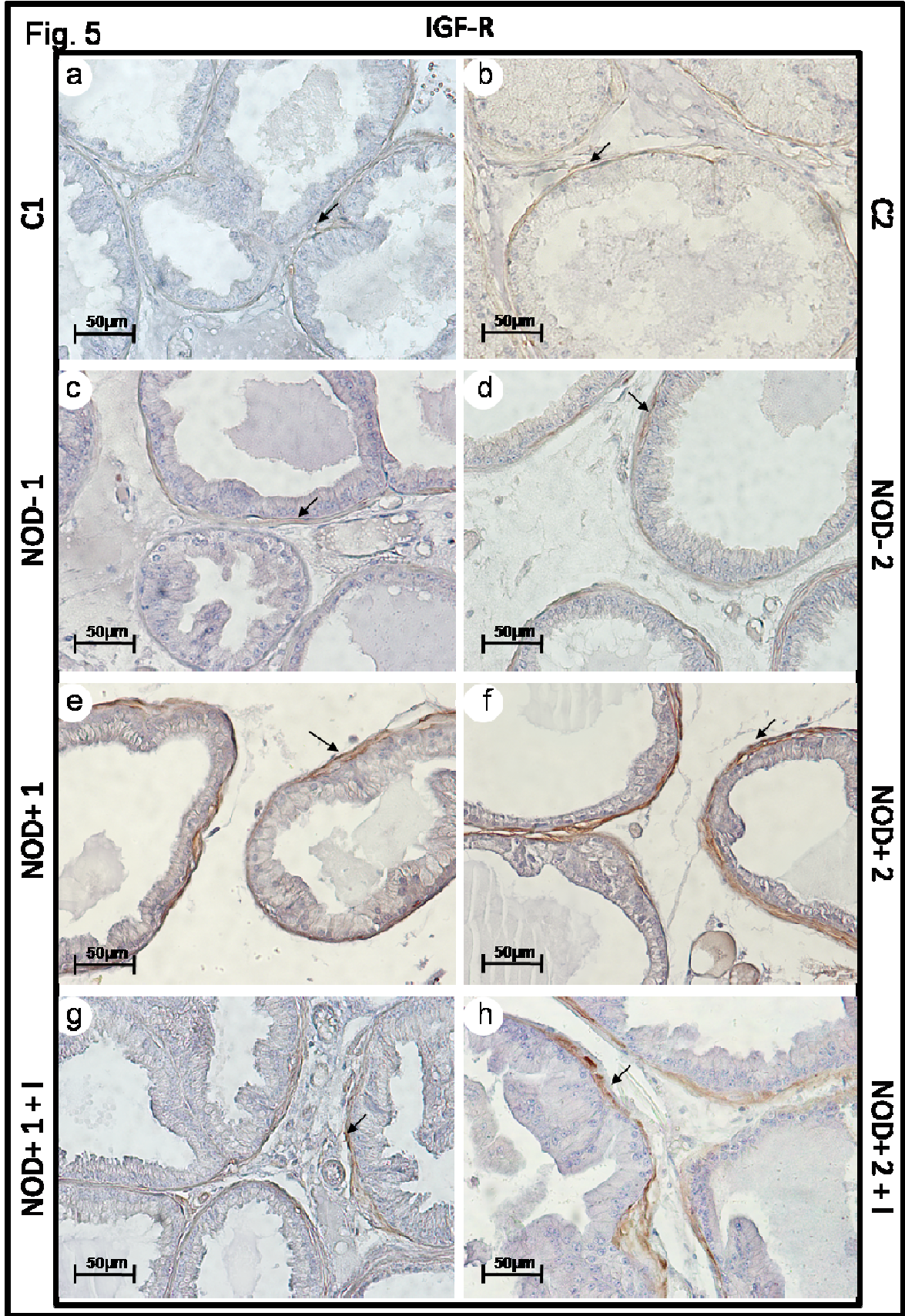
#### Grupo *NOD*<sup>+</sup> 2 + I

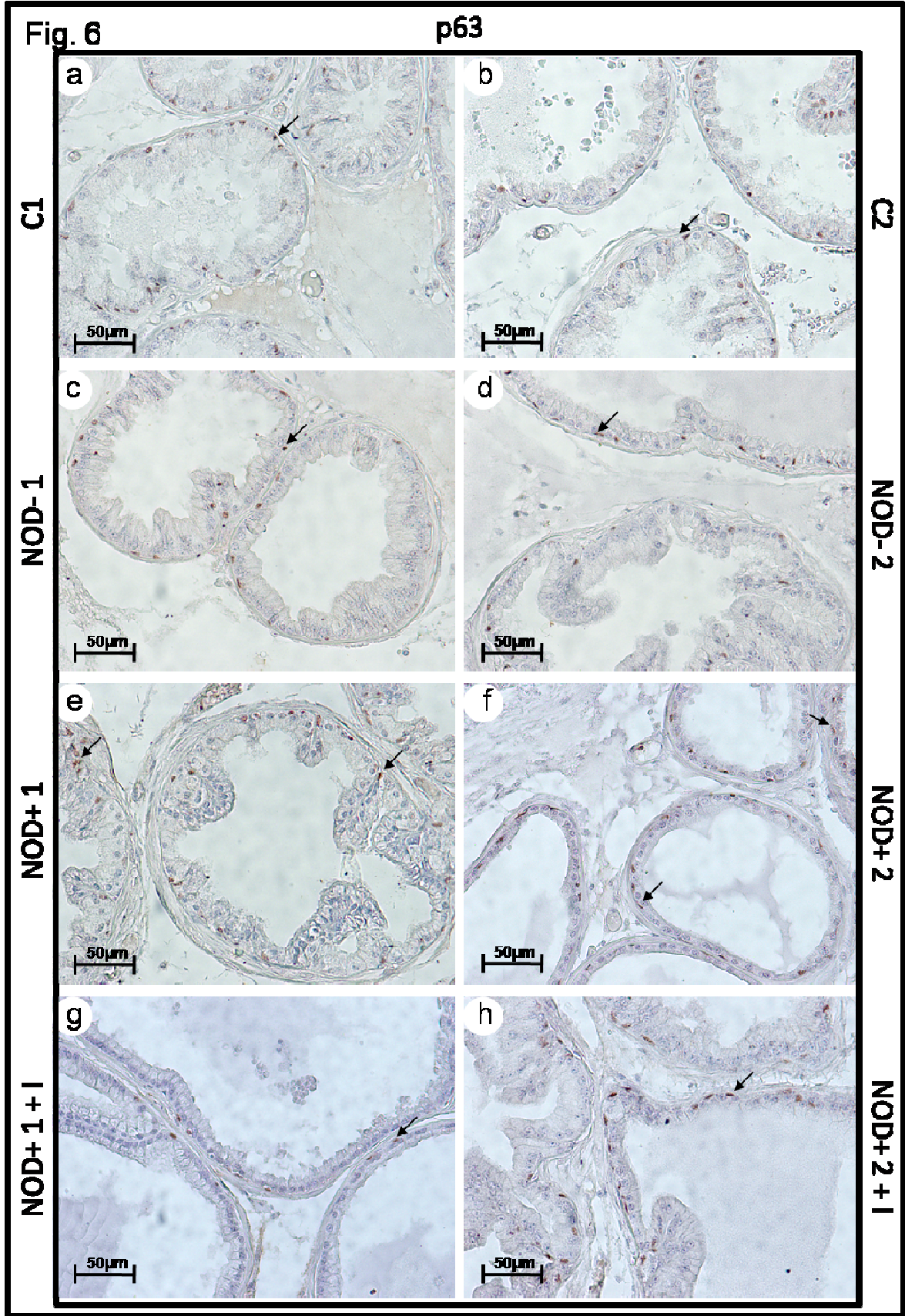
Moderada reatividade para AR foi caracterizada no epitélio e fraca no estroma do lobo ventral da próstata dos camundongos *NOD* positivos com tratamento insulínico por 20 dias (Figura 3h, Tabela 1). A reatividade do IR foi moderada no citoplasma de células epiteliais secretoras e também no estroma (Figura 4h, Tabela 1). Para o IGFR-1, a reatividade foi moderada no estroma e ausente no epitélio glandular (Figura 5h, Tabela 1). A reatividade para p63 foi moderada nas células epiteliais e ausente no estroma glandular (Figura 6h, Tabela 1). A imunomarcção para a molécula de c-Myc foi fraca restringindo-se há eventuais regiões epiteliais com alterações estruturais, e ausente no compartimento estromal (Figura 7h, Tabela 1). Moderada imunolocalização para CD44 foi verificada no epitélio glandular e ausente no estroma (Figuras 8h, Tabela 1). A reatividade do CD117 foi moderada no citoplasma de células epiteliais secretoras e ausente no estroma (Figuras 9h, Tabela 1). Para vimentina, a reatividade foi fraca no estroma e ausente no epitélio glandular (Figuras 10h, Tabela 1).

