



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIA QUILLES ANTONIASSI

**“Estudo do estroma reativo prostático após a orquiectomia bilateral e posterior inibição da atividade da aromatase pela crisina e inibição da atividade da 5-alfa-redutase pela finasterida”**

**CAMPINAS**

**2020**

**JULIA QUILLES ANTONIASSI**

**“Estudo do estroma reativo prostático após a orquiectomia bilateral e posterior inibição da atividade da aromatase pela crisina e inibição da atividade da 5-alfa-redutase pela finasterida”**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA**

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULIA QUILLES ANTONIASSI E ORIENTADA PELO PROF. DR. SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA.

**CAMPINAS**

**2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

An88e Antoniassi, Julia Quilles, 1991-  
Estudo do estroma reativo prostático após a orquiectomia bilateral e posterior inibição da atividade da aromatase pela crisina e inibição da atividade da 5-alfa-redutase pela finasterida / Julia Quilles Antoniassi. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.  
Coorientador: Ricardo Alexandre Fochi.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Crisina. 3. Finasterida. 4. Células estromais. 5. Envelhecimento. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Fochi, Ricardo Alexandre, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of prostatic reactive stroma after bilateral orchiectomy followed by inhibition of activity by chrysin and inhibition of 5-alpha-reductase activity by finasteride

**Palavras-chave em inglês:**

Prostate

Chrysin

Finasteride

Stromal cells

Aging

**Área de concentração:** Biologia Celular

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

**Banca examinadora:**

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]

Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Taize Machado Augusto

Ellen Cristina Rivas Leonel

**Data de defesa:** 31-01-2020

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

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4015-371X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5671597017857347>

Campinas, 31 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)

Prof. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Prof. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Prof. Dra. Taize Machado Augusto

Prof. Dra. Ellen Cristina Rivas Leonel

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural da Unidade Instituto de Biologia.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela oportunidade, confiança, incentivo e pela compreensão que tornaram possível a conclusão deste trabalho e, também, pelo exemplo que ele representa.*

*Ao meu co-orientador Dr. Ricardo Alexandre Fochi, que me auxiliou sempre que necessário com todo o empenho e disponibilidade necessária.*

*Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira, e Prof. Dr. Bruno Sanches pela disponibilidade e contribuições.*

*Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira, Profa. Dra. Taize Machado Augusto, Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Profa. Dra. Ellen Cristina Rivas Leonel, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Larissa Kido e Profa. Dra. Ana Carolina Negrin pela disponibilidade em participarem da finalização desse trabalho.*

*A UNICAMP que me acolheu de uma forma muito especial e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos os docentes, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Protocolo 2014/26660-0.*

*Ao apoio financeiro da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – 141439/2018-1.*

*Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, por toda contribuição na minha formação e por ter disponibilizado o espaço físico para a realização deste trabalho.*

*Ao amigo e técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM), Luiz Roberto Falleiros Jr., técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálises, por me auxiliar e animar ambiente de trabalho com seu bom humor.*

*A minha querida amiga Sarah Bertazzi Augusto, por fazer parte da minha vida por tantos anos e por ter me auxiliado imensamente nesse trabalho.*

*A todos do Laboratório de Microscopia e Microanálises: Profa. Dra. Patricia Vilamaior, Profa. Dra. Rejane Maira Góes, Mãe, Ricardo, Carol Negrin, Mari Marcielo, Vanessa, Ellen, Camila, Simone, Luiz Henrique, Nayara, Fernanda, Guilherme, Carol Frandsen, Tatiane, Carol Bedolo, Mariele, Cássia, Gustavo, Bruno Sanches e Juliana. Obrigada pela companhia,*

*convivência, incentivo, sempre me ajudando quando necessário e me ensinando a cada dia, agradeço por proporcionarem um ambiente de trabalho tranquilo, confortável e divertido. Todos vocês possuem méritos para que a produção desse trabalho fosse possível.*

#### *Agradecimentos especiais*

*Agradeço imensamente a Deus pelas oportunidades concebidas, por me guiar, me iluminar e me amparar nessa jornada*

*À minha família, por tudo! Por serem uma família em todos os sentidos, com amor, compreensão e acolhimento. Obrigada por me ajudar, consolar e não me deixar desistir. À minha mãe, Eliana, por ser a mulher mais forte do mundo e me dar um amor maravilhoso. Ao meu pai, João Carlos, por ser nosso alicerce e minha segurança. Ao meu irmão, Diego, por ser meu cúmplice e me apoiar sempre. À minha cunhada, Gabi, por dar amor, paz e consolo á todos nós. Ao meu amor, Marcos, por me acompanhar, consolar, amparar, me dar segurança e me amar em toda essa montanha russa da vida. Junto de vocês e com Deus tenho certeza de que venceremos qualquer adversidade que aparecer.*

*Às minhas amigas de trabalho e da vida Simone e Vanessa, amigas que levarei por toda a minha vida, obrigada pelo apoio em todos os sentidos.*

*A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa importante jornada.*

**"Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes".**

**Isaac Newton**

## RESUMO

O compartimento estromal responde rapidamente a situações adversas, como reparo de lesões e resposta a distúrbios na homeostase tecidual, que também podem ser resultantes da gênese do câncer. A reação estromal é um fenômeno conhecido que envolve processos celulares, múltiplas proteínas e sinalizadores de matriz extracelular que proporcionam uma resposta do tecido conjuntivo a uma agressão epitelial, principalmente às alterações neoplásicas e inflamatórias. Embora sejam conhecidos os processos que levam à formação do estroma reativo, na próstata ainda restam muitas questões relacionadas a esse fenômeno. Assim o presente trabalho teve como objetivo identificar, quantificar e caracterizar as células estromais e epiteliais, além de elementos de matriz extracelular associados ao estroma reativo prostático em gerbilos, submetidos a diferentes formas de ablação androgênica. Gerbilos machos com 90 dias de idade ( $n = 5$  por grupo) foram castrados (Cc) ou tratados semanalmente por gavagem com crisina (Cr) (50mg/kg/semana em 0,1 ml de óleo de milho), um inibidor da aromatase, ou tratados semanalmente por gavagem com finasterida (F) (10mg/kg/semana em 0,1 ml de óleo de milho), um inibidor da  $5\alpha$ -redutase. O grupo controle (Cn) foi formado por animais intactos e o grupo controle veículo (Cv) foi formado por animais que receberam apenas óleo de milho. Cada grupo experimental foi subdividido em outros três subgrupos e foram eutanasiados com 1, 4 e 52 semanas de tratamento. Os dados foram comparados estatisticamente pela análise de variância (Anova bidirecional) e, posteriormente, pelos pós-testes de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ). A castração cirúrgica promoveu uma regressão glandular expressiva, reduzindo vários parâmetros morfofuncionais e a incidência de inflamações e lesões pré-malignas e malignas. Além disso, o estroma glandular passou a apresentar um maior número de macrófago CD68 e secreção aumentada de MMP-9. O emprego da crisina como inibidor da aromatase, desencadeou uma involução glandular mais sutil. Nesses animais também foi observado uma redução da incidência de lesões inflamatórias, pré-malignas e malignas. Após 1 semana de tratamento com a crisina foi observado um aumento da secreção de MMP-9 e redução de TGF- $\beta$ , e depois de 52 semanas o inverso, com maior síntese de TGF- $\beta$  e presença de telócitos, além de uma menor secreção de MMP-2 e MMP-9. Ao contrário da crisina, a finasterida auxiliou na formação de um microambiente favorável à inflamação e permissivo ao desenvolvimento de lesões prostáticas, formando um estroma reativo. Esse estroma está caracterizado pelo aumento de TGF- $\beta$ , metaloproteinases (2 e 9), células inflamatórias, miofibroblastos e aumento de telócitos. Assim, conclui-se que a utilização de finasterida e crisina a longo prazo possuem efeitos distintos, sendo que a finasterida potencializa a inflamação, o desenvolvimento de estroma reativo e o surgimento de lesões prostáticas, e a crisina possui um papel protetivo ao desenvolvimento de lesões prostáticas, principalmente nos animais senis.

Palavras-chave: próstata ventral; crisina; finasterida; estroma reativo; senescência.

## ABSTRACT

The stromal compartment responds quickly to adverse situations such as injury repair and response to disorders on tissue homeostasis, which may also result from cancer genesis. Stromal reaction is a known phenomenon involving cellular processes, multiple proteins and extracellular matrix signaling that provide a connective tissue response to epithelial aggression, mainly as neoplastic and inflammatory alterations. Although the processes that lead to the formation of the reactive stroma are known, in the prostate there are still many questions related to this phenomenon. So, the present study aimed to identify, quantify and characterize stromal and epithelial cells, as well as extracellular matrix elements associated with reactive prostatic stroma in gerbils, submitted to different forms of androgen ablation. 90-day-old male gerbils (n = 5 per group) were castrated (Cc) or weekly treated by gavage with chrysin (Cr) (50mg/kg/week in 0.1 ml corn oil), an aromatase inhibitor, or with finasteride (F) (10mg/kg/week in 0.1 ml corn oil), a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. The control group (Cn) was composed by intact animals and the vehicle control group (Cv) was formed by animals that received only corn oil. Each experimental group was subdivided into three other subgroups and euthanized after at 1, 4 and 52 weeks of treatment. Data were statistically compared by analysis of variance (bidirectional ANOVA) and subsequently by Bonferroni post-tests ( $p \leq 0.05$ ). Surgical castration promotes an expressive glandular regression, with variation of several morphofunctional parameters and with incidence of inflammation, premalignant and malignant lesions. In addition, the glandular stroma presented a larger number of CD68 macrophages and increased MMP-9 secretion. The use of chrysin as an aromatase inhibitor triggered a more subtle gland involution. In these animals, a reduction in inflammatory, premalignant and malignant lesions was also observed. After 1 week of chrysin treatment, an increase in MMP-9 secretion and a reduction in TGF- $\beta$  was observed, and after 52 weeks the opposite was observed, with higher synthesis of TGF- $\beta$  and presence of telocytes, and a smaller secretion of MMP-2 and MMP-9. Unlike chrysin, finasteride promoted formation of a microenvironment favorable to inflammation and the development of prostatic lesions, forming a reactive stroma. This stroma is associated with increased TGF- $\beta$ , metalloproteinases (2 and 9), inflammatory cells, myofibroblasts and telocytes. Thus, it is concluded that the use of finasteride and chrysin for a long period have distinct effects, finasteride enhances inflammation, the development of reactive stroma and the appearance of prostatic lesions, and chrysin plays a protective role in the development of prostatic lesions, especially in senile animals.

Keywords: ventral prostate; chrysin; finasteride; reactive stroma; senescence.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVO</b> .....	24
<b>3. RESULTADOS</b> .....	25
<b>3.1. MANUSCRITO I</b> .....	26
<b>3.2. MANUSCRITO II</b> .....	60
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>6. ANEXO I</b> .....	98
<b>7. ANEXO II</b> .....	99

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1.A Próstata

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino responsável por secretar um líquido alcalino que constitui o sêmen. Essa secreção apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito, colaborando com a neutralização do meio ácido vaginal e contribuindo grandemente para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (PRICE, 1963; GUYTON; HALL, 2006).

Essa glândula possui uma alta incidência de doenças, por isso analisar a sua morfologia e a fisiologia dessa glândula se torna importante. O câncer de próstata é o tipo de câncer mais comum e a segunda causa de mortes mais frequente, relacionada com câncer, entre os homens (INCA – 2020; ROSS; KANTOFF, 2007; THOMAS *et al.*, 2011).

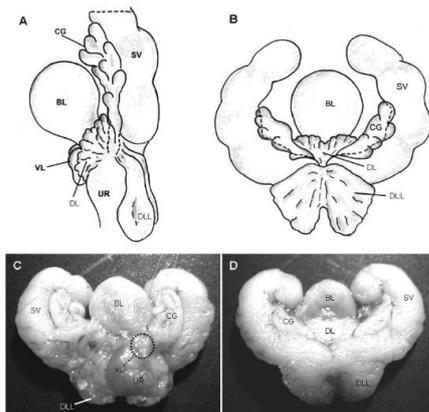
A próstata dos Gerbilos (fig. 1) tem se mostrado um interessante modelo biológico para estudos da biologia prostática, porque sua morfologia é muito semelhante à próstata humana, no que diz respeito à distribuição dos componentes teciduais e celulares (ROCHEL *et al.*, 2007). Além disso, esses animais desenvolvem neoplasias espontâneas com o envelhecimento (CAMPOS *et al.*, 2010; QUINTAR *et al.*, 2017). Diferentemente de outros roedores, a próstata de Gerbilos machos é formada por quatro pares de lobos fortemente associados à uretra: lobo anterior ou glândula coaguladora (GC), lobo dorsal (LD), lobo dorsolateral (LDL) e lobo ventral (LV) (ROCHEL *et al.*, 2007) (fig. 2).



**Figura 1.** Gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

Fonte:

[https://www.google.com/search?q=gerbilo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewiIwanBg8PfAhWDUJAKHZC4BygQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgrc=uu8rNLXBmeq88M:608#imgrc=uu8rNLXBmeq88M](https://www.google.com/search?q=gerbilo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewiIwanBg8PfAhWDUJAKHZC4BygQ_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgrc=uu8rNLXBmeq88M:608#imgrc=uu8rNLXBmeq88M).



**Figura 2.** Estrutura da próstata de Gerbilo adulto. A–C: Lateral (A), dorsal (B,D), e ventral (C). BL, Bexiga; CG, glândula coaguladora; DL, lobo dorsal; DLL, lobo dorsolateral; SV, vesícula seminal; VL, lobo ventral; UR, uretra pélvica e músculo uretral. (ROCHEL *et al.*, 2007)

Histologicamente, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar. Os lobos prostáticos são compostos por um estroma e por um tecido epitelial. O compartimento estromal dos Gerbilos, ricamente vascularizado, possui uma região subepitelial e uma camada de músculo liso, responsável pela contração durante a ejaculação, envolvendo os túbulos (ROCHEL *et al.*, 2007). O epitélio prostático masculino é constituído por um compartimento basal, composto por células proliferativas e por um compartimento luminal secretor, composto por células diferenciadas e com capacidade secretora dos tipos apócrinas e merócrinas (TIMMS; PETERSEN; VOM SAAL, 1999; HUDSON *et al.*, 2001), além de células neuroendócrinas presentes em um compartimento intermediário aos dois anteriores. Em Gerbilos a distribuição desses tipos celulares no epitélio é análoga às descritas para os outros mamíferos, incluindo a espécie humana (SANTOS *et al.*, 2003).

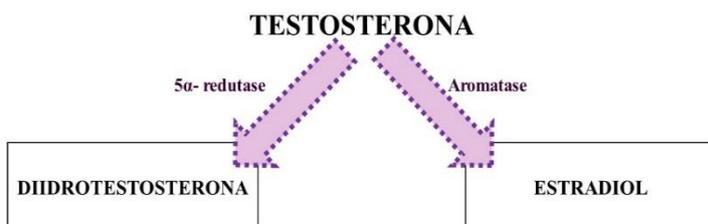
## **1.2.Regulação Hormonal da Próstata**

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também exercem funções importantes para a homeostase dessa glândula. Os efeitos androgênicos nas células prostáticas resultam da interação do hormônio com receptores de andrógenos (AR), sendo a produção de andrógenos regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (CUNHA *et al.*, 2001). Na próstata, os estrógenos também agem via receptores específicos de estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), exercendo ações diretas e indiretas no crescimento e diferenciação desta glândula (MCPHERSON *et al.*, 2007). Resultados obtidos com estudos epidemiológicos e experimentais mostram que, além desses hormônios esteroides sexuais regularem o desenvolvimento, o crescimento e a funcionalidade da próstata, eles também têm papel ativo no desenvolvimento e na progressão de câncer nesse tecido (HÄRKÖNENA; MÄKELÄ, 2004; VIHKO, 2006). Assim, o equilíbrio entre esses dois hormônios é importante, não apenas para a manutenção funcional da glândula prostática, mas também para o surgimento e desenvolvimento de doenças (RISBRIDGER *et al.*, 2003). Rivas e colaboradores (2002) sugerem que o balanço na ação de andrógenos e estrógenos tem importância fundamental na determinação do desenvolvimento normal e anormal de algumas regiões do trato genital masculino, já que observaram que uma redução da ação androgênica sensibilizou o trato genital aos estrógenos.

O principal andrógeno circulante é a testosterona (T) e as células de Leydig são responsáveis por 95% de sua produção, enquanto a adrenal, produz em torno de 5%

(HSING; DEVESA, 2001). Na próstata, a diidrotestosterona (DHT) é o hormônio predominante, formado a partir da T por ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase (5 $\alpha$ -r) (STEERS, 2001) (fig. 3). A T e a DHT se ligam ao mesmo tipo de AR, porém desencadeiam mecanismos e resposta distintos. A T regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, já a DHT tem papel fundamental durante a virilização embrionária e puberal, além de manter a funcionalidade da próstata do indivíduo adulto (LABRIE *et al.*, 2000; SORONEN *et al.*, 2004). Alterações dos níveis androgênicos ou de suas funções devido a problemas de ligação da DHT ao AR, bem como nos níveis ou funções dos fatores de crescimento que são mediados pela DHT, podem ser considerados causas da ruptura da homeostase prostática (CARSON; RITTMASER, 2003).

Os estrógenos regulam o desenvolvimento e a função da próstata em vários estágios da vida do homem, através de mecanismos diretos e indiretos (CUNHA *et al.*, 2001; HÄRKÖNENA; MÄKELÄ, 2004; CARRUBA, 2006). Em homens, a produção diária de estradiol é de 40-50 $\mu$ g, dos quais apenas de 5-10 $\mu$ g são provenientes diretamente da secreção testicular. A maior parte dos estrógenos presentes nestes organismos é derivada da aromatização da T, por ação da enzima aromatase (Aro), nos tecidos adiposos, fígado e na próstata, onde os efeitos diretos dos estrógenos podem ser alcançados pela produção local deste hormônio (EKMAN, 2000; HÄRKÖNENA; MÄKELÄ, 2004) (fig. 3). Em situações anormais, o local de expressão da Aro pode alterar-se de várias formas e, assim, postula-se que estas mudanças sejam críticas para o aparecimento ou a progressão do câncer de próstata de modo semelhante ao observado no câncer de mama (RISBRIDGER *et al.*, 2003). O bloqueio da atividade estrogênica pode causar um desequilíbrio na produção de fatores de crescimento que agem nas células epiteliais, provocando também uma quebra na interação entre o compartimento epitelial e estromal da próstata (HUYNH *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Produção hormonal intraprostática.

O balanço entre as concentrações de andrógenos e estrógenos nos tecidos periféricos pode diferir significativamente daquele encontrado no plasma sanguíneo. Embora os níveis séricos de T reduzam-se mais de 90% depois da castração, a taxa androgênica prostática fica somente de 50 a 60% menor no tecido com câncer, sugerindo assim, a importância da produção hormonal *in situ* no câncer prostático (LABRIE, 1991; RISBRIDGER *et al.*, 2003; MIZOKAMI *et al.*, 2004). Já dados epidemiológicos revelam que não há grandes diferenças entre as concentrações hormonais encontradas no sangue de homens saudáveis e naqueles diagnosticados com câncer prostático (CARRUBA, 2006). As concentrações intracelulares dos esteroides nos tecidos alvos são reguladas por biossíntese e metabolismo local desses hormônios, altamente dependente das enzimas metabolizadoras de esteroides específicas (LABRIE *et al.*, 2000; CARRUBA, 2006; VIHKO *et al.*, 2006). Estas enzimas incluem, além das previamente citadas Aro e 5 $\alpha$ -r (tipos 1 e 2), as desidrogenases do tipo 3 $\beta$ -hidroxiesteróides desidrogenases (3 $\beta$ -HSDs), 3 $\alpha$ -hidroxiesteróides desidrogenases (3 $\alpha$ -HSDs) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróides desidrogenases (17 $\beta$ -HSDs), as sulfotransferases e sulfatases (SORONEN *et al.*, 2004; VIHKO *et al.*, 2006). Como principal fonte para esta produção hormonal local, há esteroides derivados da adrenal, como a dehidroepiandrostenediona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEA-S) e androstenediona, as quais aparecem abundantemente na circulação (LABRIE *et al.*, 2000; VIHKO *et al.*, 2006). Esses esteroides tornam-se substratos nos tecidos periféricos e os hormônios, a partir deles produzidos, exercem suas ações nas mesmas células onde a síntese aconteceu, sem que tenham sido necessárias liberação e diluição dos hormônios ativados no espaço extracelular ou na circulação geral, modo esse conhecido como intrócrino. Portanto, esses esteroides provenientes da adrenal acabam por regular, de modo muito eficaz, a influência dos andrógenos e estrógenos ativos a nível pré-receptor nas células alvo (VIHKO *et al.*, 2006). Assim, a taxa de formação de cada hormônio esteroide sexual depende da atividade específica de enzimas metabolizadoras de andrógenos e estrógenos presentes nas células de cada tecido (LABRIE, 1991; LABRIE *et al.*, 2000). Alterações no padrão de expressão destas enzimas podem modificar a concentração intracelular hormonal, desempenhando papel patofisiológico no desenvolvimento de cânceres associados a hormônios, uma vez que alteradas, podem provocar a quebra da interação epitélio-estromal e contribuir fortemente para o aparecimento de alterações no compartimento estromal prostático

(LABRIE *et al.*, 2000; SORONEN *et al.*, 2004; CARRUBA, 2006; VIHKO *et al.*, 2006).

É sabido que o cenário hormonal intraprostático pode influenciar sobremaneira a interação epitélio-estroma nas mais diversas fases do desenvolvimento da próstata, nosso grupo de pesquisa há décadas vem pesquisando essas relações, quer seja na ablação hormonal cirúrgica (CARVALHO; VILAMAIOR; TABOGA, 1997; VILAMAIOR *et al.*, 2000; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2005), quer seja nas castrações químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2007) ou ainda na ação de desreguladores endócrinos e até mesmo durante o desenvolvimento (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006) e envelhecimento (PEGORIN DE CAMPOS *et al.*, 2008). Assim, faz-se necessário investigar mais profundamente as relações que a cascata hormonal intraprostática alterada sob diversos aspectos (castração ou inibição de enzimas metabolizadoras de esteroides) pode influenciar na interação epitélio-estroma e no estabelecimento do estroma reativo prostático.

McPherson e colaboradores (MCPHERSON *et al.*, 2001), estudando camundongos knockout para a enzima Aro, verificaram um aumento significativo da T, da DHT e de prolactina, com uma concomitante super-regulação de AR nas células epiteliais prostáticas, culminando em uma hiperplasia de toda a glândula. A diminuição na ativação da T e DHT e o aumento da produção de metabólitos estrogênicos no epitélio prostático poderia aumentar a proliferação das células e, portanto, desregular o crescimento prostático, o que comprovaria uma quebra na homeostase da interação epitélio/estroma (SORONEN *et al.*, 2004).

### **1.3. Senescência**

Durante o envelhecimento as proporções de andrógenos e estrógenos ficam alteradas, esse desequilíbrio hormonal altera a próstata e aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas, como neoplasias intra-epiteliais e adercinomas (BANEJEE *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.* 2003; CAMPOS *et al.*, 2008).

Essas alterações prostáticas em decorrência do envelhecimento são observadas em cachorros (LEAV *et al.* 2001), ratos (BANERJEE *et al.* 1998) e gerbilos (PEGORIN DE CAMPOS *et al.* 2006; CAMPOS *et al.* 2008; CAMPOS *et al.*, 2010). Nos gerbilos senis, maiores que 12 meses de idade, a maioria das lesões observadas são carcinomas e adenocarcinomas (CAMPOS *et al.* 2008), sendo um bom modelo para análises de câncer de próstata.

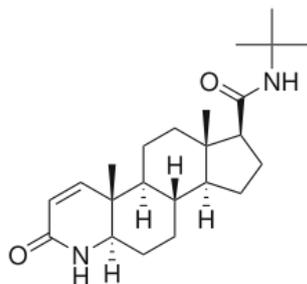
Além disso, alterações importantes no microambiente estromal foram observadas na próstata de animais senis, como o intenso aumento de marcação de TGF- $\beta$ . Juntamente com o desbalanço hormonal, esse fator pode estar relacionado com o desenvolvimento de alterações prostáticas. O aumento de TGF- $\beta$  promove a ativação de fibroblastos, o aumento da angiogênese e favorece a reação inflamatória (TUXHORN *et al.*, 2001; BARRON and ROWLEY, 2012; MONTICO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

#### 1.4. Ablação Androgênica

Estudos baseados na privação androgênica, seja por orquiectomia ou por castração química, têm mostrado que a síntese e organização dos componentes da matriz extracelular (MEC), juntamente com as células de músculo liso (CML) e os fibroblastos, também apresentam respostas adaptativas a diversas situações hormonais sendo, em grande parte, estas repostas moduladas por andrógenos e/ou estrógenos (CARVALHO; VILAMAIOR; TABOGA, 1997; VILAMAIOR *et al.*, 2000; CORRADI *et al.*, 2004; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2005; PEGORIN de CAMPOS *et al.*, 2006).

A castração cirúrgica leva a uma involução da glândula prostática e a uma remodelação dos componentes estromais prostáticos, além de modificações fenotípicas das CML, sugerindo um possível papel para estas células na remodelação e síntese dos componentes da MEC (VILAMAIOR *et al.*, 2000; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2005).

A finasterida (fig. 4) é uma droga conhecida capaz de bloquear a ação da enzima 5 $\alpha$ -r tipo 1 e 2 e, portanto, inibidora da formação da DHT. A utilização de finasterida é comum para o tratamento de alopecia e acne. Quando administrada para cães com hiperplasia prostática benigna (HPB), induziu nos componentes epiteliais e estromais prostáticos uma significativa remodelação, um aumento na proporção de estradiol em relação ao total de andrógeno, além de aumentar o número de células apoptóticas no início do tratamento (SHIBATA *et al.*, 2001). Shibata e colaboradores (2001) e Corradi e colaboradores (2004), notaram por diferentes formas de análise, o aparecimento de um novo microambiente estromal, respectivamente, na próstata de cães e gerbilos adultos depois do tratamento com a finasterida.



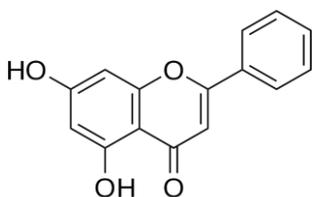
**Figura 4.** Fórmula química da finasterida, inibidor da enzima 5 $\alpha$ -redutase. (TRAISH, 2011).

A crisina (5,7 diidroxiflavona) é um potente flavonoide. Os flavonóides são uma família diversificada de compostos fenólicos naturais, encontrados em frutas e vegetais, eles possuem baixa toxicidade e potenciais propriedades anticâncer (PATEL, 2014; RYU *et al.*, 2017). A crisina é encontrada naturalmente em mel, própolis e várias espécies de plantas, incluindo o maracujá (*Passiflora coerulea*) (PICHICHERO *et al.*, 2011). Ela possui a capacidade de inibir o processo de aromatização, impedindo a conversão da testosterona em estrogênios. Sua ação se dá pela competição com o sítio de ligação da T à Aro, assim esse flavonoide parece ser um potencial instrumento para terapias antiestrogênicas (JANA *et al.*, 2008).

Esse composto possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, pró-apoptóticas e anticâncer conhecidas (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2011; RYU *et al.*, 2017; MANI; NATESAN, 2018).

Inibindo a Aro, o tratamento com crisina pode levar a um acúmulo de testosterona, por isso esse composto também tem sido utilizado como suplemento alimentar, como uma alternativa ao uso de testosterona como anabolizante, ou no tratamento de desordens reprodutivas (Dhawan *et al.* 2002; Jana *et al.* 2008). No entanto, muito pouco se sabe sobre a sua eficácia na inibição da Aro no tecido prostático.