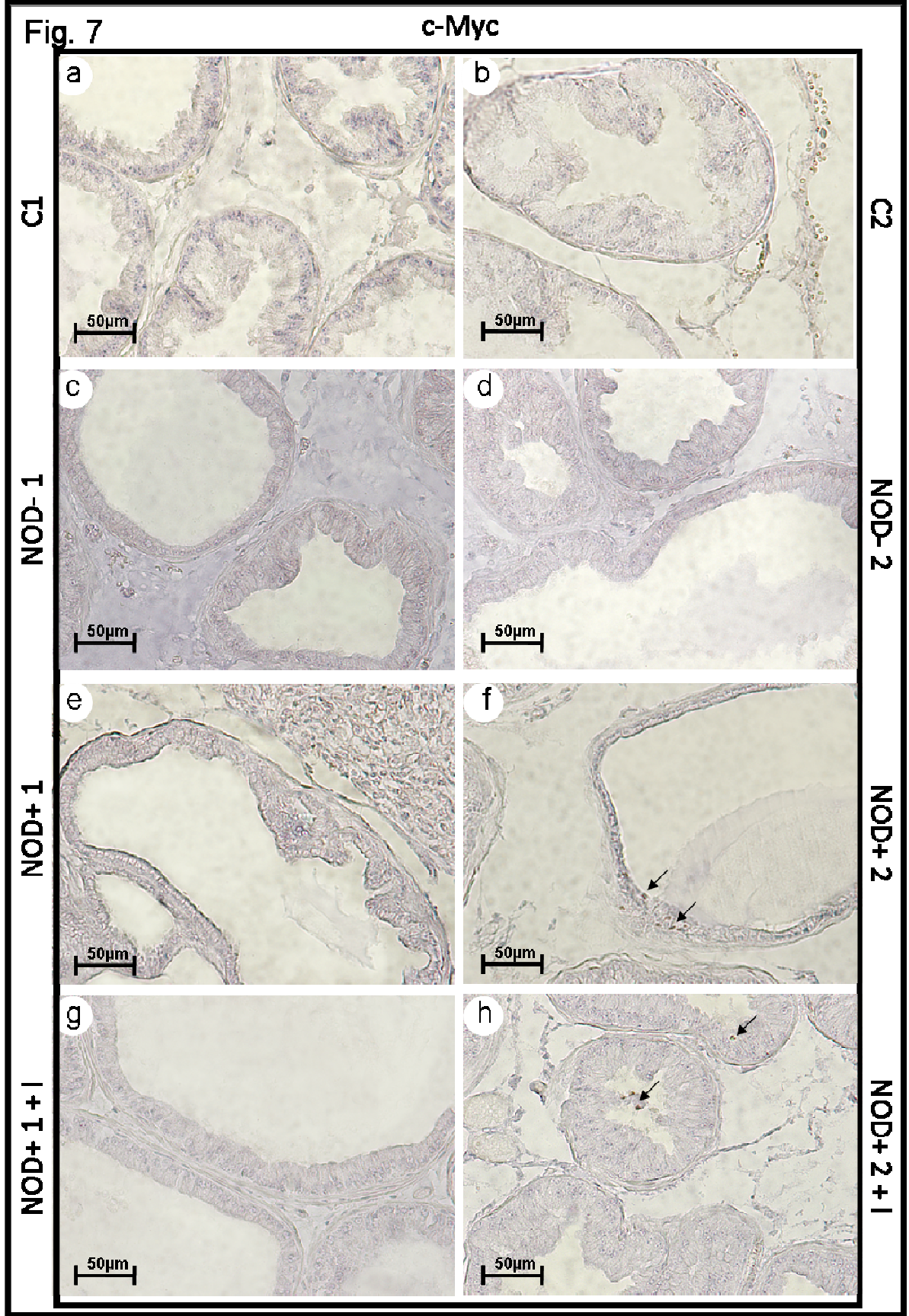
Com relação a análise dos níveis proteicos, verificou-se que as moléculas de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 apresentaram níveis proteicos de 85%; 83%; 100%; 160%; 70%; 130% e 0% respectivamente, em relação ao padrão de  $\beta$ -actina no grupo NOD+2 + I (Figura 11; Figura 12 e Tabela 2).



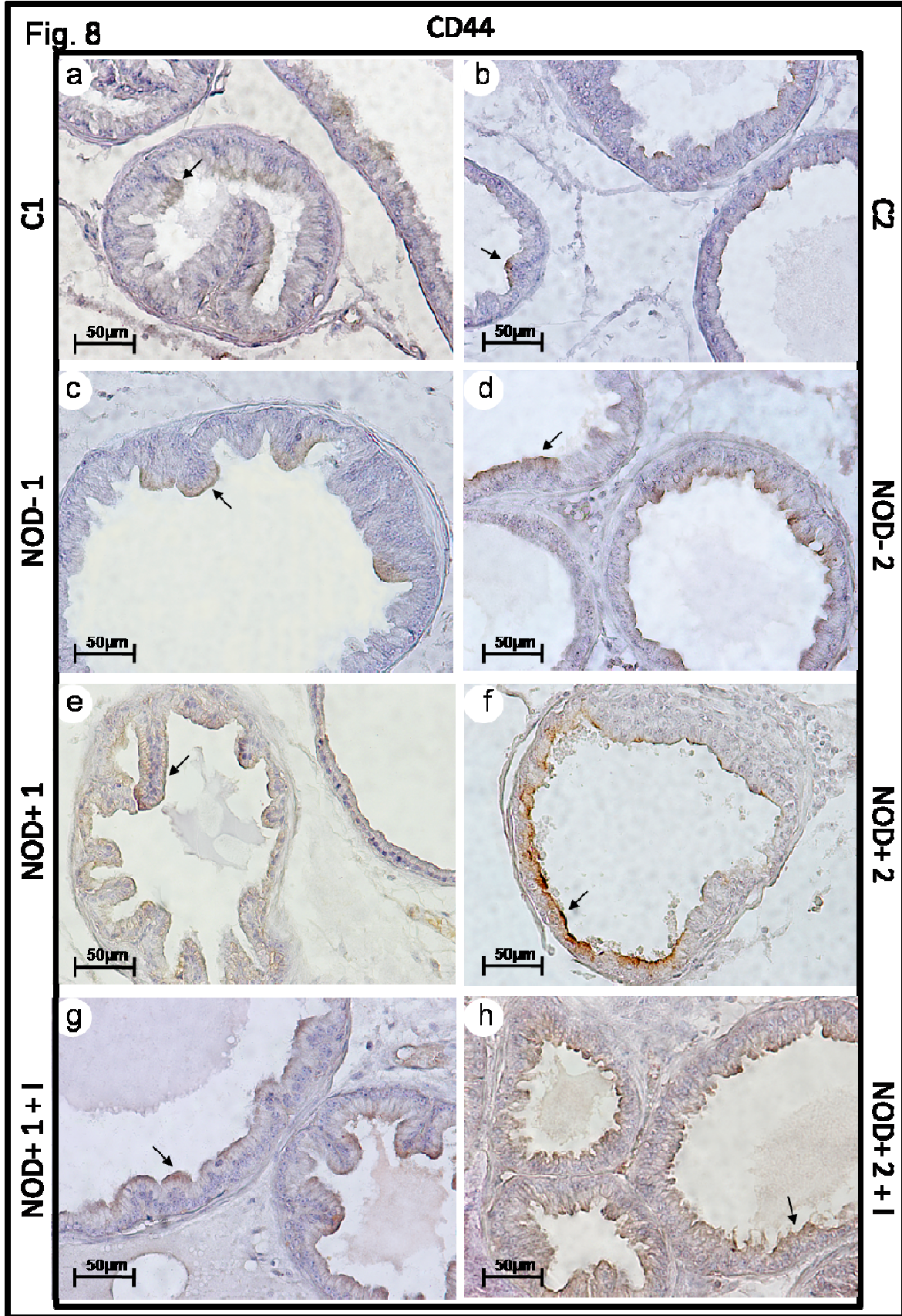


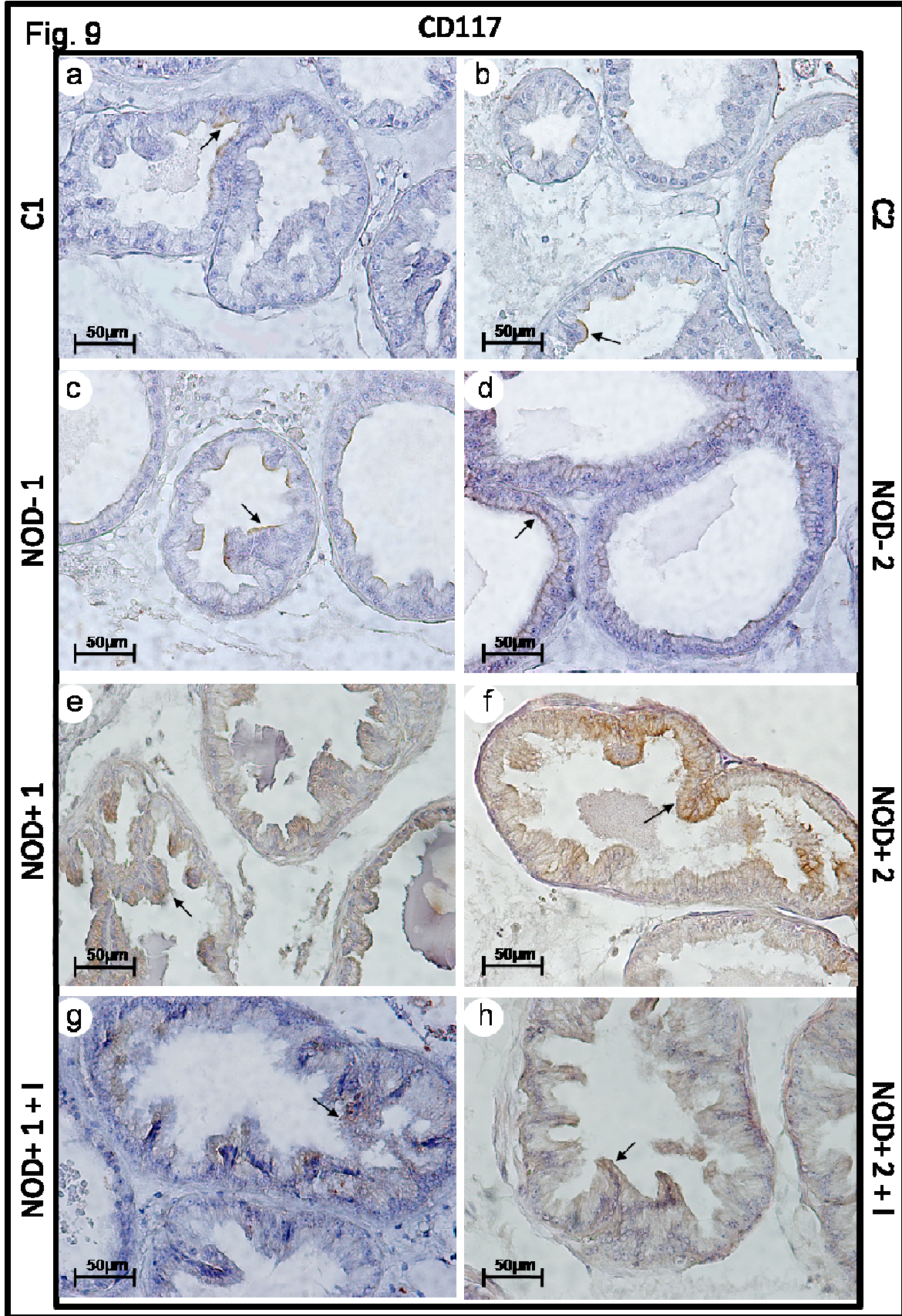


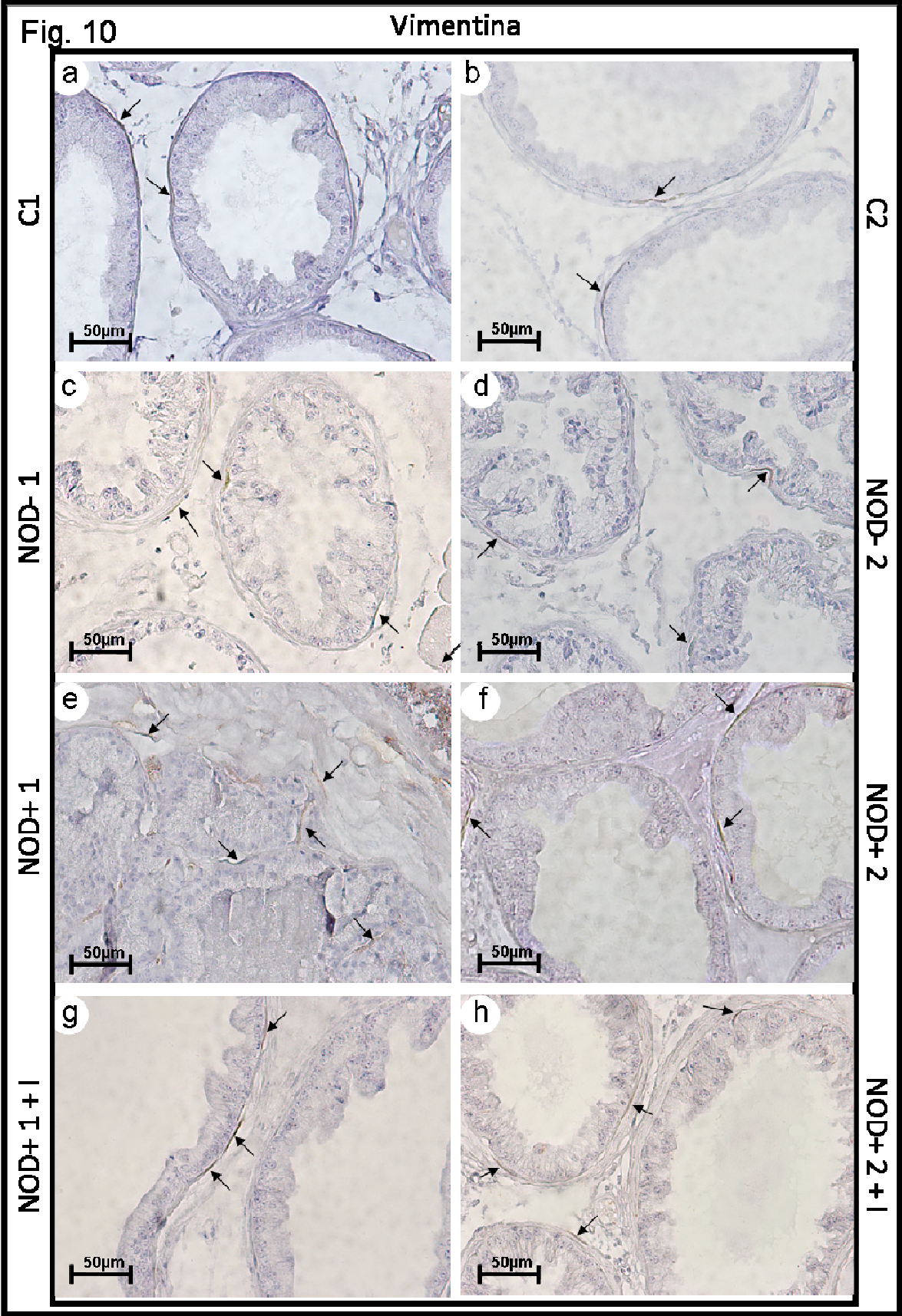












### Legenda das figuras – 3 a 10

**Figura 3** – Imunohistoquímica para Receptor Androgênico (AR) no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d)** Intensa imunorreatividade no epitélio e moderada no estroma (setas) para C1, C2,  $NOD^- 1$  e  $NOD^- 2$ , respectivamente. **(e; g; h)** Moderada imunorreatividade no epitélio e fraca no estroma (setas) para  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$ , respectivamente. **(f)** Fraca imunorreatividade no epitélio e no estroma (setas) para  $NOD^+ 2$ .

**Figura 4** – Imunohistoquímica para Receptor de Insulina (IR) no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d)** Intensa imunorreatividade no epitélio e moderada no estroma (setas) para C1, C2,  $NOD^- 1$  e  $NOD^- 2$ , respectivamente. **(e; f)** Fraca imunorreatividade no epitélio e no estroma (setas) para  $NOD^+ 1$  e  $NOD^+ 2$ , respectivamente. **(g; h)** Moderada imunorreatividade no epitélio e no estroma (setas) para  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$ , respectivamente.

**Figura 5** – Imunohistoquímica para Receptor do Fator de Crescimento Homólogo à Insulina (IGF-R) no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d)** Fraca imunorreatividade no estroma (seta) e ausente no epitélio para C1, C2,  $NOD^- 1$  e  $NOD^- 2$ , respectivamente. **(e; g; h)** Moderada imunorreatividade no estroma (seta) e ausência no epitélio para  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$ , respectivamente. **(f)** Intensa imunorreatividade no estroma (seta) e ausência no epitélio para  $NOD^+ 2$ .

**Figura 6** – Imunohistoquímica para p63 no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d; g)** Fraca imunorreatividade no epitélio (seta) e ausência no estroma para C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$  e  $NOD^+ 1 + I$  respectivamente. **(f)**

Intensa imunorreatividade no epitélio (setas) e ausência no estroma para  $NOD^+ 2$ . **(e; h)** Moderada imunorreatividade no epitélio (setas) e no estroma para  $NOD^+ 1$  e  $NOD^+ 2 + I$ , respectivamente.

**Figura 7** – Imunohistoquímica para c-Myc no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d; e; g)** Ausência de imunorreatividade em ambos compartimentos para C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$  e  $NOD^+ 1 + I$  respectivamente. **(f; h)** Fraca imunorreatividade no epitélio (setas) e ausência no estroma para  $NOD^+ 2$  e  $NOD^+ 2 + I$ , respectivamente.

**Figura 8** – Imunohistoquímica para CD44 no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d; g)** Fraca imunorreatividade no epitélio (seta) e ausência no estroma para C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  respectivamente. **(e; h)** Moderada imunorreatividade no epitélio (setas) e ausência no estroma para  $NOD^+ 1$  e  $NOD^+ 2 + I$  respectivamente. **(f)** Forte imunorreatividade no epitélio (seta) e ausência no estroma para  $NOD^+ 2$ .

**Figura 9** – Imunohistoquímica para CD117 no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d; g)** Fraca imunorreatividade no epitélio (setas) e ausência no estroma para C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  respectivamente. **(e; h)** Moderada imunorreatividade no epitélio (setas) e ausência no estroma para  $NOD^+ 1$  e  $NOD^+ 2 + I$  respectivamente. **(f)** Forte imunorreatividade no epitélio (seta) e ausência no estroma para  $NOD^+ 2$ .

**Figura 10** – Fotomicrografias de imunohistoquímica para vimentina no epitélio secretor e estroma da próstata ventral dos camundongos dos grupos C1, C2,  $NOD^- 1$ ,  $NOD^- 2$ ,  $NOD^+ 1$ ,  $NOD^+ 2$ ,  $NOD^+ 1 + I$  e  $NOD^+ 2 + I$  (a, b, c, d, e, f, g, h). **(a; b; c; d; h)** Fraca

imunorreatividade no estroma (setas) e ausente no epitélio para C1, C2,  $NOD^{-} 1$ ,  $NOD^{-} 2$ , e  $NOD^{+} 2 + I$  respectivamente. **(e)** Intensa imunorreatividade no estroma (seta) e ausência no epitélio para  $NOD^{+} 1$ . **(f; g)** Moderada imunorreatividade no estroma (seta) e ausência no epitélio para  $NOD^{+} 2$  e  $NOD^{+} 1 + I$ , respectivamente.

**Tabela 1** - Distribuição da imunoreatividade do AR, IR, IGFR-1, p63, c-Myc, CD44, CD117 e vimentina nos compartimentos epitelial e estromal do lobo ventral da próstata nos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

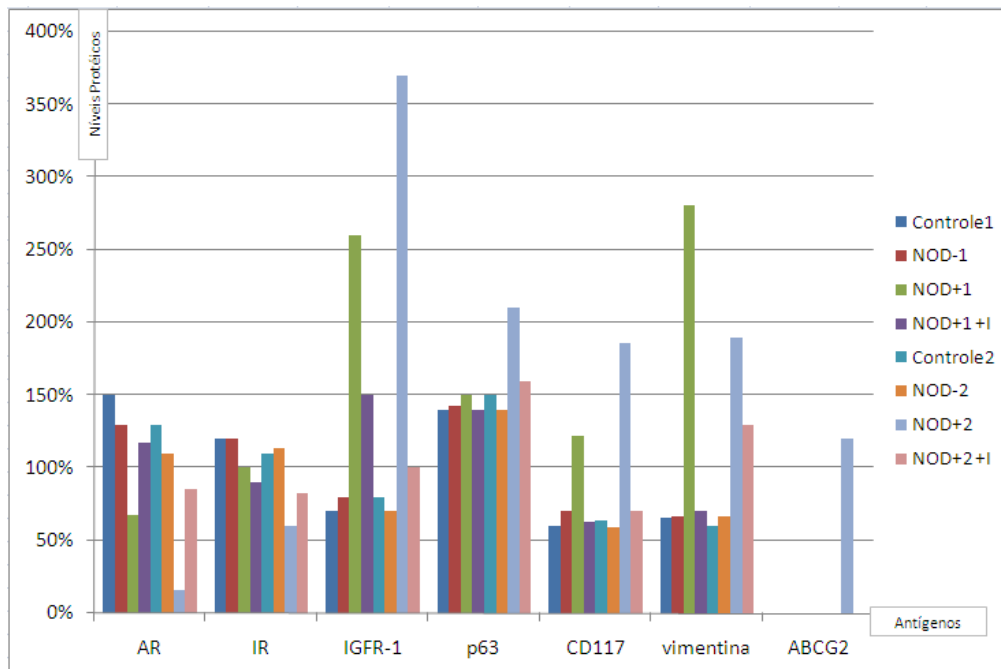
Grupos	AR		IR		IGFR-1	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
C1	3	2	3	2	0	1
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 1	3	2	3	2	0	1
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1	2	1	1	1	0	2
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1 + I	2	1	2	2	0	2
C2	3	2	3	2	0	1
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 2	3	2	3	2	0	1
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2	1	1	1	1	0	3
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2 + I	2	1	2	2	0	2
Grupos	p63		c-Myc		CD44	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
C1	1	0	0	0	1	0
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 1	1	0	0	0	1	0
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1	2	0	0	0	2	0
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1 + I	1	0	0	0	1	0
C2	1	0	0	0	1	0
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 2	1	0	0	0	1	0
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2	3	0	1	0	3	0
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2 + I	2	0	1	0	2	0
Grupos	CD117		vimentina			
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma		
C1	1	0	0	1		
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 1	1	0	0	1		
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1	2	0	0	3		
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 1 + I	1	0	0	2		
C2	1	0	0	1		
<i>NOD</i> <sup>-</sup> 2	1	0	0	1		
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2	3	0	0	2		
<i>NOD</i> <sup>+</sup> 2 + I	2	0	0	1		