Inibidores de Aro podem ser utilizados no tratamento de HPB por terem efeitos antiestrogênicos na próstata (ITO *et al.*, 2000; SÉRALINI; MOSLEMI, 2001), pois sabe-se que os estrógenos são capazes de provocar o aumento nos elementos do estroma prostático, principalmente das fibras colágenas, das não-colagênicas e de elastina, enquanto os componentes epiteliais regredem (SCARANO *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Fórmula química da crisina, inibidor da enzima aromatase (SHOIEB, 2018).

### 1.5.O Estroma Prostático

A evolução do compartimento estromal das glândulas lhe conferiu uma plasticidade inerente de responder rapidamente a situações emergencialmente adversas, tais como o reparo de lesões e respostas a perturbações na homeostase tecidual, que podem ser resultantes, inclusive, da gênese do câncer. Desta forma, os componentes do microambiente estromal, imediatamente adjacente ao epitélio, podem atuar de forma coordenada quando o epitélio sofre danos que de alguma maneira levam ao rompimento de sua integridade estrutural (BARRON; ROWLEY, 2012; GEVAERT *et al.*, 2014).

O compartimento estromal prostático pode ser entendido como um arranjo complexo de CML e fibroblastos imersos em uma MEC ao redor dos ductos e ácinos. Nesse compartimento há ainda macrófagos teciduais, células endoteliais vasculares, e células do sistema imune (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002). Os fibroblastos, juntamente com as CML sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da MEC, a qual por sua vez, é composta basicamente de fibras de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos, entre outras moléculas como fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas remodeladoras (TUXHORN *et al.*, 2001). O colágeno e as fibras elásticas fornecem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, além de servirem de substrato para adesão e migração celular, processos mediados por glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e laminina. Os proteoglicanos regulam a estrutura da MEC e sua permeabilidade, ligam-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases. Os fatores de crescimento, as enzimas remodeladoras e seus inibidores, junto com os componentes fibrilares da MEC participam ativamente de vários processos fisiológicos e patológicos da próstata, permitindo proliferação e migração dos tipos celulares envolvidos na manutenção e reparo tecidual desse órgão (KREIS; VALE, 1999; TUXHORN *et al.*, 2001).

As interações parácrinas entre o epitélio e as CML ao seu redor são importantes para a morfogênese prostática e a homeostase do órgão adulto. Experimentos realizados com recombinação tecidual revelam que o desenvolvimento prostático é altamente dependente de andrógenos, como resultado obrigatório das interações parácrinas entre o epitélio e o mesênquima do seio urogenital (HAYWARD; ROSEN; CUNHA, 1997; MARKER *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2004a). Pesquisas revelam que inúmeras formas de perturbações, endógenas e/ou exógenas, destas interações podem desencadear carcinogênese na próstata (CUNHA *et al.*, 2002; 2004a; MARKER *et al.*, 2003).

Durante esses processos, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino estimulado por andrógenos (SUNG; CHUNG, 2002; CUNHA *et al.*, 2002). Muitos estudos têm mostrado que o crescimento de células prostáticas cancerígenas pode ser estimulado ou inibido em ambientes estromais específicos (CONDON, 2005).

As CML e os fibroblastos têm participação central nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio e apresentam plasticidade funcional, sendo capazes de modular seu fenótipo frente a situações fisiológicas e patológicas, caracterizando-se pela mudança na expressão de genes de proteínas específicas (FARNSWORTH, 1999; WORTH *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2004b). As CML e os fibroblastos são ainda células estromais dotadas de uma plasticidade via variação fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos e para CML, de acordo com os estímulos, sendo que os miofibroblastos parecem ser o tipo celular principal encontrado em condições patológicas (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002). Como principal fonte de constituintes da MEC, os fibroblastos têm sido alvo de muitos estudos para se esclarecer como esse tipo celular é capaz de induzir as alterações que o compartimento estromal sofre para permitir o aparecimento e desenvolvimento de desordens benignas e malignas na próstata. Os fibroblastos são importantes para a síntese de componentes da MEC, principalmente colágenos do tipo I, II e IV, fibronectina, além de atuarem na regulação da diferenciação epitelial e no processo de inflamação e para o processo de cicatrização de ferimentos. Também contribuem para a formação da membrana basal, pela secreção de laminina e são fontes importantes de proteases que degradam a MEC, como as metaloproteinases. Além disso, os fibroblastos secretam fatores de crescimento que direcionam as interações epitélio/estroma (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

### **1.6.O Estroma Reativo**

O câncer de próstata, de malignidade invasiva diagnosticado nos homens e também em animais experimentais, tem os andrógenos e estrógenos altamente envolvidos como fatores de sobrevivência e progressão. Além disso, os mecanismos moleculares desse problema são complexos, pois trata-se de uma doença relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno-dependente, sendo também influenciada por fatores ambientais, dietas, repostas imunes e inflamatórias (HUYNH *et al.*, 2001; CARRUBA, 2006; DE MARZO *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, epidemiologistas e pesquisadores têm concentrado esforços para explicar como esses vários fatores somam-

se e contribuem para o surgimento e desenvolvimento dessa patogênese (HSING; DEVESA, 2001). Sabe-se que o ambiente e a dieta podem induzir significativas mudanças nos níveis e no metabolismo dos hormônios esteroides, ocasionando uma desregulação endócrina, o que pode contribuir para o desenvolvimento de lesões prostáticas e até mesmo do câncer de próstata. Com base nisto, esses hormônios podem ser considerados ou como intermediadores dos fatores exógenos, como o ambiente ou a nutrição, ou como alvos moleculares do processo de iniciação, promoção e até mesmo progressão do câncer (CARRUBA, 2006). Esta progressão é um processo complexo de múltiplos passos que começa com a transformação de células epiteliais e estromais, passa por remodelação da MEC, formação de novos vasos sanguíneos e influxo de vários tipos de células imunes, principalmente macrófagos e depois, ainda continua com o crescimento, invasão e metástase do tumor. Assim, tudo isto não é exclusivamente desencadeado pela ativação de oncogenes e inibição de genes supressores de tumor. Muitas evidências sugerem que o desenvolvimento do câncer também seja altamente dependente da criação, a partir do estroma, de um ambiente permissivo e promotor da tumorigênese (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002).

As modificações dos fenótipos celulares estromais e da composição da MEC têm sido observadas em muitos tipos de cânceres, principalmente nos de mama, de cólon e próstata (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002; TOMAS; KRUSLIN, 2004). Estas alterações são conhecidas como desmoplasia, reação estromal ou estroma reativo (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002; TOMAS; KRUSLIN, 2004; KALLURI; ZEISBERG, 2006). Esses autores referem-se à desmoplasia nos tecidos em que o estroma se revela muito vascularizado e com abundante quantidade de fibrilas de colágeno, fibronectina, proteoglicanos e tenascina C, sendo esta última, ausente do estroma de tecidos saudáveis. Tuxhorn *et al.* (2001) preferem utilizar o termo estroma reativo para descrever a gênese de um novo microambiente estromal que é criado em resposta ao carcinoma e que acompanha a progressão tumoral. Em geral, um estroma desmoplásico ou reativo típico contém células estromais fenotipicamente alteradas, MEC remodelada, aumento da biodisponibilidade de fatores de crescimento, alta atividade de proteases, maior vascularização e influxo de células inflamatórias (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002; TOMAS; KRUSLIN, 2004; KALLURI; ZEISBERG, 2006). Não somente no câncer pode ser observado o estabelecimento de um estroma reativo, um microambiente estromal reativo também pode ser observado em processos de cicatrização, fibrose e na maioria das doenças proliferativas, incluindo a hiperplasia prostática (HPB) (SILVA JR

*et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). A ativação da proliferação celular estromal facilita a remodelação tecidual através da deposição de substâncias da MEC e produção de fatores de crescimento, sendo está uma resposta adaptativa do estroma visando a preservação da homeostase da próstata (DESMOULIERE *et al.*, 2005). Pesquisas anteriores têm mostrado que a reação estromal inicia-se em focos pré-malignos de neoplasia intraepitelial prostática nos humanos e co-evolui com o desenvolvimento do carcinoma e a expressão do fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1) (TUXHORN *et al.*, 2001, 2002; BARRON *et al.*, 2010). Similarmente, o estroma reativo aparece nos locais de HPB, associando-se com a expressão aumentada de interleucina-8 (SCHAUER *et al.*, 2008). Barron e colaboradores (2010) acreditam que um melhor entendimento destes mecanismos sejam os novos alvos terapêuticos para o entendimento de doenças onde o microambiente estromal tem papel chave na progressão e desfecho clínico. Para estes pesquisadores, a elevada expressão de TGF- $\beta$ 1 induz fibroplasia estromal associada a alterações no compartimento epitelial, além de inflamação.

O estroma reativo é composto, na maioria dos cânceres, principalmente por populações distintas fibroblastos e miofibroblastos, sendo estes últimos cruciais para a progressão tumoral. Além disso, um estroma reativo também apresenta elevada expressão de vários fatores de crescimento responsáveis pela regulação do reparo tecidual e angiogênese (TUXHORN *et al.*, 2001; 2002). Experimentalmente, fibroblastos isolados de focos de cicatrização de ferimentos, de tecidos com fibrose ou de regiões de carcinoma são capazes de se proliferar em larga escala e de secretar altas taxas de constituintes da MEC, sendo então chamados de *ativados*. Nestas situações, os fibroblastos ativados passam a sintetizar altas taxas de proteases degradadoras de matriz, como as metaloproteinases MMP-2, MMP3 e MMP-9, diversos fatores de crescimento e moduladores de respostas imunes, como as interleucinas, além de expressar  $\alpha$ -actina de músculo liso. A serino protease de superfície celular, conhecida como proteína de ativação de fibroblasto (FAP – fibroblast activation-protein) tem sido considerada um marcador promissor específico desses fibroblastos ativados (KALLURI; ZEISBERG, 2006; GEVAERT *et al.*, 2014). Um mecanismo de transição epitelial-mesenquimal vem sendo cada vez mais reconhecido nas células cancerosas como um importante determinador de progressão tumoral. Dados obtidos a partir de experimentos em nosso laboratório demonstraram o surgimento de focos de estroma reativo em próstata de Gerbilos depois do bloqueio da atividade de 5 $\alpha$ -r pela finasterida,

que leva à metabolização hormonal intraprostática, onde houve um acúmulo evidente de colágeno na região adjacente ao epitélio e proliferação de fibroblastos nesta mesma região, independentemente da idade do animal estudado (CORRADI *et al.* 2009a, b).

Há muito interesse por parte de nosso grupo de pesquisa em se entender as diferenças entre um compartimento estromal sadio e o estroma reativo. Um estroma normal na maioria dos órgãos contém um baixo número de fibroblastos associados à MEC, enquanto que um estroma reativo mostra-se com abundante quantidade de fibroblastos e maior número de miofibroblastos, aumentada densidade capilar, chamada de microvasculatura reativa (SAN MATIN *et al.*, 2014), alta deposição de colágeno tipo I e fibrina, de fibronectina, de tenascina-C, de vimentina (TUXHORN *et al.*, 2001) e síntese alterada de proteoglicanos (COULSON-THOMAS *et al.*, 2015) e glicosaminoglicanos (KALLURI; ZEISBERG, 2006). A ativação do compartimento estromal prediz ser o passo crítico para o crescimento e progressão de adenocarcinoma na próstata, porém, os mecanismos específicos desta ativação estromal e até que ponto o estroma regula a biologia da tumorigênese não estão ainda completamente esclarecidos (TUXHORN *et al.*, 2002).

### **1.7. Telócitos**

No estroma prostático podemos elencar algumas populações celulares que ficam imersas na MEC: as células que sintetizam MEC - os fibroblastos, as células musculares lisas, as raras células mesenquimais indiferenciadas, células endoteliais e as células do sistema imune - neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos. Recentemente, uma grande diversidade de populações de fibroblastos e fibrócitos têm sido reconhecidas no estroma, levando-se em conta os tipos de produtos de síntese e as diferentes respostas a sinalizadores extracelulares específicos. Assim, fibroblastos/fibrócitos estromais CD34+, células estromais CD34+ ou telócitos parecem ser uma sinonímia para um mesmo tipo celular do estroma reativo (DIAZ-FLORES *et al.*, 2014). Há que se ressaltar a grande importância de células contrácteis tais como as células musculares lisas, que em condições específicas de remodelação estromal prostática podem atuar de maneira a sintetizar elementos de MEC (CARVALHO; VILAMAIOR; TABOGA, 1997; VILAMAIOR *et al.*, 2000; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2005;).

A utilização da nomenclatura *telócitos* (TC) para as células estromais CD34+ é relativamente recente, uma vez que estas células foram descobertas há poucos anos

atrás, em 2005, quando o grupo de pesquisa chefiado por L.M. Popescu, em Bucharest na Romênia, descreveu um novo tipo de célula que aparece no estroma de vários órgãos, o qual ficou conhecido como células-tipo célula intersticial de Cajal, devido à similaridade com as células canônicas gastrointestinais. Faussone-Pellegrini e colaboradores (2011) descreveram este tipo celular no intestino humano e perceberam que era consistentemente diferente das células canônicas gastrointestinais tanto na ultraestrutura, quanto imunofenotipicamente. Em 2010, depois da confirmação deste tipo celular peculiar no estroma de vários órgãos e de sua caracterização através de estudos imunohistoquímicos e ultraestruturais, estes dois grupos de pesquisadores concluíram que estavam estudando um novo tipo celular e deram o nome de telócitos, por acharem este mais apropriado, de acordo com o seu fenótipo celular (FAUSSONE-PELLEGRINIE; POPESCU, 2011). De fato, estudos com microscopia eletrônica e cultura de células mostraram características muito particulares deste tipo celular as quais inequivocamente distinguem-nas das células intersticiais de Cajal e das demais células intersticiais: a presença de 2-5 prolongamentos celulares muito finos (menos de 0,2 $\mu$ m), extremamente longos (10-100 $\mu$ m), de aspecto moniliforme (com várias dilatações), com presença de múltiplas cavéolas. Com isso, dadas estas peculiaridades e para evitar maiores confusões com os outros tipos celulares (fibroblasto, fibrócito, células-tipo fibroblasto, células mesenquimais) a nomenclatura telócito foi proposta, utilizando-se o termo telópode para os prolongamentos (POPESCU; FAUSSONE-PELLEGRINI, 2010).

Um marcador específico de TC ainda não foi encontrado. De fato, TC podem apresentar diferentes perfis dentre os vários órgãos estudados e de acordo com os estudos realizados até o momento, marcações com o anticorpo CD34 tem se mostrado como a melhor opção para a identificação dos TC, possivelmente em combinação com c-Kit (CD117) e vimentina (FAUSSONE-PELLEGRINIE; POPESCU, 2010; DIAZ-FLORES *et al.*, 2014).

Os TC têm sido encontrados em uma ampla variedade de órgãos (coração, estômago, intestino, vesícula biliar, útero, tuba uterina, vasos sanguíneos, pulmão, pleura, pâncreas, glândula mamária, placenta, mesentério, músculo esquelético) localizados no tecido conjuntivo e poderiam ser organizados em uma rede 3D, dispersos na MEC e entremeados junto com as células residentes (fibroblastos, adipócitos e mastócitos) e não residentes (macrófagos, células imunes e granulócitos), ou ainda na periferia de vários tecidos (epitelial, muscular, nervoso), ou ao redor de vasos

sanguíneos (WANG; CRETOIU, 2016). Normalmente, células do tecido conjuntivo são reconhecidas como sendo principalmente (ou até mesmo apenas) fibroblastos e/ou fibrócitos (FAUSSONE-PELLEGRINIE; POPESCU, 2011). Várias funções vêm sendo sugeridas para o TC, como suporte mecânico, guia para migração de outras células para definir a organização final de um órgão ou seu reparo, ou ainda sua renovação, vigilância imunológica nas tubas uterinas (FAUSSONE-PELLEGRINIE; POPESCU, 2011). Também tem sido sugerido aos TC papel neurotransmissor no intestino, os quais contribuem possivelmente com a geração de lentas ondas como as produzidas pelas células intersticiais de Cajal. Já os TC presentes nos ovidutos e miométrio parecem ser sensíveis aos hormônios esteróides (SUCIU *et al.*, 2010). Até agora, há somente um artigo publicado sobre o envolvimento dos TC na patologia do coração de pacientes com fibrilação atrial (MANDACHE *et al.*, 2010). Geralmente, os estudos das células estromais são focados principalmente nas subpopulações de fibroblastos. Porém, a estas células é dada a função de produzir a matriz do tecido conjuntivo, especialmente colágeno, o que as diferencia substancialmente, até o momento, dos TC. O progresso esperado no conhecimento e entendimento das células intersticiais irá mostrar que nem todas as células presentes no interstício, aparentemente fibroblastos e/ou fibrócitos, deve ser rotulado como fibroblastos. Em outras palavras, outros tipos de células intersticiais, principalmente os TC, não devem ser mais negligenciados (POPESCU; FAUSSONE-PELLEGRINI, 2010).

A investigação da presença dos TC no compartimento estromal prostático de gerbilos indicou, pela primeira vez, este novo tipo celular como constituinte tecidual da próstata. Os estudos publicados recentemente com dados de nosso laboratório (CORRADI *et al.* 2009a, b) sugerem uma participação efetiva de numerosos fibroblastos ativados em focos de reação estromal, os quais nem todos, segundo Popescu e Faussone-Pellegrini (2010), podem ser realmente fibroblastos. Avaliando a reatividade dessas células ao anticorpo CD34 foi confirmada em nosso laboratório a suspeita de que parte dos fibroblastos eram CD34+, portanto sendo TC. Assim Corradi e colaboradores (2013) descreveram pela primeira vez a presença de TC na próstata. Com base nisso, novos estudos são necessários a fim de se tentar averiguar o efetivo papel dos TC no estroma reativo prostático, buscando respostas para as perguntas que ainda não são respondidas e para dados, que até o momento, são conflitantes na biologia do estroma prostático.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivos Gerais**

O presente trabalho objetivou identificar, quantificar e caracterizar, as células estromais bem como os principais elementos de MEC associados ao estroma reativo prostático em gerbilos, adultos e senis, submetidos ao tratamento com crisina (inibidor de aromatase), finasterida (inibidor de  $5\alpha$ -r) e castração.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliação morfológica por métodos histoquímicos, através da coloração com hematoxilina-eosina, Tricrômico de Gomori, Periodic Acid Schiff (P.A.S.);
- A análise, por imuno-histoquímica para musculatura estromal lisa ( $\alpha$ -actina), metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), macrófagos (CD68), telócitos (CD34) e fibroblastos ativados (FAP);
- Análise de multipicidade e incidência de inflamação, lesões pré-malignas e malignas.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados do presente trabalho foram divididos em dois manuscritos. O primeiro deles foi submetido à “Experimental and Molecular Pathology”. O segundo encontra-se em fase de elaboração.

### 3.1. MANUSCRITO I

**“A crisina atua como um potencial atenuante das desordens histopatológicas prostáticas decorrentes do envelhecimento em gerbilo da Mongólia”**

**“Chrysin acts as a potential mitigator of histopathological prostate disorders due to aging in the Mongolian Gerbil”**

Julia Quilles Antoniassi<sup>a</sup>, Sarah Bertazzi Augusto<sup>b</sup>, Luiz Henrique Alves Guerra<sup>c</sup>, Simone Jacovaci Colleta<sup>c</sup>, Luis Octávio Regasini<sup>c</sup>, Rejane Maira Góes<sup>c</sup>, Patrícia Simone Leite Vilamaior<sup>c</sup>, Ricardo Alexandre Fochi<sup>d</sup>, Sebastião Roberto Taboga<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo 13084-86, Brasil.

<sup>b</sup> Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP), Hospital do Câncer de Barretos, São Paulo 14784-400, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras, e Ciências Exatas (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), São Paulo 15054-000, Brasil.

<sup>d</sup> Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São Paulo 15025-400, Brasil.

\* Autor correspondente Endereço:

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras, e Ciências Exatas (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo St., 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil. Telefone: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390. E-mail: taboga@ibilce.unesp.br (SR Taboga)

## RESUMO

A fisiologia da próstata é regulada por hormônios esteroides, como andrógenos e estrógenos. Os andrógenos induzem diferenciação, desenvolvimento e atividade secretora, e os estrógenos modulam os efeitos androgênicos, regulando o crescimento e a fisiologia normal da próstata. A maioria dos estrógenos presentes no organismo é derivada da aromatização da testosterona pela ação da enzima aromatase. Este estudo teve como objetivo elucidar os efeitos do desequilíbrio hormonal causado pela castração ou inibição dessa enzima no microambiente prostático de gerbilos da Mongólia. Gerbilos machos com 90 dias de idade ( $n = 5$  por subgrupo) foram castrados (Cc) ou tratados semanalmente por gavagem com crisina (Cr) (50mg/kg em 0,1 ml de óleo de milho), um inibidor da aromatase. O grupo controle (Cn) foi formado por animais intactos. Os animais foram mortos com 1, 4 e 52 semanas de tratamento. Os dados foram comparados estatisticamente pela análise de variância (Anova bidirecional) e, posteriormente, pelo pós-teste de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ). A orquiectomia bilateral, como era de se esperar, promoveu uma regressão glandular expressiva, reduzindo vários parâmetros morfofuncionais, como por exemplo a secreção glandular e o volume relativo dos seus compartimentos, bem como a incidência de inflamações e lesões pré-malignas e malignas. Além disso, o estroma glandular passou a apresentar um maior número de macrófago CD68 e secreção aumentada de MMP-9. O emprego da crisina como inibidor da aromatase, também desencadeou uma involução glandular, porém mais sutil. De maneira geral, nesses animais tanto o epitélio quanto o estroma glandular sofreram um processo de atrofia, havendo redução da secreção prostática e também da incidência de lesões inflamatórias, pré-malignas e malignas. Tais efeitos, entretanto, mostraram-se um pouco diferentes em razão do tempo de tratamento, sendo observado após 1 semana um aumento da secreção de MMP-9 e redução da produção de TGF- $\beta$ , e depois de 52 semanas o inverso, com maior síntese de TGF- $\beta$  e presença de telócitos, além de uma menor secreção de MMP-2 e MMP-9. Dessa forma, pode-se concluir que a crisina possui efeitos intraprostáticos semelhantes à da castração cirúrgica, levando a uma regressão da estrutura glandular com diminuição da incidência de displasias e lesões pré-malignas ou malignas, porém com uma vantagem significativa, o fato de ser um procedimento pouco invasivo quando comparado à castração cirúrgica.

Palavras-chave: próstata ventral, gerbilo, crisina, estroma prostático, senescência

## 1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino, possui característica andrógeno-dependente o que a torna suscetível a lesões significativas. Esse fato é corroborado pelas estatísticas que demonstram ser o câncer de próstata a segunda causa de morte não acidental entre os homens ocidentais (Siegel *et al.*, 2016).

Durante o envelhecimento é comum a ocorrência de um desequilíbrio hormonal, alterando a proporção de andrógenos e estrógenos, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas, como neoplasias intra-epiteliais e adercarcinomas (Banerjee *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2003). Além disso, alterações importantes no microambiente estromal foram observadas na próstata de animais senis, como o intenso aumento de marcação de TGF- $\beta$ . Juntamente com o desbalanço hormonal, esse fator pode estar relacionado com o desenvolvimento de alterações prostáticas. O aumento de TGF-  $\beta$  promove a ativação de fibroblastos, o aumento da angiogênese e favorece a reação inflamatória (Barron and Rowley, 2012; Montico *et al.*, 2015; Tuxhorn *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2017).

Terapias anti-androgênicas, como a castração cirúrgica ou química, são utilizadas frequentemente no tratamento para o câncer de próstata. No entanto, é comum observação do desenvolvimento de câncer de próstata resistente à castração um tempo após a ablação androgênica (Feldman and Feldman, 2001). Sabe-se que a privação de andrógenos leva a uma regressão glandular com redução da atividade sintética, apoptose de muitas células epiteliais e alterações no compartimento estromal.

Atualmente tem-se tentado identificar alimentos funcionais que contenham compostos naturais com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e que possam prevenir ou impedir o desenvolvimento e recorrência de câncer. Os flavonóides são uma família diversificada de compostos fenólicos naturais, encontrados em frutas e vegetais. Os flavonóides possuem baixa toxicidade e possuem potenciais propriedades anticâncer (Patel, 2014; Ryu *et al.*, 2017). A crisina (5,7-di-hidroxifavona) é um flavonóide encontrado naturalmente em mel, própolis e várias espécies de plantas, incluindo o maracujá (*Passiflora coerulea*) (Pichichero *et al.*, 2011). Esse composto possui propriedades anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer conhecidas (Cho *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007). Ela inibe o processo de aromatização bloqueando o

metabolismo da testosterona pela enzima Aromatase (Jana *et al.*, 2008). Sendo assim, a crisina é um composto com propriedades antiestrogênica, capaz de reduzir a produção intra-tecidual de estrógenos. Inibindo a aromatase, o tratamento com crisina leva a um acúmulo de testosterona, por isso esse composto também tem sido utilizado como suplemento alimentar como uma alternativa ao uso de testosterona como anabolizante. Os efeitos desse composto na próstata ainda não foram totalmente descritos, sabe-se que ela possui um efeito protetivo contra lesões prostáticas, por possuir propriedades anti-proliferativa, anti-inflamatória e pró-apoptótica (Mani and Natesan, 2018; Ryu *et al.*, 2017; Samarghandian *et al.*, 2011).

Sendo assim o presente trabalho objetivou analisar comparativamente os efeitos da ablação androgênica feita pela castração cirurgia do tratamento com a crisina, em gerbilos adultos e senis.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) machos adultos de 90 dias foram mantidos em isoladores de acrílico com maravalha estéril, sob condições ideais de temperatura, umidade e luminosidade, com água e alimentação *ad libitum*, no Biotério do Grupo de Pesquisa em Biologia da Reprodução do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP) (CEUA / UNESP, protocolo 130/2016).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Fig. 1):

- Controle normal (Cn): animais íntegros, livres de qualquer manipulação experimental foram mantidos em isoladores por todo o tempo do experimento sob as mesmas condições de biotério dos grupos experimentais.
- Controle veículo (Cv): animais íntegros receberam por todo o tempo do experimento doses semanais do de óleo de milho, o qual foi empregado como veículo de diluição.
- Castrados (Cc): animais foram sedados pela combinação dos medicamentos xilazina/cetamina e após esse procedimento, foram bilateralmente orquiectomizados. Após a recuperação cirúrgica os animais foram devolvidos aos isoladores e mantidos em biotério.

- **Crisina (Cr):** animais receberam semanalmente, por gavagem, doses de 50mg/Kg/semana de crisina, em 0,1ml de óleo de milho. A produção da crisina foi descrita por Ribeiro e colaboradores (2018) e realizada no Laboratório de Química Verde e Medicinal (IBILCE/UNESP).

Após os todos os tratamentos acima descritos, cada grupo experimental foi dividido em três subgrupos (n=5 por subgrupo), um contendo animais eutanasiados com 1 semana de tratamento, outro contendo animais eutanasiados com 4 semanas de tratamento e outro contendo animais eutanasiados com 52 semanas de tratamento.

Os animais foram insensibilizados por inalação de CO<sub>2</sub>, pesados e decapitados em guilhotina para coleta de sangue. Os complexos prostáticos foram removidos, pesados e após a separação dos lobos, os mesmos foram pesados e processados para os diferentes ensaios de microscopia e microanálises.

## **2.2 Dosagem Hormonal Sérica**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3000 rpm e o soro foi separado e congelado a -80°C para posterior análise dos níveis de testosterona e estradiol. As dosagens foram realizadas por ELISA Captura/Sanduiche (anticorpo-antígeno-anticorpo) utilizando kits comerciais específicos (Enzo Life Sciences International Inc., PA, EUA) de alta sensibilidade. As leituras foram realizadas em leitor Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System (BioTek Instruments, VT, EUA).

## **2.3 Análises Histológicas**

Após a pesagem, os órgãos coletados foram fixados por 12 horas em paraformol tamponado a 4%, lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast (Histosec, Merk). Os órgãos foram seccionados a 3-5µm e corados por Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrômico de Gomori, e Periodic Acid Schiff (P.A.S.), para estudos morfológicos gerais da próstata.

## **2.4 Análises Estereológicas e Morfométricas**

As análises estereológicas foram realizadas para a obtenção do volume relativo dos diferentes compartimentos prostáticos de todos os grupos em estudo. Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo (n=5) a partir de lâminas coradas

com Tricrômico de Gomori, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics). As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978) e aplicado à próstata por Vilamaior e colaboradores. Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência dos compartimentos epitelial, luminal, estroma muscular, colágeno e vaso sanguíneo da glândula prostática.

Para as análises morfométricas, os cortes histológicos corados por H&E foram submetidos às análises de espessura ( $\mu\text{m}$ ) das células epiteliais secretoras e da camada muscular. Para cada uma dessas análises foram coletadas 200 medidas de cada grupo experimental ( $n=5$ ). A análise do material foi realizada em microscópio Olympus BX60, utilizando o software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics para as medidas morfométricas.

## **2.5 Análises Imunoistoquímicas**

Para avaliar o efeito da blação hormonal e do tratamento com a crisina na próstata de Gerbilos machos foram verificadas as possíveis alterações nos componentes celulares e extracelulares do estroma prostático. Para tal foram realizadas análises imunoistoquímica da musculatura lisa estromal ( $\alpha$ -Actina, SC32251/Santa Cruz Biothecnology, diluição 1:100), expressão de metaloproteínases (anti-MMP-2, SC6838/Santa Cruz Biothecnology, diluição 1:25); anti-MMP-9, SC6840/Santa Cruz Biothecnology, diluição 1:50), alterações quantitativas de macrófagos (anti-CD68, SC20060/ Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50) e telócitos (anti-CD34, SC74499/ Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:50), além da presença de um estroma reativo pela expressão de TGF- $\beta$  (anti-TGF- $\beta$ , SC146/Santa Cruz Biothecnology, diluição 1:75).

Procedimentos gerais para imunoistoquímica: os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) ( $\alpha$ -Actina, CD68 e TGF- $\beta$ ) ou tampão tris-EDTA (pH 9,0) (MMP-2, MMP-9, CD34) três vezes durante 7 min em micro-ondas. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos. Depois disso, foi realizado a permeabilização de membrana com triton a 0,5% por 10 minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi realizado com 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluída em água por 2 vezes de 15 minutos e depois os cortes foram lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado através da incubação dos cortes em uma solução bloqueadora (leite desnatado a 5% em tampão TBS-NP40) por 30 minutos

à temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram utilizados em diluições variadas (entre 1:25 a 1:100) a 4°C overnight. Após serem lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos, e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase (RabbitABC Staining System SC-2018 – Santa Cruz Biotechnology), os cortes foram revelados com a diaminobendizina (DAB). A contra coloração dos cortes foi feita com Hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em etanol, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional.

## **2.6 Multiplicidade e incidência de lesões**

As próstatas foram seccionadas em série (cinco cortes por animal, n=5) e o exame de classificação histopatológico das lesões prostáticas foi realizado de acordo com critérios previamente descritos (Gonçalves *et al.*, 2010; Shappell *et al.*, 2004). Foi quantificado o número de focos inflamatórios, lesões pré-malignas e lesões malignas, sendo que foram consideradas distúrbios inflamatórios com a presença de células inflamatórias intraluminal e periductais, lesões pré-malignas (regiões de neoplasia intraepitelial - PIN) e lesões malignas (regiões de carcinoma microinvasivo e adenocarcinoma). A incidência corresponde à porcentagem de animais que apresentaram essas alterações prostáticas no total do grupo analisado. A multiplicidade foi estimada pelo número total de focos de alterações prostáticas observadas em cada corte histológico dividida pelo número total de seções analisadas (o valor expresso é uma média de lesões por seção).

## **2.7 Análises Estatísticas**

Os dados utilizados para a análise são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou média  $\pm$  erro padrão. Como os ensaios de normalidade (teste de Kolmogorow-Smirnoff) e de homocedasticidade (teste de Levene) dos dados pareciam ser válidos, os dados foram analisados inicialmente por análise bidirecional (ANOVA) para examinar os efeitos do tratamento e do período como os dois fatores e a interação dessas comparações múltiplas pós-hoc foi realizada com o teste de Bonferroni, os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as avaliações estatísticas foram realizadas usando o software Statistica 7.0 (Copyright®Statsoft, Inc. de 1984 a 2004).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Características da próstata normal

O presente trabalho utilizou animais intactos de 90 dias (Cn1), 120 dias (Cn4) e 15 meses (Cn52) de idade para os grupos controle. Foi observada uma maior dosagem sérica de testosterona nos animais de 120 dias de idade (Cn4) (tabela I).

Nos animais adultos de 90 dias de idade o lobo ventral apresenta ácinos com lúmen dilatado e intensa secreção no seu interior, revestido por células secretoras colunares altas e cercadas por um estroma delgado, formado, principalmente, de células musculares lisas e fibras colágenas (Fig. 2 A, B, C e D). No estroma foi observada uma marcação moderada de TGF- $\beta$  (Fig. 6A). Observou-se poucas regiões de marcação de MMP-2, estando acumulada na região apical do epitélio e na região mais externa ao ácino no estroma muscular (Fig. 7A). A MMP-9 é mais abundante na próstata desses animais do que a proteinase descrita anteriormente, sendo encontrada, principalmente na região apical do epitélio e dispersa no estroma muscular (Fig. 8A). Os animais adultos possuem pouca marcação de células CD68+, localizadas, principalmente na região periacinar (Fig. 10A).

Na próstata de Gerbilos foi observado um pequeno número de células CD34+, os telócitos (Fig. 11A). Essas células apresentam diversos prolongamentos celulares, podendo formar redes de prolongamentos. Elas podem estar em diferentes localidades do estroma prostático, como: na região distal do estroma muscular, na região subepitelial, próximo a vasos, em aglomerados (Fig. 11A).

Nos animais de 120 dias de idade (Cn4) foi observado níveis séricos de testosterona maiores do que o observado nas outras idades (Cn1 e Cn52) (tabela I). Além disso, as marcações de MMP-2, MMP-9 e células CD34+ também aumentaram (Fig. 7B, 8B e 11B). Foi observado maior incidência e multiplicidade de inflamação, acompanhada pelo aumento da multiplicidade de lesões malignas (Fig. 5).

Os animais senis (Cn52) apresentaram alterações prostáticas importantes desencadeadas pelo desbalanço hormonal intraprostático característico do avanço da idade. O peso do animal aumentou e do complexo prostático diminuiu no grupo Cn52 em relação aos demais grupos controle (tabela I). Os ácinos se tornaram maiores, com aumento do espaço luminal, acompanhado de uma redução do volume do compartimento epitelial, do musculo liso e das fibras colágenas, enquanto as células

epiteliais e o compartimento estromal tornaram-se atrofiados (tabela1; Fig. 4A1, A2, B, C). A secreção prostática observada no interior do lúmen reduziu consideravelmente (Fig. 4D). O microambiente estromal encontra-se alterado, com marcação intensa para TGF- $\beta$ , redução de MMP-2, aumento de MMP-9 e um discreto aumento de macrófagos CD68 (Fig. 6C, 7C, 8C, 10C). Foram observadas poucas células CD34+, semelhante ao observado no grupo Cn1 (Fig. 11C). Essas alterações estromais refletem no surgimento de alterações morfológicas, com um aumento de células com o citoplasma claro e núcleo atípico no epitélio, o aumento da incidência de inflamação e lesões malignas, no entanto a incidência de lesões pré-malignas reduziu (Fig. 4 A, B e C; Fig. 5). Foi observado um aumento na multiplicidade de inflamações, lesões pré-malignas e malignas (Fig. 5).

O óleo de milho é largamente utilizado como veículo de diluição de compostos lipossolúveis, como o inibidor em questão (crisina). Sendo assim, a fim de observar se esse diluidor pode causar efeitos sobre a próstata de Gerbilos, formou-se um grupo em que foi aplicado apenas óleo de milho pelo mesmo período de tratamento dos demais grupos. Os dados desses grupos mostraram que esse diluidor desencadeou discretas alterações prostáticas que não são relevantes para as análises desse estudo, sendo assim esses dados não foram apresentados aqui.

### **3.2 Efeitos da castração sobre a próstata**

A castração cirúrgica desencadeou importantes alterações prostáticas nas variadas análises realizadas após cada um dos três períodos. Tais alterações se expressaram como uma significativa regressão da glândula prostática, principalmente nos grupos Cc4 e Cc52. Os níveis de testosterona diminuíram acentuadamente uma semana após a castração, mantendo-se baixos após 4 e 52 semanas (tabela I). O estradiol diminuiu apenas no grupo Cc52 (tabela I). A quantidade de secreção diminuiu visivelmente após a castração (Fig. 2H, 3H e 4H).

Foi observada uma redução do peso do complexo prostático uma semana após a castração (tabela I). O volume epitelial diminuiu enquanto o de colágeno aumentou no grupo Cc1 (tabela I; Fig. 2E). Os compartimentos epiteliais e estromais tornaram-se atrofiados (tabela I; Fig. 2F). Rupturas na camada de musculo liso foram observadas nos animais Cc1 (Fig. 9D1, 9D2). A marcação para MMP-9 também foi maior assim como para macrófagos CD68 (Fig. 8D, 10D). No entanto, poucas células CD34+ foram

observadas (Fig. 11D). Uma semana após a castração não houve incidência de inflamação (Fig. 5).

O peso corporal dos animais aumentou 4 semanas após a castração, sendo acompanhado pela redução do peso do lobo ventral, do peso relativo e do peso do complexo prostático (tabela I). Assim como no grupo Cc1, no grupo Cc4 o volume relativo do epitélio diminuiu, enquanto o volume de colágeno aumentou (tabela I; Fig. 3E, 3G, 3H). A altura do compartimento epitelial e estromal reduziu (tabela I; Fig. 3F). Nos animais do grupo Cc4 pôde-se observar regiões descontínuas na camada muscular lisa periacinar (Fig. 9 E1, E2). A marcação de MMP-9 foi maior em relação ao grupo Cn1, Cc1 e Cn4 (Fig. 8E). A presença de macrófagos CD68 foi mais comum (Fig. 10E). A incidência de inflamação e lesões pré-malignas e malignas reduziu, acompanhada da redução da multiplicidade de inflamação e lesões malignas (Fig. 5).

Nos animais do grupo Cc52 foi observado uma redução em todos os parâmetros biométricos (peso do animal, peso do lobo ventral, peso relativo e peso do complexo prostático) (tabela I). Nesses animais também foi observado o aumento do volume epitelial e do estroma muscular, além do colágeno e vasos sanguíneos, com uma redução, entretanto, do volume luminal (tabela I; Fig. 4 E, F, G e H). Os ácinos se tornaram reduzidos e pregueados. A altura das células epiteliais reduziu e do compartimento estromal aumentou (table 1; FIG. 4F). A marcação de MMP-2 e MMP-9 aumentou no grupo Cc52, além disso, também foi mais frequente a observação de células CD34+ (Fig. 7F, 8F, 11F). Nos animais castrados e senis não houve incidência e multiplicidade de inflamações e lesões prostática malignas, a multiplicidade de lesões pré-malignas foi menor que o observado no grupo Cn52 (Fig. 5).

### **3.3 Efeitos da crisina na inibição da enzima Aromatase sobre a próstata de Gerbilos**

O tratamento com a crisina alterou o equilíbrio hormonal prostático a ponto de acarretar uma regressão da estrutura glandular, de maneira diferente na dependência do período de tratamento, sendo que quanto maior o período de tratamento mais evidentes as alterações observadas.

Após uma semana de tratamento foi observado um aumento da concentração sérica de testosterona e estradiol (tabela I). Com 4 semanas de tratamento foi observado uma redução concentração sérica de testosterona e estradiol (tabela I). Com 52 semanas de tratamento, foi observada apenas uma redução dos níveis de estradiol (tabela I).

Com uma semana de tratamento os compartimentos estromais e epiteliais se tornaram atrofiados (tabela I; Fig. 2J1). O volume relativo de colágeno não alterou, porém esse começou a se acumular abaixo do epitélio, formando uma camada subepitelial evidente (Fig. 2K). A secreção diminuiu (Fig. 2L). Além disso, foi observado a presença de debris celulares no interior do lúmen. Foi constatado também um aumento da imunomarcção de MMP-9 e uma redução de TGF- $\beta$  (Fig. 8I, 8I1, 8I2). Não houve incidência e multiplicidade de inflamação, houve uma redução da incidência de lesões pré-malignas (Fig. 5).

Nos animais tratados com crisina por 4 semanas o peso da próstata ventral reduziu (tabela I). Ocorreu uma redução da imunomarcção de MMP-2 e um discreto aumento de MMP-9. Foi mais frequente a observação de células CD34+ (Fig. 7H, 8H, 11H). A secreção diminuiu, sendo que alguns ácinos apresentaram um padrão de secreção alterado, com acúmulo de cristais de aspecto de espinhos (Fig. 3L1, 3L2). Foram observadas algumas regiões de ruptura da CML (Fig. 9H1, 9H2). A marcação para telócitos se tornou mais frequente e mais evidente (Fig. 11H). A incidência de inflamação reduziu nos animais desse grupo (Fig. 5).

No grupo Cr52 o peso dos animais e do complexo prostático reduziram (tabela I). A porcentagem de epitélio reduziu e de vasos sanguíneos aumentou (tabela I; Fig. 4 I, J, K, L). O compartimento epitelial se tornou atrofiado, enquanto o estromal hipertrofiou (tabela I; Fig. 4J). A secreção diminuiu (Fig. 4L). foram observadas algumas regiões de ruptura da CML (Fig. 9I). Ocorreu um aumento da imunomarcção de TGF- $\beta$  e uma redução de MMP-2 e de MMP-9 (Fig. 6I1, 6I2, 7I, 8I). A observação de telócitos foi mais frequente e mais evidente (Fig. 11I). A incidência de lesões pré-malignas aumentou e de lesões malignas reduziu. A multiplicidade de inflamação e lesões prostáticas aumentou (Fig. 5).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento de alterações prostáticas espontâneas em gerbilos senis

Sabe-se que a próstata é uma glândula andrógeno-dependente e que a ação desses hormônios é mediada por receptores de andrógenos, além disso essa glândula também é fortemente influenciada pelos níveis estrogênicos, que agem via receptores específicos de estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (McPherson *et al.*, 2007). Inúmeros estudos

mostram que o equilíbrio entre esses dois hormônios é importante para a manutenção da homeostase prostática e para o surgimento e desenvolvimento de doenças (Risbridger *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2002).

O presente trabalho mostrou que gerbilos senis estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões prostáticas, evidenciadas pela observação de neoplasias intra-epiteliais e adecarcinomas em alguns animais. Diversos estudos mostram que os desequilíbrios hormonais que ocorrem durante o processo de envelhecimento, com diminuição nas proporções entre andrógenos e estrógenos, contribuem para o desenvolvimento de alterações patológicas da próstata (Banerjee *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2003). Ao longo do envelhecimento a atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase está alterada, fazendo com que os níveis de DHT diminuam e o estradiol se acumule (Banerjee *et al.*, 2001; Montico *et al.*, 2015). Além disso, segundo Campos e colaboradores (2008) a homeostase entre a proliferação celular e apoptose também torna-se alterada durante o envelhecimento (Campos *et al.*, 2008).

Alterações importantes no microambiente estromal foram observadas na próstata de animais senis, como o intenso aumento da marcação de TGF- $\beta$ . Juntamente com o desbalanço hormonal, esse fator pode estar relacionado com o desenvolvimento de alterações prostáticas. O aumento de TGF-  $\beta$  promove a ativação de fibroblastos, o aumento da angiogênese e favorece a reação inflamatória (Barron *et al.*, 2010; Descazeaud *et al.*, 2011; Montico *et al.*, 2015; Tuxhorn *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2017).

#### **4.2 A castração cirúrgica desencadeou uma regressão da glândula prostática**

A castração levou a uma regressão glandular decorrente de alterações hormonais prostáticas associada a uma supressão do fluxo sanguíneo para o tecido prostático, levando a uma menor proliferação celular e um aumento no processo de morte celular.

A supressão androgênica pela castração leva a um processo de involução da próstata, causando atrofia e morte de células epiteliais e uma remodelação estromal (Taboga *et al.*, 2009). Essa regressão glandular é regulada pela redução do número de receptores androgênicos na glândula e pelo aumento de TGF- $\beta$  no compartimento estromal, levando a um aumento das taxas de apoptose e redução da proliferação celular (Cordeiro *et al.*, 2008; Placencia *et al.*, 2008).

O presente estudo mostrou que logo após a castração as alterações encontradas e o processo inflamatório desencadeado são mais intensos, como observado no grupo Cc1, no entanto, um período após o processo cirúrgico (grupos Cc4 e Cc52), pode-se

observar a gradativa regressão do processo inflamatório e a diminuição da observação de lesões.

Previamente, foram descritos alterações nas células de musculo liso desencadeadas pela castração, sendo que essas células se tornaram curtas, pregueadas e com aspecto espinhoso, situação observada no presente trabalho após os três períodos de tratamento (Antonioli *et al.*, 2004; Vilamaior *et al.*, 2005).

Macrófagos CD68+ provavelmente participam dessa remodelação prostática, como demonstrado pelo aumento dessas células nos animais dos grupos Cc1 e Cc4. Estudos mostram que há uma resposta inflamatória poucos dias após a castração, com o aumento do número de macrófagos CD68+ e CD163+ localizados no estroma que podem ser recrutados para o compartimento epitelial em decorrência da castração (Silva *et al.*, 2017). Essas células realizam um importante papel fagocítico de células apoptóticas resultantes da ablação androgênica (Nagata *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2017). Esses macrófagos CD68+ são capazes de secretar tanto fatores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- $\beta$ , quanto pró-inflamatórios, como citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (Silva *et al.*, 2017).

A castração cirúrgica desencadeia uma remodelação estromal, em certos aspectos, semelhante ao observado na reação estromal durante a invasão de células epiteliais, como o aumento de colágeno e metaloproteinases. Entretanto, com a castração essa remodelação, provavelmente, está sendo desencadeada pelas células musculares lisas, levando ao desenvolvimento de um microambiente menos permissivo ao desenvolvimento de lesões (Antonioli *et al.*, 2004).

A ablação androgênica é amplamente apontada como um mecanismo de controle da progressão de câncer de próstata (Novara *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2017). O presente trabalho atesta a eficiência da castração cirúrgica, visto que em gerbilos senis uma grande quantidade de lesões prostáticas espontâneas é observada. No entanto, apesar de a castração reduzir o risco de lesões, ela também altera o microambiente prostático levando a uma remodelação estromal.

### **4.3 Efeito protetivo da crisina na próstata**

A crisina é um flavonoide encontrado em várias espécies vegetais. Ela tem sido largamente estudada por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias (Ciftci *et al.*, 2012) e anticancerígenas (Kasala *et al.*, 2016). Esse composto possui efeitos inibitórios sobre a atividade da enzima aromatase, responsável pela aromatização

da testosterona em estradiol (Edmunds *et al.*, 2005; Nabavi *et al.*, 2015; Ta and Walle, 2007; Wang and Morris, 2007).

Estudos mostram que a aplicação de inibidores de aromatase, como a crisina e o letrozol, provocam um aumento dos níveis séricos de testosterona acompanhado por uma redução dos níveis de estradiol (Ciftci *et al.*, 2012; Corradi *et al.*, 2009a, 2009b; McPherson *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2008). No entanto, foi observado que a dosagem e o tempo de tratamento são relevantes para a inibição eficiente da enzima aromatase realizada pela crisina, sendo que o tratamento com dose de 50 mg/kg/semana não foi capaz de aumentar os níveis de testosterona em experimentos com duração de até 1 ano (Amin Altawash *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018).

Observamos que os períodos de 1 e 4 semanas de tratamento não foi suficiente para causar um desequilíbrio hormonal em níveis séricos, pois a concentração de estradiol nos animais tratados foi semelhante ou superior ao observado nos animais controle. No entanto, os valores mencionados tratam da concentração sérica hormonal, sendo que as concentrações intraprostáticas de andrógenos e estrógenos podem estar alteradas. O tratamento por 52 semanas provocou uma inibição efetiva da enzima aromatase, provocando uma redução dos níveis séricos de estradiol.

O presente trabalho evidenciou as propriedades anti-inflamatórias da crisina e foi possível observar um papel protetivo desse composto em relação ao desenvolvimento de lesões malignas prostáticas, evidenciado pela redução da incidência de inflamação em todos os grupos tratados com crisina e a redução de incidência e multiplicidade de lesões malignas em animais senis, cuja presença dessas alterações prostáticas normalmente é frequente.

Estudos *in vitro* mostraram efeitos protetivos, anti-proliferativos, anti-inflamatório e pró-apoptóticos da crisina sobre linhagens celulares de câncer (Mani and Natesan, 2018; Salimi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017). Essas propriedades anti-proliferativas dão-se pelo bloqueio das células cancerígenas na fase sub-G1 do ciclo celular, o que interfere na proliferação e predispõem à apoptose essas células (Ryu *et al.*, 2017; Samarghandian *et al.*, 2011). As propriedades pró-apoptóticas são devidas à ativação da caspase-8 (Samarghandian *et al.*, 2011). Esse efeito protetivo, também, pode estar relacionado com o aumento de ER $\beta$ , com características anti-proliferativas, desencadeado por esse composto (Caires, 2016). Além disso, recentemente ela vem sendo utilizada no tratamento do câncer, pois induz a morte celular pela ativação do fator de necrose tumoral (TNF) (Nabavi *et al.*, 2015). Shoieb e colaboradores

demonstraram que o tratamento com crisina após a indução de HPB é capaz de reduzir o estresse oxidativo e inibir a ativação de NF- $\kappa$ B, IGF-1 e IGF-1R (Shoieb *et al.*, 2018). No entanto, a utilização desse composto em fases pré-púbere pode aumentar as taxas de proliferação e acelerar o desenvolvimento da glândula (Ribeiro *et al.*, 2018).

O presente trabalho mostrou que o tratamento com a crisina alterou a marcação de metaloproteinases 2 e 9 nos diferentes períodos de tratamento. Estudos indicam que o aumento dessas proteinases está relacionado com o desenvolvimento de lesões prostáticas (Bruni-Cardoso *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2015; Justulin *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004). Nos grupos tratados por 4 e 52 semanas foi observada uma redução da marcação de MMP-2, evidenciando que, ao mesmo tempo que seu aumento direciona o desenvolvimento de lesões prostáticas, sua redução também pode estar relacionada com a manutenção da morfologia normal prostática em gerbilos senis.

A utilização da crisina tanto como composto catabólico na dieta quanto no tratamento de disfunções prostáticas devem ser mais bem analisadas. Ela possui eficientes propriedades anti-inflamatórias e mostrou bons resultados em relação ao controle de lesões malignas. Além disso, em comparação à ablação androgênica pela castração, a utilização da crisina é um método menos invasivo. No entanto, pouco se sabe sobre possíveis efeitos colaterais que a sua utilização pode acarretar.

#### **4.4 Os telócitos são células sensíveis às variações no microambiente prostático.**

Recentemente foi descrito um novo grupo de células no estroma prostático, os telócitos. Essas células possuem pouco citoplasma e inúmeros e extensos prolongamentos, chamados telópodes (Corradi *et al.*, 2013; Sanches *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; chaps. 2, Xiao *et al.*). Na próstata os telócitos possuem a função de dar suporte na contração do músculo liso periductal e participam da compartimentalização estromal (Corradi *et al.*, 2013). Essas células possuem junções com células epiteliais e células musculares lisas, sendo que a interação entre essas células é importante para a manutenção do fenótipo normal da glândula prostática (Felisbino *et al.*, 2019).

O presente trabalho mostrou que essas células são sensíveis a alterações prostáticas, estando aumentadas em todos os tratamentos analisados, principalmente nos grupos tratados com crisina. Sabe-se que a ablação androgênica pela castração leva a uma modificação do fenótipo dos telócitos, levando à perda ou redução dos telópodes e

à dilatação do núcleo (Felisbino *et al.*, 2019). Essas células são AR positivas, ER- $\beta$  positivas e produzem TGF- $\beta$ , sendo sensíveis a variações de andrógenos e estrógenos, podendo participar da regulação da proliferação tecidual (Felisbino *et al.*, 2019; Sanches *et al.*, 2017). Portanto a variação intratecidual de andrógeno e estrógeno observada nos grupos tratados com crisina podem ter direcionado esse aumento de células CD34+.

## 5. CONCLUSÕES

Tanto a castração cirúrgica quanto o tratamento com a crisina afetam o microambiente estromal e possuem capacidade de diminuir a incidência de displasias prostáticas. A castração cirúrgica apresenta uma capacidade protetiva maior na próstata, mas trata-se de um método invasivo, por isso a utilização de crisina pode ser um método mais eficiente e menos invasivo.