(0 = imunoreatividade ausente; 1 = fraca imunoreatividade; 2 = moderada reatividade; 3 = intensa imunoreatividade)





**Figura 12** – Percentuais dos níveis protéicos de AR, IR, IGFR-1, p63, CD117, vimentina e ABCG2 em relação a  $\beta$ -actina para cada um dos grupos experimentais:



**Tabela 2** – Percentuais médios, desvios-padrão e análise estatística dos níveis protéicos AR, IR, IGF-R, p63, CD117, vimentina e ABCG2 em relação ao padrão de  $\beta$ -actina para cada grupo experimental:

Proteínas Grupos	AR	IR	IGFR-1	p63	CD117	vimentina	ABGC2
C1	150 ± 10 a	120 ± 20 a	70 ± 10 a	140 ± 30 a	60 ± 20 a	66 ± 9 a	0 ± 0 a
NOD-1	130 ± 10 ab	120 ± 20 a	80 ± 10 a	140 ± 10 a	70 ± 10 a	67 ± 6 a	0 ± 0 a
NOD+1	68 ± 7 c	100 ± 10 a	260 ± 20 b	150 ± 10 a	122 ± 6 b	280 ± 10 b	0 ± 0 a
NOD+1+I	117 ± 6 b	90 ± 10 a	150 ± 10 c	140 ± 30 a	63 ± 9 a	70 ± 10 a	0 ± 0 a
C2	130 ± 10 ab	110 ± 20 a	80 ± 10 a	150 ± 30 a	64 ± 5 a	60 ± 20 a	0 ± 0 a
NOD-2	110 ± 20 b	114 ± 9 a	70 ± 10 a	140 ± 20 a	59 ± 4 a	67 ± 9 a	0 ± 0 a
NOD+2	16 ± 2 d	60 ± 10 b	370 ± 20 d	210 ± 20 b	186 ± 7 b	190 ± 10 c	120 ± 20 b
NOD+2+I	85 ± 3 c	83 ± 8 b	100 ± 20 a	160 ± 20 a	70 ± 20 a	130 ± 10 d	0 ± 0 a

(letras diferentes representam significância estatística entre os grupos  $P < 0,05$ )

## 7 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente resultado, os camundongos diabéticos apresentaram alteração morfológica na próstata quando comparado aos animais dos Grupos Controles. Os camundongos diabéticos há 20 dias tiveram ocasionais pontos de adenocarcinoma em estágio inicial, NIP e adenose.

Com relação aos camundongos diabéticos com controle glicêmico, recuperação das principais alterações estruturais foi observada em relação aos animais diabéticos de período equivalente. Porém, nos animais do Grupo *NOD*<sup>+</sup> 2 + I frequente ocorrência de NIP e hipertrofia estromal foram detectadas correlacionando-se ao grupo diabético com tratamento insulínico por 7 dias.

De acordo com a literatura especializada, é conhecido que a função reprodutiva nos mamíferos é altamente sensível às alterações do estado metabólico e às reservas de energia do organismo (Schneider, 2004). Além disso, condições metabólicas adversas, como observado em indivíduos diabéticos, são comumente associadas a redução da capacidade reprodutiva (Schneider, 2004).

De acordo com Ribeiro et al. (2006) e Cagnon et al. (2000), o diabetes experimental causou hipertrofia estromal, redução das áreas epitelial e luminal, além de ocorrência de NIPs e processo inflamatório no lobo ventral da próstata de camundongos espontaneamente diabéticos.

Ribeiro et al. (2009) observaram alterações atróficas e remodelação estromal, sendo esses elementos favoráveis à migração celular no microambiente glandular, proliferação e processos patogênicos na próstata ventral de ratos diabéticos-induzidos experimentalmente. Da mesma forma, Cagnon & Fávaro (2009) constataram alteração da estrutura da matriz extracelular, levando à diminuição de moléculas relacionadas à adesão celular, além de aumento do índice proliferativo em relação ao apoptótico na próstata de camundongos espontaneamente diabéticos.

Arcolino et al. (2010) observaram drástica redução do nível de testosterona após 1 semana do diabetes instalado em ratos diabéticos-induzidos por aloxana, enquanto após 3 meses de detecção da doença a diminuição desse hormônio foi em menor grau. Em curto

prazo de instalação do diabetes, a proliferação de células diminuiu, sendo que em médio prazo verificou-se aumento da taxa apoptótica epitelial (Arcolino et al., 2010). Os mesmos autores observaram aumento da frequência de células positivas para p63 em ambos períodos de ocorrência do diabetes. Arcolino et al. (2010) constataram amenização da queda nos níveis de testosterona após o tratamento insulínico, bem como redução de células p63 positivas e taxa de apoptose. Contudo, o tratamento insulínico não interferiu na proliferação celular (Arcolino et al., 2010).

Com relação às lesões prostáticas, sabe-se que no câncer de próstata, uma quantidade crescente de evidências sugeriu ligação entre inflamação crônica persistente e desenvolvimento de tumor (Birbach et al., 2011). Primeiramente, dados epidemiológicos indicaram que pacientes com diagnóstico de prostatite crônica têm risco aumentado de desenvolver câncer de próstata quando em idade avançada (Birbach et al., 2011). Além disso, pacientes que receberam tratamento por longo período com anti-inflamatórios não esteróides têm risco reduzido de desenvolver câncer de próstata. Estudos apontaram que lesões estruturais, por alguns autores referidas como atrofia prostática inflamatória, são frequentemente encontradas próximo às regiões de NIPs, sendo esta última lesão defendida por alguns autores como precursora do câncer de próstata (Birbach et al., 2011). Também, a inflamação é comumente sugerida como mecanismo que associa a síndrome metabólica e o câncer de próstata. A obesidade, um dos componentes da síndrome metabólica, está relacionada ao estágio inicial de inflamação crônica e com infiltração de macrófagos no tecido adiposo, além de elevadas concentrações de moléculas pró-inflamatórias. Ainda, o tecido adiposo secreta grande quantidade de proteínas, incluindo fatores pró-inflamatórios como citocinas o que sugeriu possível envolvimento com o carcinoma prostático (Hemelrijck et al., 2011).

As citocinas inflamatórias que pertencem à família das interleucinas, os membros da família IGF e as células-tronco podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da hiperplasia benigna da próstata e/ou sintomas do trato urinário inferior (LUTS) (Mc Laren et al., 2011). Isto pode ocorrer através de mecanismos envolvendo a sinalização de interleucina, de IGF e das células tronco, contribuindo para a reativação dos processos de desenvolvimento da próstata adulta (Mc Laren et al., 2011). Tais mecanismos levam ao

crescimento do tecido, ao aumento da incidência de HBP-LUTS, associados à obesidade e ao diabetes. A sinalização do IGF pode fornecer a base do mecanismo para o efeito do diabetes e da obesidade sobre o crescimento da próstata (Mc Laren et al., 2011).

A origem da lesão denominada hiperplasia adenomatosa atípica (HAA), lesão proliferativa e caracterizada por pequenos ácinos aglomerados, a qual ocorre geralmente na zona de transição da próstata é similar ao padrão estrutural do adenocarcinoma de próstata. Porém, tal lesão distingue-se do câncer pela ausência de nucléolos proeminentes e uma camada de células basais que está presente. Contudo, a correlação da lesão HAA com CP não está totalmente esclarecida (Zhang et al., 2011). Já, Brimo & Epstein (2012), analisando amostras humanas, sugeriram que esta lesão, HAA, pode ser precursora de CP na zona de transição, sendo esta área com maior incidência de HAA em relação às outras. Outra evidência que sustenta a possível relação de HAA com o câncer é a faixa etária dos pacientes com HAA, a qual ocorre geralmente de 5-10 anos menor em relação aos pacientes com carcinoma (Zhang et al., 2011). Sabe-se ainda, que a incidência de HAA aumenta com a idade e com a presença de câncer, assim como a incidência de câncer aumenta quando HAA está presente (Zhang et al., 2011). Desta forma, tais fatos revelaram que ambas as lesões estão intimamente relacionadas apesar dos mecanismos não estarem bem estabelecidos (Leite et al., 2010).

A literatura apontou divergências quanto ao papel da terapia insulínica no diabetes e suas influências na próstata. Hitron et al. (2012) defenderam que a utilização de insulina e outros medicamentos anti-diabéticos não aumentaram o grau das lesões quando ocorreu diagnóstico de tumor de próstata, nem tão pouco diminuí o tempo para sua progressão. E, esses mesmos autores sugeriram que futuras análises devem considerar diferentes parâmetros para a análise de diabetes como tratamento insulínico, ocorrência de lesões, nível de insulina sérica, índice de massa corpórea (IMC), lipídeos (colesterol HDL, LDL, TG), testosterona, e expressão de IGFR-1 nas amostras teciduais a fim de avaliar totalmente o efeito do tratamento do diabetes sobre os tumores de próstata. Estudos indicaram que o diabetes aumentou o risco relativo de diferentes tipos de câncer em homens, exceto o câncer de próstata, quando efeito protetor foi observado (Onitilo et al., 2012). No entanto, estudos demonstraram que o tratamento insulínico pode agravar ou até mesmo originar

lesões prostáticas (Michel et al., 2000; Will et al., 1999). Hammarsten et al. (2010) indicaram que o nível elevado de insulina, juntamente às aberrações da síndrome metabólica são promotores de câncer de próstata, supondo que a síndrome metabólica mascara a ocorrência precoce do câncer de próstata. É sabido que insulina e seu receptor influenciaram os níveis de IGF-1 e em conjunto desempenharam importante papel tanto no início do câncer quanto de sua progressão (Janghorbani et al, 2012).

Assim, pode-se concluir que as alterações estruturais identificadas nos animais diabéticos foram proporcionais ao tempo de ocorrência da doença, comprometendo a integridade estrutural da próstata. Desta forma, o Grupo *NOD*<sup>+</sup> 2 apresentou maior desordem morfológica glandular, assim como maior frequência de processos proliferativos, o que provavelmente prejudicou o funcionamento da próstata e predispôs esta a ocorrência de lesão, além de provavelmente prejudicar o processo reprodutivo. Considerando-se as avaliações estruturais no diabetes, bem como o tratamento insulínico nos diferentes períodos experimentais, pode-se concluir que o diabetes controlado com administração de insulina, tanto por período curto como prolongado da doença, levou à recuperação e/ou interrupção das lesões estruturais, provenientes do diabetes experimental. Pode-se concluir que o maior período de ocorrência da doença indicou danos morfológicos que tendem a permanecer, sendo o tratamento insulínico de menor eficiência para a recuperação das alterações estruturais. Isto posto, pode-se sugerir que o tratamento insulínico de longa duração não reverte alterações morfológicas prostáticas, apesar de amenizá-las. Com o monitoramento insulínico via glicemia e glicosúria foram identificados picos de hiper e hipoglicemia esporádicos que devem ter contribuído com o quadro encontrado no grupo *NOD*<sup>+</sup> 2 + I, culminando na maior probabilidade de ocorrência de alterações morfológicas e estruturais no tratamento prolongado. Sendo assim, pode-se hipotizar que o tratamento insulínico não restabeleceu o funcionamento do organismo saudável, no qual a insulina é produzida conforme a necessidade metabólica e quadros de hiper e hipoglicemia não são usuais. Também, pode-se concluir que a ocorrência de células inflamatórias provavelmente foi importante para dinâmica do microambiente prostático, com conseqüente favorecimento e/ou intensificação das lesões. Pode-se ainda sugerir que a insulina protegeu de certa forma,

o tecido prostático propiciando microambiente com menor suscetibilidade às desordens glandulares.

Com relação à análise molecular, os camundongos diabéticos apresentaram reatividades e quantificação protéica reduzidas para as moléculas de AR e IR, quando comparados aos respectivos grupos controles nos períodos experimentais correspondentes. No diabetes com controle glicêmico houve recuperação dos níveis protéicos dessas moléculas quando comparados aos diabéticos sem controle glicêmico de período experimental correspondente. Para o IGFR-1 e p63, os camundongos diabéticos apresentaram intensa reatividade e elevada quantificação protéica quando comparado aos valores observados nos grupos controles correspondentes. No diabetes com controle glicêmico houve redução de reatividade e quantificação protéica dessas moléculas em relação aos animais dos grupos diabéticos sem tratamento insulínico de período correspondente. Para a molécula de c-Myc somente nos grupos *NOD*<sup>+</sup>2 e *NOD*<sup>+</sup>2 + I verificou-se positiva imunoreatividade, localizadas nas regiões prostáticas com características morfológicas atípicas. Os camundongos diabéticos apresentaram aumento de reatividade para CD44, reatividade e quantificação protéica para CD117 e vimentina quando comparados aos respectivos grupos controles, NODs negativos, diabéticos tratados com insulina nos dois períodos experimentais. Para ABCG2, apenas nos camundongos diabéticos 20 dias identificou-se quantificação protéica.

É conhecido que a próstata e as demais glândulas sexuais acessórias são órgãos andrógeno-dependentes e também sofrem influência de fatores de crescimento, bem como de outros hormônios para a manutenção de suas integridades estruturais e seus funcionamentos (Cunha et al., 2004). Andrógenos e interações epitélio-mesenquimais são necessárias para o normal desenvolvimento da próstata, além de serem fundamentais no desenvolvimento de doenças como a hiperplasia benigna prostática (HBP) (Cunha et al., 2011).

Estudos atuais forneceram evidências que a insulina também desempenha papel importante no crescimento e desenvolvimento prostático (Porto et al., 2011). Elevada incidência de HBP nos indivíduos resistentes à insulina destacou ainda mais o papel crítico da insulina na patogênese da doença, sendo a resistência insulínica frequentemente

associada à hiperinsulinemia compensatória, condição que pode levar à ativação excessiva da sinalização do receptor de insulina (Kasturi et al., 2006). Evidências experimentais suportaram a hipótese da ocorrência de interação sinérgica entre insulina e testosterona na regulação do crescimento da próstata (Vikram & Jena, 2011; Lostroh, 1971). Segundo Vikram & Jena (2011), tanto testosterona quanto insulina promoveu a proliferação celular na próstata ventral e alteraram os níveis de outros hormônios, resultando na instabilidade do equilíbrio celular.

De acordo com Kheterpal et al. (2012), indivíduos com baixos níveis de testosterona tem maior risco de desenvolver síndrome metabólica, levando ao estado de hiperinsulinemia, o qual pode influenciar na relação testosterona e carcinoma prostático. O aumento dos níveis de insulina está associado ao aumento de IGF-1, o qual desempenha papel importante na regulação da proliferação celular e na apoptose, diferenciação, migração e sobrevivência celular (Duan et al., 2010). IGF-1 é conhecido por estimular o crescimento *in vitro* de linhagens de células humanas prostáticas cancerosas, tanto andrógenos responsivas quanto andrógeno-independentes (Kheterpal et al., 2012).

O quadro de hiperinsulinemia, presente no diabetes do tipo II, sem controle glicêmico, pode estimular a produção de IGF pelo fígado, sendo este último agente mitogênico e antiapoptótico que tem afinidade com IR bem como IGFR-1 e estimula o crescimento prostático. Níveis séricos de IGF são associados ao risco aumentado de caracterização de HBP, com regulação da circulação de andrógeno e hormônio do crescimento (Wang & Olumi, 2011).

Em adição, níveis altos anormais de IGFs foram encontrados em várias células tumorais (LeRoith e Roberts, 2003). Estudos epidemiológicos têm sugerido que alto nível de IGF-1 é um fator de risco para câncer de mama, próstata, cólon e pulmão. Já a redução do nível de IGF-1 circulante está associado ao diabetes do tipo I, e administração de IGF-1 auxilia o metabolismo de glicose e proteína e atenua cardiomiopatia diabética (Norby et al., 2002). Esta relação entre IGF-1 circulante e diabetes suporta a teoria que o indivíduo diabético está protegido em relação ao câncer de próstata (Wedepohl et al., 2002). Considerando os atuais resultados demonstrando aumento de IGFR-1, pode-se sugerir que o diabetes não protege o indivíduo do câncer de próstata.

Há também, associação entre o aumento de níveis de IGFR-1, o aumento de expressão do antígeno específico da próstata (PSA) e elevados graus de estadiamento de Gleason; o que reforçou o IGFR-1 como um primordial não-hormonal condutor de tumorigênese (Hitron et al., 2012).

Com relação ao p63, é conhecido que esse promoveu o crescimento celular e protegeu as células da apoptose. A próstata requer a expressão de p63 para o seu desenvolvimento, sendo que isto também foi observado na mama, nas células mioepiteliais normais circundantes de glândulas acinares (Graziano & De Laurenzi, 2011). Por outro lado, enquanto a maioria dos cânceres de próstata foram p63 negativos, o p63 está superexpresso em um subgrupo de tumores basais ou pouco diferenciados como os adenocísticos e adenocarcinomas em estágio inicial (Graziano & De Laurenzi, 2011). Além disso, Dhillon et al. (2009) afirmaram que alguns adenocarcinomas da próstata mostraram localização citoplasmática aberrante para p63, o que foi correlacionado com a redução de apoptose e um prognóstico ruim para o paciente com a lesão.

Em geral, a superexpressão de p63 é encontrada somente em um pequeno percentual de carcinomas e devido a isto, p63 é utilizado rotineiramente no diagnóstico para avaliar a presença de células basais normais, distinguindo entre as glândulas benignas e malignas (Graziano & De Laurenzi, 2011). Já Zucchi et al. (2008) defenderam que a identificação do p63 é essencial para a manutenção da multipotência de células tronco, a partir de uma população de células tronco da mama que são capazes de reinstalar tumores após o transplante em ratos. Assim, a subpopulação celular que não expressa p63 deixa de apresentar multipotência, permitindo a diferenciação celular (Graziano & De Laurenzi, 2011).

Segundo Graziano & De Laurenzi (2011), apesar dos mecanismos moleculares estarem indefinidos e haver especulações sobre o papel do p63 na oncogene, não há divergências quanto à alteração de expressão de p63 estar ligada à progressão tumoral. Estudos recentes sugeriram papel importante do p63 na manutenção do fenótipo da célula tronco cancerosa (Graziano & De Laurenzi, 2011).

Em adição, a imunolocalização do p63 e da citoqueratina de alto peso molecular tem sido recomendada como adjuntos na confirmação do diagnóstico de carcinoma



prostático em casos duvidosos (Leite et al., 2010). No entanto, imitadores benignos do câncer de próstata, como: atrofia, hiperplasia adenomatosa atípica, adenoma nefrogênico e hiperplasia mesonéfrico; podem ter ausência de imunomarcção para estes marcadores dificultando o parecer clínico (Brimo & Epstein, 2012; Leite et al., 2010).

Com relação ao biomarcador para CD44, Zhang et al. (2012) constataram aumento de expressão de CD44 em linhagens celulares de carcinoma prostático não-aderentes em relação às aderentes. Além disso, outro estudo verificou que uma subpopulação celular CD44+ demonstrou maior capacidade de formação de tumor em relação às células negativas para essa molécula. Na verdade, CD44 normalmente participa na interação de adesão celular, o qual está envolvida na migração e proliferação de células cancerosas bem como de metástases (Orian-Rousseau 2010). Consequentemente, o aumento de expressão de CD44 no câncer prostático pode ser responsável por sua capacidade de aumento de sobrevivência celular e tumorigenicidade (Zhang et al., 2012).

Considerando o biomarcador para CD117, o aumento de sua expressão tem sido encontrado em vários tipos de câncer, incluindo tumores gastrointestinais, leucemia mielóide aguda e gliomas (Gorelik et al., 2010). Além disso, tal aumento da frequência de expressão CD117 no compartimento epitelial de próstata com câncer e metástase óssea, em comparação com a hiperplasia benigna da próstata e câncer de próstata primário, tem sido identificado por imunohistoquímica em amostras humanas, sugerindo influência de CD117 e metástase óssea no câncer de próstata (Wiesner et al., 2008).

Em adição, com relação à reatividade da vimentina, segundo Salvatori et al. (2012) verificaram que tumores prostáticos indiferenciados apresentaram elevada expressão de vimentina, sendo que altos níveis da proteína podem ser correlacionados à capacidade invasiva das células cancerosas prostáticas. Salvatori et al. (2012) também observaram que a elevada expressão de moléculas de adesão e baixa expressão de vimentina indicaram interações célula-célula e redução da motilidade celular.

Ainda, resultados clínicos de amostras prostáticas humanas com diagnóstico de câncer são consistentes com a hipótese de desregulamentação da expressão de MYC ser crítica, e ocorrer precocemente e prevalentemente no câncer prostático (Gurel et al., 2008). Embora a proteína MYC encontra-se aumentada na maioria dos casos de câncer de próstata

primário e metastático, Gurel et al. (2008) encontraram tal molécula significativamente diminuída em lesões de alto grau (Gleason 7-9), e em lesões metastáticas não tratadas, em comparação com lesões de grau intermediário (Gleason 6). No entanto, a expressão de MYC em lesões de grau elevado e metastático era ainda muito maior em relação à maioria dos casos onde o epitélio prostático estava normal aparentemente, indicando que a superexpressão MYC pode ainda ser importante nestas lesões menos diferenciadas (Gurel et al., 2008).