## 6. DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

## 7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Mr. Luiz Roberto Falleiros Junior pelo suporte técnico. Os autores agradecem ao Prof. Dr. Peter James Harris pela revisão do inglês desse artigo. Esse trabalho foi financiado pela FAPESP (2014/26660-0), CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amin Altawash, A.S., Shahneh, A.Z., Moravej, H., Ansari, M., 2017. Chrysin-induced sperm parameters and fatty acid profile changes improve reproductive performance of roosters. *Theriogenology* 104, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.022>
- Antonioli, E., Della-Colleta, H.H.M., Carvalho, H.F., 2004. Smooth Muscle Cell Behavior in the Ventral Prostate of Castrated Rats. *J. Androl.* 25, 50–56. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02758.x>
- Banerjee, P.P., Banerjee, S., Brown, T.R., 2001. Increased Androgen Receptor Expression Correlates with Development of Age-Dependent, Lobe-Specific Spontaneous Hyperplasia of the Brown Norway Rat Prostate. *Endocrinology* 142, 4066–4075.
- Barron, D.A., Rowley, D.R., 2012. The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. *Endocr Relat Cancer.* 19, 187–204.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

- Barron, D.A., Strand, D.W., Ressler, S.J., Dang, T.D., Hayward, S.W., Yang, F., Ayala, G.E., Ittmann, M., Rowley, D.R., 2010. TGF- $\beta$ 1 induces an age-dependent inflammation of nerve ganglia and fibroplasia in the prostate gland stroma of a novel transgenic mouse. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013751>
- Bruni-Cardoso, A., Lynch, C.C., Rosa-Ribeiro, R., Matrisian, L.M., Carvalho, H.F., 2010. MMP-2 contributes to the development of the mouse ventral prostate by impacting epithelial growth and morphogenesis. *Dev. Dyn.* 239, 2386–2392. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22382>
- Caíres, Cássia Regina Suzuki. Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos. 2016. 48f. Dissertação (Mestrado em genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.
- Campos, M.S., Ribeiro, N.C.S., De Lima, R.F., Santos, M.B., Vilamaior, P.S.L., Regasini, L.O., Biancardi, M.F., Taboga, S.R., Santos, F.C.A., 2018. Anabolic effects of chrysin on the ventral male prostate and female prostate of adult gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 1180–1191. <https://doi.org/10.1071/RD17456>
- Campos, S.G.P., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2008. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *Int. J. Exp. Pathol.* 89, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00550.x>
- Cho, H., Yun, C.W., Park, W.K., Kong, J.Y., Kim, K.S., Park, Y., Lee, S., Kim, B.K., 2004. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol. Res.* 49, 37–43. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00248-2)
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., Beytur, A., 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 44, 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01127.x>
- Cordeiro, R.S., Scarano, W.R., Campos, S.G.P., Santos, F.C.A., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 39, 1312–1324. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.02.008>
- Corradi, L.S., Campos, S.G.P., Santos, F.C.A., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2009a. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 79–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00618.x>
- Corradi, L.S., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2009b. Increased androgen receptor

- and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc. Res. Tech.* 72, 939–950.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.20740>
- Corradi, L.S., Jesus, M.M., Fochi, R.A., Vilamaior, P.S.L., Justulin-, L.A., Góes, R.M., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., 2013. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 398–406. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12021>
- Descazeaud, A., Weinbreck, N., Robert, G., Vacherot, F., Abbou, C.C., Labrousse, F., Allory, Y., Rubin, M.A., De La Taille, A., 2011. Transforming growth factor  $\beta$ -receptor II protein expression in benign prostatic hyperplasia is associated with prostate volume and inflammation. *BJU Int.* 108, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09699.x>
- Edmunds, K.M., Holloway, A.C., Crankshaw, D.J., Agarwal, S.K., Foster, W.G., 2005. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 709–720. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005055>
- Feldman, B.J., Feldman, D., 2001. THE DEVELOPMENT OF ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER. *Nat Rev Cancer* 1, 34–45.
- Felisbino, S.L., Sanches, B.D.A., Delella, F.K., Scarano, W.R., Dos Santos, F.C.A., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Justulin, L.A., 2019. “Prostate telocytes change their phenotype in response to castration or testosterone replacement.” *Sci. Rep.* 9, 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40465-1>
- Fu, B., Xue, J., Li, Z., Shi, X., Jiang, B.H., Fang, J., 2007. Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  through reducing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stability and inhibiting its protein synthesis. *Mol. Cancer Ther.* 6, 220–226.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0526>
- Gonçalves, B.F., Campos, S.G.P. d., Costa, C.F.P., Scarano, W.R., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2015. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: An approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. *Acta Histochem.* 117, 4–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.10.009>
- Gonçalves, B.F., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Campos, S.G.P., 2010. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp. Mol. Pathol.* 88, 96–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.09.017>
- Jana, K., Yin, X., Schiffer, R.B., Chen, J.J., Pandey, A.K., Stocco, D.M., Grammas, P., Wang, X.J., 2008. Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells. *J. Endocrinol.* 197, 315–323.  
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0282>

- Justulin, L.A., Della-Coleta, H.H.M., Taboga, S.R., Felisbino, S.L., 2010. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int. J. Androl.* 33, 696–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01016.x>
- Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Barua, C.C., Madhana, R.M., Dahiya, V., Budhani, M.K., Mallugari, R.R., Maramreddy, S.R., Gogoi, R., 2016. Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Pharmacol. Reports* 68, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.014>
- Mani, R., Natesan, V., 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* 145, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>
- McPherson, S.J., Ellem, S.J., Simpson, E.R., Patchev, V., Fritzscheier, K.H., Risbridger, G.P., 2007. Essential role for estrogen receptor  $\beta$  in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 148, 566–574. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0906>
- McPherson, S.J., Wang, H., Jones, M.E., Pedersen, J., Iismaa, T.P., Wreford, N., Simpson, E.R., Risbridger, G.P., 2001. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology* 142, 2458–2467. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8079>
- Montico, F., Kido, L.A., San Martin, R., Rowley, D.R., Cagnon, V.H.A., 2015. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *Prostate* 75, 1643–1661. <https://doi.org/10.1002/pros.23045>
- Nabavi, S.F., Braidly, N., Habtemariam, S., Orhan, I.E., Daglia, M., Manayi, A., Gortzi, O., Nabavi, S.M., 2015. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. *Neurochem. Int.* 90, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.09.006>
- Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K., 2010. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.014>
- Novara, G., Galfano, A., Secco, S., Ficarra, V., Artibani, W., 2009. Impact of surgical and medical castration on serum testosterone level in prostate cancer patients. *Urol. Int.* 82, 249–255. <https://doi.org/10.1159/000209352>
- Patel, V.H., 2014. Nutrition and prostate cancer: An overview. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 14, 1295–1304. <https://doi.org/10.1586/14737140.2014.972946>
- Pichichero, E., Cicconi, R., Mattei, M., Canini, A., 2011. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. *Int. J. Oncol.* 38, 473–483. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.876>
- Placencia, V.R., Sharif-Afshar, A.-R., Li, X., Huang, H., Uwamariya, C., Neilson, E.G., Shen, M.M., Matusik, R.J., Hayward, S.W., Bhowmick, N.A., 2008. Stromal TGF- $\beta$  signaling mediates prostatic response to androgen ablation by paracrine Wnt activity. *Cancer Res.* 68,

- 4709–4718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6289>. Stromal
- Ribeiro, N.C.S., Campos, M.S., Santos, M.B., Ayusso, G.M., Vilamaior, P.S.L., Regasini, L.O., Taboga, S.R., Biancardi, M.F., Perez, A.P.S., Santos, F.C.A., 2018. Prepubertal chrysin exposure upregulates either AR in male ventral prostate or AR and ER $\alpha$  in Skene's paraurethral gland of pubertal and adult gerbils. *Fitoterapia* 124, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.11.003>
- Risbridger, G.P., Bianco, J.J., Ellem, J.S., McPherson, J.S., 2003. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 187–191. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100187>
- Rivas, A., Fisher, J.S., McKinnell, C., Atanassova, N., Sharpe, R.M., 2002. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: Evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology* 143, 4797–4808. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220531>
- Roy, R., Yang, J., Moses, M.A., 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5287–5297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556>
- Ryu, S., Lim, W., Bazer, F.W., Song, G., 2017. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *J. Cell. Physiol.* 232, 3786–3797. <https://doi.org/10.1002/jcp.25861>
- Salimi, A., Roudkenar, M.H., Seydi, E., Sadeghi, L., Mohseni, A., Pirahmadi, N., Pourahmad, J., 2017. Chrysin as an Anti-Cancer Agent Exerts Selective Toxicity by Directly Inhibiting Mitochondrial Complex II and V in CLL B-lymphocytes. *Cancer Invest.* 35, 174–186. <https://doi.org/10.1080/07357907.2016.1276187>
- Samarghandian, S., Afshari, J.T., Davoodi, S., 2011. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clinics* 66, 1073–1079. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000600026>
- Sanches, B.D.A., Maldarine, J.S., Zani, B.C., Biancardi, M.F., Santos, F.C.A., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2016. The Expression of the Androgen Receptor and Estrogen Receptor 1 is Related to Sex Dimorphism in the Gerbil Prostate Development. *Anat. Rec.* 299, 1130–1139. <https://doi.org/10.1002/ar.23364>
- Sanches, B.D.A., Maldarine, J.S., Zani, B.C., Tamarindo, G.H., Biancardi, M.F., Santos, F.C.A., Rahal, P., Góes, R.M., Felisbino, S.L., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2017. Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 3309–3321. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13234>
- Santos, F.C.A., Custodio, A.M.G., Campos, S.G.P., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2008. Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries1. *Biol. Reprod.* 79, 674–685.

- <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068759>
- Schulz, W.A., Burchard, M., Cronauer, M. V., 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 437–448. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag064>
- Shappell, S.B., Thomas, G. V., Roberts, R.L., Herbert, R., Ittmann, M.M., Rubin, M.A., Humphrey, P.A., Sundberg, J.P., Rozengurt, N., Barrios, R., Ward, J.M., Cardiff, R.D., 2004. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 64, 2270–2305. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-0946>
- Shoieb, S.M., Esmat, A., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., 2018. Chrysin attenuates testosterone-induced benign prostate hyperplasia in rats. *Food Chem. Toxicol.* 111, 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.017>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Silva, J.A.F., Bruni-Cardoso, A., Augusto, T.M., Damas-Souza, D.M., Barbosa, G.O., Felisbino, S.L., Stach-Machado, D.R., Carvalho, H.F., 2017. Macrophage roles in the clearance of apoptotic cells and control of inflammation in the prostate gland after castration. *Prostate* 78, 95–103. <https://doi.org/10.1002/pros.23449>
- Ta, N., Walle, T., 2007. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 107, 127–129.
- Taboga, S.R., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., 2009. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 53, 946–955.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Rowley, D.R., 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 166, 2472–2483. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65620-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65620-0)
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Yang, F., Dang, T.D., Rowley, D.R., 2002. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62, 6021–6025.
- Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2005. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol. Int.* 29, 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.05.006>
- Wang, L., Xie, L., Tintani, F., Xie, H., Li, C., Cui, Z., Wan, M., Zu, X., Qi, L., Cao, X., 2017. Aberrant Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation Recruits Mesenchymal Stem Cells During Prostatic Hyperplasia. *Stemcells Transl.* 6, 394–404. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0174>
- Wang, X., Cretoiu, D., n.d. Telocytes - Connecting Cells.

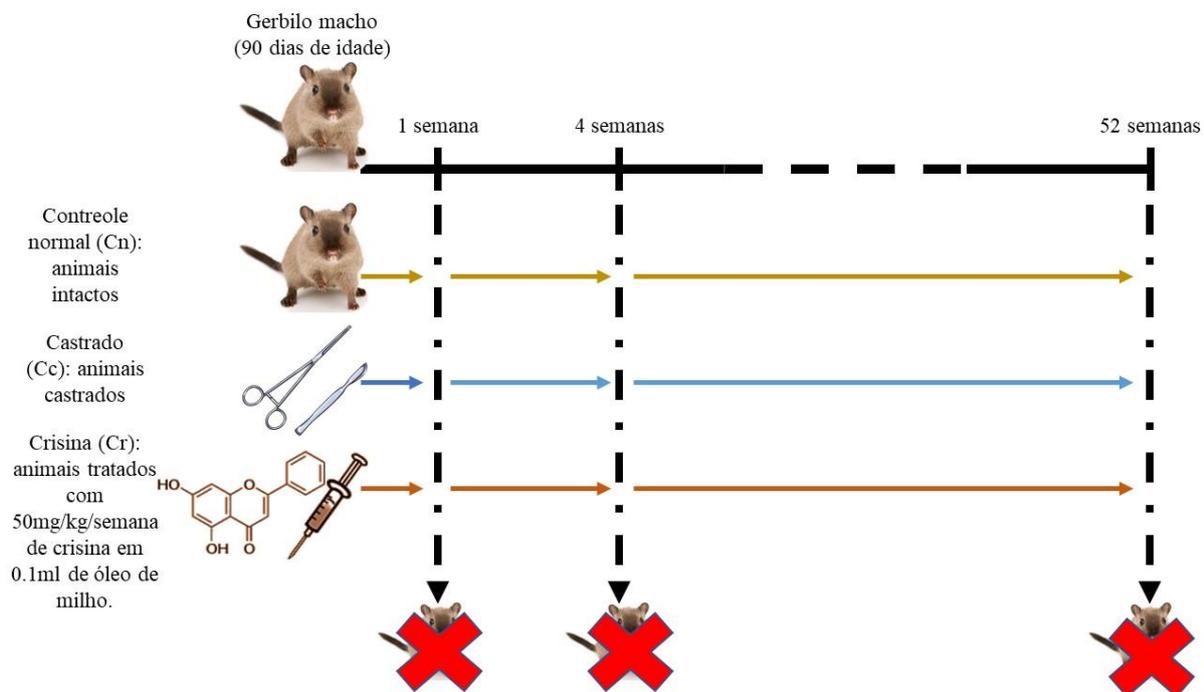
- Wang, X., Morris, M., 2007. Effects of the Flavonoid Chrysin on Nitrofurantoin Pharmacokinetics in Rats: Potential Involvement of ABCG2. *DRUG Metab. Dispos.* 35, 268–274.
- Xu, D., Jin, J., Yu, H., Zhao, Z., Ma, D., Zhang, C., Jiang, H., 2017. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0514-4>
- Zhang, L., Shi, J., Feng, J., Klocker, H., Lee, C., Zhang, J., 2004. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7, 327–332. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500750>

TABELA

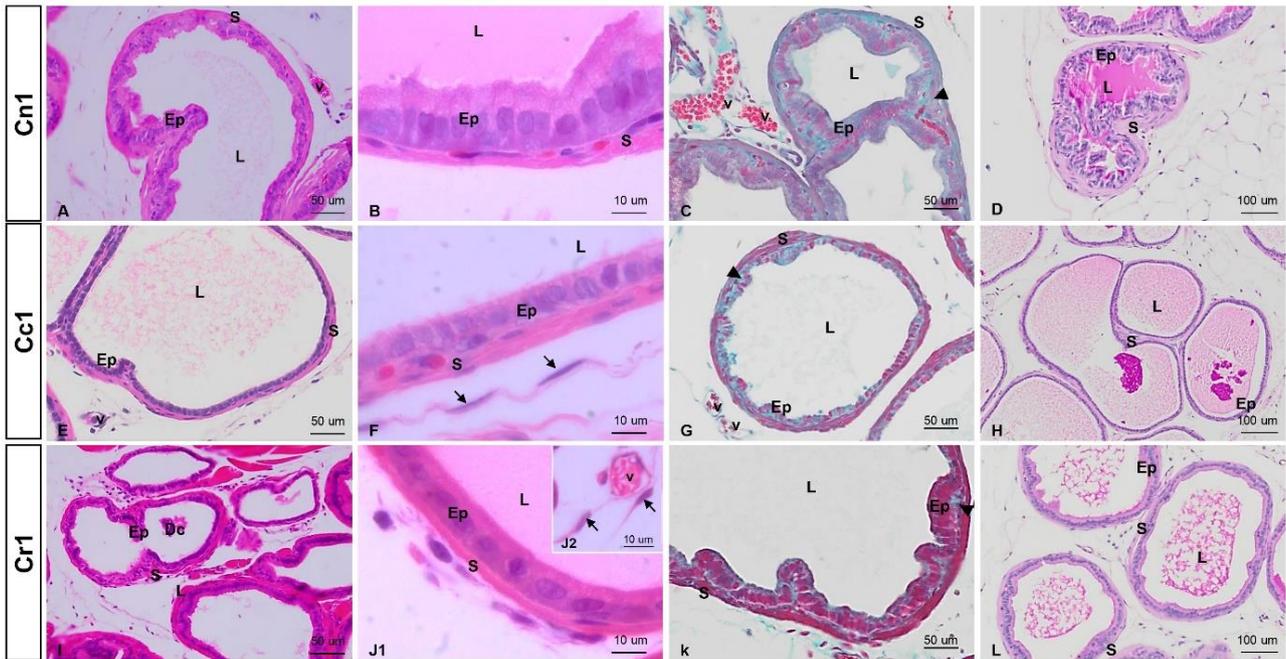
	Cn1	Cc1	Cr1	Cn4	Cc4	Cr4	Cn52	Cc52	Cr52
Animal Weight (g)	70,08 ± 1,384 ab	71,64 ± 1,658 ab	74,6 ± 2,6 ab	72,56 ± 1,386 ab	83 ± 3,739 bc	72,5 ± 2,291 ab	99,43 ± 7,556 d	91,5 ± 1,842 cd	84,29 ± 1,267 abc
Ventral Prostate Weight (g)	0,022 ± 0,003 ab	0,017 ± 0,002 ac	0,020 ± 0,001 a	0,024 ± 0,002 a	0,007 ± 0,001 c	0,015 ± 0,001 d	0,041 ± 0,005 b	0,014 ± 0,003 d	0,033 ± 0,002 b
Relative Weight (10 <sup>7</sup> )	0,391 ± 0,056 a	0,239 ± 0,035 ab	0,273 ± 0,016 ac	0,320 ± 0,024 a	0,102 ± 0,011 b	0,205 ± 0,015 abc	0,411 ± 0,061 a	0,144 ± 0,033 bc	0,380 ± 0,029 a
Prostatic Complex Weight (g)	0,609 ± 0,044 a	0,327 ± 0,023 b	0,675 ± 0,054 a	0,742 ± 0,026 a	0,146 ± 0,01 bc	0,664 ± 0,053 a	0,346 ± 0,046 d	0,084 ± 0,006 c	0,272 ± 0,003 c
Epithelium	18,21 ± 1,437 ad	11,06 ± 0,753 bc	15,89 ± 1,349 bd	19,5 ± 1,095 d	12,13 ± 0,569 bc	16 ± 1,038 abd	10,34 ± 0,532 c	20,06 ± 1,147 ad	9,08 ± 0,882 c
Lumen	47,52 ± 1,694 a	54,66 ± 1,801 a	46,44 ± 2,565 a	48,47 ± 1,598 a	52,31 ± 1,95 a	49,87 ± 1,807 a	75,43 ± 1,786 b	29,17 ± 3,114 c	73,51 ± 1,532 b
Muscle Stroma	8,91 ± 0,663 ab	8,62 ± 0,522 ab	7,17 ± 0,54 ac	8,25 ± 0,412 ab	9,58 ± 0,484 ab	8,67 ± 0,471 ab	4,53 ± 0,366 d	10,37 ± 0,563 b	5,51 ± 0,417 cd
Collagen	0,58 ± 0,137 a	1,39 ± 0,172 b	0,52 ± 0,116 a	0,57 ± 0,117 a	1,23 ± 0,143 b	0,61 ± 0,121 a	0,16 ± 0,0836 a	1,21 ± 0,243 b	0,20 ± 0,073 a
Blood Vessels	0,68 ± 0,166 ab	0,35 ± 0,089 a	0,23 ± 0,080 a	0,35 ± 0,096 a	0,23 ± 0,075 a	0,34 ± 0,093 a	0,56 ± 0,109 a	1,37 ± 0,257 b	1,01 ± 0,202 ab
Epithelial Height	14,28 ± 0,196 a	6,36 ± 0,114 b	12,58 ± 0,273 cd	14,48 ± 0,259 a	8,09 ± 0,193 e	14,01 ± 0,256 a	11,3 ± 0,177 f	7,08 ± 0,172 be	9,85 ± 0,197 g
Morphometry									
Stromal compartment Height	7,54 ± 0,152 a	5,37 ± 0,125 fg	6,15 ± 0,133 bh	6,98 ± 0,160 aci	6,64 ± 0,183 bi	7,09 ± 0,164 ad	5,08 ± 0,097 f	10,92 ± 0,222 j	5,94 ± 0,149 bh
Serum hormone levels									
Testosterone (ng/ml)	1,20 ± 0,121 ac	0,42 ± 0,049 b	2,06 ± 0,461 c	2,30 ± 0,155 d	0,31 ± 0,022 be	1,37 ± 0,089 ae	0,92 ± 0,112 abe	0,09 ± 0,011 f	0,91 ± 0,057 e
Estradiol (pg/ml)	17,19 ± 0,732 ab	17,46 ± 0,649 ab	19,11 ± 0,809 ab	21,18 ± 0,639 ab	20,75 ± 0,643 ab	27,37 ± 2,195 b	18,46 ± 3,519 ab	4,84 ± 1,661 c	1,21 ± 0,477 c

**Tabela I** – Parâmetros biométricos, estereológicos, morfométricos, e concentrações hormonais séricas observadas entre os diferentes grupos experimentais. Os parâmetros biométricos do peso corporal, do lobo ventral da próstata, peso relativo da próstata ventral (peso do lobo ventral/peso do animal) e peso do complexo prostático. A análise estereológica mostra o volume dos compartimentos dos tecidos da próstata (epitélio, lúmen, estroma muscular liso, colágeno e vasos sanguíneos) e a análise morfométrica mostra a altura dos compartimentos epitelial e estromal. Níveis hormonais séricos de testosterona (ng/ml) e estradiol (pg/ml). Os valores mencionados correspondem à média e o erro padrão (n=5). As letras representam a variação significativa entre os grupos, letras iguais representam resultados semelhantes na mesma linha. Legenda: Cn – grupo controle normal; Cc – grupo castrado, Cr – grupo tratado com 50 mg/Kg de crisina; Os números 1, 4 e 52 após os grupos representam as semanas de tratamento.

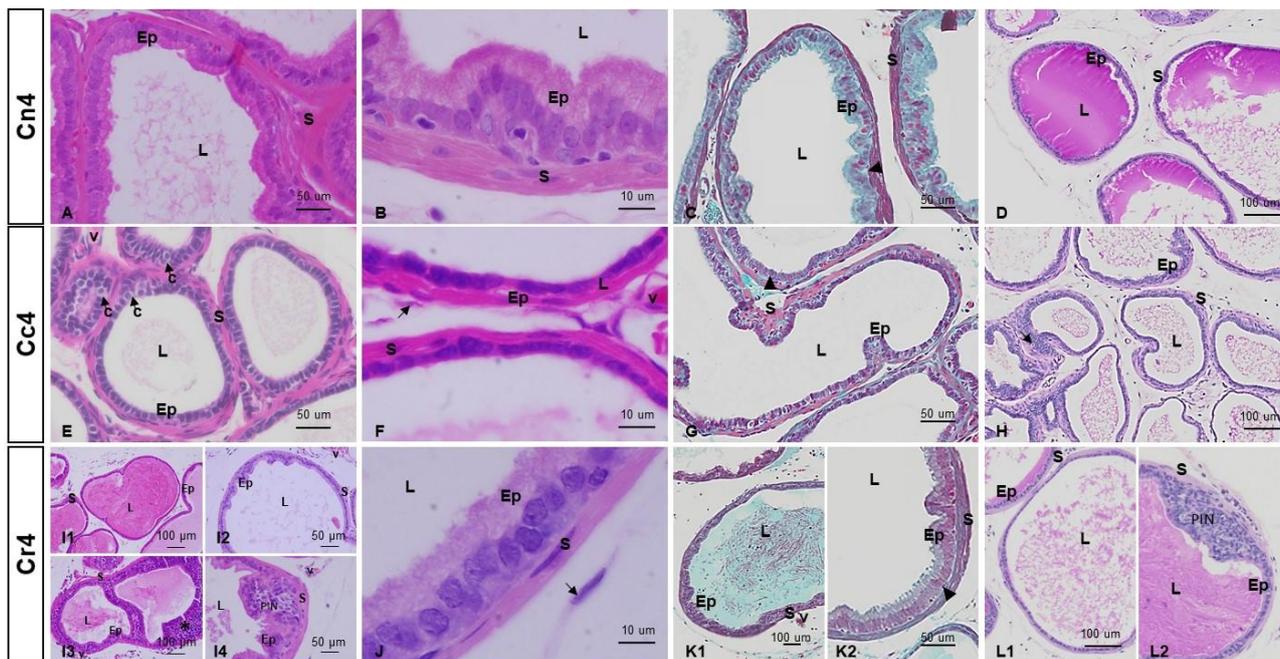
## FIGURAS



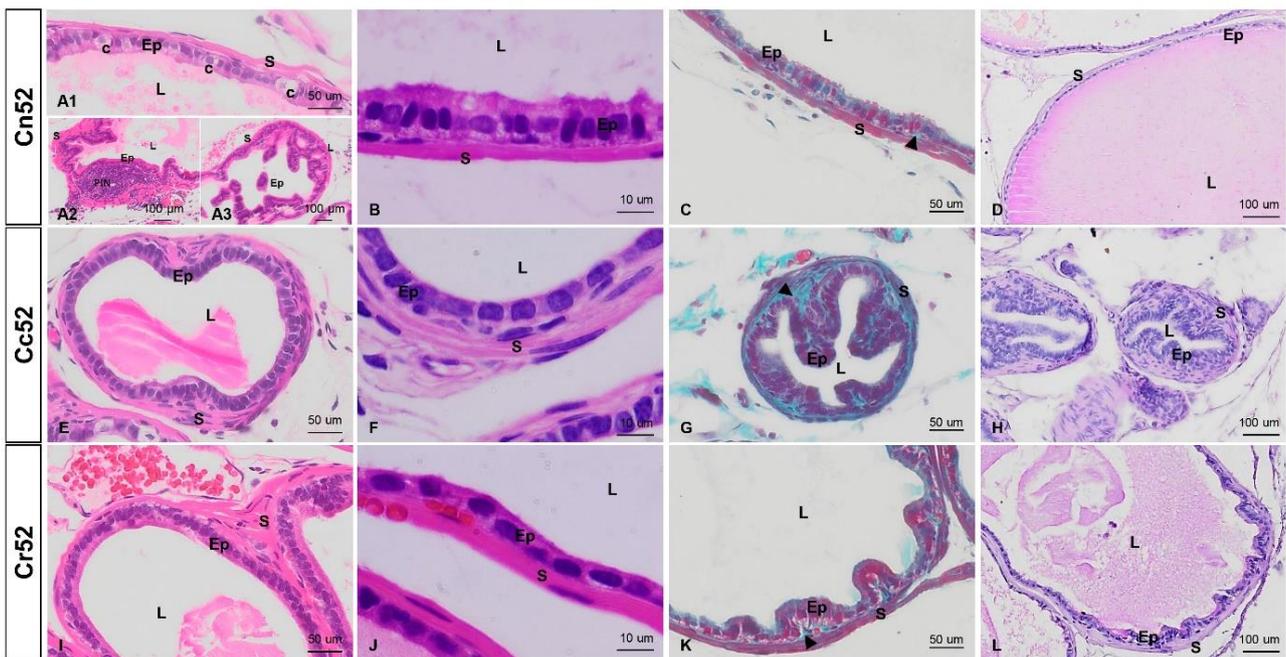
**Figura 1:** Diagrama do desenho experimental que esquematiza os diferentes experimentos realizados nesse estudo.



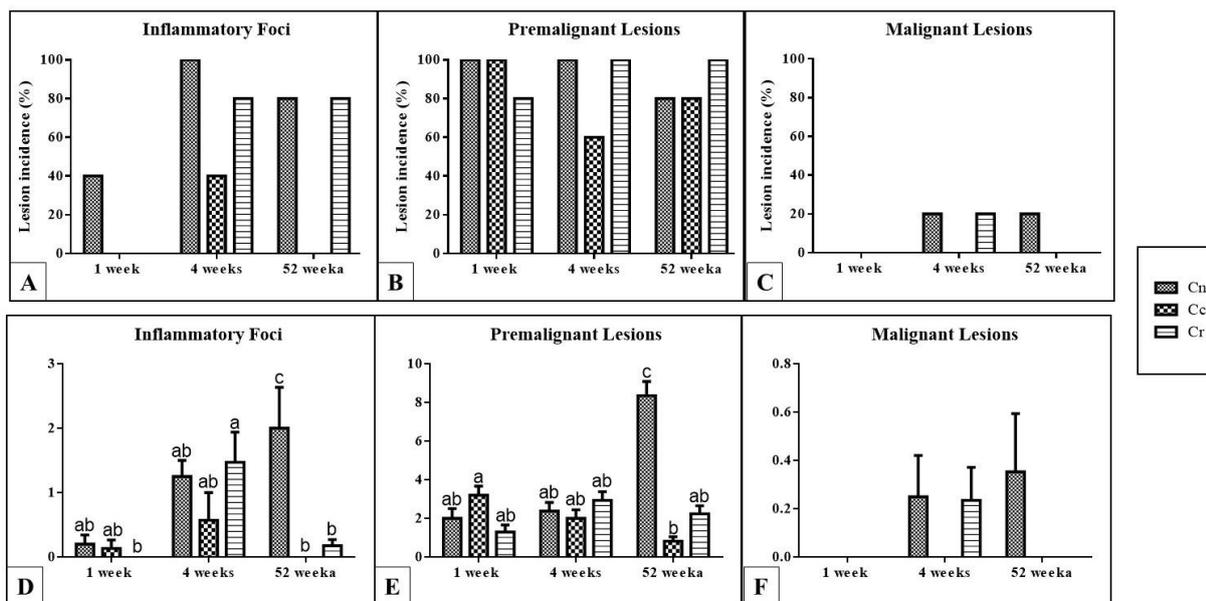
**Figura 2:** Cortes histológicos da próstata ventral de Gerbilos dos grupos tratados por 1 semana, corados por Hematoxilina & Eosina (A, B, E, F, I e J), Tricrômico de Gomori (C, G e K) e P.A.S. (D, H e L). Legenda: Cn1 – grupo controle normal; Cc1 – grupo castrado e eutanasiado 1 semana após o procedimento, Cr1 – grupo tratado com 50 mg/Kg de crisina por 1 semana; Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; v – vaso sanguíneo; cabeça de seta – região de acúmulo de colágeno; seta – telócitos; Dc - debris celulares.



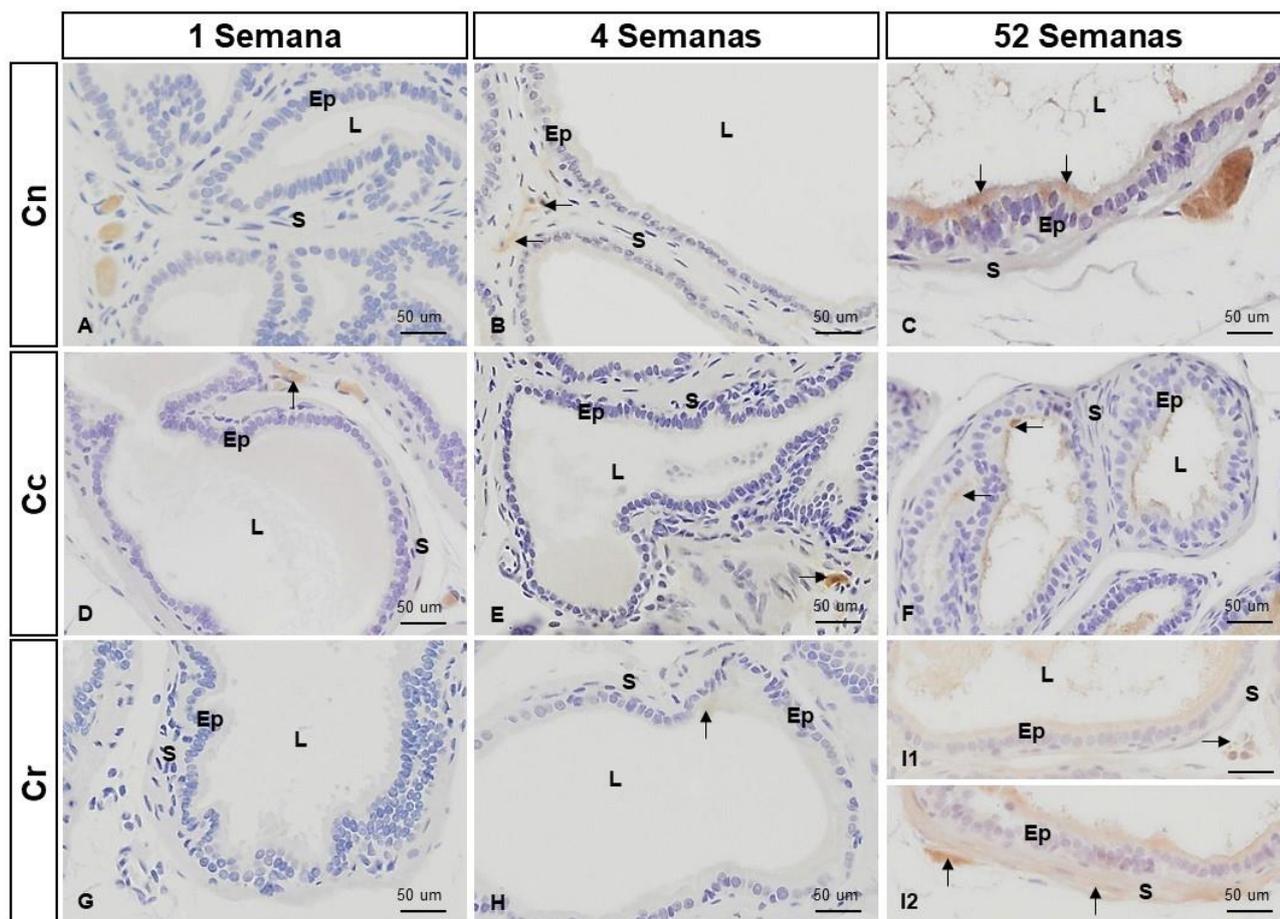
**Figura 3:** Cortes histológicas da próstata ventral de Gerbilos dos grupos tratados por 4 semanas, corados por Hematoxilina & Eosina (A, B, E, F, I e J), Tricrômico de Gomori (C, G e K) e P.A.S. (D, H e L). Legenda: Cn4 – grupo controle normal; Cc4 – grupo castrado e eutanasiado 4 semanas após a castração, Cr4 – grupo tratado com 50 mg/Kg/semana de crisina por 4 semanas; Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; v – vaso sanguíneo; cabeça de seta – região de acúmulo de colágeno; seta – telócitos; c – células claras; PIN – neoplasia intra-epitelial; \* - acúmulo de células inflamatórias.



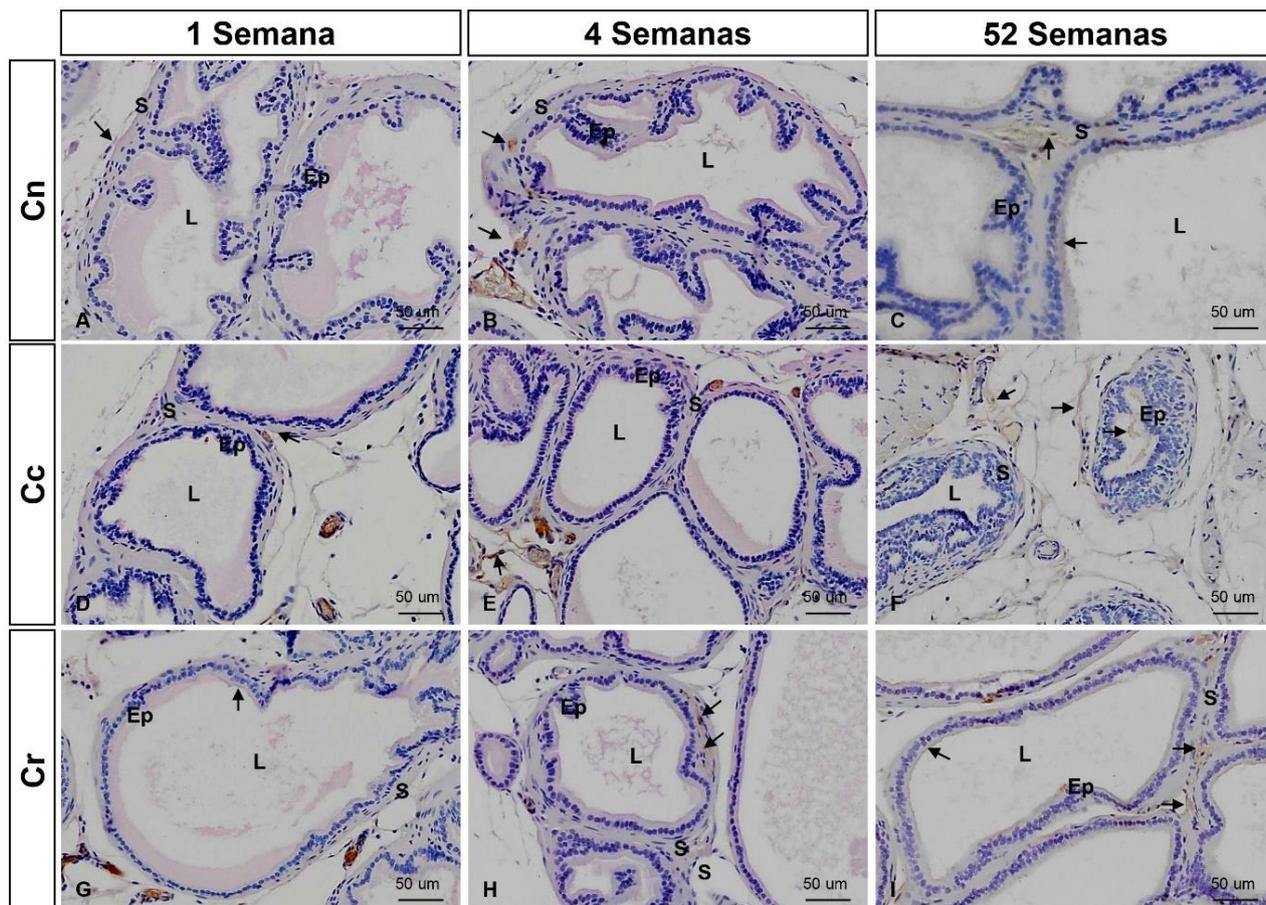
**Figura 4:** Cortes histológicas da próstata ventral de Gerbilos dos grupos tratados por 52 semanas, corados por Hematoxilina & Eosina (A, B, E, F, I e J), Tricrômico de Gomori (C, G e K) e P.A.S. (D, H e L). Legenda: Cn52 – grupo controle normal; Cc52 – grupo castrado e eutanasiado 52 semanas após a castração, Cr52 – grupo tratado com 50 mg/Kg/semana de crisina por 52 semanas; Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; c – células claras; PIN – neoplasia intra-epitelial; cabeça de seta – região de acúmulo de colágeno.



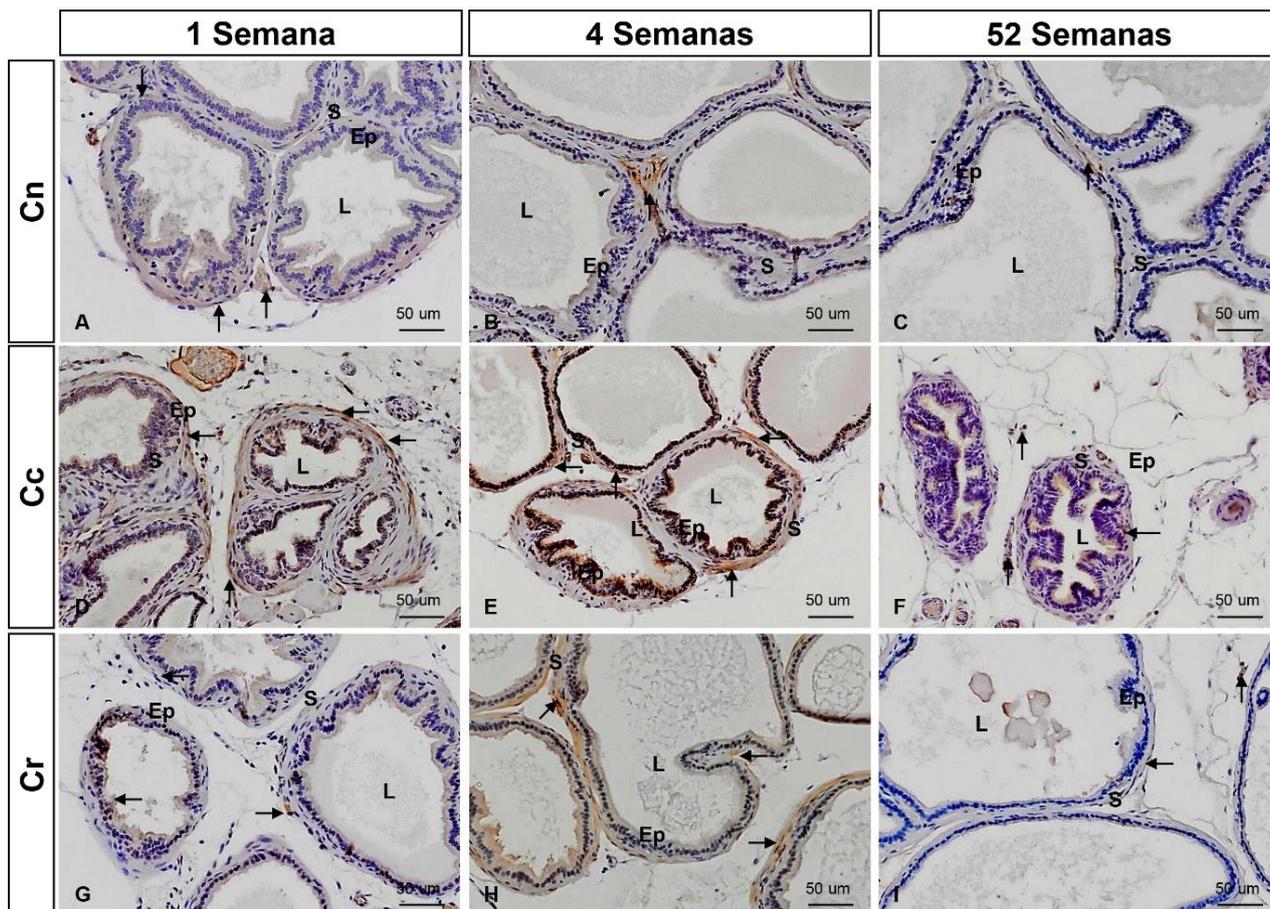
**Figura 5:** Análises de incidência (A, B e C) e multiplicidade (D, E e F) de inflamação e lesões prostáticas nos lóbulos prostáticos de gerbilos da Mongólia. Análises de incidência e multiplicidade foram realizadas em todos os animais ( $n = 5$  por subgrupo). Os dados sobre incidência indicam a porcentagem de animais afetados. Os dados sobre multiplicidade correspondem a variação no número de focos de lesão em cada grupo. As letras representam a variação significativa entre todos os grupos.



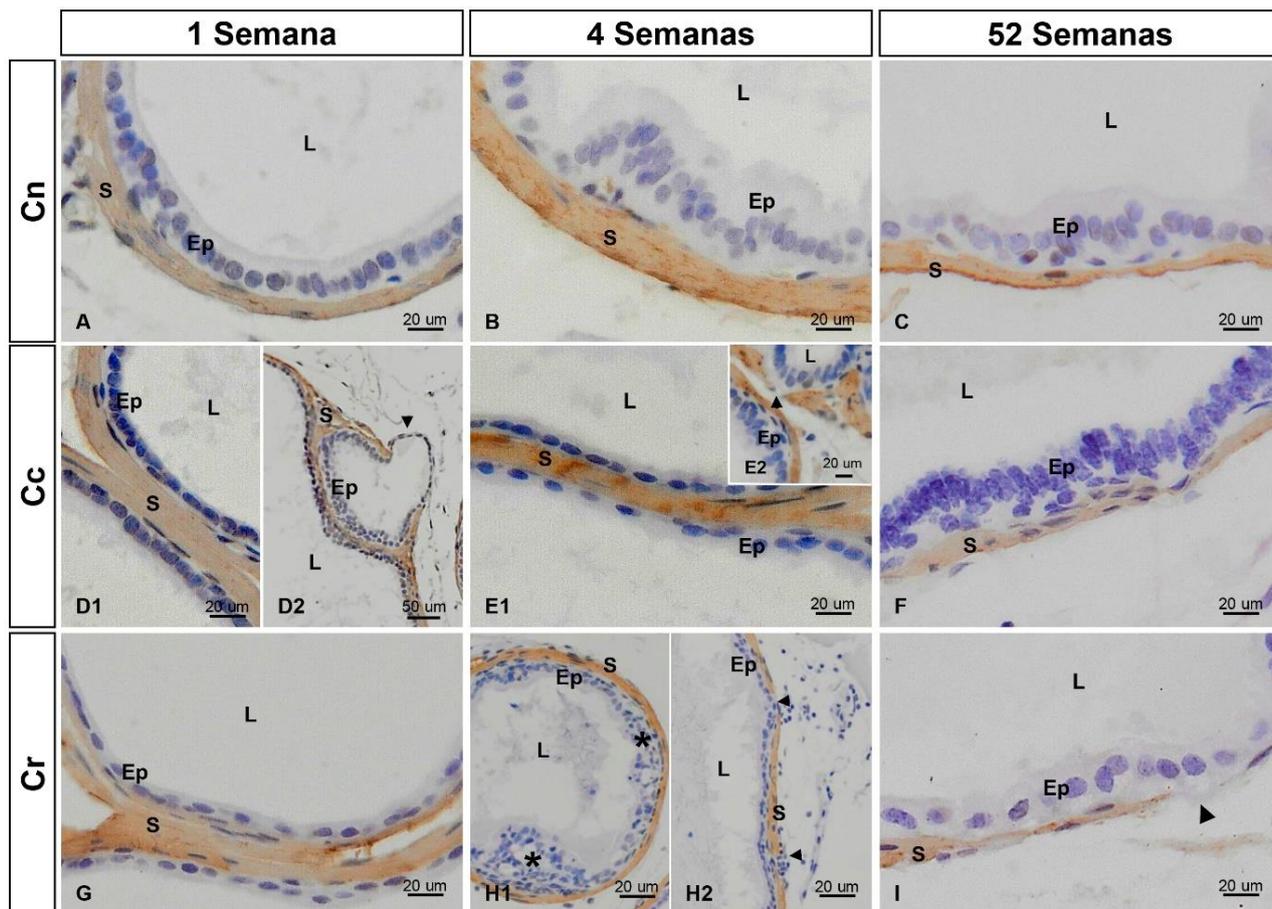
**Figura 6:** Cortes histológicos da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-TGF- $\beta$ . Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; seta - regiões de marcações.



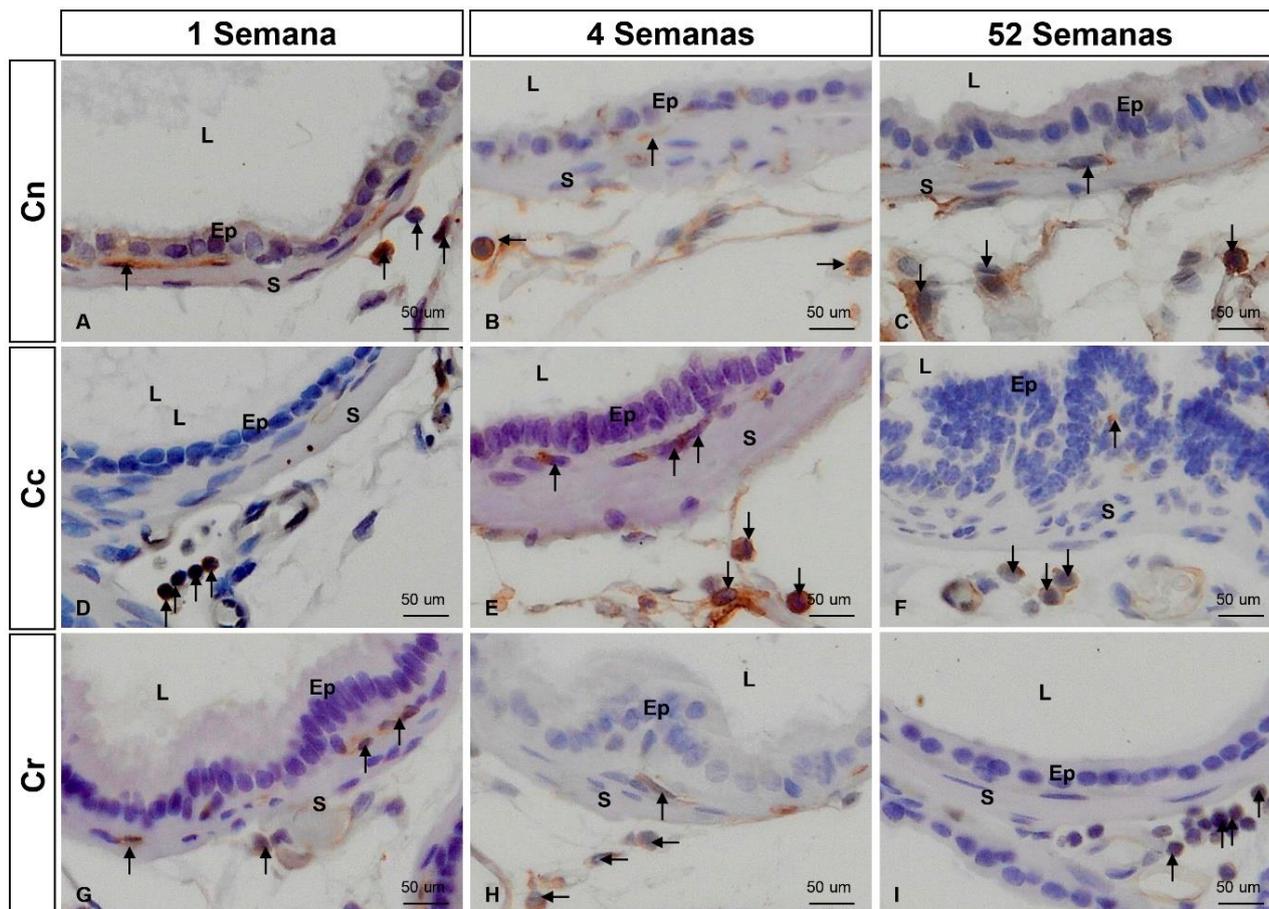
**Figura 7:** Cortes histológicos da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-MMP-2. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta - regiões marcadas.



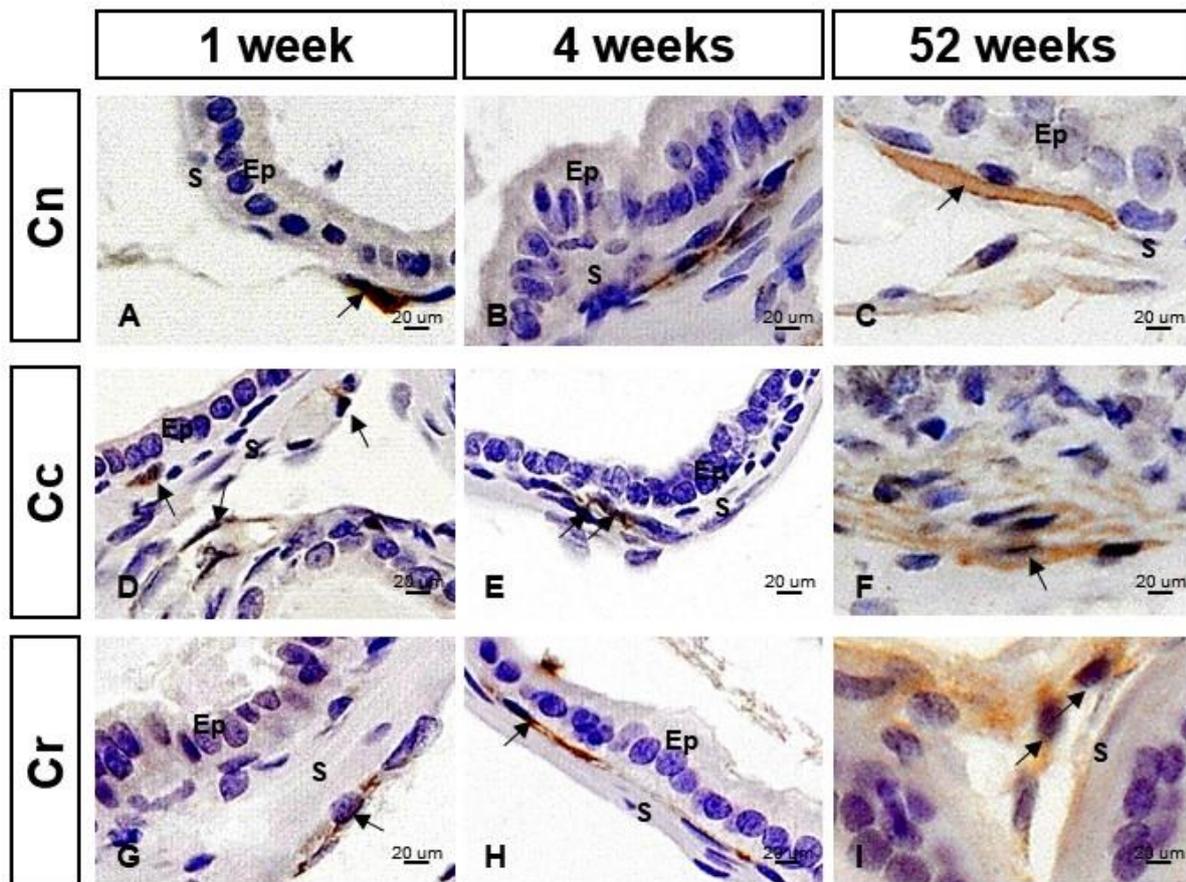
**Figura 8:** Cortes histológicas da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-MMP-9. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta - regiões marcadas.



**Figura 9:** Cortes histológicos da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para  $\alpha$ -actina de musculo liso. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Cabeça de seta – ruptura da camada muscular; \* - acúmulo de células inflamatórias.



**Figura 10:** Cortes histológicas da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-CD68. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta – células CD68- positivas.



**Figura 11:** Cortes histológicas da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-CD34. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta – células CD34- positivas.

### 3.2. MANUSCRITO II

#### **“Repercussões histopatológicas da finasterida no estabelecimento do estroma reativo durante o envelhecimento prostático em gerbilos da Mongólia”**

Julia Quilles Antoniassi<sup>a</sup>, Sarah Bertazzi Augusto<sup>b</sup>, Luiz Henrique Alves Guerra<sup>c</sup>, Simone Jacovaci Colleta<sup>c</sup>, Bruno Sanches<sup>a</sup>, Rejane Maira Góes<sup>c</sup>, Patrícia Simone Leite Vilamaior<sup>c</sup>, Ricardo Alexandre Fochi<sup>d</sup>, Sebastião Roberto Taboga<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo 13084-86, Brasil.

<sup>b</sup> Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP), Hospital do Câncer de Barretos, São Paulo 14784-400, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras, e Ciências Exatas (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), São Paulo 15054-000, Brasil.

<sup>d</sup> Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São Paulo 15025-400, Brasil.

\* Autor correspondente Endereço:

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras, e Ciências Exatas (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo St., 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brasil. Telefone: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390. E-mail: taboga@ibilce.unesp.br (SR Taboga)

## RESUMO

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor regulada por andrógenos e estrógenos. A enzima 5 $\alpha$ -redutase participa da regulação dos níveis prostáticos desses hormônios, sendo responsável pela conversão da testosterona em diidrotestosterona. A finasterida é capaz de desencadear uma reação estromal. A reação estromal envolve processos celulares, múltiplas proteínas e sinalizadores de matriz extracelular que proporcionam uma resposta do tecido conjuntivo a uma agressão epitelial, principalmente às alterações neoplásicas e inflamatórias. Embora sejam bem conhecidos os processos que levam à formação do estroma reativo, na próstata ainda restam muitas questões relacionadas a esse fenômeno. Assim o presente trabalho tem como objetivo principal identificar, quantificar e caracterizar, as células estromais bem como os principais elementos de matriz extracelular associados ao estroma reativo prostático. Gerbilos jovens (90 e 120 dias) e senis (1 ano e 3 meses), foram submetidos ao tratamento com finasterida (10 mg/kg/dia em 0,1 ml de óleo de milho) para inibição da enzima 5 $\alpha$ -redutase, por curto (1 semana de tratamento) e longo período (4 e 52 semanas de tratamento). O grupo controle foi formado com gerbilos machos tratados semanalmente com 0,1 ml de óleo de milho (veículo de diluição). Os dados foram comparados estatisticamente pela análise de variância (two-way-Anova) e, posteriormente, pelos pós-testes de Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ). Para avaliação das interações celulares e extracelulares foram empregadas análises morfológicas e imunoistoquímicas para marcadores específicos de células e de moléculas da matriz extracelular. A finasterida possui propriedades pró-inflamatórias bem evidentes e aumenta a incidência de lesões pré-malignas e malignas. O presente estudo mostrou que a inibição dessa enzima é capaz de alterar o equilíbrio hormonal intraprostático e a interação entre epitélio e estroma nos animais jovens, criando um microambiente favorável à inflamação e permissivo ao desenvolvimento de lesões prostáticas, um estroma reativo. Esse estroma está caracterizado pelo aumento de TGF- $\beta$ , metaloproteinases (2 e 9), inflamação, miofibroblastos e acúmulo de telócitos. Nos animais senis é comum o aparecimento de lesões prostáticas, porém o tratamento com finasterida intensificou as alterações estromais e mais lesões prostáticas foram observadas.