Assim como c-Myc, o ABCG2 foi considerado marcador fenotípico e que distingue supostas células-tronco humanas malignas de benignas no tecido prostático, em xenoenxertos humanos primários de tecido prostático benigno e canceroso, no câncer de próstata de camundongos TRAMPs e em células progenitoras cultivadas de próstata de ratos (Huss et al., 2005).

A maioria dos transportadores ABC relacionados com efluxo esteróides, ABCG2 e ABCB1 tem demonstrado relação no efluxo dos metabólitos do colesterol, diidrotestosterona (DHT) e estrogênio (Huss et al., 2005). Assim, transportadores ABC podem proteger as células tronco da próstata de sinais de esteróides, isolando células-tronco de alterações androgênicas, tais como induzida por ablação androgênica terapêutica (Mathew et al, 2009). Também, Bunting (2002) sugeriu que ABCG2 tem papel na manutenção da pluripotência de células tronco humanas em estado indiferenciado, e na proteção destas células-tronco de xenobióticos ou outras toxinas in vivo; já que ABCG2 é expresso diferencialmente durante hematopoiese, com alta expressão do mesmo em células tronco de medula óssea primitivas, seguido de uma redução acentuada em células-tronco em processo de diferenciação (Bunting, 2002).

Assim, conclui-se que o diabetes levou à ativação de um processo proliferativo tanto epitelial quanto estromal; sugerindo que a falta de ação androgênica e insulínica tecidual tenha sensibilizado as células basais. O processo de ativação das células basais no epitélio glandular indicou proliferação e reorganização celular o que certamente tem importante papel na proliferação glandular. O desequilíbrio da próstata no diabetes por um maior período experimental sugeriu a ocorrência de alterações malignas, sendo que a terapia com insulina resultou na diminuição destas alterações, indicando o efeito protetor no tecido.

Contudo, considerando o período experimental de 20 dias esse efeito não foi tão expressivo, visto que a continuidade da proliferação do compartimento basal e a ocorrência de células basais de fenótipo intermediário.

O diabetes caracterizou reatividade estromal com a ocorrência de miofibroblastos, além do desequilíbrio da dinâmica glandular e sinalização parácrina, especialmente no período inicial da doença. Pode-se concluir que o tratamento insulínico indicou a parada e/ou regressão do processo de síntese estromal, considerando a reatividade da vimentina.

A existência de reatividade positiva para c-Myc apenas nos grupos diabéticos com 20 dias, *NOD*<sup>+</sup> 2 e *NOD*<sup>+</sup> 2 + I, indicou tendência à malignidade na próstata de animais diabéticos por períodos de 20 dias mesmo com controle glicêmico. Ainda, a imunorreatividade positiva para c-Myc nestes casos reforçaram a constatação estrutural de que o período de ocorrência da doença interferiu na deflagração e/ou severidade da lesão prostática.

De maneira geral, os tratamentos insulínicos tanto com 7 quanto com 20 dias de diabetes levaram à diminuição dos diferentes marcadores de células tronco relacionados à processos proliferativos epiteliais, demonstrando o papel protetor e equilíbrio tecidual prostático da insulina.

## 8- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Camundongos diabéticos apresentaram alterações morfológicas e estruturais prostáticas proporcionais ao tempo de ocorrência da doença; como atrofia epitelial, hipertrofia estromal, NIP, adenose e adenocarcinoma em estágio inicial;
- Tratamento insulínico de camundongos diabéticos levou a recuperação e/ou interrupção das lesões estruturais verificados em animais diabéticos sem controle glicêmico;
- O tratamento insulínico de longa duração não reverteu completamente as alterações morfológicas prostáticas, sugerindo a não substituição da secreção de insulina normalmente produzida conforme a necessidade metabólica em indivíduos não-diabéticos;
- Picos de hiper e hipoglicemia devem ter contribuído com o quadro encontrado no grupo NOD+ 2 + I, considerando a maior probabilidade de ocorrência de alterações morfológicas e estruturais no tratamento prolongado;
- O diabetes não protegeu o indivíduo do câncer de próstata;
- O diabetes levou à ativação de processo proliferativo tanto epitelial quanto estromal; sugerindo que a falta de ação androgênica e insulínica tecidual tenha sensibilizado as células basais;
- O tratamento insulínico indicou a parada e/ou regressão da ativação estromal, considerando a reatividade da vimentina;

- A imunorreatividade positiva para c-Myc constatou que o período de ocorrência da doença interferiu na deflagração e/ou severidade da lesão prostática;
- A insulina sugeriu papel protetor, garantindo o equilíbrio tecidual prostático já que houve redução da reatividade de biomarcadores de células tronco relacionados aos processos proliferativos epiteliais.

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.A.; DIZEYI, N.; ALM, P.; DI SANT'AGNESE, P.A.; DEFTOS, L.J.; AUMULLER, G. Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate*. 44(3):181-6, 2000.

ARCOLINO, F. O; RIBEIRO, D. L; GOBBO, M. G; TABOGA, S. R; GÓES, R.M; Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats *Int. J. Exp. Pathol.* 91(2):144-54, 2010.

ARGILÉS, J. M; LÓPEZ-SORIANO, F. J; Insulin and cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 18(4):683-7, 2001

AUMÜLLER, G. & ADER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.* 198(1):145-58, 1979.

ATKINSON, M. A; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat. Med.* 5(6):601-4, 1999.

BARNARD, R. J; ARONSON, W. J; TYMCHUK, C. N; NGO, T. H. Prostate cancer: another aspect of the insulin-resistance syndrome? *Obes. Rev.* 3(4):303-8, 2002.

BASARIA, S.; MULLER, D.C.; CARDUCCI, M.A.; EGAN, J.; DOBS, A.S. Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy. *Cancer*. 106(3):581-8, 2006.

BELL, D.R.; VAN ZANT, G. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene*. 23(43):7290-6, 2004.

BERRY, P.A.; MAITLAND, N.J.; COLLINS, A.T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 288(1-2):30-7, 2008.

BIRBACH, A.; EISENBARTH, AD.; KOZAKOWSKI, N.; LADENHAUF, E.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; SCHMID, J. A. Persistent Inflammation Leads to Proliferative Neoplasia and Loss of Smooth Muscle Cells in a Prostate Tumor Model. *Neoplasia*. 13(8):692-703, 2011.

BONKHOFF, H.; REMBERGER, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch. A, Pathol. Anat. Histopathol.* 422(1):35-8, 1993.

BRIMO F.; EPSTEIN, J. I. Immunohistochemical pitfalls in prostate pathology. *Hum. Pathol.* 43(3):313-24, 2012.

BUNTING KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells.* 20(1):11-20, 2002.

CAGNON, V.H; CAMARGO, A.M.; ROSA, R.M.; FABIANI, C.R.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). *Tissue Cell.* 32(4):275-83., 2000.

CAGNON, V. H.; FÁVARO, W. J. Dystroglycan patterns on the prostate of non-obese diabetic mice submitted to glycaemic control. *Int. J. Exp. Pathol.* 90(2):156-65, 2009.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 25(11):2739-49, 2007.

CIARDULLO, A.V.; DAGHIO, M.M.; BRUNETTI, M.; BERRINI, M.; DAYA, G.; FELTRI, G.; NOVI, D.; GOLDONI, C.A.; GUERZONI, A.; MESSORI, A.; MAGRINI, N. Audit of shared-care program for persons with diabetes: baseline and 3 annual follow-ups. *Acta Diabetol.* 41(1):9-13, 2004.

COLLINS, A.T.; MAITLAND, N.J. Prostate cancer stem cells. *Eur. J. Cancer.* 42(9):1213-8, 2006.

COLLIER, A; GHOSH, S; MCGLYNN, B; HOLLINS, G. Prostate Cancer, Androgen Deprivation Therapy, Obesity, the Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease: A Review. *Am. J. Clin. Oncol.* 35(5):504-9, 2012

CONGET, I. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev. Esp. Cardiol.* 55(5):528-35, 2002.

COX, M. E; GLEAVE, M. E; ZAKIKHANI, M; BELL R. H; PIURA, E; VICKERS, E; CUNNINGHAM, M; LARSSON, O; FAZLI, L; POLLAK, M. Insulin receptor expression by human prostate cancers. *Prostate.* 69(1):33-40, 2009.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation.* 70(9-10):473-85, 2002.

CUNHA, G.R. & MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation.* 70(9-10):469-72, 2002.

CUNHA, G. R.; RICKE, 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. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92(4):221-36, 2004.

CUNHA, G. R.; RICKE, W. A. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 82(4-5):168-72, 2011.

DE MARZO, A.M.; MARCHI, V.L.; EPSTEIN, J.I.; NELSON, W.G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 155(6):1985-92, 1999.

DE MARZO, A. M; MEEKER, A. K; ZHA, S; LUO, J; NAKAYAMA, M; PLATZ, E. A; ISAACS, W. B; NELSON, W. G; Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology.* 62(5 Suppl 1):55-62, 2003.

DENNIS J, DONAGHUE T, FLORIAN M, KERBEL RS. Apparent reversion of stable in vitro genetic markers detected in tumour cells from spontaneous metastases. *Nature* 292(5820):242-5, 1981.

DENLEY, A.; COSGROVE, L.J.; BOOKER, G.W.; WALLACE, J.C.; FORBES, B.E. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(4-5):421-39, 2005.

DHILLON, P. K.; BARRY, M.; STAMPFER, M. J.; PERNER, S.; FIORENTINO, M.; FORNARI, A.; ET AL. Aberrant cytoplasmic expression of p63 and prostate cancer mortality. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(2):595-600, 2009.

DJAVAN, B.; WALDERT, M.; SEITZ, C.; MARBERGER, M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J. Urol.* 19(4):225-33, 2001.

DOYLE, L.; ROSS, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene.* 22(47):7340-58, 2003.

DROLLER, M.J. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br. J. Urol.* 79 Suppl 2:42-52, 1997.

DUAN C, REN H, GAO S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167(3):344-51, 2010.

ELWOOD-YEN, K.; GRAEBER, T.G.; WONGVIPAT, J.; IRUELA-ARISPE, M.L.; ZHANG, J.; MATUSIK, R.; THOMAS, G.V.; SAWYERS, C.L. Myc-driven murine



prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*. 4(3):223-38, 2003.

Em <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/area/341/orientacao-e-prevencao.html>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2013.

Em <<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/noticias/noticias-da-sbd/1066-11-dos-brasileiros-tem-diabetes-mostra-pesquisa-citacao-da-pesquisa-realizada-pela-dra-marilia-de-brito-gomes>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2013.

FARINOLA, M.A.; EPSTEIN, J.I. Utility of immunohistochemistry for alpha-methylacyl-CoA racemase in distinguishing atrophic prostate cancer from benign atrophy. *Human Pathol*. 35(10):1272-8, 2004.

FÁVARO, W. J; PADOVANI, C. R; CAGNON, V. H. Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue Cell*. 41(2):119-32, 2009.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B. J.; RYAN, G. B.; STATKOV, P. R.; MAINO, G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. Med*. 135(4):719-34, 1972.

GORELIK E, LOKSHIN A, LEVINA V. Lung cancer stem cells as a target for therapy. *Anticancer Agents Med. Chem*. 10(2):164-71, 2010.

GRAZIANO V, DE LAURENZI V. Role of p63 in cancer development. *Biochim. Biophys. Acta*. 1816(1):57-66, 2011.

GUREL B, IWATA T, KOH CM, JENKINS RB, LAN F, VAN DANG C, HICKS JL, MORGAN J, CORNISH TC, SUTCLIFFE S, ISAACS WB, LUO J, DE MARZO AM. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod. Pathol*. 21(9):1156-67, 2008.

HAFFNER, S. M.; KATZ, M. S; DUNN, J. F. The relationship of insulin sensitivity and metabolic clearance of insulin to adiposity and sex hormone binding globulin. *Endocr. Res*. 16(3):361-76,1990.

HAFFNER, S. M. Sex hormones, obesity, fat distribution, type 2 diabetes and insulin resistance: epidemiological and clinical correlation. *Int J Obes. Relat. Metab. Disord*. 24 Suppl 2:S56-8, 2000.

HAMMARSTEN, J; HÖGSTEDT, B. Calculated fast-growing benign prostatic hyperplasia--a risk factor for developing clinical prostate cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol*. 36(5):330-8, 2002.

HAMMARSTEN, J.; DAMBER, J. E.; PEEKER, R.; MELLSTRÖM, D.; HÖGSTEDT, B. A higher prediagnostic insulin level is a prospective risk factor for incident prostate cancer. *Cancer Epidemiol.* 34(5):574-9, 2010.

HAUTANEN, A. Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 Suppl 2:S64-70, 2000.

HEMELRIJCK, M. V.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G.; GARMO, H.; BINDA, E.; HAYDAY, A.; LAMBE, M.; HOLMBERG, L.; HAMMAR, N. Risk of prostate cancer is not associated with levels of C-reactive protein and other commonly used markers of inflammation. *Int. J. Cancer:* 129(6):1485-92, 2011.

HITRON, A.; ADAMS, V.; TALBERT, J.; STEINKE, D. The influence of antidiabetic medications on the development and progression of prostate cancer. *Cancer Epidemiol.* 36(4):e243-50, 2012.

HOMO-DELARCHE, F. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(4):437-47, 2001.

HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate.* 52(3):213-35, 2002.

HUSS, W. J; GRAY, D. R; GREENBERG, N. M; MOHLER, J. L; SMITH, G. J. Breast cancer resistance protein-mediated efflux of androgen in putative benign and malignant prostate stem cells. *Cancer Res.* 65(15):6640-50, 2005.

IKEDA, K; WADA, Y; FOSTER H. E. JR; WANG, Z; WEISS, R. M; LATIFPOUR, J. Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor-beta *J. Urol.* 164(1):180-5, 2000.

ILIĆ, M; VLAJINAC, H; MARINKOVIĆ, J. Case-control study of risk factors for prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 74(10):1682-6, 1996.

JANGHORBANI M, DEGHANI M, SALEHI-MARZIJARANI M. Systematic review and meta-analysis of insulin therapy and risk of cancer. *Horm. Cancer.* 3(4):137-46, 2012.

JENSEN, N. A.; PEDERSEN, K. M.; LIHME, F.; RASK, L.; NIELSEN, J. V.; RASMUSSEN, T. E.; MITCHELMORE, C. Astroglial c-Myc overexpression predisposes mice to primary malignant gliomas. *J. Biol. Chem.* 278(10):8300-8, 2003.

KASPER, S. Identification, characterization, and biological relevance of prostate cancer stem cells from clinical specimens. *Urol. Oncol.* 27(3):301-3, 2009.

KASTURI, S.; RUSSELL, S.; MCVARY, K. T. Metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *Curr. Urol. Rep.* 7(4):288-92, 2006.

KHETERPAL, E.; SAMMON, J. D.; DIAZ, M.; BHANDARI, A.; TRINH, Q. D.; POKALA N.; SHARMA, P.; MENON, M.; AGARWAL, P. K. Effect of metabolic syndrome on pathologic features of prostate cancer. *Urol. Oncol.* S1078-1439(11)00472-8, 2012.

KEITH, B.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 129(3):465-72, 2007.

KELLEY, D. E; HENRY, R. R; EDELMAN, S. V. Acute effects of intraperitoneal versus subcutaneous insulin delivery on glucose homeostasis in patients with NIDDM. Veterans Affairs Implantable Insulin Pump Study Group. *Diabetes Care.* 19(11):1237-42, 1996.

KIKUTANI, H.; MAKINO, S. The murine autoimmune Diabetes mode: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* 51:285-322, 1992.

KINBARA, H; CUNHA, G. R; BOUTIN, E; HAYASHI, N; KAWAMURA, J. Evidence of stem cells in the adult prostatic epithelium based upon responsiveness to mesenchymal inductors. *Prostate.* 29(2):107-16, 1996.

KNOEPFLER, P. S. Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell.* 2(1):18-21, 2008.

KNOX, J.D; CRESS, A.E.; CLARK, V.; MANRIQUEZ, L.; AFFINITO, K.S.; DALKIN, B.L.; NAGLE, R.B. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am. J. Pathol.* 145(1):167-74, 1994.

KOH, C.M.; BIEBERICH, C.J.; DANG, C.V.; NELSON, W.G. YEGNASUBRAMANIAN, S.; DE MARZO, A.M. MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer.* 1(6):617-28, 2010.

KURITA, T.; MEDINA, R.T.; MILLS, A.A.; CUNHA, G.R. Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development.* 131(20):4955-64, 2004.

LAM, J.S.; REITER, R.E. Stem cells in prostate and prostate cancer development. *Urol. Oncol.* 24(2):131-40, 2006.

LEAV, I.; MCNEAL, J.E.; KWAN, P.W.; KOMMINOTH, P.; MERK, F.B. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate.* 29(3):137-45, 1996.

LEAV I.; LAU, K.M.; ADAMS, J.A.; MCNEAL, J.E.; TAPLIN, M.E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S.M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 159(1):79-92, 2001.

LEITE, K.R.; SROUGI, M.; SANUDO, A.; DALL'OGGIO, M. F.; NESRALLAH, A.; ANTUNES, A. A.; CURY, J.; CAMARA-LOPES, L. H. The use of immunohistochemistry for diagnosis of prostate cancer. *Int Braz J. Urol.* 36(5):583-90,2010.

LEONG, K. G; WANG, B. E; JOHNSON, L; GAO, W. Q; Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature.* 456(7223):804-8, 2008.

LEROITH, D., ROBERTS, C.T. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 195, 127–137, 2003.

LIN, V.K.; WANG, S.Y.; VAZQUEZ, D.V.; XU, C.; ZHANG, S.; TANG, L. Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stem cell like property. *Prostate.* 67(12):1265-76, 2007.

LOSTROH AJ. Effect of testosterone and insulin in vitro on maintenance and repair of the secretory epithelium of the mouse prostate. *Endocrinology.* 88(2):500-3, 1971.

MAJUMDER, P. K; GRISANZIO, C; O'CONNELL, F; BARRY, M; BRITO, J. M; XU, Q; GUNNEY, I; BERGER, R; HERMAN, P; BIKOFF, R; FEDELE, G; BAEK, W. K; WANG, S; ELLWOOD-YEN, K; WU, H; SAWYERS, C. L; SIGNORETTI, S; HAHN, W. C, LODA, M; SELLERS, W. R. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell.* 14(2):146-55, 2008.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(10):3463-8, 1999.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop. Biol.* 253(2):165-74., 2003.

MATHEW G, TIMM EA JR, SOTOMAYOR P, GODOY A, MONTECINOS VP, SMITH GJ, HUSS WJ. ABCG2 Mediated Dye Cycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle.* 8(7):1053-61, 2009.

MC LAREN ID, JERDE TJ, BUSHMAN W. Role of interleukins, IGF and stem cells in BPH. *Differentiation.* 82(4-5):237-43, 2011.

MCNEAL, J.E.; STAMEY, T.A.; HODGE, K.K. The prostate gland: Morphology, pathology, ultrassound anatomy. *Monogr. Urol.* 9:36-54, 1988.

MICHEL M.C., MEHLBURGER L., SCHUMACHER H., BRESSEL H.U., GOEPEL M. Effect of diabetes on lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 163(6):1725-9, 2000.

MIMEAULT, M.; MEHTA, P.P.; HAUKE, R.; BATRA, S.K. Functions of normal and malignant prostatic stem/progenitor cells in tissue regeneration and cancer progression and novel targeting therapies. *Endocr. Rev.* 29(2):234-52, 2008.

MOKDAD, A.H. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 286(10):1195-200, 2001.

NANDANA, S.; ELLWOOD-YEN, K.; SAWYERS, C.; WILLS, M.; WEIDOW, B.; CASE, T.; VASIOUKHIN, V.; MATUSIK, R. HEPsin Cooperates with Myc in the Progression of Adenocarcinoma in a Prostate Cancer Mouse Model. *Prostate.* 70(6):591-600, 2010.

NANDEESHA, H. Insulin: a novel agent in the pathogenesis of prostate cancer. *Int Urol. Nephrol.* 41(2):267-72, 2009.

NELSON, E.C.; CAMBIO, A.J.; YANG, J.C.; OK, J.H.; LARA JR., P.N.; EVANS, C.P. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 10(1):6-14, 2007.

NESBIT, C.E.; TERSAK, J.M.; PROCHOWNIK, E.V. Myc oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 18(19):3004-16, 1999.

NEUVIANS, T.P.; GASHAW, I.; HASENFUS, A.; HACHERHACKER, A.; WINTERHAGER, E.; GROBHOLZ, K. Differential expression of IGF components and insulin receptor isoforms in human seminoma versus normal testicular tissue. *Neoplasia.* 7(5):446-56., 2005.

NORBY, F.L., WOLD, L.E., DUAN, J.H., HINTZ, K.K., REN, J. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E658–E666, 2002.