Palavras-chave: próstata ventral, gerbilo, finasterida, senescência, estroma reativo.

## 1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino com uma alta incidência de doenças, por isso analisar a morfologia e a fisiologia dessa glândula se torna importante. O desenvolvimento e manutenção dessa glândula é regulada por hormônios andrógenos e estrógenos, assim como o aparecimento de desordens prostáticas na senescência (Montico *et al.*, 2011; Pegorin De Campos *et al.*, 2006; Scarano *et al.*, 2006; Taboga *et al.*, 2009).

A senescência é um período cujo ambiente hormonal está desequilibrado, refletindo em alterações morfológicas e funcionais na próstata, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas, como neoplasias intra-epiteliais e adercarcinomas (Banerjee *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2008).

Vários compostos podem agir como desreguladores endócrinos e alterar a homeostasia prostática, como é o caso de inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo de hormônios sexuais, como a crisina, que inibe a aromatase, enzima que converte testosterona em estradiol, e a finasterida, que inibe a ação da 5 $\alpha$ -redutase, enzima que converte testosterona em di-hidrotestosterona (DHT), uma forma mais ativa de testosterona (Campos *et al.*, 2019; Maldarine *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2018).

A utilização de finasterida é comum para o tratamento de alopecia e acne. Por ter essas propriedades inibitórias sobre a 5 $\alpha$ -redutase, a finasterida também pode ser utilizada como tratamento para hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata (Andriole *et al.*, 2005; Shapiro and Kaufman, 2003; Shibata *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003). No entanto, esse composto altera o microambiente estromal prostático, por isso sua utilização ainda é amplamente debatida, podendo ter efeitos variáveis para o tipo de câncer e a fase de utilização (Corradi *et al.*, 2004; Delella *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2001).

Corradi e colaboradores (Corradi *et al.*, 2009a) mostraram que a finasterida altera o microambiente estromal, sendo observado o acúmulo de colágeno na camada subepitelial e entre as células musculares lisas. Essas células apresentaram diâmetro reduzido, citoplasma condensado e contorno externo irregular, além disso, alguns fibroblastos adquiriram um fenótipo ativado.

Por um longo período os estudos sobre a próstata focaram em analisar o compartimento epitelial e em como suas alterações levam ao desenvolvimento de lesões

prostáticas. Porém, atualmente sabe-se que o compartimento estromal é um microambiente dinâmico que influencia diretamente no comportamento das células epiteliais e auxilia o reparo tecidual após lesão (da Silva Júnior *et al.*, 2015). Cada vez mais tem-se a importância de se estudar a relação do surgimento de alterações estromais e a progressão do câncer. Na neoplasia intra-epitelial surgem alterações no estroma periacinar que incluem alterações fenotípicas das células estromais, remodelação da matriz extracelular e aumento da angiogênese (Ayala *et al.*, 2003; da Silva Júnior *et al.*, 2015; Tuxhorn *et al.*, 2001). Esse novo microambiente estromal é chamado de estroma reativo e está associado ao crescimento tumoral. É caracterizado por um aumento da inflamação, aumento da angiogênese e fatores de crescimento, com remodelação de matriz extracelular (da Silva Júnior *et al.*, 2015; Rowley, 1998).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental**

Trinta Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) machos de 90 dias de idade foram utilizados nesse experimento. Eles foram obtidos do Biotério do Grupo de Pesquisa em Biologia da Reprodução do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP). Os gerbilos foram alojados em gaiolas de polietileno mantidas em 25°C e 40-70% de umidade relativa em um período de 12 horas de ciclo claro-escuro; água e comida foram fornecidas *Ad Libitum*. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA / UNESP, protocolo 130/2016). Os animais foram divididos arbitrariamente em seis grupos experimentais (n=5):

1. Controle veículo (Cv): animais íntegros receberam semanalmente por todo o tempo do experimento doses do veículo de diluição, óleo de milho.

2. Finasterida (F): animais receberam semanalmente, por gavagem, doses de 10mg/Kg/semana de finasterida, em 0,1ml de óleo de milho (CORRADI *et al.*, 2009a, b; 2013).

Cada grupo experimental foi dividido em três subgrupos, um contendo animais eutanasiados com 1 semana de tratamento, outro contendo animais eutanasiados com 4 semanas de tratamento e outro contendo animais eutanasiados com 52 semanas de tratamento.

No final de cada tratamento, os gerbilos foram pesados e mortos por decapitação após inalação de CO<sub>2</sub>. Os complexos prostáticos e o lobo ventral das próstatas foram pesados e fixados em paraformol tamponado a 4% (pH 7,2-0,1 M) por 12 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de banhos de etanol, clarificados em xilol e incorporado em parafina (Histosec; Merck, Darm-Stadt, Alemanha). Cortes de 4 µm foram coletados em um micrótomo e fixado em lâminas de vidro silanizadas.

## **2.2 Dosagem Hormonal Sérica**

As amostras de sangue foram coletadas imediatamente após a decapitação, centrifugadas (3.000 rpm por 20 min) e as amostras séricas foram congeladas a -80°C para análises subsequentes de níveis de testosterona e estradiol. As análises foram realizadas por ELISA, usando kits comerciais específicos (Kit EIA de testosterona, número de registro 582701, Cayman Chemical Company, MI) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. Leituras foram tomadas usando um leitor Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, CA).

## **2.3 Citoquímicas**

Secções de tecido foram coradas por hematoxilina-eosina (H&E), Tricrômico de Gomori e Periodic Acid Schif (P.A.S.), para análises gerais. As análises foram realizadas usando um microscópio luz BX-60 (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a um sistema de aquisição de imagem (Image ProPlus; ©Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD).

## **2.4 Análises Estereológicas e Morfométricas**

Análise estereológica dos cortes histológicos corados com Tricrômico de Gomori foi realizada para determinar a frequência (%) dos constituintes prostáticos (epitélio, lúmen, estroma muscular, colágeno e vasos sanguíneos). Para esse fim, foram utilizados seis cortes equidistantes ao longo do bloco. Um campo de cada corte foi capturado em 200x de ampliação, totalizando 30 campos por grupo (n=5),

A frequência (%) foi estimada usando o sistema de teste multiponto M130 (Weibel, 1963) aplicado à próstata por Vilamaior e colaboradores (2006).

Para análises morfométricas, cinco cortes equidistantes ao longo do bloco corados em H&E foram utilizados e capturados à ampliação de 1000x (n=5) através de um

analisador de imagens com o sistema Image-Pro Plus 6.0 (Image ProPlus;©Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD), foram realizadas medidas da altura das células epiteliais ( $\mu\text{m}$ ) e espessura da camada de estroma muscular liso (LME).

## 2.5 Análises Imunoistoquímicas

Para avaliar os efeitos do tratamento na próstata de machos de Gerbilos foram verificadas as possíveis alterações nos componentes celulares e extracelulares do estroma reativo prostático. Para tal análises utilizaram-se os seguintes marcadores para identificação por imunoistoquímica em microscopia de luz.

- $\alpha$ -Actina de músculo liso: (SC32251/Santa Cruz Biothecnology) - marcador de célula muscular lisa;
- TGF- $\beta$  – anti-TGF- $\beta$  (SC146/Santa Cruz Biothecnology) – marcador de estroma reativo, diluição 1:50;
- MMP-2 – anti-MMP-2 (SC6838/Santa Cruz Biothecnology) – marcador de MMP-2, diluição 1:25;
- MMP-9 – anti-MMP-9 (SC6840/Santa Cruz Biothecnology) – marcador de MMP-9, diluição 1:50;
- CD68 – anti-CD68 (SC20060/ Santa Cruz Biotechnology) - marcador de macrófagos, diluição 1:50;
- CD34: anti-CD34, (SC74499/ Santa Cruz Biotechnology – marcador de telócitos, diluição 1:50;
- FAP: anti FAP (F11-24), Santa Cruz Biotechnology – marcador de fibroblastos ativados, diluição 1:50.

Procedimentos gerais para imunoistoquímica: os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) ou tampão tris-EDTA (pH 9,0) fervendo três vezes durante 7 min em micro-ondas. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi realizado com 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluída em água por 2 vezes de 15 minutos e depois os cortes foram lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos. Os anticorpos primários foram utilizados em diluições variadas a 4°C overnight. Após serem lavados em TBS\_NP40 por 3 vezes de 5 minutos, e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase (RabbitABC Staining System SC-2018 – Santa Cruz Biotechnology), os cortes foram revelados com a

diaminobendizina (DAB). A contra coloração dos cortes foi feita com Hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em etanol, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional.

## **2.6 Multiplicidade e incidência de lesões**

Para obter esses índices, cinco cortes de próstatas ventrais coradas com H&E por animal (n=5) foram examinados em ordem para quantificar o número de focos inflamatórios, lesões pré-malignas e lesões malignas. Essas análises foram realizadas com o auxílio de um microscópio BX-60 light escopo (Zeiss, Jena, Alemanha). A análise das lesões foram de acordo com o descrito por Shappell *et al.* (2004) e Gonçalves *et al.* (2010), sendo que foram considerados distúrbios inflamatórios como intraluminal e células inflamatórias periductais, lesões pré-malignas (regiões de neoplasia intra-epitelial - PIN) e lesões malignas (regiões de carcinoma microinvasivo e adenocarcinoma). A incidência corresponde à porcentagem de animais que apresentam essas alterações prostáticas no total do grupo analisado. A multiplicidade foi estimada pelo número total de focos de alterações prostáticas observadas em cada corte histológico dividido pelo número total de secções analisadas (o valor expresso é uma média de lesões por seção).

## **2.7 Análises Estatísticas**

Os dados utilizados para a análise são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou média  $\pm$  erro padrão. Como os ensaios de normalidade (teste de Kolmogorow-Smirnoff) e de homocedasticidade (teste de Levene) dos dados pareciam ser válidos, os dados foram analisados inicialmente por análise bidirecional (ANOVA), para examinar os efeitos do tratamento e do período. Como os dois fatores e a interação dessas comparações múltiplas pós-hoc foi realizada com o teste de Bonferroni, os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as avaliações estatísticas foram realizadas usando o software Statistica 7.0 (Copyright®Statsoft, Inc. de 1984 a 2004).

### 3. RESULTADOS

O tratamento com a finasterida desencadeou alterações hormonais mostrando uma eficiente inibição da enzima 5 $\alpha$ - redutase. Os níveis hormonais de testosterona reduziram no grupo tratado por uma semana (F1), em relação ao controle (Cv1), enquanto o estradiol aumentou (tabela I). Nos animais tratados por 4 semanas foi observado um aumento nos níveis de testosterona e estradiol (tabela I). No grupo tratado por 52 semanas ocorreu um aumento da testosterona e uma redução do nível de estradiol (tabela I), em relação ao grupo Cv52.

No grupo F1 foi observada uma redução do volume de fibras colágenas em relação ao controle, acompanhada por uma atrofia das células epiteliais (tabela I; fig. 1 E1, E2, F, G1 e G2). Apesar de não significativo um maior número de vasos foi observado (tabela I; fig. 1 E1, E2, F, G1 e G2). A secreção diminuiu nos animais desse grupo, debris celulares foram observados no interior do lúmen (fig. 1H). A incidência de focos inflamatórios, lesões pré-malignas e malignas nos animais de F1 foi maior do que a observada em Cv1, além disso a multiplicidade de inflamação e lesões malignas também aumentou (fig. 2). Foi observado um aumento da imunomarcagem de TGF- $\beta$ , FAP, MMP-9, células CD68+ e células CD34+ (fig. 3 B, C, E e F; fig. 4 B, C, E e F; fig. 5 E, F, G e H).

Nos animais do grupo F4 foi observado um aumento do volume do compartimento epitelial (tabela i; fig. 1 M1 e M2). A secreção diminuiu nos animais desse grupo, observaram-se células com acúmulo de secreção no citoplasma (fig. 1 P1 e P2). Foram observados, aumento de células claras no epitélio, debris celulares no interior do lúmen (fig. 1 M1, M2, N1, N2, O1, O2, P1 e P2). A incidência de focos inflamatórios foi menor em F4 do que o observado em Cn4 e F1, porém a incidência de lesões pré-malignas foi maior em F4 em comparação a Cn4 (fig. 2). Além disso, a multiplicidade de inflamação e lesões pré-malignas também reduziu (fig. 2). A imunomarcagem para TGF- $\beta$ , FAP e MMP-9, aumentou intensamente nos animais do grupo F4 (fig. 3 K e L). Foi observado um aumento da marcação de células CD68+ e CD34+ (fig. 4L; fig. 5 M, N, O e P).

Nos grupos tratados por 4 e 52 semanas foram observadas regiões de ruptura da camada de músculo liso (fig. 3 J1, J2, J3 e P). Nesses dois períodos de tratamento,

também foi frequente a observação de células claras (fig. 1 M1, M2, N1, N2, O1, O2, P1, U1, U2, U3, V, W e X).

O tratamento por 52 semanas alterou intensamente o microambiente prostático, deixando o órgão suscetível ao surgimento de lesões, como PINs e adenocarcinoma (fig. 1 U2 e U3). Foi observado uma redução do peso corporal e do lobo ventral prostático nos animais desse grupo experimental (F52) (tabela I). O volume do compartimento epitelial e muscular reduziram, o volume do lúmen aumentou (tabela I; fig. 1 U1, U2, U3, V e W). A quantidade de colágeno observada nos ácinos desses animais foi menor, porém o colágeno se acumulou entre as CML e na camada subepitelial (tabela I; fig. 1W). Além disso, o compartimento epitelial se tornou hipertrofiado (tabela I; fig. 1V). Ocorreu uma intensa redução da secreção prostática no grupo F52 (fig. 1X). A incidência e a multiplicidade de focos inflamatórios aumentaram consideravelmente em F52. Também foi observado aumento na multiplicidade de lesões pré-malignas e malignas (fig. 2). A imunomarcação para TGF- $\beta$  e MMP-9 aumentou com o desenvolvimento da idade nos animais controle, sendo que a utilização de finasterida ao longo do envelhecimento intensificou ainda mais essas marcações (fig. 3 N e Q; fig. 4 M e Q). Nesse grupo (F52) também foi observado um aumento da imunomarcação de FAP, MMP-2, células CD68+ e células CD34+ (fig. 3R; fig. 4 P e R; fig. 5 U, V, W e X).

O tratamento com finasterida aumentou a marcação de células CD34+, as quais apresentam diversos prolongamentos celulares. Elas foram observadas, principalmente, na região subepitelial, porém elas também foram observadas na região distal do estroma muscular e associadas em regiões de lesões prostáticas (fig. 5).

#### **4. DISCUSSÃO**

A finasterida é um potente inibidor da enzima 5 $\alpha$ -redutase, responsável pela produção intra-prostática de DHT a partir da testosterona. Esse composto também é comumente utilizado no tratamento da HPB, alopecia e acne.

O presente trabalho mostra que a finasterida realizou uma eficiente inibição da enzima 5 $\alpha$ -redutase, evidenciado pelo acúmulo de testosterona sérica nos animais tratados por 4 e 52 semanas. Nos animais tratados por 4 semanas essa redução foi acompanhada por aumento dos níveis séricos de estradiol. Estudos mostram que o

tratamento com a finasterida inicialmente provoca um acúmulo de testosterona, esse hormônio fica disponível para reagir com a enzima aromatase e produzir estradiol, por isso a longo prazo observa-se uma redução de andrógenos e um aumento de estrógenos (Corradi *et al.*, 2004; Custódio *et al.*, 2004). Os efeitos observados pela finasterida podem ser pela ação direta desse composto na próstata ou pelo acúmulo de estradiol.

A finasterida leva a modificações na arquitetura, ultraestrutura e a uma remodelação estromal (Corradi *et al.*, 2004). O presente trabalho mostrou que a utilização desse composto por curto e longo período é capaz de alterar a homeostasia prostática, criando um microambiente favorável à inflamação e permissivo ao desenvolvimento de lesões prostáticas.

Alterações na homeostasia prostática podem desencadear uma remodelação dos compartimentos epiteliais e estromais, criando um microambiente distinto do estroma encontrado em tecidos saudáveis, essa remodelação é chamada de reação estromal ou estroma reativo (Kalluri and Zeisberg, 2006; Tomas and Krušlin, 2004; Tuxhorn *et al.*, 2001). O estroma reativo possui maior plasticidade, é caracterizado por apresentar abundante vascularização, alterações estruturais das células musculares, miofibroblastos, influxo de células inflamatórias e uma matriz extracelular diferenciada com aumento da disponibilidade de fatores de crescimento e proteases (Kalluri and Zeisberg, 2006; Tomas and Krušlin, 2004; Tuxhorn *et al.*, 2001).

Estudos anteriores mostraram que a utilização da finasterida é capaz de desencadear a formação de estroma reativo com proliferação de fibroblastos, células musculares lisas com contorno irregular, maior vascularização, aumento de  $\alpha$ SMA, VIM e TGF- $\beta$  (Corradi *et al.*, 2013, 2009b, 2009a, 2004; Montico *et al.*, 2015). O presente trabalho mostrou que a finasterida alterou o microambiente prostático mesmo em um curto período de tratamento, levando a alterações morfológicas e moleculares no estroma prostático, constituindo um estroma reativo.

O tratamento com a finasterida também levou ao aumento de células marcadas com a proteína de ativação dos fibroblastos (FAP). Essas células estromais possuem um fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, são chamadas de miofibroblastos e estão associadas ao carcinoma, presentes no estroma reativo. Elas expressam, além de FAP,  $\alpha$ SMA, vimentina e tenascina-C (Barron and Rowley, 2012; Montico *et al.*, 2015; Tuxhorn *et al.*, 2002). Esses miofibroblastos alteram a arquitetura tecidual, produzindo uma grande quantidade de fatores de crescimento que promovem a progressão do tumor (Tuxhorn *et al.*, 2002; Webber *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014), com a

remodelação da MEC, o aumento de células inflamatórias e a indução de angiogênese (Tuxhorn *et al.*, 2001). A secreção de SDF-1 e TGF- $\beta$  pelas células tumorais está envolvida no recrutamento e ativação dessas células estromais (Montico *et al.*, 2015; Webber *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Portanto, a secreção de TGF- $\beta$  é colocada como um importante fator para o desenvolvimento e progressão do estroma reativo.

O surgimento do estroma reativo pode ser um evento anterior ao desenvolvimento do câncer de próstata, pois ele também é observado em animais com lesões pré-malignas que expressa altos níveis de TGF- $\beta$  (Montico *et al.*, 2015; Tuxhorn *et al.*, 2002). O TGF- $\beta$  é tido como um importante indutor de estroma reativo, as células epiteliais iniciam a produção aumentada de TGF- $\beta$  que desencadeia a ativação de fibroblastos e a remodelação estromal (Montico *et al.*, 2015). Na hiperplasia prostática benigna, o TGF- $\beta$  é responsável por mobilizar células-tronco mesenquimais no sangue circulante para o estroma prostático (Wang *et al.*, 2017). Além disso, sabe-se que a sinalização do TGF- $\beta$  feita pelos fibroblastos estromais desempenha um importante papel na mediação da resposta prostática à ablação androgênica (Placencia *et al.*, 2008). O tratamento com finasterida levou ao aumento de TGF- $\beta$  em todos os períodos analisados, mostrando o potencial indutor de reação desse composto. O aumento desse fator pode ter desencadeado a diferenciação de miofibroblastos imunomarcados por FAP.

Outra alteração encontrada no tratamento com a finasterida foi em relação às marcações para metaloproteinases. Sabe-se que os níveis de metaloproteinases estão relacionados com os níveis de andrógenos na próstata, estando aumentadas com ablação androgênica (Justulin *et al.*, 2010). Vários estudos demonstram a importância dessas enzimas na remodelação estromal (Bruni-Cardoso *et al.*, 2010a, 2010b; Justulin *et al.*, 2010; Wilson, 1995) e no desenvolvimento de patologias prostáticas (Incorvaia *et al.*, 2007). As metaloproteinases 2 e 9 têm sido intensamente estudadas na próstata pois elas participam da degradação de componentes da MEC (Bruni-Cardoso *et al.*, 2010a; Justulin *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2004). O aumento de MMP-2 tem sido colocado como um fator determinante para o desenvolvimento de lesões prostáticas. Nossos estudos mostraram um aumento relevante dessa metaloproteinase apenas nos grupos tratados com finasterida por 52 semanas, porém foi observado um aumento de MMP-9 nos animais controle senis (Cv52) e em todos os grupos tratados com finasterida, ou seja, nos grupos com maior incidência de inflamação e lesões prostáticas. Sendo assim essa proteinase pode estar agindo na degradação de

componentes da MEC e direcionando o desenvolvimento e progressão dessas lesões. Além disso, foi observado um aumento no número de macrófagos estromais após o tratamento com finasterida em todos os períodos, essas células expressam MMP-9, contribuindo para a remodelação estromal (Silva *et al.*, 2017).

Um novo tipo celular tem sido analisado em diversos órgãos, os telócitos. Essas são células intersticiais, possuem citoplasma reduzido e amplos prolongamentos (Corradi *et al.*, 2013; Sanches *et al.*, 2016). Essas células são CD34 positivas, CD34/c-Kit positivas, ER $\beta$  positivas e produzem TGF- $\beta$ , sendo sensíveis a variações de estrógenos (Felisbino *et al.*, 2019; Sanches *et al.*, 2016). Durante o desenvolvimento, sabe-se que na próstata os telócitos desempenham um papel apoiando diferenciação de células musculares lisas e contribuição para a organização dos tecidos prostáticos, formando redes densas entre os ácinos (Sanches *et al.*, 2017). Na próstata de adultos os telócitos, provavelmente, possuem a função de dar suporte na contração do músculo liso periductal, participam da compartimentalização estromal (Corradi *et al.*, 2013) e da regulação da proliferação celular (Sanches *et al.*, 2017). O presente trabalho mostrou que essas células estão aumentadas quando o microambiente estromal está alterado, seja pela senescência ou pelo tratamento com a finasterida, indicando que essas células podem estar envolvidas no reparo prostático ou no desenvolvimento do estroma reativo.

Montico e colaboradores (2015) observaram um aumento de células duplo positivas para CD34+/ $\alpha$ SMA e CD34/VIM no estroma prostático de ratos com câncer de próstata e ratos idosos, mostrando a relação dessas células como precursoras do estroma reativo, além disso, elas são derivadas de células vasculares ou da medula óssea e podem ser progenitoras de miofibroblastos.

Sabe-se que esse tipo celular pode ativar e regular macrófagos pela secreção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10, sendo assim, essas células podem estar regulando o aumento de macrófagos CD68+ (Wang and Cretoiu, n.d.). Além disso, os telócitos são PDGFR e VEGF positivos, fatores que estão relacionados com a remodelação celular e angiogênese, características que foram observadas no estroma reativo analisado (Wang and Cretoiu, n.d., chaps. 2, Xiao).

## 5. CONCLUSÕES

A finasterida possui propriedades pró-inflamatórias bem evidentes em tratamento de curto e longo prazo, além disso, ela aumenta a incidência de lesões pré-malignas e malignas. Essas displasias prostáticas, provavelmente, surgem em decorrência do desequilíbrio hormonal intraprostático e de alterações na interação entre epitélio e estroma nos animais tratados com finasterida. Foi observada uma reação estromal desencadeada pela finasterida com aumento de TGF- $\beta$ , metaloproteinases (2 e 9), inflamação, miofibroblastos e acúmulo de telócitos em todos os períodos de tratamento. Sendo assim, foi criado um microambiente favorável à inflamação e permissivo ao desenvolvimento de lesões prostáticas. Esse estroma reativo pode ser um evento anterior ao desenvolvimento do câncer de próstata, visto que também está associado a regiões de inflamação e lesões pré-malignas. Nos animais senis é comum o aparecimento de lesões prostáticas, porém o tratamento com finasterida intensificou as alterações estromais e mais lesões prostáticas foram observadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andriole, G., Bostwick, D., Civantos, F., Epstein, J., Lucia, M.S., McConnell, J., Roehrborn, C.G., 2005. The effects of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on the natural history, detection and grading of prostate cancer: Current state of knowledge. *J. Urol.* 174, 2098–2104. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000181216.71605.38>
- Ayala, G., Tuxhorn, J.A., Wheeler, T.M., Frolov, A., Scardino, P.T., Ohori, M., Wheeler, M., Spitle, J., Rowley, D.R., 2003. Reactive Stroma as a Predictor of Biochemical-Free Recurrence in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 4792–4801.
- Banerjee, P.P., Banerjee, S., Brown, T.R., 2001. Increased Androgen Receptor Expression Correlates with Development of Age-Dependent, Lobe-Specific Spontaneous Hyperplasia of the Brown Norway Rat Prostate. *Endocrinology* 142, 4066–4075.
- Barron, D.A., Rowley, D.R., 2012. The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. *Endocr Relat Cancer.* 19, 187–204. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Bruni-Cardoso, A., Augusto, T.M., Pravatta, H., Damas-Souza, D.M., Carvalho, H.F., 2010a. Stromal remodelling is required for progressive involution of the rat ventral prostate after castration: Identification of a matrix metalloproteinase-dependent apoptotic wave. *Int. J. Androl.* 33, 686–695. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01004.x>
- Bruni-Cardoso, A., Rosa-Ribeiro, R., Pascoal, V.D.B., De Thomaz, A.A., Cesar, C.L.,

- Carvalho, H.F., 2010b. MMP-2 regulates rat ventral prostate development in vitro. *Dev. Dyn.* 239, 737–746. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22222>
- Campos, M.S., Silva, J.P.A., Lima, D.S., Regasini, L.O., Marques, M.R., Biancardi, M.F., Taboga, S.R., Santos, F.C.A., 2019. Short-term exposure to chrysin promotes proliferative responses in the ventral male prostate and female prostate of adult gerbils. *Int. J. Exp. Pathol.* 100, 192–201. <https://doi.org/10.1111/iep.12317>
- Campos, S.G.P., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2008. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *Int. J. Exp. Pathol.* 89, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00550.x>
- Corradi, L.S., Campos, S.G.P., Santos, F.C.A., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2009a. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 79–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00618.x>
- Corradi, L.S., Góes, R.M., Carvalho, H.F., Taboga, S.R., 2004. Inhibition of 5- $\alpha$ -reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72, 198–208. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07205004.x>
- Corradi, L.S., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2009b. Increased androgen receptor and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc. Res. Tech.* 72, 939–950. <https://doi.org/10.1002/jemt.20740>
- Corradi, L.S., Jesus, M.M., Fochi, R.A., Vilamaior, P.S.L., Justulin, L.A., Góes, R.M., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., 2013. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 398–406. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12021>
- Custódio, A.M.G., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2004. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: Comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol. Int.* 28, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.12.008>
- da Silva Júnior, M.M., Matheus, W.E., Garcia, P.V., Stopiglia, R.M., Billis, A., Ferreira, U., Fávoro, W.J., 2015. Characterization of reactive stroma in prostate cancer: Involvement of growth factors, metalloproteinase matrix, sexual hormones receptors and prostatic stem cells. *Int. Braz J Urol* 41, 849–858. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0355>
- Delella, F.K., Justulin, L.A., Felisbino, S.L., 2010. Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. *Int. J. Androl.* 33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00970.x>
- Felisbino, S.L., Sanches, B.D.A., Delella, F.K., Scarano, W.R., Dos Santos, F.C.A., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Justulin, L.A., 2019. “Prostate telocytes change their phenotype in response to castration or testosterone replacement.” *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40465-1>
- Incorvaia, L., Badalamenti, G., Rini, G., Arcara, C., Fricano, S., Sferrazza, C., Di Trapani, D., Gebbia, N., Leto, G., 2007. MMP-2, MMP-9 and activin a blood

- levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. *Anticancer Res.* 27, 1519–1525.
- Justulin, L.A., Della-Coleta, H.H.M., Taboga, S.R., Felisbino, S.L., 2010. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int. J. Androl.* 33, 696–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01016.x>
- Kalluri, R., Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Maldarine, J.S., Sanches, B.D.A., Santos, V.A., Amaro, G.M., Calmon, M.F., Rahal, P., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2019. Low-dose in utero exposure to finasteride promotes developmental changes in both male and female gerbil prostates. *Environ. Toxicol.* 1–12. <https://doi.org/10.1002/tox.22838>
- Montico, F., Hetzl, A.C., Cândido, E.M., Fávaro, W.J., Cagnon, V.H.A., 2011. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron* 42, 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.03.004>
- Montico, F., Kido, L.A., San Martin, R., Rowley, D.R., Cagnon, V.H.A., 2015. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *Prostate* 75, 1643–1661. <https://doi.org/10.1002/pros.23045>
- Pegorin De Campos, S.G., Zanetoni, C., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2006. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 723–733. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20347>
- Placencia, V.R., Sharif-Afshar, A.-R., Li, X., Huang, H., Uwamariya, C., Neilson, E.G., Shen, M.M., Matusik, R.J., Hayward, S.W., Bhowmick, N.A., 2008. Stromal TGF- $\beta$  signaling mediates prostatic response to androgen ablation by paracrine Wnt activity. *Cancer Res.* 68, 4709–4718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6289>.Stromal
- Ribeiro, N.C.S., Campos, M.S., Santos, M.B., Ayusso, G.M., Vilamaior, P.S.L., Regasini, L.O., Taboga, S.R., Biancardi, M.F., Perez, A.P.S., Santos, F.C.A., 2018. Prepubertal chrysin exposure upregulates either AR in male ventral prostate or AR and ER $\alpha$  in Skene's paraurethral gland of pubertal and adult gerbils. *Fitoterapia* 124, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.11.003>
- Rowley, D.R., 1998. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev.* 17, 411–419. <https://doi.org/10.1023/A:1006129420005>
- Roy, R., Yang, J., Moses, M.A., 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5287–5297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556>
- Sanches, B.D.A., Maldarine, J.S., Zani, B.C., Biancardi, M.F., Santos, F.C.A., Góes, R.M., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2016. The Expression of the Androgen Receptor and Estrogen Receptor 1 is Related to Sex Dimorphism in the Gerbil Prostate Development. *Anat. Rec.* 299, 1130–1139.

<https://doi.org/10.1002/ar.23364>

- Sanches, B.D.A., Maldarine, J.S., Zani, B.C., Tamarindo, G.H., Biancardi, M.F., Santos, F.C.A., Rahal, P., Góes, R.M., Felisbino, S.L., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2017. Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 3309–3321. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13234>
- Scarano, W.R., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., 2006. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 1190–1200. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20391>
- Schulz, W.A., Burchard, M., Cronauer, M. V., 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 437–448. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag064>
- Shapiro, J., Kaufman, K.D., 2003. Use of Finasteride in the Treatment of Men With Androgenetic Alopecia (Male Pattern Hair Loss). *Soc. Investig. Dermatology, Inc.* 8, 20–23.
- Shibata, Y., Fukabori, Y., Ito, K., Suzuki, K., Yamanaka, H., 2001. Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *J. Urol.* 165, 289–293. <https://doi.org/10.1097/00005392-200101000-00081>
- Silva, J.A.F., Bruni-Cardoso, A., Augusto, T.M., Damas-Souza, D.M., Barbosa, G.O., Felisbino, S.L., Stach-Machado, D.R., Carvalho, H.F., 2017. Macrophage roles in the clearance of apoptotic cells and control of inflammation in the prostate gland after castration. *Prostate* 78, 95–103. <https://doi.org/10.1002/pros.23449>
- Taboga, S.R., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., 2009. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 53, 946–955.
- Thompson, I.M., Klein, E.A., Lippman, S.M., Coltman, C.A., Djavan, B., 2003. Prevention of Prostate Cancer with Finasteride: US/European Perspective. *Eur. Urol.* 44, 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2003.11.001>
- Tomas, D., Krušlin, B., 2004. The potential value of (myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 61, 324–331. <https://doi.org/10.1002/pros.20109>
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Rowley, D.R., 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 166, 2472–2483. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65620-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65620-0)
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Yang, F., Dang, T.D., Rowley, D.R., 2002. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62, 6021–6025.
- Wang, L., Xie, L., Tintani, F., Xie, H., Li, C., Cui, Z., Wan, M., Zu, X., Qi, L., Cao, X., 2017. Aberrant Transforming Growth Factor-b Activation Recruits Mesenchymal Stem Cells During Prostatic Hyperplasia. *Stemcells Transl.* 6, 394–404. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0174>

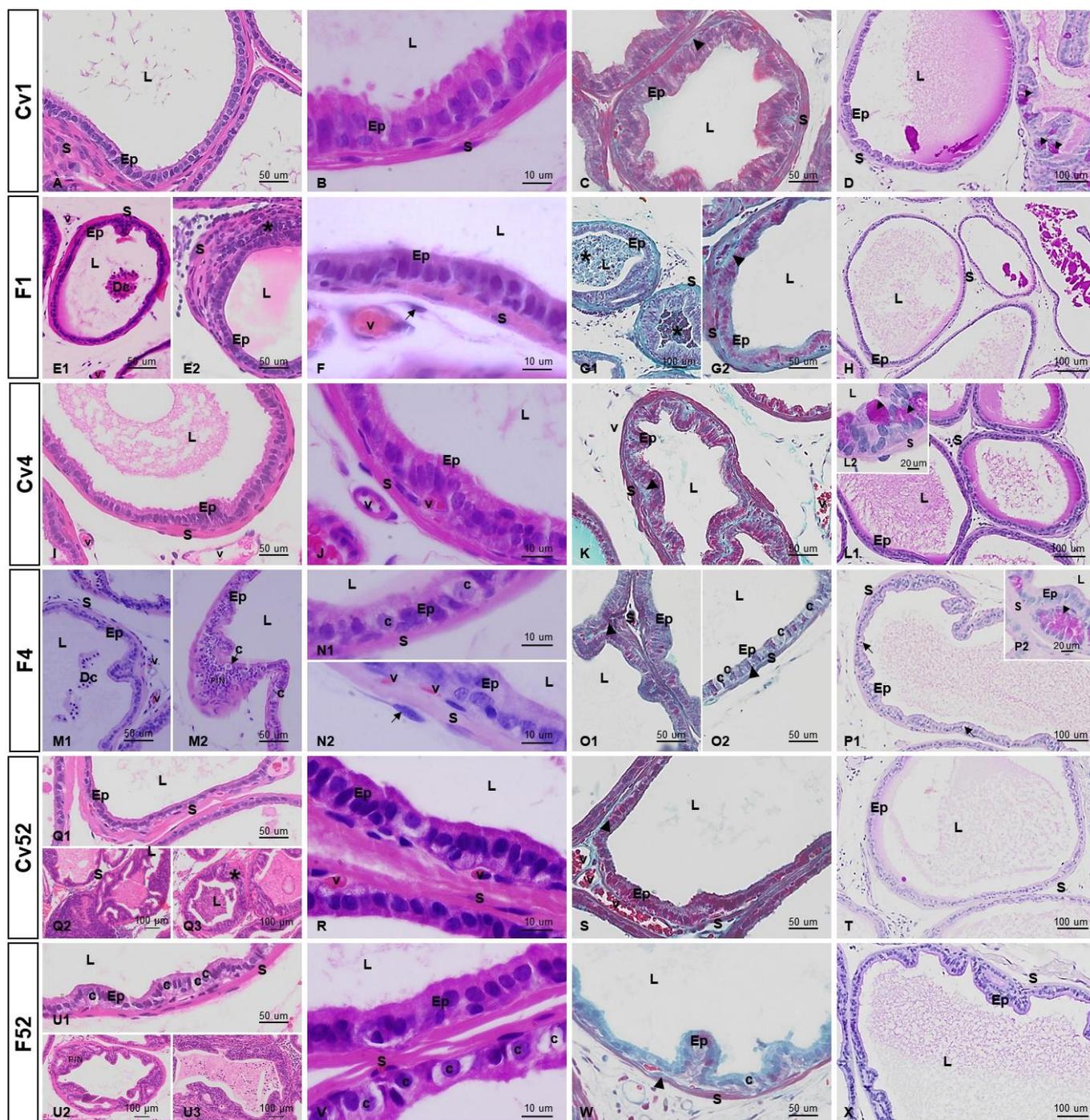
- Wang, X., Cretoiu, D., n.d. Telocytes - Connecting Cells.
- Webber, J.P., Spary, L.K., Mason, M.D., Tabi, Z., Brewis, I.A., Clayton, A., 2016. Prostate stromal cell proteomics analysis discriminates normal from tumour reactive stromal phenotypes. *Oncotarget* 7, 20124–20139. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7716>
- Wilson, M.J., 1995. Proteases in prostate development, function, and pathology. *Microsc. Res. Tech.* 30, 305–318. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300406>
- Wu, J.P., Huang, W. Bin, Zhou, H., Xu, L.W., Zhao, J.H., Zhu, J.G., Su, J.H., Sun, H. Bin, 2014. Intensity of stromal changes is associated with tumor relapse in clinically advanced prostate cancer after castration therapy. *Asian J. Androl.* 16, 710–714. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.129131>
- Zhang, L., Shi, J., Feng, J., Klocker, H., Lee, C., Zhang, J., 2004. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7, 327–332. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500750>

## **TABELA**

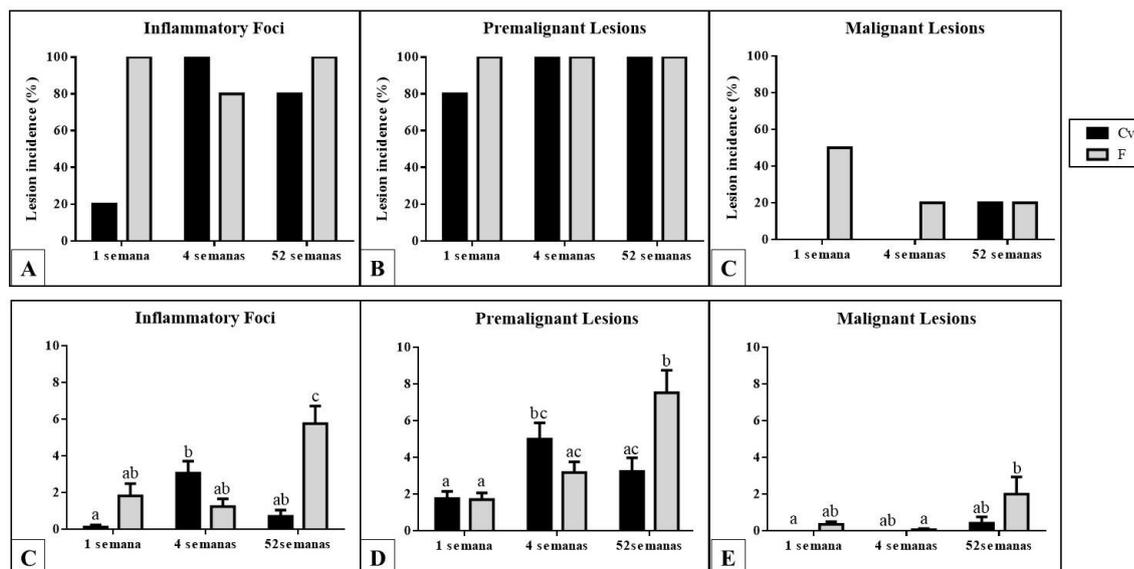
	Cv1	F1	Cv4	F4	Cv52	F52
Animal Weight (g)	69,2 ± 1,04 a	71,7 ± 1,41 a	74,5 ± 1,77 a	74,4 ± 1,62 a	115,6 ± 1,79 b	96,2 ± 4,15 c
Ventral Prostate Weight (g)	0,021 ± 0,002 a	0,02 ± 0,002 a	0,017 ± 0,001 a	0,023 ± 0,002 a	0,039 ± 0,001 b	0,037 ± 0,003 b
Relative Weight (10 <sup>3</sup> )						
Epithelium	17,1 ± 1,673 ab	13,17 ± 1,057 ac	13,52 ± 0,878 ac	18,71 ± 1,177 b	16,27 ± 1,018 ab	9,89 ± 0,765 c
Lumen	48,4 ± 1,736 ab	53,87 ± 1,516 a	52,87 ± 2,067 ab	45,35 ± 2,035 b	50,08 ± 1,884 ab	66,1 ± 2,179 c
Muscle Stroma	7,49 ± 0,597	8,14 ± 0,463	8,31 ± 0,573	7,63 ± 0,495	8,42 ± 0,51	4,89 ± 0,396 a
Collagen	0,75 ± 0,145 a	0,19 ± 0,078 b	0,48 ± 0,122 a	0,81 ± 0,153 a	0,5 ± 0,119 b	0,12 ± 0,049 ab
Vase	0,43 ± 0,087 a	0,81 ± 0,186 ab	0,42 ± 0,101 a	0,33 ± 0,111 ab	1,33 ± 0,24 b	0,89 ± 0,152 ab
Morphometry						
Epithelial Height	14,19 ± 0,296 a	12,75 ± 0,25 b	13,18 ± 0,347 ab	14,18 ± 0,328 a	11,87 ± 0,255 b	12,46 ± 0,219 b
Stromal compartment Height	6,66 ± 0,146 a	6,32 ± 0,137 a	5,53 ± 0,123 b	6,07 ± 0,142 ab	6,08 ± 0,178 ab	6,19 ± 0,135 a
Serum hormone levels						
Testosterone (ng/ml)	1,35 ± 0,117 ab	0,88 ± 0,093 a	0,85 ± 0,101 Cv4	1,45 ± 0,111 b	0,96 ± 0,107 ac	1,19 ± 0,107 abc
Estradiol (pg/ml)	16,51 ± 2,343 a	20,38 ± 0,918 a	13,24 ± 1,73 ab	34,49 ± 2,911 c	12,76 ± 4,304 abc	2,09 ± 0,396 bc

**Tabela I** – Parâmetros biométricos, estereológicos, morfométricos, e concentrações hormonais séricas observadas entre os diferentes grupos experimentais. Os parâmetros biométricos do peso corporal, do lobo ventral da próstata, peso relativo da próstata ventral (peso do lobo ventral/peso do animal) e peso do complexo prostático. A análise estereológica mostra o volume dos compartimentos dos tecidos da próstata (epitélio, lúmen, estroma muscular liso, colágeno e vasos sanguíneos) e a análise morfométrica mostra a altura dos compartimentos epitelial e estromal. Níveis hormonais séricos de testosterona (ng/ml) e estradiol (pg/ml). Os valores mencionados correspondem à média e o erro padrão (n=5). As letras representam a variação significativa entre

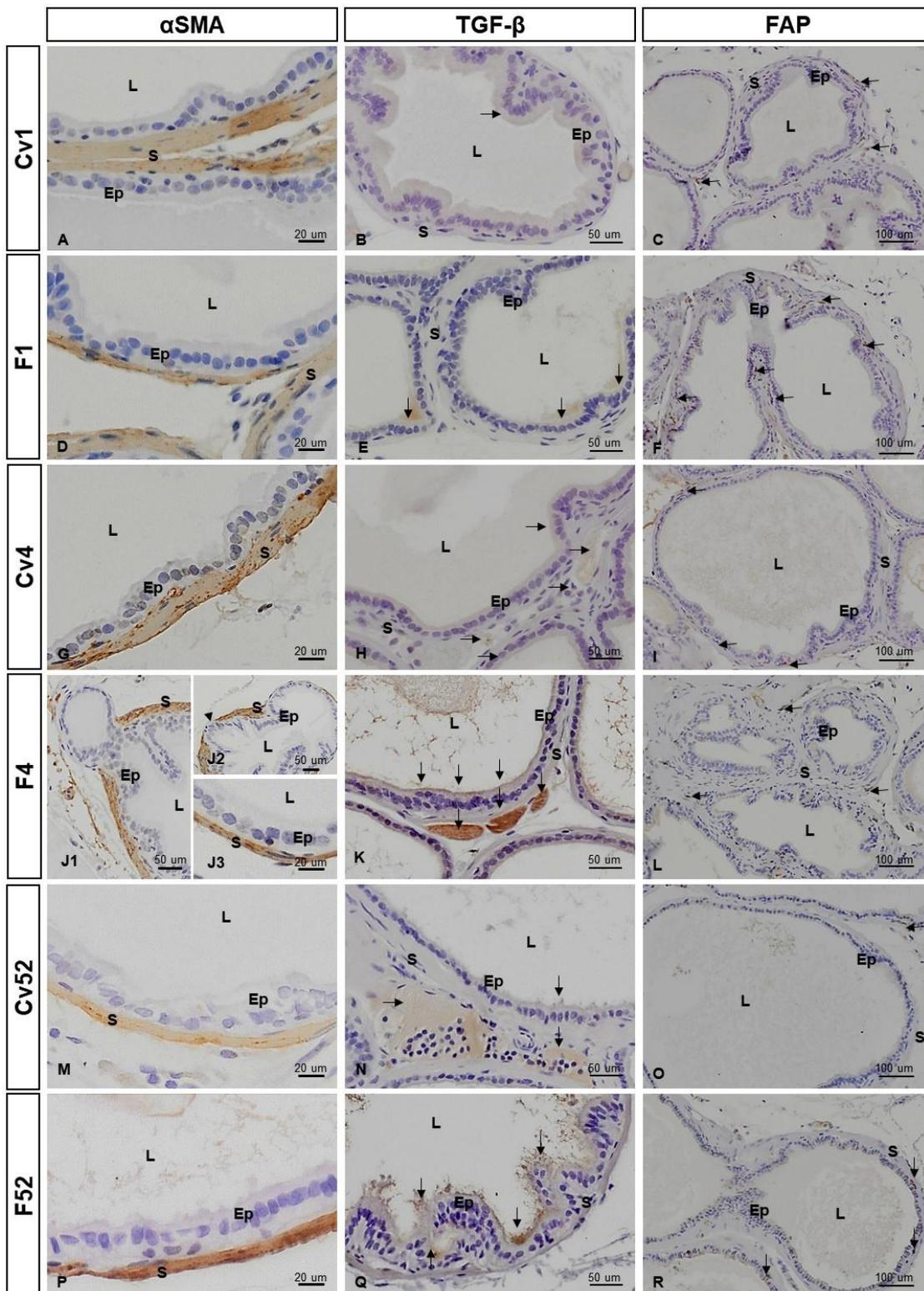
**FIGURAS**



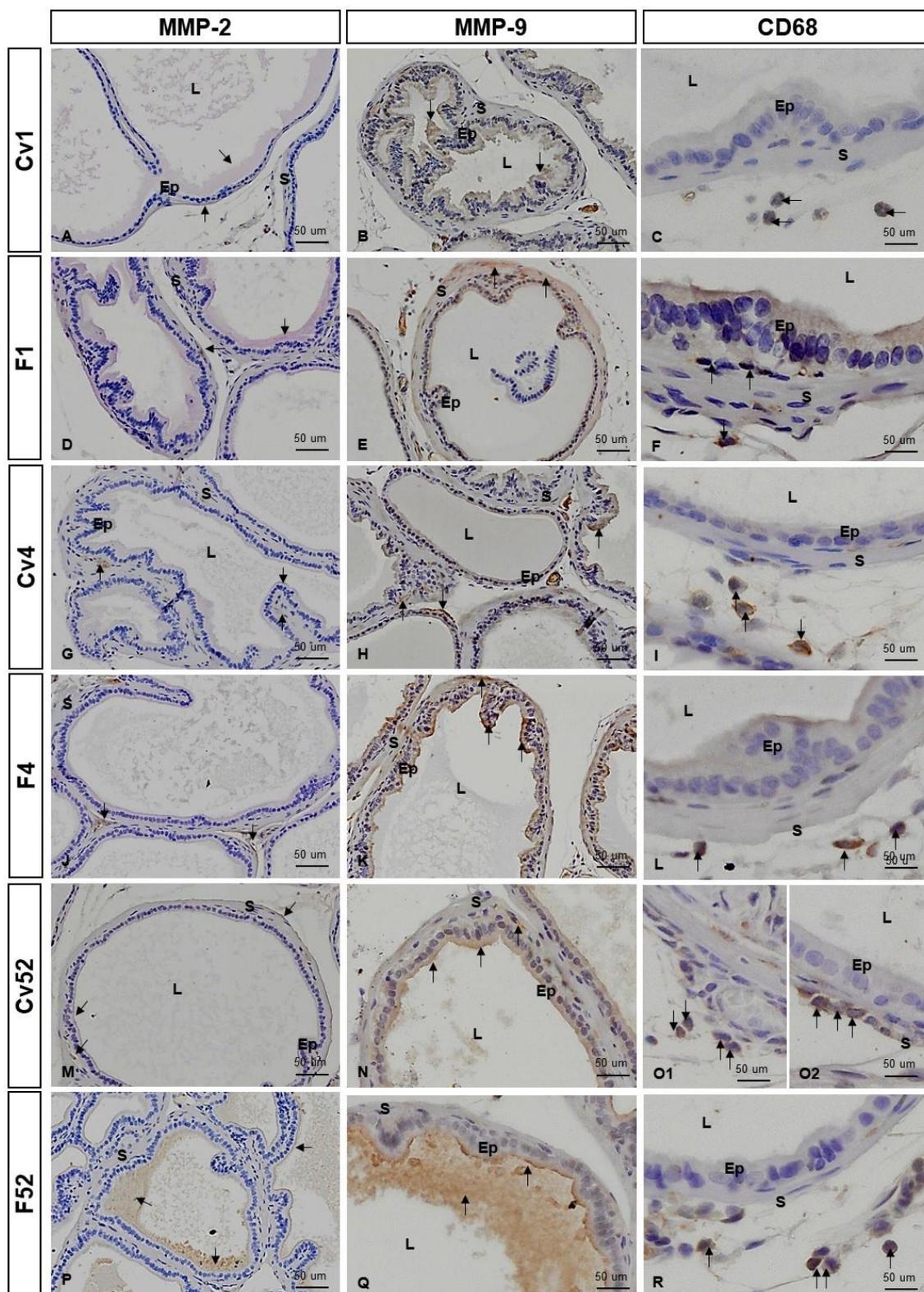
**Figura 1.** Cortes histológicas da próstata ventral de Gerbilos dos grupos experimentais, corados por Hematoxilina & Eosina (A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R, U e V), Tricrômico de Gomori (C, G, K, O, S e W) e P.A.S. (D, H, L, P, T e X). Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; cabeça de seta – acúmulo de colágeno; Dc - debris celulares; Seta - telócitos; \* - acúmulo de células inflamatórias; c – células claras.



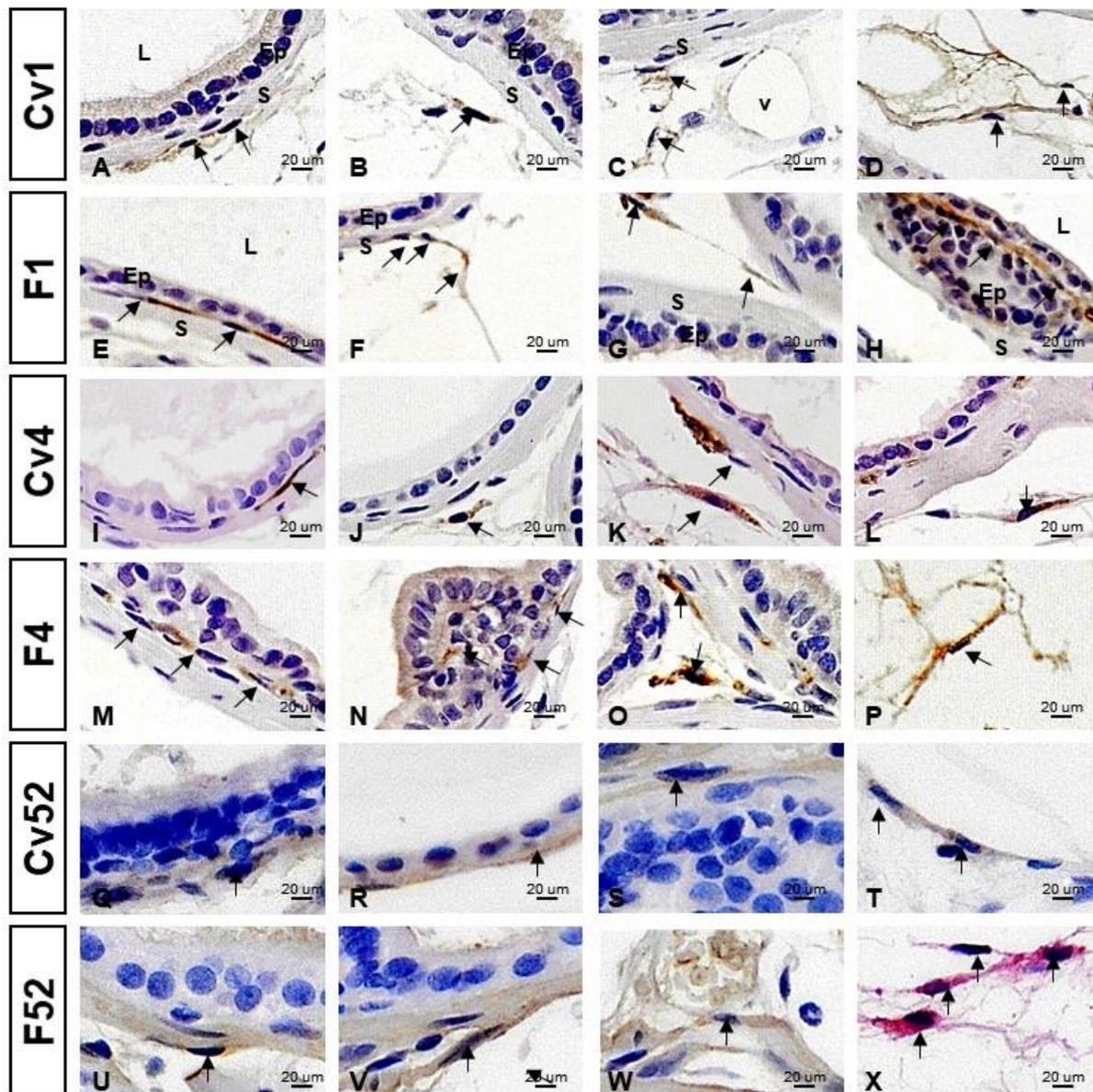
**Figura 2:** Análises de incidência (A, B e C) e multiplicidade (D, E e F) de inflamação e lesões prostáticas nos lóbulos prostáticos de gerbilos da Mongólia. Análises de incidência e multiplicidade foram realizadas em todos os animais ( $n = 5$  por grupo). Os dados sobre incidência indicam a porcentagem de animais afetados. Os dados sobre multiplicidade correspondem à variação no número de focos de lesão em cada grupo. As letras representam a variação significativa entre os grupos.



**Figura 3.** Cortes histológicos da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para  $\alpha$ -actina (A, D, G, J, M e P), TGF- $\beta$  (B, E H, K, N e Q) e FAP (C, F, I, L, O e R). Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Cabeça de seta – ruptura da camada muscular; \* - acúmulo de células inflamatórias.



**Figura 4.** Cortes histológicos da próstata de Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para MMP-2 (A, D, G, J, M e P), MMP-9 (B, E, H, K N e Q) e CD68 (C, F, I, L O e R). Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta - regiões marcadas.



**Figura 5.** Cortes histológicas da próstata de Gerbilos dos Gerbilos dos grupos experimentais submetidos a imunomarcção para anti-CD34. Contra coloração com Hematoxilina de Harris. Legenda: Ep - epitélio; S - estroma; L - lúmen; Seta – células CD34- positivas.

#### 4. CONCLUSÕES

- A senescência levou ao desenvolvimento de um microambiente de estroma reativo na próstata, caracterizado por aumento da expressão de TGF- $\beta$  e fatores de remodelação tecidual (MMP-2 e MMP-9) Resultando no desenvolvimento de processos inflamatórios e lesões na próstata durante o envelhecimento.
- A castração cirúrgica causou uma regressão da glândula nos animais adultos e foi capaz de prevenir o surgimento de infiltrados inflamatórios e lesões prostáticas nos animais senis. Apesar disso, a castração alterou o microambiente prostático, regulando positivamente o TGF- $\beta$  e as metaloproteinases.
- A crisina é capaz de alterar o microambiente prostático levando a uma involução branda da glândula com redução secretora, reduzindo o número de animais com inflamação e de ácinos afetados com lesões pré-malignas e malignas. Porém, ela também afeta o microambiente estromal.
- A finasterida mostrou-se intensificador do desenvolvimento do estroma reativo com aumento de TGF- $\beta$ , metaloproteinases (2 e 9), inflamação, miofibroblastos e acúmulo de telócitos em todos os períodos de tratamento. Ela possui propriedades pró-inflamatórias bem evidentes e aumenta a incidência de lesões pré-malignas e malignas. Esse estroma reativo pode ser um evento anterior ao desenvolvimento do câncer de próstata, visto que também está associado a regiões de inflamação e lesões pré-malignas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIOLI, E.; DELLA-COLLETA, H. H. M.; CARVALHO, H. F. Smooth Muscle Cell Behavior in the Ventral Prostate of Castrated Rats. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 50 – 56, 2004.
- BANERJEE, P.P.; BANERJEE, S.; BROWN T.R. Increased androgen receptor expression correlates with development of agedependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. **Endocrinology**, v. 142, p. 4066–4075, 2001.
- BARRON, D. A.; STRAND, D. W.; RESSLER, S. J.; DANG, T. D.; HAYWARD, S. W.; YANG, F.; AYALA, G. E.; ITTMANN, M.; ROWLEY, D. R. TGF- $\beta$ 1 Induces an Age-Dependent Inflammation of Nerve Ganglia and Fibroplasia in the Prostate Gland Stroma of a Novel Transgenic Mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e:13751, 2010.
- BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The Reactive Stroma Microenvironment and Prostate Cancer Progression. **Endocrine-related Cancer**, v. 19, n. 6, p. 187-204, 2012
- BRUNI-CARDOSO, A.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. **Histochemistry Cell Biology**, v. 129, p. 805–815, 2008.
- CAÍRES, Cássia Regina Suzuki. Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos. 2016. 48f. Dissertação (Mestrado em genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.
- CAMPOS, S. G.; P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, p. 13–24, 2008

- CAMPOS, S. G. P.; GONÇALVES, B. F.; SCARANO, W. R.; CORRADI, L. S. SANTOS, F. C. A.; CUSTODIO, A. M. G.; VILAMAIOR, P. S. L.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, p. 394–407, 2010.
- CARRUBA, G. Estrogens and Mechanisms of Prostate Cancer Progression. **Estrogens and Human Diseases**, v. 1089, p. 201-217, 2006.
- CARVALHO, H. F. DE; VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. **The Prostate**, v. 32, n. 1, p. 27–34, 1997.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 61, n. 4, p. 2-7, 2003.
- CIFTCI, O.; OZDEMIR, I.; AYDIN, M.; BEYTUR, A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. **Andrologia**, v. 44, n. 3, p. 181–186, 2011.
- CONDON, M. S. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 132-137, 2005.
- CORRADI, L. S.; GÓES, R. M.; CARVALHO, H. F.; TABOGA, S. R. Inhibition of 5- $\alpha$ -reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. **Differentiation**, v. 72, n. 5, p. 198-208, 2004.
- CORRADI, L. S.; CAMPOS, S. G.; SANTOS, F. C.; VILAMAIOR, P. S.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 90, n. 1, p.79-94, 2009a.
- CORRADI, L. S.; GÓES, R. M.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R. Increased androgen receptor and remodeling in theprostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 12, p. 939-50, 2009b.
- CORRADI, L. S.; JESUS, M, M.; FOCHI, R. A.; VILAMAIOR, P. S.; JUSTULIN, L. A. JR.; GÓES, R. M.; FELISBINO, S. L.; TABOGA, S.R. Structural and

- ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 3, p.398-406, 2013.
- COULSON-THOMAS, Y. M.; GESTEIRA, T. F.; NORTON, A. L.; KAO, W. W.; NADER, H. B.; COULSON-THOMAS, V. J. The role of proteoglycans in the reactive stroma on tumor growth and progression. **Histology and histopathology**, v. 30, p. 33-41, 2015.
- CUNHA, G. R.; WANG, Y. Z.; HAYWARD, S. W.; RISBRIDGER, G. P. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. **Reproduction, Fertility and Development** , v. 13, n. 4, p. 285-296 , 2001.
- CUNHA, G. R.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, v. 70, p. 473-485, 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. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n.4, 221-236, 2004a.
- CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 5, p. 417-434, 2004b.
- CUSTÓDIO, A.M.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Acid phosphatase activity in gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate: comparative study in female and male glands during postnatal development. **Cell Biology International**, v. 28, p. 335–344, 2004.
- DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; STUCLIFFE, S.; XU, J.; GRONBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAAC, W.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.
- DESCAZEAUD, A., WEINBRECK, N.; ROBERT, G.; VACHEROT, F.; ABBOU, C. C.; LABROUSSE, F.; ALLORY, Y.; RUBIN, M. A.; DE LA TAILLE, A. Transforming growth factor  $\beta$ -receptor II protein expression in benign prostatic hyperplasia is associated with prostate volume and inflammation. **British Journal of Urology**, v. 108, n. 2b, p. e23-e28, 2011.
- DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 7-12, 2005.

- DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; GARCÍA, M. P.; SÁEZ, F. J.; DÍAZ-FLORES, L. Jr.; VALLADARES, F.; MADRID, J. F. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. **Histology and Histopathology**, v. 29, n. 7, p. 831-70, 2014.
- DI GIROLAMO, N.; INDOH, I.; JACKSON, N.; WAKEFIELD, D.; MCNEIL, H. P.; YAN, W.; GECZY, C.; ARM, J. P.; TEDLA, N. Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration. **Journal Immunology**, v. 177, p. 2638–2650, 2006.
- DOS SANTOS, F. C.; CARVALHO, H. F.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Tissue and Cell**, 2003, v. 35, n. 6, p. 447–457.
- EDMUNDS, K. M.; HOLLOWAY, A. C.; CRANKSHAW, D. J.; AGARWAL, S. K.; FOSTER, W. G. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. *Reprod Nutr De*, v. 45, p. 709-20, 2005.
- EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: Androgens and estrogens. **The Prostate**, v. 45, p. 14-18, 2000.
- ELKINGTON, P. T.; GREEN, J. A.; FRIEDLAND, J. S. Analysis of matrix metalloproteinase secretion by macrophages. **Methods Molecular Biology**, v. 531, p. 253–265, 2009.
- FARNSWORTH, W. E. Prostate stroma: physiology. **Prostate**, v. 38, p. 60-72, 1999.
- FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S.; POPESCU, L. M. Telocytes. **BioMolecular Concepts**, v. 2, p. 481-489, 2011.
- FRANCK-LISSBRANT, I.; HAGGSTROM, S.; DAMBER, J. E.; BERGH, A. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. **Endocrinology**, v. 139, p. 451–456, 1998.
- GEVAERT, T.; LERUT, E.; JONIAU, S.; FRANKEN, J.; ROSKAMS, T.; DE RIDDER, D. Characterization of subepithelial interstitial cells in normal and pathological human prostate. **Histopathology**, v. 65, n. 3, p. 418-28, 2014.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11. ed. Pennsylvania: Elsevier Philadelphia, 2006.

- HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 297–305, 2004.
- HAYWARD, S. W.; ROSEN, M. A.; CUNHA, G. R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **British Journal of Urology**, v. 79, p. 18-26, 1997.
- HUDSON, D. L.; GUY, A. T.; FRY, P.; O'HARE, M. J.; WATT, F. M.; MASTERS, J. R. Epithelial Cell Differentiation Pathways in the Human Prostate: Identification of Intermediate Phenotypes by Keratin Expression. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 271–278, 2001.
- HUYNH, H.; ALPERT, L.; ALAOUJ-JAMALI, M. A.; NG, C. Y.; CHAN, T. W. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **Journal of Endocrinology**, v. 171, p. 109-118, 2001.
- HSING, A. W.; DEVESA, S. S. Trends and Patterns of Prostate Cancer: What Do They Suggest? **Epidemiologic Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3-13, 2001.
- ITO, K.; FUKABORI, Y.; SHIBATA, Y.; SUZUKI, K.; MIEDA, M.; GOTANDA, K.; HONMA, S.; YAMANAKA, H. Effects of a new steroidal aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced and spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. **European Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 543-554, 2000.
- INCORVAIA, L.; BADALAMENTI, G.; RINI, G.; ARCARA, C.; FRICANO, S.; SFERRAZZA, C.; DI TRAPANI, D.; GEBBIA, N.; LETO, G. MMP-2, MMP-9 and activin A blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1519–1525, 2007.
- JANA, K.; YIN, X.; SCHIFFER, R. B.; CHEN, J. J.; PANDEY, A. K.; STOCCO, D. M.; GRAMMAS, P.; WANG, X. Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells. **Journal of Endocrinology**, v. 197, p. 315-323, 2008.
- JUSTULIN JR, L. A.; DELLA-COLETA, H. H. M.; TABOGA, S. R.; FELISBINO, S. L. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during

- ventral prostate atrophy and regrowth. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 696-708, 2009.
- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, 2006.
- KNOX, J. D.; WOLF, C.; MCDANIEL, K.; CLARK, V.; LORIOT, M.; BOWDEN, G. T.; NAGLE, R. B. Matrilysin expression in human prostate carcinoma. **Molecular Carcinogenesis**, v. 15, p. 57–63, 1996.
- KREIS, T.; VALE, R. Guidebook to the extracellular matrix anchor, and adhesion proteins. New York: **Oxford University Press**, 1999.
- KWONG, J.; CHOI, H. L.; HUANG, Y.; CHAN, F. L. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. **Cell Tissue Research**, v. 298, p. 123–136, 1999.
- LABRIE, F. Endocrine therapy for prostate cancer. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 20, p. 845-872, 1991.
- LABRIE, F. Intracrinology: The Basis for the Rational Design of Endocrine Therapy at All Stages of Prostate Cancer. **European Urology**, v. 24, p. 94-105, 1993.
- LABRIE, F.; THE-LUU, V.; LIN, S. X.; SIMARD, J.; LABRIE, C. Role of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases in Sex Steroid Formation in Peripheral Intracrine Tissues. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 10, p. 421-427, 2000.
- LIMAYE, A. M.; DESAI, K. V.; CHAVALMANE, A. K.; KONDAIAH, P. Regulation of mRNAs encoding MMP-9 and MMP-2, and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 by androgens in the rat ventral prostate. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 294, p. 10–18, 2008.
- LI, S. C.; CHEN, G. F.; CHAN, P. S.; CHOI, H. L.; HO, S. M.; CHAN, F. L. Altered expression of extracellular matrix and proteinases in Noble rat prostate gland after long-term treatment with sex steroids. **Prostate**, v. 49, p. 58–71, 2001.
- MANDACHE, E.; GHERGHICEANU, M.; MACARIE, C.; KOSTIN, S.; POPESCU, L. M. Telocytes in human isolated atrial amyloidosis: ultrastructural remodeling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 2739–2747, 2010.
- MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 145, p. 187–196, 2018.

- MARKER, P. C.; DONJACOUR, A. A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165-174, 2003.
- MCPHERSON, S. J.; WANG, H.; JONES, M. E.; PEDERSEN, J.; IISMAA, T. P.; WREFORD, N.; SIMPSON, E. R.; RISBRIDGER, G. P. Elevated Androgens and Prolactin in Aromatase-Deficient Mice Cause Enlargement, But Not Malignancy, of the Prostate Gland. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2458-2467, 2001.
- MCPHERSON, S.J.; WANG, H.; JONES, M.E. *et al.* Elevated androgens and prolactin in aromatase deficient mice cause enlargement, but not malignancy of the prostate gland. **Endocrinology**, v. 142, p. 2458–2467, 2001.
- MCPHERSON, S. J.; ELLEM, S. J.; SIMPSON, E. R.; PATCHEV, V.; FRITZEMEIER, K. H.; RISBRIDGER, G. P. Essential Role for Estrogen Receptor  $\beta$  in Stromal-Epithelial Regulation of Prostatic Hyperplasia. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 566-574, 2007.
- MIZOKAMI, A.; KOH, E.; FUJITA, H.; MAEDA, Y.; EGAWA, M.; KOSHIDA, K.; HONMA, S.; KELLER, E. T.; NAMIKI, M. The Adrenal Androgen Androstenediol Is Present in Prostate Cancer Tissue after Androgen Deprivation Therapy and Activates Mutated Androgen Receptor. **Cancer Research**, v. 64, n. 2, p. 765-771, 2004.
- MONTICO, F.; KIDO, L. A.; HETZL, A. C.; LORENCINI, R. M.; CÂNDIDO, E. M.; CAGNON, V. H. A. Antiangiogenic therapy effects on age-associated matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) responses: a comparative study of prostate disorders in aged and TRAMP mice. **Histochem Cell Biol**, v.142, p. 269–284, 2014.
- MONTICO, F.; KIDO, L. A.; SAN MARTIN, R.; ROWLEY, D. R.; CAGNON, V. H. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. **The Prostate**, v. 75, n. 14, p. 1643-1661, 2015.
- NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; HABTEMARIAM, S.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; MANAYI, A.; GORTZI, O.; NABAVI, S. M. 2015. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 224-231

- OLIVEIRA, S. M.; VILAMAIOR, P. S. L.; CORRADI, L. S.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. **Cell Biology International**, v. 31, n. 3, p. 235–245, 2007.
- OTRANTO, M.; SARRAZY, V.; BONTÉ, F.; HINZ, B.; GABBIANI, G.; DESMOULIÈRE, A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. **Cell Adhesion and Migration**, v. 6, n. 3, p. 203-19, 2012.
- PEGORIN De CAMPOS, S. G.; ZANETONI, C.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **the Anatomical Record**, v. 288A, n. 7, p. 723–733, 2006.
- PEGORIN De CAMPOS, S. G.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related. **International Journal of experimental Pathology**, v. 89, n. 1, p. 13–24., 2008.
- POLVERINI, P. J. Macrophage induced angiogenesis: a review. **Cytokines**, v. 1, p. 54–73, 1990.
- POPESCU, L. M.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 729-40, 2010.
- PICHICHERO, E., CICONI, R., MATTEI, M., CANINI, A. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. **International Journal of Oncology**, v 38, p 473–483, 2011.
- PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 12, p. 1-27, 1963.
- QUINTAR, A. A.; GONSCALVES, B. F.; TABOGA, S. R.; MALDONADO, C. A. The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a model for inflammation-promoted prostate carcinogenesis. **Cell Biology International**, v. 41, p. 234–1238, 2017.

- RISBRIDGER, G. P.; BIANCO, J. J.; ELLEM, S. J.; MCPHERSON, S. J. Oestrogens and prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer** , v. 10, p. 187-191, 2003.
- RIBEIRO, N. C. S.; CAMPOS, M. S.; SANTOS, M. B.; AYUSSOC, G. M.; VILAMAIOR, P. S. L.; REGASINI, L. O.; TABOGA, S. R.; BIANCARDI, M. F. PEREZ, A. P. S.; SANTOS, F. C. A.; Prepubertal chrysin exposure upregulates either AR in male ventral prostate or AR and ER $\alpha$  in Skene's paraurethral gland of pubertal and adult gerbils. **Fitoterapia**, v. 124, p. 137-144, 2018.
- RIVAS, A.; FISHER, J. S.; MCKINNELL, C.; ATANASSOVA, N.; SHARPE, R. M. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4797-4808, 2002.
- ROCHEL, S. S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S.; GÓES, R. M. Lobe Identity in the Mongolian Gerbil Prostatic Complex: A New Rodent Model for Prostate Study. **The Anatomical Record**, v. 290, n. 10, p. 1233–1247, 2007.
- ROSS, R. W.; KANTOFF, P. W. Hormone-refractory prostate cancer: choosing the appropriate treatment option. **Oncology (Williston Park)**, v. 21, p. 185-193, 2007.
- RYU, S.; LIM, W.; BAZER, F. W.; SONG, G. Chrysin Induces Death of Prostate Cancer Cells by Inducing ROS and ER Stress. **Journal of Cellular Physiology**, 2017.
- SANCHES, B. D. A.; CORRADI, L. S.; VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. Paracrine Signaling in the Prostatic Stroma: A Novel Role for the Telocytes Revealed in Rodents' Ventral Prostate. In: WANG, X.; CRETOIU, D. Telocytes - Connectins Cells. [S.l.]: Springer, 2016. Cap. 13, p. 193-206.
- SANCHES, B. D. A.; MALDARINE, J. S.; ZANI, B. C.; TAMARINDO, G. H.; BIANCARDI, M. F.; SANTOS, F. A. C. A.; RAHAL, P.; GÓES, R. M.; FELISBINO, S. L.; VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 21, p. 3309-3321, 2017.
- SALIMI, A.; ROUDKENAR, M. H.; SEYDI, E.; SADEGHI, L.; MOHSENI, A.; PIRAHMADI, N.; POURAHMAD, J. Chrysin as an Anti-Cancer Agent Exerts Selective Toxicity by Directly Inhibiting Mitochondrial Complex II and V in CLL B-lymphocytes. **Journal Cancer Investigation** , v. 35, n. 3, p. 174-186, 2017.

- SAN MARTIN, R.; BARRON, D. A.; TUXHORN, J. A.; RESSLER, S. J.; HAYWARD, S. W.; SHEN, X.; LAUCIRICA, R.; WHEELER, T. M.; GUTIERREZ, C.; AYALA, G. E.; ITTMANN, M.; ROWLEY, D. R. Recruitment of CD34(+) fibroblasts in tumor-associated reactive stroma: the reactive microvasculature hypothesis. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 6, p. 1860-1870, 2014.
- SANTOS, F.C.A.; CARVALHO, H.F.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Tissue & Cell**, v. 35, p. 447–457, 2003.
- SANTOS, F. C. A.; CUSTODIO, A. M. G.; CAMPOS, S. G. P.; VILAMAIOR, P. S. L.; GOÉS, R. M.; TABOGA, S. R. Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 674–685, 2008.
- SAMARGHANDIAN, S.; AFSHARI, J. T.; DAVOOD, S. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. **Clinics**, Sao Paulo , v. 66, p. 1073–1079, 2011.
- SCARANO, W. R.; CORDEIRO, R. S.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Intraepithelial alterations in the guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. **Journal Submicroscopic Cytology Pathology**, v. 36, n. 2, p. 141-148., 2004.
- SCHAUER, I. G.; RESSLER, S. J.; TUXHORN, J. A.; DANG, T. D.; ROWLEY, D. R. Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 72, p. 205-213, 2008.
- SCHULZ, W.A.; BURCHARDT, M.; CRONAUER, M.V. Molecular biology of prostate cancer. **Mol. Hum. Reprod.** v. 9, p. 437–448, 2003.
- SÉRALINI, G.; MOSLEMI, S. Aromatase inhibitors: past, present and future. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 117–131, 2001.
- SHIBATA, Y.; FUKABORI, Y.; ITO, K.; SUZUKI, K.; YAMANAKA, H. Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 1, p. 289–293, 2001.

- SHOIEB, S. M.; ESMAT, A.; KHALIFA, A. E.; ABDEL-NAIM, A. B. Chrysin attenuates testosterone-induced benign prostate hyperplasia in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 650–659, 2018.
- SILVA Jr, M. M.; MATHEUS, W. E.; GARCIA, P. V.; STOPIGLIA, R. M.; BILLIS, A.; FERREIRA, U.; FÁVARO, W. J. Characterization of reactive stroma in prostate cancer: involvement of growth factors, metalloproteinase matrix, sexual hormones receptors and prostatic stem cells. **International Brazilian Journal Of Urology**, v. 41, n. 5, p. 849-858, 2015.
- SORONEN, P.; LAITI, M.; TÖRN, S.; HÄRKÖNEN, P.; PATRIKAINEN, L.; LI, Y.; PULKKA, A.; KURKELA, R.; HERRALA, A.; KAIJA, H.; ISOMAA, V.; VIHKO, I. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 281–286, 2004.
- STEERS, W. D.  $5\alpha$ -reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 58, n. 6, p. 17-24, 2001.
- SUNG, S. Y.; CHUNG, W. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. **Differentiation**, v. 70, p. 506-521, 2002.
- SUCIU, L.; POPESCU, L. M.; GHERGHICEANU, M.; REGALIA, T.; NICOLESCU, M. I.; HINESCU, M. E.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. **Cells Tissues Organs**, v. 192, n. 5, p. 325-339, 2010.
- TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S. L.; GÓES, R. M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53/8, p. 946 – 955, 2009.
- TA, N; WALLE, T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 107, p.127-9, 2007.
- THOMAS, S.; WATERMAN, P.; CHEN, S.; MARINELLI, B.; SEAMAN, M.; RODIG, S.; ROSS, R. W.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R.; KELLY, K. A. Development of Secreted Protein and Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Targeted Nanoparticles for the Prognostic Molecular Imaging of Metastatic

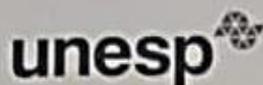
- Prostate Cancer. **Journal Nanomed Nanotechnol**, v. 2, n. 112, p. 2157-7439-2-112, 2011.
- TIMMS, B. G.; PETERSEN, S. L.; VOM SAAL, F. S. Prostate gland growth during development is stimulated in both male and female rat fetuses by intrauterine proximity to female fetuses. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 5, p. 1694–1701, 1999.
- TOMAS, D.; KRUSLIN, B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. **Prostate**, v. 61, p. 324-331, 2004.
- TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **Journal Urology**, v. 166, p. 2472-2483, 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. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2912-2923, 2002.
- TUXHORN, J. A.; MCALHANY, S. J.; YANG, F.; DANG, T. D.; ROWLEY, D. R. Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$  Activity Decreases Angiogenesis in a Human Prostate Cancer-reactive Stroma Xenograft Model. **Cancer Research**, v. 62, n. 21, p. 6021-6025, 2002.
- VIHKO, P.; HERRALA, A.; HÄRKÖNEN, P.; ISOMAA, V.; KAIJA, H.; KURKELA, R.; LI, Y.; PATRIKAINEN, L.; PULKKA, A.; SORONEN, P.; TÖRN, S. Enzymes as modulators in malignant transformation. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 93, n. 2-5, p. 277–283, 2005.
- VANNUCCHI, M. G.; Traini, C.; Guasti, D.; Del Popolo, G.; Faussone-Pellegrini, M. S. Telocytes subtypes in human urinary bladder. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 10, p. 2000–2008, 2014.
- VIHKO, P.; HERRALA, A.; HÄRKÖNEN, P.; ISOMAA, V.; KAIJA, H.; KURKELA, R.; PULKKA, A. Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 248, n. 1-2, p. 141–148, 2006.
- VILAMAIOR, P. S. L.; FELISBINO, S. R.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate**, v. 45, n. 3, p. 253-258, 2000.

- VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. **Cell Biology International**, v. 29, n. 9, p. 809–816, 2005.
- VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. **The Anatomical Record**, v. 288A, n. 8, p. 885–892, 2006.
- WANG, X.; MORRIS, M. E. Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: potential involvement of ABCG2. **Drug Metab Dispos**, v. 35, p. 268–274, 2007.
- WANG, J.; JIN, M.; MA, W.; ZHU, Z.; WANG, X. The History of Telocyte Discovery and Understanding. In: WANG, X.; CRETOIU, D. *Telocytes - Connectins Cells*. [S.l.]: Springer, 2016. Cap. 1, p. 1-18.
- WANG, X.; CRETOIU, D. *Telocytes - Connectins Cells*. [S.l.]: Springer, 2016.
- WANG, L.; XIE, L.; TINTANI, F.; XIE, H.; LI, C.; CUIA, Z.; WAN, M.; ZU, X.; QI, L.; CAO, X. Aberrant Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation Recruits Mesenchymal Stem Cells During Prostatic Hyperplasia. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 2, p. 394-404, 2017.
- WILSON, M. J. Proteases in prostate development, function, and pathology. **Microscopy Research Technique**, v. 30, p. 305–318, 1995.
- WORTH, N. F.; ROLFE, B. E.; SONG, J.; CAMPBELL, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 49, p. 130-145, 2001.
- XIAO, J.; BEI, Y. Decoding Telocytes. In: WANG, X.; CRETOIU, D. *Telocytes - Connectins Cells*. [S.l.]: Springer, 2016. Cap. 2, p. 23-39.
- XU, D.; JIN, J.; YU, H.; ZHAO, Z.; MA, D.; ZHANG, C.; JIANG, H. Chrysin inhibited tumor glycolysis and induced apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting hexokinase-2. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, p. 1-11, 2017.

ZHONG, W. D.; HAN, Z. D.; HE, H. C.; BI, X. C.; DAI, Q. S.; ZHU, G. *et al.* CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. **Oncology**, v. 7, p. 230–236, 2008.

## 6. ANEXO I

### 6.1 Certificado de experimentação animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

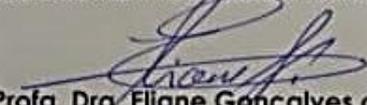
#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do estroma reativo prostático após a orquiectomia bilateral e posterior inibição da atividade da aromatase pela crisina e inibição da atividade da 5-alfa-redutase pela finasterida", registrada com o nº. 130/2016 - CEUA, sob a responsabilidade do Professor Doutor Sebastião Roberto Taboga e da doutoranda Julia Quiles Antoniassi, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 25 de maio de 2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01 de junho de 2016 a 30 de agosto de 2018
Espécie/linhagem/Raça	Gerbil
Nº de animais	75 (setenta e cinco)
Peso/Idade	70 gramas/ 120 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 28 de novembro de 2019.

  
**Profa. Dr. Eliane Gonçalves de Freitas**  
 Presidente da CEUA

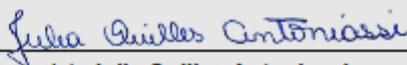
## 7. ANEXO II

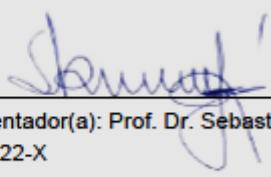
### 7.1 Declaração de direitos autorais

#### Declaração

As cópias de artigos da minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo do estroma reativo prostático após a orquiectomia bilateral e posterior inibição da atividade da aromatase pela crisina e inibição da atividade da 5-alfa-redutase pela finasterida**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06/08/2020

Assinatura:   
Nome do(a) autor(a): **Julia Quilles Antoniassi**  
RG n.º 47762745-6

Assinatura:   
Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga**  
RG n.º 44749322-X