ONITILLO, A. A.; ENGEL, J. M.; GLURICH, I.; STANKOWSKI, R. V.; WILLIAMS, G. M.; DOI, S. A. Diabetes and cancer I: risk, survival, and implications for screening. *Cancer.* 283(4):E658-66, 2012.

ORIAN-ROUSSEAU V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur. J. Cancer;* 2010 May;46(7):1271-7. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.024. Epub Mar 19, 2010.

ÖZTÜRK, Y.; ALTAN, V.M.; YILDIZOGLU-ARI, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.* 48(1):69-112, 1996.

PANDINI, G.; MINEO, R.; FRASCA, F.; ROBERTS-JR, C.; MARCELLI, M.; VIGNERI, R.; BELFIORE, A. Androgens Up-regulate the insulin-like growth factor-1 receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.*; v.65, pp.1849-1857, 2005.

PEEHL, D. M; COHEN, P; ROSENFELD, R. G; The insulin-like growth factor system in the prostate. *World J. Urol.* 13(5):306-11, 1995.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 25(11):2896-902, 2007.

PRINS, G.S.; BIRSCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology.* 129(6):3187-99, 1991.

PORTO, E. M.; DOS SANTOS, S. A.; RIBEIRO, L. M.; LACORTE, L. M.; RINALDI, J. C.; JUSTULIN JR, L. A.; FELISBINO, S. L.; Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc. Res. Tech.* 74(11):1040-8., 2011.

RAVIKUMAR, P. & ANURADHA, C.V. Effects of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytother. Res.* 13(3):197-201, 1999.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414(6859):105-11, 2001.

RIBEIRO, D.L.; CALDEIRA, E.J.; CANDIDO, E.M.; MANZATO, A.J.; TABOGA, S.R.; CAGNON, V.H. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur. J. Histochem.* 50(1):51-60, 2006.

RIBEIRO DL, TABOGA SR, GÓES RM. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. *Int. J. Exp. Pathol.* 90(4):400-11, 2009.

RITZ, E. Consequences of late referral in diabetic renal disease. *Acta Diabetol.* 39 Suppl 1:S3-8, 2002.

RIZZO, S.; ATTARD, G.; HUDSON, D.L. Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 38(6):363-74, 2005.

RUSCICA, M.; DOZIO, E.; MOTTA, M.; MAGNI, P. Role of neuropeptide Y and its receptors in the progression of endocrine-related cancer. *Peptides.* 28(2):426-34, 2007.

SALVATORI L, CAPORUSCIO F, VERDINA A, STARACE G, CRISPI S, NICOTRA MR, RUSSO A, CALOGERO RA, MORGANTE E, NATALI PG, RUSSO MA, PETRANGELI E. Cell-to-cell signaling influences the fate of prostate cancer stem cells and their potential to generate more aggressive tumors. *PLoS One*. 7(2):e31467, 2012.

SATO, K.; QIAN, J.; SLEZAK, J.M.; LIEBER, M.M.; BOSTWICK, D.G.; BERGSTRALH, E.J.; JENKINS, R.B. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 15;91(18):1574-80, 1999.

SAITO, M.; NISHI, K.; FOSTER JUNIOR, H.E.; WEISS, R.M.; LATIFPOUR, J. Effect of experimental diabetes on rat prostate endothelin receptors. *Eur. J. Pharm.* 310(2-3):197-200, 1996.

SCHNEIDER JE. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* 81(2):289-317, 2004.

SCHOELLER EL, SCHON S, MOLEY KH. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res.* 349(3):839-47, 2012.

SIGNORETTI S, PIRES MM, LINDAUER M, HORNER JW, GRISANZIO C, DHAR S, MAJUMDER P, MCKEON F, KANTOFF PW, SELLERS WR, LODA M. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(32):11355-60, 2005.

SHAPIRO, E.; HARTANTO, V.; PERLMAN, E.J.; TANG, R.; WANG, B.; LEPOR, H. Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that BPH is not a unique stromal process. *Prostate.* 33(3):177-82, 1997.

SOUDAMANI, S; YUVARAJ, S.; MALINI,T.; BLASUBRAMANIAN,K. Experimental Diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 287(2):1281-9, 2005.

STEFAN, S.F. Definition and classification of diabetes including maturity-onset diabetes of the young. In SETFAN, SF. (Ed.). *Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: W. B. Saunders; p. 251-259, 1996.

TAKAO, T.; TSUJIMURA, A. Prostate stem cells: The niche and cell markers. *Int. J. Urol.* 15(4):289-94, 2008.

TAKAHASHI K., N.; TAKEUCHI, T.; SHIMIZU, T.; NISHIMATSU, H.; FUKUHARA, H.; KAMIJO, T.; MORIYAMA, N.; TEJIMA, S.; KITAMURA, T. Engineered IGF-1 expression induces glandular enlargement in the murine prostate. *J. Endocrinol.* 177(3):389-98., 2003.

- TAYLOR R.A.; RISBRIDGER, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*. 76(6):671-81, 2008.
- TESONE, M.; VALLE, L.B.S; FOGLIA, V.G.; CHARREAU, E.H. Endocrine function of the testis in streptozotocin diabetic rats. *Acta Physiol. Lat. Am.* 26(5):387-94, 1976.
- TESONE, M.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; VALLE, L.B.; CALVO, J.C.; BARANAO, J.L.; FOGLIA, V.G.; CHARREAU, E.H. Androgen receptors in the diabetic rat. *Diabetologia*. 18(5):385-90, 1980.
- THOMAS, J. A.; KNYCH, E. T. Jr. Further studies on the influence of oestrogens on androgen dependent fructose formation in sex accessory organs. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 53(3):455-61, 1966.
- TOORIANS, A.W.; KELLEHER, S.; GOOREN, L.J.; JIMENEZ, M.; HANDELSMAN, D.J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 88(11):5207-11, 2003.
- TSUJIMURA, A.; KOIKAWA, Y.; SALM, S.; TAKAO, T.; COETZEE, S.; MOSCATELLI, D.; SHAPIRO, E.; LEPOR, H.; SUN, T.T.; WILSON, E.L. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J. Cell. Biol.* 157(7):1257-65, 2002.
- TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol* 166(6):2472-83, 2001.
- TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; SMITH, M. J.; SMITH, V. C., DANG, T. D.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 8(9):2912-23, 2002.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol.* 40(3):121-8, 2005.
- VAN LEENDERS, G.; DIJKMAN, H.; HULSBERGEN-VAN DE KAA, C.; RUITER, D.; SCHALKEN, J. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab. Invest.* 80(8):1251-8, 2000.
- VETTOR, R; DE PERGOLA, G; PAGANO, C; ENGLARO, P; LAUDADIO, E; GIORGINO, F; BLUM, W. F; GIORGINO, R; FEDERSPIL, G. Gender differences in serum leptin in obese people: relationships with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. *Eur. J. Clin. Invest.* 27(12):1016-24, 1997.
- VIKRAM, A.; JENA, G. Role of insulin and testosterone in prostatic growth: who is doing what? *Med. Hypotheses.* 76(4):474-8, 2011.



- VIKRAM A, KUSHWAHA S, JENA GB. Relative influence of testosterone and insulin in the regulation of prostatic cell proliferation and growth. *Steroids*. 76(4):416-23, 2011.
- WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*. 68(4-5):270-9, 2001.
- WANG, Z.; OLUMI, A. F. Diabetes, growth hormone-insulin-like growth factor pathways and association to benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 82(4-5):261-71, 2011.
- WEDEIRPASS, E.; YE, W.; VAINIO, H.; KAAKS, R.; ADAMI, H.O. Reduced risk of prostate cancer among patients with diabetes mellitus. *Int. J. Cancer*. 102(3):258-61, 2002.
- WEIHUA, Z.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell. Endocrinol*. 193(1-2):1-5, 2002.
- WILL, J.C.; VINICOR, F.; CALLE, E.E. Is diabetes mellitus associated with prostate incidence and survival? *Epidemiology*. 10(3):313-8, 1999.
- WIESNER C, NABHA SM, SANTOS EB, YAMAMOTO H, MENG H, MELCHIOR SW, BITTINGER F, THUROFF JW, VESSELLA RL, CHER ML, BONFIL RD. C-kit and its ligand stem cell factor: potential contribution to prostate cancer bone metastasis. *Neoplasia*.;10:996–1003, 2008.
- WONG, Y.C.; XIE, W.; TSAO, S.W. Structural changes and alteration in expression of TGF-beta1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate*. 45(4):289-98, 2000.
- YAMAMOTO, H.; MASTERS, J. R.; DASGUPTA, P.; CHANDRA, A.; POPERT, R.; FREEMAN, A.; AHMED, A. CD49f is an efficient marker of monolayer – and spheroid colony – forming cells of the benign and malignant human prostate *PLoS One*. 7(10):e46979, 2012.
- YILDIRIM, S.; AYAN, S.; SARIOGLU, Y.; GULTEKIN, Y.; BUTUNER, C.; The effects of long-term oral administration of l-arginine on the erectile response of rabbits with alloxan-induced diabetes. *BJU Int*. 83(6):679-85, 1999.
- ZENZMAIER, C.; UNTERGASSER, G.; BERGER, P. Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp. Gerontol*. 43(11):981-5, 2008.
- ZHANG L, JIAO M, LI L, WU D, WU K, LI X, ZHU G, DANG Q, WANG X, HSIEH JT, HE D. Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 138(4):675-86, 2012.

ZHANG, X.; LEE, C.; NG, P. Y.; RUBIN, M.; SHABSIGH, A.; BUTTYAN, R. Prostatic neoplasia in transgenic mice with prostate-directed overexpression of the c-myc oncoprotein. *Prostate*. 43(4):278-85, 2000.

ZHANG, C.; MONTIRONI, R.; MACLENNAN, G. T.; LOPEZ-BELTRAN, A.; LI, Y.; TAN, P. H.; WANG, M.; ZHANG, S.; ICZKOWSKI, K. A.; CHENG, L. Is atypical adenomatous hyperplasia of the prostate a precursor lesion? *Prostate*. 71(16):1746-51, 2011.

ZUCCHI, I.; ASTIGIANO, S.; BERTALOT, G.; SANZONE, S.; COCOLA, C., PELUCCHI, P., ET AL., Distinct populations of tumor-initiating cells derived from a tumor generated by rat mammary cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(44):16940-5, 2008.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "Diabetes e células-tronco prostáticas: caracterização e relevância biológica na próstata ventral de camundongos espontaneamente diabéticos frente à terapia insulínica":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição:

( X ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2447-1, Instituição: IB - UNICAMP.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº \_\_\_\_\_, Instituição:

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Raísa Mistieri Lorencini

Aluno(a): Raísa Mistieri Lorencini

Orientador(a): Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

*Ana Maria Aparecida Guaraldo*  
 Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
 Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura