



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Estudo do potencial migratório de células tumorais prostáticas expostas à fibronectina

Greyce Roberta de Souza

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada Área de concentração
Biologia Estrutural e Funcional.

Prof. Dr^a. Flávia Karina Delella

Botucatu – SP

2015

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n. Cx. Postal. 510. CEP: 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil
Fone/Fax. +55 (14) 3811-6148 – posgraduacao@ibb.unesp.br / [HTTP://www.ibb.unesp.br](http://www.ibb.unesp.br)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Estudo do potencial migratório de células tumorais prostáticas
expostas à fibronectina**

Greyce Roberta de Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Karina Delella

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada Área de concentração
Biologia Estrutural e Funcional.

Prof^a. Dr^a. Flávia Karina Delella

Botucatu – SP

2015

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n. Cx. Postal. 510. CEP: 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil
Fone/Fax. +55 (14) 3811-6148 – posgraduacao@ibb.unesp.br / HTTP://www.ibb

A vida requer cuidado. Os amores também. Flores e espinhos são belezas que se dão juntas. Não queira uma só, elas não sabem viver sozinhas...

Quem quiser levar a rosa para sua vida, terá de saber que com elas vão inúmeros espinhos. Não se preocupe, a beleza da rosa vale o incômodo dos espinhos...

(Padre Fábio de Melo)

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.”*

(Luís de Camões)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

Dedicatória

Àqueles que sempre tiveram muito orgulho dos meus estudos, que me apoiaram e me ajudaram em todas as dificuldades que surgiram.... Que na sua simplicidade, quando eu terminei a graduação em Biologia, falavam para os seus conhecidos:
"Agora eu tenho uma filha professora!"

E, com a mesma simplicidade - apesar de não entender direito o que é que eu fazia - ouvi dizerem a uma pessoa: "Minha filha estuda lá em Rubião, vai ser Mestre."

Aos professores e coordenadores do Curso de Férias "Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP", para que, mesmo diante de todas as dificuldades, não desanimem e continuem a dar vida aos sonhos de muitos que, assim como eu, acreditava que era impossível chegar e estudar nessa instituição.
Para todos aqueles que, apesar de todas as dificuldades, lutam e acreditam ainda no futuro de uma Educação melhor.

A todos que lutam diariamente contra essa triste doença, tema do presente trabalho.

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus, pelas oportunidades ofertadas, pelo dom da vida e por todas as graças concedidas.

Aos principais incentivadores e amigos constantes de toda a minha vida, meus pais, Roberto e Teresa. O exemplo de vocês com certeza me torna uma pessoa melhor. Obrigada pela educação e o amor que sempre tem me dado... Aos meus irmãos, Rogélio e Cláudia, minha cunhada Keila e meus queridos sobrinhos, Murilo e Mariana.

À minha professora orientadora Dra Flávia Karina Delella, por aceitar o grande desafio de orientar-me, mesmo sabendo de todos meus obstáculos e dificuldades e que mesmo assim não hesitou e manteve a constante orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho. Um exemplo de pessoa, generosa, esforçada e, sobretudo compreensiva! Você que fez tudo para que eu conseguisse fazer o Mestrado e chegar até a conclusão. Muitas foram as vezes em que tive vontade de desistir por causa dos percalços da minha vida!! Você estava sempre pronta, com palavras de ânimo, para não deixar que isso acontecesse. Ajudou-me em tudo!!! Tivemos ótimos e tristes momentos, vitórias e fracassos, boas conversas e algumas discussões. Mas tudo, sem tirar nem pôr, valeu muito a pena! A você, mestre e amiga, orientadora em todas as situações que passei nestes pouco mais de 2 anos né.... As palavras são simples e contam muito pouco do que eu gostaria de falar, mas como sempre te digo: minha admiração, respeito e gratidão serão pra vida toda! Meu agradecimento especial a você Flávia Delella que foi um anjo que Deus me enviou. Obrigada pelo tempo, atenção, ensinamentos e conselhos. Obrigada por aceitar e me encorajar sempre.

Aos companheiros de laboratório, Maira, Bruno e Brenda pela valiosíssima ajuda nos momentos finais deste trabalho, sem a ajuda de vocês jamais conseguiria chegar até aqui. Com vocês aprendi o verdadeiro significado de trabalho em equipe e solidariedade. Muito obrigada pelo suporte emocional (Maira principalmente), intelectual e tantos outros mais que me mantiveram forte e me ajudaram a continuar em frente.

Ao querido companheiro Jorge, pela paciência, pelo incentivo e compreensão da ausência e da distância, nessa fase tão importante de minha vida.

A minha dócil e inseparável companheira Belly.

Agradecimentos

À professora Dra Adriane Wasko, que me deu a oportunidade, através do Curso de Férias, de conhecer pessoas que pudessem ajudar a realizar meu sonho.

Ao laboratório de matriz extracelular. Caros amigos: Brenda, Bruno, Helga, Fernanda, Máira, Alexandre, Sergio Alexandre (Pei), Ketlin, Amanda, Ana Carolina, Jaqueline, Carina, Flávia, Caroline, Prof. Sérgio, Prof. Justulin. Agradeço a todos vocês por toda a ajuda durante esta etapa, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigado pela companhia, pelos cafés, almoços e todas as conversas que tivemos nestes últimos dois anos.

Aos ICs Jrs Felipe, Maria Eduarda e Isabelle, pelas conversas, pelos ensinamentos de viver com vocês e principalmente pelo respeito, confiança e educação que sempre confiaram.

Aos amigos e amigas que souberam compreender a ausência e estimularam esta conquista. Em especial Juh e Alana, vocês que muito me encorajaram e aguentaram todas minhas crises e não me deixaram cair nos momentos de dificuldades, estiveram sempre do meu lado ou *on line* com uma palavra de conforto, esperança e fé...

Aos companheiros e amigos de trabalho Luciano e Thaís pelas traduções nas altas horas (e ainda mandava palavra errada) correções e dúvidas de ortografia e afins, as trocas de aulas juntamente com a Selma e claro... todo apoio, compreensão e os conselhos em parceria com Bruno e as muitas risadas e os bons momentos.

Aos meus Alunos da ETEC "Astor de Mattos Carvalho", em especial àqueles que me acompanharam, aceitaram minha loucura e vieram até Botucatu ajudar a dar vida ao Curso de Férias e hoje seguem na área de Biologia. Quanto orgulho de vocês, em especial João Marcos e Mirian Carolini, que aguentaram meu mau humor, assistiram inúmeras vezes seminários e apresentação de Projeto que iria apresentar, fora do horário de vocês...Obrigada pelas dicas e o conselho: "seja como você é na sala com a gente...Ah e respira.. Você está falando muito rápido".

À Jaque que me acolheu todas as vezes que precisei em sua casa e após sua viagem Ketlin, sempre companheira e parceira das correrias e desabafos, estava ali sempre com um sorriso e me colocando pra cima e junto com Priscila e Patrícia.

Ao Prof. Sérgio Felisbino, pelas palavras na hora que mais precisei, naquele dia eu estava disposta a largar tudo, e por um milagre Deus te conduziu a sair de sua sala e levar a sua Livre Docência para ler e me fez enxergar que dificuldades no caminhos todos nós temos, jamais conseguiria expor nesse pedaço de papel a minha admiração e eterna gratidão,

À Dona Maria Helena e ao Senhor Moacir, por terem me acolhido e oferecido sua casa nos dias em que não tinha onde ficar, entre uma reunião a outra entre Botucatu e Cabrália, que Deus lhes abençoe sempre.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, pelo empenho constante na melhoria do Programa.

Aos demais colegas do Departamento de Morfologia, IBB, Unesp de Botucatu.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela educação e competência impecáveis com que desempenham sua função. E também especialmente aos técnicos José Eduardo, Ricardo, Vivian e Keila. À secretária Luciana e também a Dona Terezinha (Dona Tera).

Aos professores que aceitaram o convite para constituírem a banca examinadora desta dissertação. Obrigada por contribuírem com a minha formação!

Aos professores Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima , Dr. Luis Antonio Justulin Junior, e Dra. Arielle Arena, pela participação na fase da minha qualificação e pelas contribuições científicas.

Aos professores do Departamento de Morfologia pelos ensinamentos e carinho.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta que deveriam estar aqui e por erro meu não foram citados, peço que me desculpem!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURASvii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. Introdução	01
1.1 A Glândula Prostática.....	02
1.2 Elementos do Estroma Prostático e a Matriz Extracelular.....	05
1.3 Interação Epitélio Estroma.....	09
1.4 O Câncer de Próstata.....	11
1.5 O Estudo do Câncer de Próstata Utilizando Cultura de Células.....	13
1.5.1 Células Tumorais Prostática: LNCaP.....	14
1.5.2 Células Tumorais Prostática: PC-3	16
1.5.3 Estudos <i>In vitro</i> utilizando linhagens de CaP e componentes da Matriz extracelular ..	17
2. Justificativa e Relevância do Tema Proposto.....	20
3. Objetivos.....	21
4. Material e Métodos.....	22
5. Resultados.....	27
6. Discussão.....	38
7. Conclusões Gerais.....	42
8. Referências Bibliográficas	43

Lista de Abreviaturas

AgNO₃: Nitrato de Prata

AR: Receptor de Andrógeno

CaP: Câncer de próstata

CML: Célula Muscular Lisa

DATASUS/SAI: Departamento de Informática do SUS/Sistema de Informação Ambulatorial

DHT: Di hidrotosterona

EGF: Fator de Crescimento Epitelial

ER: Receptor de Estrógeno

FAC: Fibroblastos Associados ao Câncer

Fb: Fibroblastos

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblasto

H/E: Hematoxilina e Eosina

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MEC: Matriz Extracelular

MMPs: Metaloproteinases de Matriz

MMP-2: Metaloproteinase de Matriz -2

MMP-9: Metaloproteinase de Matriz -9

NIP: Neoplasia Intraepitelial Prostática

NOR: Região Organizadora de Nucléolo

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PSA: Antígeno Específico Prostático

SFB: Soro Fetal Bovino

T: Testosterona

TGF: Fator de Crescimento de Transformação

TN: Tenascina

WH: *Wound Healing*

RESUMO

A próstata é uma glândula anexa do sistema genital masculino, encontrada apenas em mamíferos, cuja principal função é produzir parte do fluido seminal. As lesões prostáticas surgem mais comumente em homens de meia idade e o câncer prostático (CaP) é o mais diagnosticado e a segunda causa de mortes por câncer entre os homens na América e nos países da Europa Ocidental. O microambiente extracelular trata-se de uma complexa rede que compreende a matriz extracelular (MEC) e moléculas reguladoras. A MEC possui papel fundamental na regulação de numerosos eventos celulares, tais como adesão, proliferação, diferenciação, entre outros. Um fino equilíbrio é mantido entre a síntese e degeneração de seus componentes, e quando desregulado pode causar dano tecidual e câncer. Na próstata, as interações entre o tecido epitelial e seu estroma são responsáveis em manter a função fisiológica normal, por meio de restrições proliferativas e migratórias. Quando o câncer se desenvolve, células transformadas perdem essas restrições, enquanto o estroma se adapta para sustentar a “função” do tumor. Sabe-se que as células tumorais com potencial invasivo adquirem fenótipo migratório associado ao aumento na expressão de genes envolvidos na motilidade celular, permitindo a essas células responder a sinais oriundos do microambiente tumoral. Assim, o nosso estudo teve como objetivo estudar a ação da fibronectina, uma molécula de adesão da MEC, sobre a migração de células tumorais prostáticas e a expressão de moléculas envolvidas nesse processo. Para isso, realizamos a exposição das células LNCaP e PC-3 à fibronectina na concentração de 25 µg/mL e analisamos viabilidade celular, morfologia, número total de nucléolos, atividade e localização das metaloproteinases de matriz -2 e -9 e o processo de migração celular. A exposição à fibronectina não alterou viabilidade celular e morfologia, mas aumentou a quantidade de nucléolos, assim como a marcação e a atividade das MMPs -2 e -9 e diminuiu a capacidade de migração nas células LNCaP e PC-3. Novos estudos estão sendo realizados em nosso laboratório para melhor entender a influência da fibronectina também sobre a expressão de microRNAs. Esses resultados corroboram com estudos que mostram o papel bivalente da fibronectina na carcinogênese, ora atuando como um supressor tumoral, ora como um ativador da carcinogênese.

Palavras Chave: Próstata, Câncer, Migração celular, MMPs, Cultura Celular.

ABSTRACT

The prostate is a gland attached to the male genital system, found only in mammals, whose main function is to produce part of the seminal fluid. Prostatic lesions appear most commonly in middle-aged men and prostate cancer (PCa) is the most commonly cancer diagnosed and the second leading cause of cancer deaths among men in America and in Western European countries. The extracellular microenvironment is a complex network comprising extracellular matrix (ECM) and regulatory molecules. The ECM has a fundamental role in the regulation of many cellular events, such as adhesion, proliferation, differentiation, among others. A fine balance is maintained between the synthesis and degeneration of its components, and when unregulated can cause tissue damage and cancer. In the prostate, the interactions between the epithelial tissue and its stroma are responsible for maintaining normal physiological function through proliferative and migratory restrictions. When cancer develops, transformed cells lose these restrictions, while the stroma is adapted to support the "function" of the tumor. It is known that tumor cells with invasive potential acquire migratory phenotype associated with increased expression of genes involved in cell motility, allowing these cells to respond to signals from the tumor microenvironment. Thus, our study aimed to study the action of fibronectin, an ECM adhesion molecule, on migration of prostate cancer cells and the expression of molecules involved in this process. To achieve this goal, we performed the exposure of LNCaP and PC-3 cells to fibronectin in the concentration of 25 mg / mL and analyzed cell viability, morphology, total number of nucleoli, location and activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 and the process of cell migration. Exposure to fibronectin did not alter cell viability and morphology, but increased the amount of nucleoli, as well as marking and the activity of MMP -2 and -9 and decreased migration capacity in LNCaP and PC-3 cells. Further studies are being conducted in our laboratory to better understand the influence of fibronectin also on the expression of microRNAs. These results are consistent with studies showing the bivalent role of fibronectina in carcinogenesis, time acting as a tumor suppressor, time as an activator of carcinogenesis.

Key Words: Prostate, Cancer, Cell Migration, MMPs, Cell Culture.

1. Introdução

O câncer é um problema de saúde mundial. Não oponente o amplo avanço do conhecimento em relação ao diagnóstico e tratamento da doença, ainda permanece entre as maiores causas de morbidade e mortalidade (DATASUS/SIA). A incidência de câncer no mundo cresceu 20% na última década, e espera-se para 2030, 27 milhões de casos novos de câncer (DATASUS/SIA). No Brasil, de acordo com o INCA, em 2014 houve 580 mil casos novos da doença, sendo 69 mil relativo ao câncer de próstata (CaP). O CaP é o primeiro em incidência e a segunda causa de morte por câncer entre os homens na América e nos países da Europa Ocidental (Siegel et al., 2014; Rittmaster et al., 2009), totalizando mais de 200.000 óbitos anualmente no mundo inteiro (Wang et al., 2011).

Neste sentido, projeções alarmantes mostram aproximadamente o surgimento de 1,7 milhão de novos casos de CaP e que 0,5 milhão de mortes são estimadas para o ano de 2030 (Center et al., 2012), gerando gastos excessivos aos sistemas de saúde pública, com números igualmente alarmantes de custos de 8 bilhões de dólares anualmente (11% dos custos para o tratamento de todos os cânceres) e 81.658 dólares por paciente, desde o diagnóstico até o óbito, nos EUA (Racioppi et al., 2012).

As taxas de incidência do CaP são superiores em cerca de seis vezes nos países desenvolvidos, em comparação aos países em desenvolvimento (INCA, Estimativa 2014). Alguns fatores elevam as chances de um homem desenvolver o CaP, tais como: a idade (homens mais velhos, com mais de 50 anos de idade, têm maiores chances de desenvolverem a doença); a etnia (os descendentes africanos são os indivíduos que mais desenvolvem o CaP); o histórico familiar (homens com casos de CaP na família têm o risco de desenvolver a doença aumentado em 2 a 3 vezes); a dieta (homens obesos, com dieta rica em gordura animal apresentam maior pré-disposição); além da influência dos componentes genéticos e de fatores epigenéticos (Glass et al., 2013).

O estudo do câncer de próstata (CaP), reveste-se de grande relevância clínica, em função da sua elevada incidência e de altas taxas de curas em pacientes quando a doença é detectada em fases iniciais (Srougi, 2008).

1.1 A Glândula Prostática

A próstata é uma glândula sexual encontrada nos mamíferos e, nos homens, tem como função a produção do líquido prostático que compõe parte do sêmen. O líquido prostático é composto por um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolisinase, enzimas específicas e outros fatores (Marker et al., 2003). Esta secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado além de possuir enzimas, nutrientes e gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal e garantem a motilidade dos espermatozoides (Aumüller & Seitz, 1990). Em algumas espécies, a próstata ainda produz proteínas importantes para a formação do “plug copulatório”, o qual atua como uma proteção contra a superfecundação (Cunha et al., 1987). No homem, o principal componente da secreção prostática é o antígeno específico prostático (PSA), uma serina pertencente à família das calicreínas, proteases importantes para a dissolução do coágulo seminal (Wang et al., 2011).

Anatomicamente, a próstata está localizada na parte baixa do abdômen, inferior à bexiga urinária e anterior ao intestino reto e envolve parte da uretra, como mostra a Figura 1. No homem, a uretra possui de 15 a 20 cm de comprimento e suas três regiões são denominadas de acordo com estruturas por onde ela passa: uretra prostática (região que possui de 2 a 4 cm de comprimento, fica totalmente envolvida pela próstata, é revestida por epitélio de transição e nela se abrem muitos pequenos ductos da próstata como o utrículo e o par de ductos ejaculadores), uretra membranosa (possui apenas de 1 a 2 cm de comprimento, passa pela membrana perineal (diafragma urogenital), é revestida por epitélio que varia entre colunar estratificado e colunar pseudoestratificado) e uretra esponjosa (parte mais longa da uretra com até 15 cm de comprimento, passa por toda extensão do pênis, terminando na glândula peniana como orifício externo da uretra) (Gartner & Hiatt, 2003; INCA, 2014).

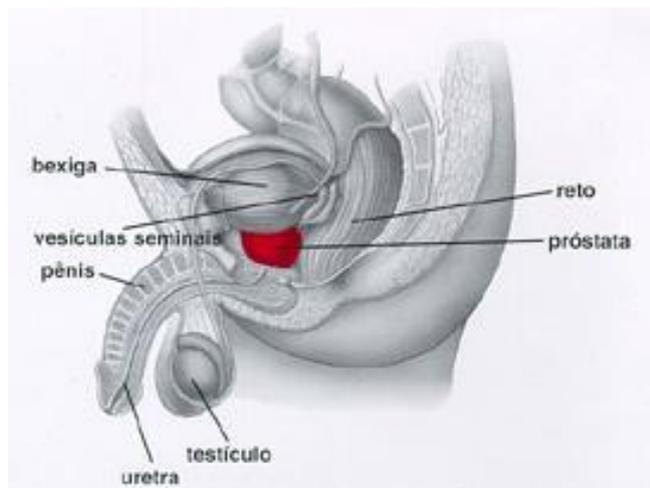


Figura 1: Aparelho genital masculino ilustrando a localização da próstata (destacada em vermelho).

Fonte: INCA, 2014.

A próstata humana possui estrutura compacta, sem lobos distintos e pesa aproximadamente 20g. Morfologicamente, a próstata humana é dividida em três conjuntos de glândulas túbulo-alveolares: 1) glândulas da zona central; 2) glândulas da zona periférica; 3) glândulas da zona de transição (Mcneal, 1981; De Marzo et al., 1998; Roy-burman et al., 2004).

Comparativamente, a próstata é reconhecida por diferenças anatômicas e bioquímicas nas diferentes espécies de mamíferos, porém, apresenta arquitetura tecidual uniforme. A próstata de mamífero adulto é constituída de dois componentes principais, o epitelial e o estromal, ambos regulados por hormônios (Kindiblon, 2003; Marker et al., 2003). Os elementos glandulares se organizam para formar alvéolos e ductos excretores, revestidos por células secretoras cúbicas ou cilíndricas altas. Abaixo destas células há uma camada de células basais (Billis, 2003). A arquitetura do compartimento estromal serve como suporte estrutural para o epitélio da glândula (De Marzo et al., 1998).

O estroma da próstata humana e de rato é em grande parte composto por células musculares lisas (CML). Essa camada é tão espessa na próstata humana quanto na de rato. Porém, a razão entre as células estromais e epiteliais é mais alta na próstata humana. A camada estromal também contém fibroblastos (Fb), linfócitos, células endoteliais e neuronais (Marker et al., 2003). Observações comparativas do desenvolvimento prostático demonstram que a morfogênese, processo dependente de testosterona, ocorre de maneira análoga em

roedores e humanos (Timms et al., 1994). A histologia da glândula prostática humana está ilustrada na Figura 2.

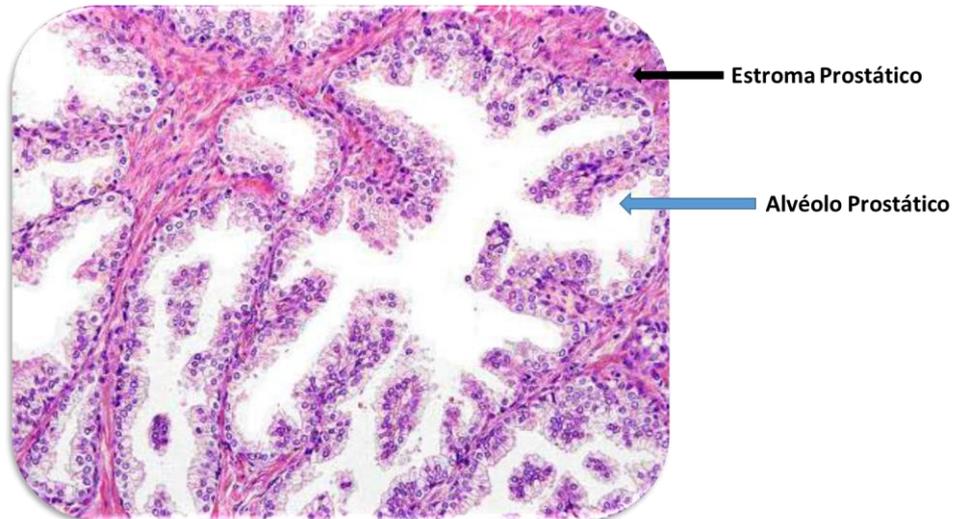


Figura 2: Corte histológico da próstata humana corado com hematoxilina/eosina. Fonte: Duarte, 2010.

Pode-se assim observar que o epitélio prostático é composto por cinco tipos celulares: **células epiteliais secretoras** (revestem o lúmen dos alvéolos prostáticos, expressam altos níveis de receptor de andrógeno (AR) e são responsáveis pela produção e secreção do líquido prostático); **células epiteliais basais** (formam uma monocamada sobre a membrana basal, envolvendo o epitélio prostático e constituem a principal população de células proliferativas do epitélio da glândula prostática adulta); **células neuroendócrinas** (aparecem em menor quantidade e secretam grande variedade de fatores de crescimento, que possivelmente, afetam o desenvolvimento e a manutenção do tecido prostático); **células do tipo stem cells** (são células candidatas a célula tronco, ainda não diferenciadas, são raras e parecem estar localizadas na camada de células basais) e **células transitórias amplificadoras** (expressam característica entre células basais e secretoras e podem ser progenitoras ainda não diferenciadas) (Oldridge et al., 2012) (Figura 3).

As células secretoras geralmente são classificadas como cilíndricas altas, com citoplasma contendo principalmente complexo de Golgi, retículo endoplasmático granular, grânulos de secreção e mitocôndrias. Além de produzirem a secreção, essas células também podem armazená-la devido ao extenso pregueamento do epitélio secretor (Mcneal, 1981; Garraway et al., 2003). Já as células basais encontram-se entremeadas às células epiteliais

secretoras, são menores e achatadas ou arredondadas (Jesik et al., 1982; Garraway et al., 2003).

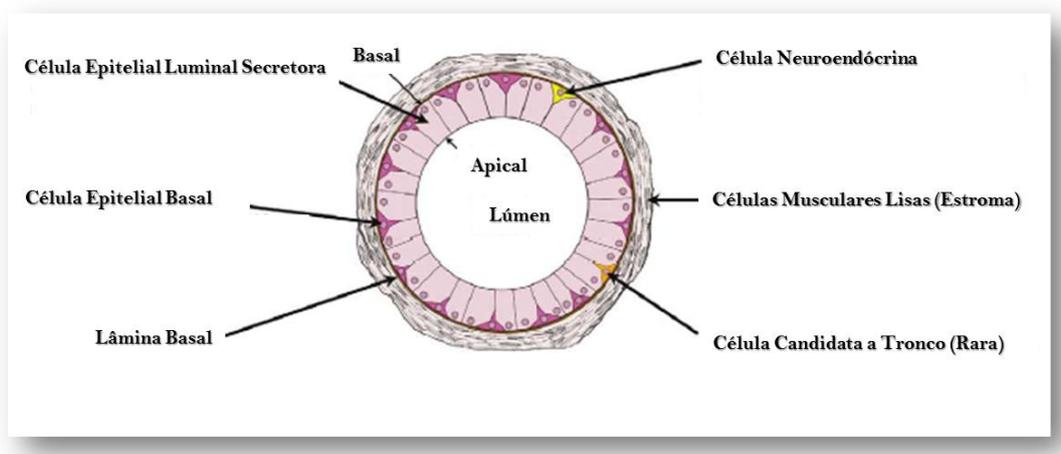


Figura 3: Tipos celulares da glândula prostática. Fonte: Marker et al., 2003.

1.2 Elementos do Estroma Prostático e a Matriz Extracelular

A membrana basal está localizada entre o epitélio e o estroma (Figura 3), sendo seus principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (Knox et al., 1994).

O estroma prostático, que envolve os ductos e os alvéolos glandulares, é composto por três principais tipos celulares: as CMLs, os Fbs e miofibroblastos, além de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Marker et al., 2003). Os Fbs e as CMLs possuem como principal função sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular (MEC) (Tuxhorn et al, 2001). Durante as modificações da glândula no desenvolvimento do câncer, o estroma torna-se reativo e é composto predominantemente por miofibroblasto/Fb, com redução significativa ou completa perda de todo músculo liso diferenciado (Tuxhorn et al., 2002).

A CML é o principal componente celular do estroma prostático, pois além de ocupar um grande volume nesse estroma, é responsável pela contração da glândula durante a ejaculação. Essa célula também desempenha a importante função de criar um ambiente propício para a manutenção do epitélio em situações normais ou patológicas, estando envolvida, por exemplo, na estruturação e reorganização do estroma frente à uma castração (Vilamaior et al., 2000), atuando provavelmente nas interações entre o epitélio e o estroma (Cunha et al., 1996).

Os tecidos não são feitos exclusivamente por células, uma parte substancial do seu volume é o espaço extracelular, que é em grande parte preenchida por uma complexa rede de macromoléculas, que constituem a MEC (Figura 4). As macromoléculas que compõem a MEC são produzidas localmente pelas células adjacentes, e estas auxiliam na sua organização e nas propriedades físicas dos tecidos. Além disso, estas macromoléculas exercem um papel complexo ativo na regulação do comportamento das células (Alberts et al., 2002).

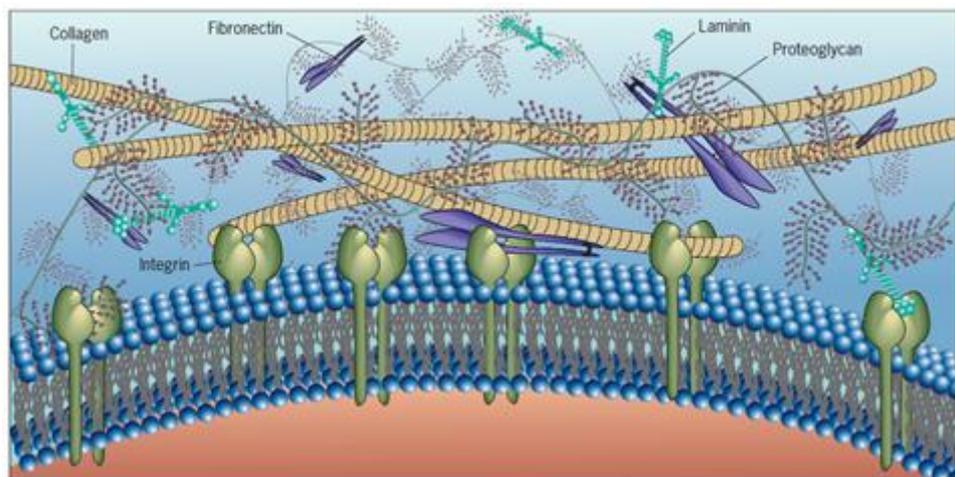


Figura 4: Esquema de organização dos componentes da matriz extracelular. Fonte: (Karp, 2005).

Os elementos da MEC, tais como, proteínas estruturais, proteoglicanos de ácido hialurônico e uma variedade de glicoproteínas interagem entre si formando um agregado que influencia nas propriedades mecânicas dos tecidos e no fenótipo das células que neles residem (Byron et al., 2013). Fatores responsáveis pela síntese e pela renovação dos componentes da MEC são determinantes na sua composição final e alterações nesses componentes ou na sua organização possuem impacto significativo sobre o fenótipo celular (Lu et al., 2011).

Cada tipo de tecido tem um conjunto específico de componentes que são organizados de forma a contribuir em suas propriedades mecânicas e na organização e fenótipo das células que nele residem (Byron et al., 2013). A ligação de células com a MEC é essencial para a manutenção da integridade dos tecidos. Assim, sustentando as células estromais prostáticas, existe uma importante MEC composta principalmente por fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas, tais como fibronectina e laminina (De Carvalho & Line, 1996; Vilamaior et al., 2005).

A fibronectina é uma grande glicoproteína, com funções críticas em processos celulares, tais como adesão, migração, diferenciação e proliferação (Hynes, 1992). Estruturalmente, a fibronectina possui 440 KD, é formada por duas cadeias polipeptídicas, unidas por um par de pontes dissulfeto de cada sub-unidade C terminal. Existem pelo menos vinte cadeias distintas de fibronectina, todas geradas por um único gene, por meio do processo de splicing alternativo (Kaspar et al., 2006). Sintetizada por uma variedade de células importantes no reparo tecidual, incluindo fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, seus domínios são capazes de interagir entre si ou com outras moléculas da matriz, receptores de superfície celular e glicosaminoglicanas (Singh et al., 2004).

A super expressão da fibronectina foi observada em diferentes tipos de carcinoma (Torbenson et al., 2002; Han et al., 2006). Por influenciar uma variedade de processos celulares através das interações com outras moléculas, incluindo integrinas e outros receptores de superfície celular, as quais subsequentemente modulam a transdução de sinal no interior das células, esta glicoproteína se faz altamente relevante também nos processos de metástase e sobrevivência celular das células tumorais (Hynes, 1992; Malik et al., 2010). Maity e colaboradores (2011) demonstraram que células tumorais humanas de câncer de mama cultivadas em superfície recoberta com fibronectina tiveram a expressão e a atividade da metaloproteinase de matrix -9 aumentadas via sinalização mediada por integrina.

A laminina é a glicoproteína mais abundante nas membranas basais (Timpl, et al., 1987; Springer, 1990). Essa família de proteínas de matriz possui grandes estruturas, em forma de cruz, que atravessam a lâmina basal e ligam-se, por um lado, a receptores específicos na superfície das células e, por outro a componentes da matriz, como colágeno tipo IV (Junqueira & Carneiro, 2012). A molécula de laminina contém várias propriedades que protegem diferentes oligopeptídeos, motivo responsável por diversos efeitos como adesão, proliferação e migração celular (Lochter & Bissell, 1995). Acredita-se então que em cultura altera crescimento, sobrevivência, morfologia, diferenciação e motilidade de vários tipos celulares (Cotran et al., 2000).

O colágeno constitui uma família de proteína alongada, sendo o componente mais abundante da MEC, o qual constitui 25% das proteínas total do corpo e atua na manutenção da sua integridade e resistência à elasticidade da parede vascular (Plenz et al., 2003; Junqueira & Carneiro 2012), formando uma rede de sustentação em vasos sanguíneos humanos (Sthebens, 1996). O genoma humano contém 42 genes distintos que

codificam diferentes cadeias α de colágeno (Alberts et al., 2002) e diferentes combinações destes geram cerca de 28 tipos diferentes de colágenos (Gordon & Hahn, 2010). Desses, treze tipos são encontrados em vasos sanguíneos ou expressos por suas células (Plenz et al., 2003), sendo o tipo I, III e IV predominantes (Bosman & Stamenkovic, 2003; Lodish et al., 2004; Elliott et al., 2005).

O colágeno tipo I possui moléculas que se associam paralelamente formando uma rede, o qual também forma as fibrilas, que são visíveis apenas ao microscópio eletrônico. As fibrilas por sua vez se agrupam e formam uma delgada fibra, chamada de fibras reticulares do conjuntivo. Nesse tipo de colágeno as fibras são mais espessas e frequentemente se associam, formando feixes de fibras com até 20 micrometros de diâmetro, constituindo as fibras de colágeno do tecido conjuntivo (Junqueira & Carneiro, 2012).

O colágeno do tipo IV possui tripla hélice que se associam formando estruturas com grau de polarização, o qual as moléculas se associam pelas extremidades formando uma rede. Sua distribuição se encontra nas lamínas basais (Junqueira & Carneiro, 2012).

As metaloproteinases de matriz (MMPs), endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, são capazes de degradar os componentes da MEC, como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Essas enzimas são secretadas na forma de um precursor latente, chamadas de zimógeno ou pró-MMPs. As MMPs latentes necessitam de uma ativação antes de se tornarem capazes de clivar os elementos da MEC. O processo de ativação ocorre no espaço extracelular por outras enzimas, tais como a plasmina, triptase e a quimase e também por outras MMPs ou por autoclivagem e auto-ativação (Stamenkovic, 2000).

Estudos recentes ajudaram a elucidar os mecanismos que envolvem as células tumorais e o processo da metástase. O evento mais crítico na metástase é o estabelecimento de uma relação entre as células tumorais e os componentes estromais do tecido invadido, para o estabelecimento da colônia tumoral. Uma característica das células tumorais em adaptar-se a diferentes tecidos é a habilidade em remodelar os componentes da MEC do tecido invadido. Essa característica é atribuída à secreção de uma variedade de proteases, principalmente as MMPs (Stamenkovic, 2000).

De acordo com a organização dos domínios, substrato que degradam e similaridade seqüencial, as MMPs são divididas em 5 grupos principais: 1) as collagenases intersticiais, 2)

as gelatinases, 3) as estromelinas, 4) as MMPs de membrana e 5) as MMPs que não se enquadram em nenhum dos grupos anteriores (Stamenkovik, 2000).

A expressão de MMPs pode ser analisada por várias técnicas. Uma técnica muito usada é a zimografia, que identifica as MMPs através da degradação de seus substratos específicos e de seu peso molecular. Essa técnica permite identificar se a MMP está em sua forma ativa ou latente, como pró-MMP (Snoek-van Beurden & Von den Hof, 2005).

Hoekstra e colaboradores (2001) sugerem o uso da expressão de MMPs nos tecidos como uma ferramenta para o diagnóstico de tumores, devido à correlação entre a expressão de MMPs no tumor e o estágio do tumor. Um exemplo é o aumento nos níveis de MMP-2 em pacientes com câncer prostático, quando comparado aos níveis de homens saudáveis (Hoekstra et al., 2001).

As MMPs 2 e 9 (gelatinases) são enzimas consideradas importantes por contribuírem no processo invasivo metastático e angiogênico de vários tumores, incluindo o câncer de próstata. Essa contribuição deve-se, principalmente, à degradação do colágeno do tipo IV, principal constituinte das membranas basais. Vijayababu e colaboradores (2006) demonstraram que o quercetin, um flavonóide comumente presente em muitos vegetais, é um potente inibidor das MMPs 2 e 9 em cultura de células de CaP (PC3). O estudo também demonstrou que as células tratadas com quercetin expressaram um aumento na atividade da pró-enzima MMP-9, quando comparado ao grupo controle, indicando que a conversão da pró-enzima MMP-9 a MMP-9 é inibida pelo flavonóide.

Essas evidências quanto à participação das MMPs no caráter metastático dos tumores demonstram que a inibição da atividade das MMPs, por inibidores naturais ou sintéticos, pode ser um importante caminho para o tratamento do CaP independente de hormônios (Lokeshwar, 1999; Hidalgo & Eckhardt, 2001).

1.3 Interação Epitélio-Estroma

Experimentos com cultura de células epiteliais e estromais uterinas revelaram que interações entre o mesênquima em desenvolvimento e o epitélio são recíprocas. Lejeune e colaboradores (1981) mostraram que quando o epitélio uterino foi retirado, as células estromais não promoveram a decidualização uterina, mesmo em resposta ao estrógeno e progesterona. Esses resultados indicam que o epitélio é provido de sinais que induzem a

resposta estromal ao tratamento hormonal. Assim como no útero, as interações entre o epitélio e o mesênquima durante o desenvolvimento prostático e entre o epitélio e o estroma na glândula adulta são mediadas por fatores de crescimento, de diferenciação e proteases, que modulam o microambiente local (Cunha et al., 2004).

Os elementos estromais e epiteliais estabelecem uma rede de sistemas de sinalização intracelular, incluindo ampla variedade de fatores solúveis e insolúveis, e seus receptores modulam a proliferação e a diferenciação das células da glândula prostática (Cunha et al., 2002). Desta forma, a interação epitélio-estroma tem importante papel na manutenção da estrutura e funcionamento da glândula prostática (Ekman, 2000).

A organogênese da próstata também é dependente de interações entre o estroma e o epitélio, de tal modo que a morfogênese e a diferenciação, tanto do epitélio quanto do estroma, fracassam se esses compartimentos crescem separadamente (Farnsworth, 1999; Marker et al., 2003). As interações parácrinas entre o epitélio e o estroma, mais especificamente entre o epitélio e a musculatura lisa ao seu redor, são de importância fundamental durante a morfogênese no embrião e estão claramente envolvidas na homeostase da glândula no indivíduo adulto (Cunha et al., 1996; Hayward et al., 1997). Durante o desenvolvimento da próstata, os complexos processos morfogenéticos exigem uma mediação ativa das células estromais, enquanto a manutenção da diferenciação do tecido epitelial adulto pode ser regulada, em grande parte, pela MEC. Trabalhos sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais (Nemeth & Lee, 1996).

Presente em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação celular e na função geral dos epitélios glandulares (Lin & Bissell, 1993), a comunicação entre as células do epitélio e as células estromais adjacentes é essencial também para a manutenção da integridade normal e das funções da glândula prostática (Taylor & Risbridger, 2008). Essas interações fornecem restrições proliferativas e migratórias que definem as informações morfológicas e são mediadas por fatores de crescimento e extracelulares (Franco e Hayward, 2012).

Na próstata do indivíduo adulto, o estroma controla a homeostasia epitelial via regulação androgênica (Cunha et al., 1987; Hayward & Cunha, 2000). Essa interação parácrina é descrita em numerosos estudos que mostram que a resposta epitelial aos andrógenos é mediada indiretamente através de fatores estromais solúveis (Cunha & Chung,

1981). Porém, sabe-se que durante o processo de carcinogênese essas interações são perturbadas e ocorre a diminuição ou a total ruptura da interação entre as células epiteliais e o estroma, resultando no crescimento descontrolado e nas transformações malignas do epitélio (Olumi et al., 1999).

Possíveis danos no estroma poderiam gerar defeitos na organização do tecido prostático, levando à indução da carcinogênese (Sonnenschein & Soto, 2008). Alguns desses danos podem induzir o desenvolvimento do câncer que surge como resultado da interrupção da sinalização intercelular que mantém a organização do tecido, o reparo e a homeostase (Barcellos-Hoff & Ravani, 2000).

Quando o câncer se desenvolve, células epiteliais transformadas perdem estas restrições, enquanto o estroma se adapta para “apoiar” a função do tumor. A próstata é um bom exemplo de um órgão que depende de seu estroma circundante durante o desenvolvimento normal e a progressão do câncer. Fibroblastos associados ao câncer (FAC) constituem um volume substancial do estroma tumoral e desempenham um papel crucial na manutenção do tumor (Franco & Hayward, 2012).

Com essas alterações, o estroma reativo fornece um micro ambiente apropriado para as células tumorais proliferarem e diferenciarem. Com isso, se faz necessário o entendimento do papel do estroma no CaP e das interações entre as células tumorais e o microambiente adjacente durante a iniciação e a progressão da doença, para o desenvolvimento e o sucesso de novas terapias (Taylor & Risbridger, 2008).

1.4 O Câncer de Próstata

O crescimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade funcional (secretora) e estrutural da próstata e das demais glândulas sexuais acessórias são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes e ocorrem através de interações recíprocas entre o estroma e o epitélio (Pour & Stepan, 1989; Kyprianou et al., 1996).

De acordo com Lee e colaboradores (1999) o controle da diferenciação e atividade prostática é muito complexa e dependente da somatória de vários fatores extrínsecos, sendo eles: hormonais, imunológicos, ambientais e genéticos e interpõem ainda com fatores intrínsecos, como a interação epitélio estroma, como mostra a Figura 5.

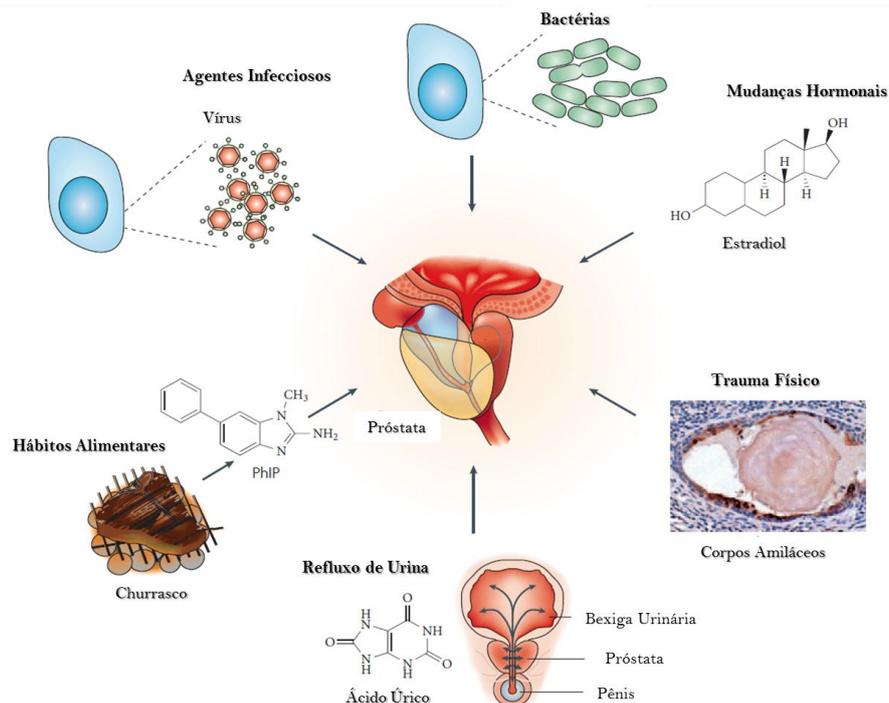


Figura 5: Fatores que influenciam a função prostática. Fonte: De Marzo et al (2007) modificado.

Assim fica evidente que a próstata é um excelente modelo para as verificações das interações epitélio-estroma e dos fatores hormonais que regulam a morfologia, a função, diferenciação, a morte e a atividade celular (Kyprianou & Isaacs, 1988; Marker et al., 2003). Mais do que isso, inúmeras evidências indicam que o desequilíbrio nessas interações é decisivo na instalação e na progressão das doenças que acometem o órgão (Tuxhorn et al., 2002).

A testosterona (T), principal hormônio androgênico, atua nas células epiteliais secretoras luminais via receptor de andrógeno. No citoplasma da célula prostática, a T é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α redutase. A DHT é cerca de 10 vezes mais potente que a T e também se liga ao receptor nuclear de andrógeno (Titus et al., 2014).

Além de sua importante função para a biologia da reprodução, a próstata pode ser local de origem de lesões como a Hiperplasia Prostática Benigna (HBP), Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP) e o CaP (Lee et al., 1999).

A HBP e o carcinoma prostático estão relacionados à falha no mecanismo de regulação do equilíbrio funcional entre os processos de proliferação celular e apoptose, com o prevaletimento do mecanismo de proliferação celular (Xie et al., 2000; Carson & Rittmaster, 2003). A HBP é um crescimento tumoral não neoplásico determinada por fatores de

crescimento com ação mitogênica, que resulta da hiperplasia tanto de células do estroma prostático como de células epiteliais glandulares (Kierszenbaum, 2008). Esse crescimento é estimulado pelo andrógeno DHT e resulta em arranjo nodular (Billis, 1997).

A NIP é uma lesão pré-maligna atípica do epitélio de revestimento dos ductos e alvéolos prostáticos, com potencial de ser precursora do carcinoma invasivo. Essa lesão caracteriza-se pela presença de células do epitélio prostático atípicas, irregularmente dispostas, com núcleos volumosos e nucléolos evidentes (Billis, 1997).

Dados de autopsias feitas em homens jovens vítimas de traumas oriundos de qualquer outro tipo de óbito não relacionada ao CaP, com idade aproximada de 30 anos, revelaram que 1 em cada 3 próstatas analisadas apresentaram alterações histológicas compatíveis com os estágios iniciais do CaP (Sakr et al., 1994). Em contraste ao surgimento histológico da doença, os sinais clínicos geralmente não surgem antes dos 50 anos de idade. A progressão entre o CaP pré-clínico e a doença clínica é bastante lenta e silenciosa, assim métodos preventivos e o acompanhamento clínico são indicados principalmente aos homens com pré-disposição ao desenvolvimento da doença (Rittmaster et al., 2009). À medida que o homem envelhece, essa incidência acentua-se, atingindo 60% a 70% dos homens com idade entre 80 e 90 anos e, hipoteticamente, todo aquele que ultrapasse os 100 anos de vida (Brawley et al., 2000).

A suspeita do CaP pode ser confirmada por alguma alteração na consistência da glândula ao exame de toque retal, por elevação dos valores de PSA (Antígeno Específico Prostático) ou ambas (Sánchez et al., 2007). O toque retal é o procedimento inicial para a avaliação, por possuir fácil realização apesar de se saber que há diferenças entre o observador (Sánchez et al., 2007). Quando necessário na investigação, a biópsia de próstata deverá ser requisitada pelo médico, principalmente se a suspeita do CaP seguir após a avaliação dos três importantes métodos de detecção: PSA, idade e toque retal (Ramirez et al., 2010). O PSA é uma glicoproteína sintetizada pelas células epiteliais prostáticas humanas que possui atividade relacionada com a liquefação do líquido seminal induzindo a viabilidade dos espermatozoides. Possui meia vida biológica de 52,8 horas sendo componente do tecido prostático saudável e do líquido seminal (Obralic et al., 2009).

Histologicamente, o CaP é uma neoplasia constituída por células cancerígenas que se originam dos alvéolos e ductos prostáticos, mostrando arranjo, graus de diferenciação e comportamento biológico variável (Billis, 1997). Essa lesão pode apresentar-se com

diferentes aspectos. Normalmente observa-se a formação de microócinos nos elementos glandulares, atingindo arranjo cribiforme, com a estruturação de glândulas no seu interior (Billis, 1997).

O uso de experimentos *in vitro* no estudo do CaP tem sido uma ferramenta importante, revelando a descobertas de novas moléculas e o envolvimento de moléculas já conhecidas no processo carcinogênico desta glândula (Sampson et al., 2013).

1.5 O Estudo do Câncer de Próstata Utilizando Cultura de Células

A utilização da técnica de cultura celular possibilita o estudo de mecanismos moleculares da célula e permite importantes avanços científicos na área médica. As linhagens celulares do CaP humano representam um modelo didático de estudos para as terapias hormonais, já que essas células são derivadas de foco metastático (Peehl, 2005; Golbano et al., 2008).

O estudo de culturas celulares *in vitro* possui como vantagens estudar o comportamento das células em condições controladas de replicação, uniformidade da amostra, exposição a fármacos em concentrações definidas e redução no número de animais utilizados em experimentos. Uma limitação para esse estudo é recriar *in vitro* o ambiente parácrino e endócrino encontrado *in vivo* (Sampson et al., 2013).

Os sistemas de cultura *in vitro* são amplamente empregados em pesquisas sobre o CaP e, mais recentemente, para análise de transcriptoma e proteômica, uma vez que as culturas reproduzem-se rapidamente e prontamente para os mais diversos tipos de pesquisas e análises (Myung & Sadar, 2012).

As primeiras linhagens de células epiteliais de tumor prostático humano a serem estabelecida espontaneamente foram: LNCaP, PC3 e DU145, originadas de metástase em linfonodo, ossos e cérebro, respectivamente, e continuam a ser as mais utilizadas (Bosland et al., 1996). Recentemente, algumas ferramentas foram introduzidas no estudo *in vitro* para a otimização e avanços na proximidade dos estudos *in vivo*. Como exemplo tem-se a técnica de cultura celular em três dimensões (3D) e a técnica de co-cultura das células epiteliais tumorais com células estromais (Sampson et al., 2013).

1.5.1 Células Tumorais Prostáticas: LNCaP

As células LNCaP (Figura 6) constituem uma linhagem celular advinda de células humanas comumente utilizadas no campo da oncologia, sendo essas dependentes de andrógeno e, assim constituindo o único modelo *in vitro* com crescimento sensível a andrógeno (Horoszewicz et al., 1980). Estas células foram isoladas em 1977 a partir de uma lesão metastática de adenocarcinoma da próstata humano derivadas da metástase em linfonodo supra clavicular esquerda de um paciente com 50 anos de idade, caucasiano. Estas células são epiteliais aderentes e crescem tanto agregadas formando *clusters* como isoladas em monocamada (Horoszewicz et al., 1980).

As células LNCaP produzem fosfatase ácida prostática e o antígeno específico prostático (PSA), além de expressarem AR, EGF e TGF α e β , entretanto receptores de estrogênio e progesterona não são detectáveis (Schuurmans et al., 1991).

As células LNCaP são aneuplóides e apresentam um conjunto completo de cromossomos humanos, incluindo o cromossomo Y. O cariótipo dessas células é visivelmente diferente daquele das células *HeLa*, que no passado foram frequentemente confundidas com alguma linhagem de células malignas estabelecidas. A manutenção constantemente alta do alto grau de poliploidia, assim como as principais características cariotípicas das culturas de LNCaP, examinadas por 20 meses ou durante aproximadamente 200 populações (passagens), sugere que a pressão da seleção exercida pelas condições de crescimento *in vitro* não eliminaram a heterogeneidade aparente dessas células (Nelson & Jow, 1990). Recentemente, o sequenciamento das células LNCaP revelou variação genética significativa e um grau de instabilidade genética que deve ser considerado ao trabalhar com esta linha celular (*Spans et al.*, 2012).

Morfologicamente, as células LNCaP (Figura 6), expandem-se agrupadas umas sobre as outras (processo denominado *cluster* em inglês). Sua morfologia consiste em células fusiformes e alongadas, núcleo grande e com cromatina condensada e geralmente é possível visualizar mais de um nucléolo. Por serem células epiteliais, mantêm grande contato célula-célula.

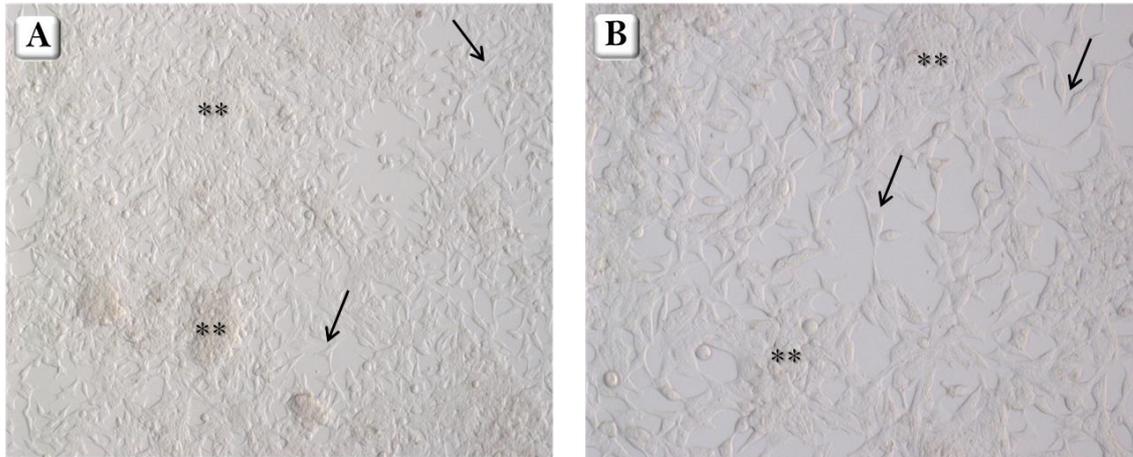


Figura 6: Células LNCaP. **A** e **B:** Visão geral das células LNCaP em confluência de aproximadamente 70%. Aumento: 10X e 20 X, respectivamente. Observar o crescimento da linhagem em monocamada (setas) ou agrupadas (**). As células LNCaP possuem formato alongado, com prolongamentos citoplasmáticos mais finos que a região central ocupada pelo núcleo. Fonte: Laboratório de Matriz Extracelular *In Vitro* IBB - Botucatu 2014.

1.5.2 Células Tumorais Prostáticas: PC-3

A linhagem de células PC-3 (Figura 7) foi estabelecida em 1979, a partir de metástase óssea de grau IV de CaP em homem branco de 62 anos. Estas células não respondem aos andrógenos, glicocorticoides ou fatores de crescimento de fibroblastos (Kaighn et al., 1979). Assim, as células PC-3 são independentes de andrógeno, expressam baixos níveis da enzima 5-alfa redutase e da enzima fosfatase ácida e não expressam PSA (Alimirah et al., 2006; Li et al., 2013).

Além disso, a análise cariotípica mostrou que as células PC3 são quase triploides, apresentando 62 cromossomos. Análise *Q-band* não mostrou nenhum cromossomo Y. Do ponto de vista morfológico, um estudo utilizando microscopia eletrônica revelou que essas células apresentam características de adenocarcinoma pouco diferenciado (Kaighn et al., 1979). Essas células têm características comuns às células neoplásicas de origem epitelial, com numerosas microvilosidades, complexos juncionais, núcleos anormais e nucléolo, muitas mitocôndrias, corpos lipoidais, podendo ser multinucleadas. (Kaighn et al., 1979).

Na expansão da linhagem PC-3 (Figura 7), o crescimento se dá em monocamada, onde é possível observar que o formato da maioria das células é poligonal, nucléolos abundantes e de aspecto granular, e apresentam um fenótipo alongado e fibroblastóide. Porém, diferente das células da linhagem LNCaP, algumas células se destacam pelo seu formato aberrante e presença de múltiplos núcleos.

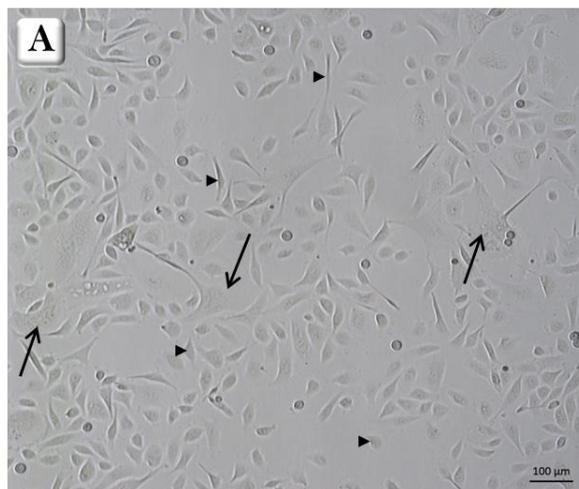


Figura 7: Células PC-3. **A:** Notar a ausência de padrão morfológico entre as células que constituem essa linhagem. Muitas apresentam formato fibroblastóide ou poligonais (cabeça de seta), outras são gigantes e multinucleadas (setas). Aumento: 10X. Fonte: Laboratório de Matriz Extracelular *In Vitro* IBB- Botucatu 2014.

1.5.3 Estudos *In Vitro* Utilizando Linhagens de CaP e Componentes da MEC

Os modelos que utilizam a interação de células cultivadas com proteínas da MEC, são bem confiáveis, uma vez que reproduzem o microambiente tecidual com mais semelhança e credibilidade do que em modelos de monocamadas, principalmente em estudo com CaP, onde a interação epitélio-estoma é significativamente importante (Coulson-Thomas et al., 2010). Procedimentos simples podem criar um modelo de cultura em monocamada mais conveniente para o estudo das interações célula-matriz. Assim, proteínas e enzimas que anteriormente não eram vistas no meio de cultura no qual as células em monocamada geralmente são cultivadas, chamado de meio condicionado, passam a ser vistas e observadas, pelas mesmas técnicas quando uma única proteína da MEC é adicionada ao meio de cultura (Moroz et al., 2013). Essas técnicas foram demonstradas em estudos onde diferentes proteínas, tais como fibronectina, laminina, colágeno I, colágeno IV, foram utilizadas.

Moroz e colaboradores (2013) verificaram se o componente fibronectina altera a expressão das enzimas MMP-2 e MMP-9 pelas linhagens de células epiteliais prostáticas humanas RWPE-1, LNCaP e PC-3. Estas células foram cultivadas até atingiram 80% de confluência e, em seguida foram expostas por 4 h a fibronectina. Posteriormente, o meio sobrenadante foi analisado por zimografia em gelatina. Os autores observaram que apenas

células RWPE-1 expressam quantidades detectáveis de MMP-9 quando cultivada em meio comum, e que a adição de fibronectina induziu a expressão de níveis elevados de MMP-2, em todas as linhagens celulares testadas. Dessa forma, concluiu-se que essas células (normais e tumorais) podem expressar atividade de MMP-2 quando em contato com componentes da MEC ou proteínas de plasma sanguíneo, tais como a fibronectina.

Sakko e colaboradores (2003) investigaram a influência do versican, uma molécula anti-adesiva da MEC para vários tipos de células mesenquimais e células nervosas, na adesão das células do CaP. O grupo utilizou linhagens celulares de adenocarcinoma prostático LNCaP, PC3 e DU145. O estudo constatou a perda de adesão dessas células à fibronectina, quando expostas a meio condicionado com versican. Em contraste, a fixação das células à laminina, um componente da membrana basal, não foi afetada pelo versican. A integridade das cadeias de condroitin sulfato e a habilidade de se ligar à sequência de peptídeos (Arg-Gly-Asp) na sequência da fibronectina foram essenciais para a inibição da adesão das células tumorais à fibronectina e confirmaram o papel anti-adesivo do versican.

Em estudo recente, Damodarasamy e colaboradores (2015) analisaram o comportamento de células prostáticas humanas normais, de HPB e de CaP cultivadas em contato com gel de colágeno extraído de cauda de ratos jovens ou senis. Tanto células normais, como células tumorais tiveram a taxa de proliferação aumentada quando cultivadas em contato com colágeno extraído da cauda de ratos senis. Ao examinar as diferenças na composição dos colágenos, o grupo descobriu que ambos possuem os mesmos componentes associados ao colágeno da MEC, porém o colágeno senil apresenta maior conteúdo de ácido hialurônico que o colágeno jovem. A adição de ácido hialurônico ao colágeno jovem aumentou significativamente a proliferação das células de HPB, mas não em células normais ou tumorais. Além disso, a análise histoquímica de tecidos prostáticos humanos apresentou maior expressão de ácido hialurônico em amostras de HPB, que em amostras de próstata normal ou de CaP. Portanto, esses resultados mostram que as mudanças na MEC envolvendo níveis de ácido hialurônico contribuem para o crescimento do epitélio da próstata com o envelhecimento.

Esses estudos mostram que a utilização da técnica de cultura celular tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que possibilita o estudo de mecanismos moleculares da célula e permitem importantes avanços científicos na área médica. Os estudos com linhagens celulares do CaP humano representam um modelo didático para o entendimento da relação

entre as células e os elementos da MEC e mostram como mudanças no contatos célula-célula e célula-matriz extracelular são claramente importantes na alteração dessas células.

2. *Justificativa e Relevância do Tema Proposto*

A próstata é uma glândula com fundamental participação no processo reprodutivo. Somado a isso, trata-se do órgão mais frequentemente acometido por neoplasias no homem, o que tem motivado estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinologia desse órgão. Atualmente, existem poucos estudos relacionando a importância dos elementos da MEC na migração das células tumorais prostáticas.

Os estudos *in vitro* permitem limitar o número das variáveis experimentais, sua execução é mais simples e mais rápida que a dos testes *in vivo* e podem substituir os animais ou, ao menos, servirem como um estudo precedente aos testes *in vivo*. Assim, torna-se extremamente interessante a elaboração de novos estudos *in vitro* relacionando a influência de elementos da MEC sobre os eventos de migração, invasão e interação em células tumorais prostáticas.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Considerando a importância da integridade na interação entre os componentes epiteliais e estromais para a manutenção da homeostase prostática e os efeitos do desequilíbrio dessa interação no desenvolvimento das afecções na glândula, objetiva-se avaliar a ação da fibronectina sobre o potencial migratório de células prostáticas tumorais humanas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar os índices de viabilidade celular das células LNCaP (linhagem de células tumorais dependentes de andrógeno) e PC-3 (linhagem de células tumorais independentes de andrógeno) cultivadas ou não em meio contendo fibronectina;
- ✓ Analisar o processo de migração dessas células quando cultivadas em meio contendo fibronectina, através de ensaio utilizando placas *transwell*;
- ✓ Localizar imunocitoquimicamente e comparar a intensidade de marcação das enzimas que degradam a MEC, MMP-2 e MMP-9 nas células cultivadas em meio contendo ou não fibronectina;
- ✓ Quantificar e comparar a atividade das enzimas MMP-2 e MMP-9 no meio de cultura das células expostas e não expostas à fibronectina, através da técnica de zimografia.
- ✓ Localizar e quantificar as Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) nas células LNCaP e PC-3 cultivadas ou não em meio contendo fibronectina.

4. Material e Métodos

4.1 Cultura de Células

4.1.1 Linhagens Celulares Epiteliais Prostáticas

Neste trabalho, foram utilizadas 2 linhagens celulares tumorais prostáticas (LNCaP e PC-3) adquiridas da empresa *American Type Cell Culture* (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) e que já faziam parte do banco de células do nosso laboratório.

As linhagens LNCaP e PC-3 foram mantidas em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™, EUA) a 10% e 1% de Antibiótico/Antimicótico 100X (Gibco/Invitrogen™, EUA). Durante a expansão das células, os meios foram trocados a cada 2 dias e o acompanhamento foi realizado ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Alemanha).

Todas as células foram expandidas em placas de cultura celular de poliestireno de 25cm² e 75cm² e mantidas em estufa com 5% de CO² em atmosfera úmida a 37°C. Quando essas células atingiram de 80% a 90% de confluência foram submetidas à tripsina (Gibco/Invitrogen™, EUA) 0,25% e transferidas para placas de cultura de 6 ou 24 poços (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) para a realização dos experimentos subsequentes.

4.1.2 Teste molecular para detecção de *Mycoplasma*

Um teste molecular para detecção de micoplasma foi realizado como medida preventiva antes de iniciar a exposição das diferentes linhagens celulares à fibronectina. O kit utilizado foi o *Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based* (Sigma-Aldrich™) e as indicações do fabricante foram seguidas durante a sua execução. Optamos em realizar o teste durante a expansão celular prévia à montagem das placas para os experimentos com fibronectina. Para isso, o sobrenadante celular foi coletado e preparado para a técnica de PCR em gel de agarose.

4.1.3 Exposição das células ao componente da matriz extracelular

As células LNCaP e PC-3 foram expostas ao elemento à fibronectina 25µg/mL (Sigma-Aldrich™) (Moroz *et al.*, 2013), dissolvida em meio de cultura específico.

Dessa forma, foram criados dois grupos experimentais para cada tipo celular: Grupo Controle (constituído por células cultivadas em meio de cultura padrão) e Grupo Fibronectina (constituído por células expostas à fibronectina).

As células cresceram em contato com esse elemento da MEC pelo período de 4 dias. Após esse tempo de exposição, o meio de cultura foi pipetado e salvo, as células lavadas com D-PBS (GIBCO/Invitrogen™) e processadas para a avaliação de viabilidade celular, morfologia e migração celular. Para a realização da técnica de Zimografia, foi utilizado apenas 1% de SFB durante a exposição à fibronectina, uma vez que o próprio soro já contém quantidade significativa de MMPs.

4.2 Análise da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada previamente ao preparo dos experimentos e somente placas com células que apresentaram viabilidade acima de 90% foram utilizadas. Posteriormente à exposição à fibronectina, a viabilidade celular também foi avaliada nas células tumorais e o resultado comparado à viabilidade das células não expostas. Para isso, as células foram tripsinizadas e amostras dessas células, tratadas com azul de tripano 0,4% (Gibco/Invitrogen™) (volume 1:1), contadas em câmara de Neubauer e visualizadas por microscopia de luz. Foram consideradas viáveis as células translúcidas e inviáveis as células marcadas com azul de tripano.

4.3 Coloração Histoquímica: Hematoxilina e Eosina

A técnica de coloração histoquímica permite analisar as evidências variáveis na morfologia e na atividade metabólica celular, além de alguns corantes específicos conseguirem diferenciar componentes fibrosos da matriz extracelular. Essas colorações estão fundamentadas no princípio ácido-base (Caputo, 2008). Na coloração de Hematoxilina/Eosina (H/E) por exemplo, a hematoxilina baseia na coloração azulada e a eosina é um ácido que cora componentes da célula em róseo. A hematoxilina tem caráter básico, ou seja, tem

afinidade por substâncias celulares ácidas (Copetti, 2004). Sendo assim, cora ácidos nucleicos, deixando o núcleo (DNA e RNA) e o Retículo Endoplasmático Rugoso (por causa dos ribossomos) em tom azul arroxeado (Atlas eletrônico de histologia, 2014). A eosina é ácida, tendo afinidade por locais onde há grande quantidade de componentes básicos, como proteínas (básicas pelo seu grupamento amina) e assim cora em tons laranja-róseo o citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias básicas das células (Copetti, 2004).

A técnica de H/E foi realizada adicionando primeiramente o fixador às células (que em nosso projeto foi o metanol P.A), nos poços contendo as células crescidas em lamínulas estéreis arredondadas de 12 mm por 8 minutos. Em seguida, as lamínulas foram passadas na bateria de álcool na sequência de 95%, 80% e 70% durante 1 minuto cada, lavadas por 30 segundos e transferidas para hematoxilina por 1 minuto. Após a lavagem em água corrente por 30 segundos foi realizada a transferência para o álcool 95%. Posteriormente foram coradas com eosina por 3 minutos e lavadas com água novamente por 30 segundos. Após a coloração, as células foram desidratadas em bateria crescente de álcool (70 %, 80% 90%, 100% I, 100% II, 100% III) e na sequência passadas durante 1 minuto em xilol, xilol I, xilol II. Para finalizar as lamínulas contendo as células foram montadas em lâminas de vidro identificadas, utilizando o meio de montagem [®]*Dako Faramount Aqueous*.

4.4 Detecção e Contagem das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO₃)

Essa técnica caracteriza-se pela reação química da prata metálica com as proteínas acídicas que compõem o complexo proteico nas Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).

O procedimento escolhido seguiu a técnica descrita originalmente por Howell & Black (1980), sendo utilizadas duas soluções: Solução A (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico; Solução B (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO₃ dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas, essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros a 4°C.

O protocolo para a coloração das RONs nas lâminas contendo as células foi adaptado daquele aplicado em cortes teciduais e seguiu as seguintes etapas: 1) passagem rápida das lâminas em HCl 1N a 60°C; 2) após secar as lâminas; pingou-se uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material que foi coberto com lamínula; 3) as lâminas foram

incubadas no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos, a mistura das soluções tornou-se marrom dourada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas.

Para a quantificação das RONS foi utilizado um microscópio Leica DM2500 conectado a uma câmera Leica DMC2900, sendo as análises morfológicas das imagens efetuadas em software LAS versão 4.5.0 para Windows 7. A frequência das RONS por núcleo foi determinada em um total de 150 células aleatórias visualizadas na objetiva de 20x em 5 diferentes campos, sendo um n de 3 lâminas para cada grupo experimental.

4.5 Ensaio de Migração Celular

Para avaliação do potencial migratório das células foram utilizados insertos BD BioCoat™ com poros de 8µm (BD Biosciences™) em placa de 24 poços. Na parte superior do inserto as células das linhagens tumorais semeadas na quantidade de 1×10^5 células para a LNCaP e 2×10^4 células para a PC-3 receberam meio padrão RPMI sem SFB, adicionado de fibronectina (25µg/µL). Já a parte inferior, foi adicionado meio RPMI contendo 10% de SFB.

Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 e 48 horas. Após o período de incubação as células foram fixadas com metanol por 10 minutos, e aquelas que não migraram, ou seja, que permaneceram na parte superior do inserto, foram retiradas por raspagem. As células que migraram através dos poros da membrana foram coradas com solução de azul de toluidina a 0,1% durante 10 segundos e fotografadas com a objetiva de 5x em microscópio invertido (ZeissAxiovert®, Alemanha). Os experimentos foram realizados em triplicata e 4 campos, que cobriam aproximadamente a área total da membrana, foram submetidos a contagem celular utilizando o software ImageJ.

4.6 Imunofluorescência para MMP-2 e MMP-9

Para a realização da imunofluorescência, foram utilizadas lamínulas contendo as células expostas ou não à fibronectina e posteriormente fixadas em metanol durante 8 minutos em temperatura ambiente, lavadas em PBS-Tween-20 0,25% (PBS-T) gelado e incubadas com solução de bloqueio (BSA 3%) por 40 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e foi então adicionado o anticorpo primário anti MMP-2 (Santa Cruz – sc6838) ou anti MMP-9 (Santa Cruz – sc10737) (diluído

1:150 em BSA 1%) por 120 minutos a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T gelado, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína FITC apropriado para cada anticorpo primário (diluído 1:150 em BSA 1%) por 60 minutos a 37°C. Em seguida o excesso de anticorpo secundário foi retirado, as lamínulas foram montadas em lâminas identificadas com o meio de montagem *VECTASHIELD® Mounting Media* e analisadas em microscópio Olympus BX61.

4.7 Zimografia

A técnica de zimografia foi realizada para analisar a atividade das MMPs -2 e -9 após 4 dias de exposição à fibronectina. Neste trabalho, o objetivo foi detectar a atividade dessas enzimas liberadas em meio de cultura. Assim, o sobrenadante celular foi coletado ao final da exposição e concentrado com a utilização de filtros Centriprep® 10.000 MWCO (Millipore™). Aliquotas contendo 18µg de proteína do meio de cultura dos diferentes grupos experimentais foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a 4°C) em gel de poliacrilamida a 8% contendo 0,1% de gelatina (colágeno denaturado). Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5% duas vezes de 15 minutos e, em seguida, em tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por duas vezes de 5 minutos. Posteriormente, os géis foram incubados por 12 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5 mM de CaCl₂ e 1 µM de ZnCl₂. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,25%. Áreas de proteólise apareceram como bandas claras contra um fundo azul escuro.

As bandas obtidas na zimografia foram digitalizadas e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas da MMP -2 e -9 foi analisada para a obtenção da densidade óptica integrada (IOD) das bandas utilizando-se o programa Image J. Os valores foram plotados em histograma para mostrar a razão entre o IOD dos grupos expostos aos elementos da MEC sobre o valor do IOD do grupo controle.

4.8 Análise Estatística

Para análise dos dados entre os grupos nos diferentes experimentos foi utilizado o teste T não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Teste Molecular para Detecção de *Mycoplasma*

Micoplasmas são microorganismos com ausência de parede celular rígida, pertencentes à classe *Mollicutes*. São os menores organismos conhecidos com capacidade de auto-replicação e podem localizar-se tanto aderidos à membrana da célula hospedeira, como no interior da célula (Timenetsky et al., 2006). O teste molecular para detecção de micoplasma nas linhagens celulares LNCaP, PC3 e RWPE-1 (linhagem de células prostáticas normais, não utilizada nesse trabalho) teve resultado negativo para todas as amostras (Figura 8). Esses resultados garantem a qualidade das células utilizadas nesse projeto e nos demais projetos do nosso laboratório, já que a contaminação por micoplasma compromete o metabolismo da célula e a sua sobrevivência.

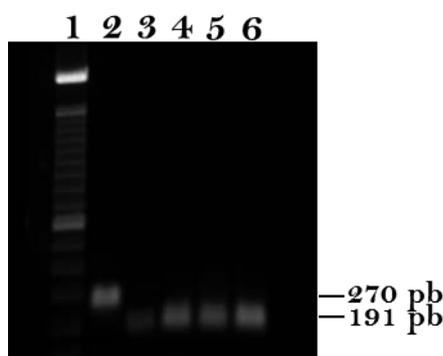


Figura 8: Resultado do teste molecular para detecção de *Mycoplasma* sp. Linha 1: padrão de peso molecular. Linha 2: Controle positivo. Linha 3: Controle Negativo. Linha 4: Amostra LNCaP. Linha 5: Amostra PC-3. Linha 6: Amostra RWPE-1.

5.2 Viabilidade Celular

A viabilidade das células LNCaP e PC-3 foi avaliada após a exposição à fibronectina. O grupo Fibronectina apresentou menor viabilidade celular em relação ao grupo Controle (Tabela I) em ambas as linhagens, porém as análises estatísticas mostraram que esta diminuição não foi significativa ($p=0,06$).

Tabela 1. Viabilidade celular das amostras após 4 dias de exposição à fibronectina

	Grupos	Viabilidade Celular (%)
LNCaP	Controle (n=3)	95,95 ± 1,17
	Fibronectina (n=3)	92,94 ± 2,80
PC3	Controle (n=3)	98,45 ± 2,68
	Fibronectina (n=3)	94,80 ± 5,89

Valores expressos em média ± DP (desvio padrão)

5.3 Morfologia Celular Após a Exposição à Fibronectina

5.3.1 Células LNCaP

A Figura 9 mostra células LNCaP dos grupos Controle e Fibronectina coradas com H/E. As células LNCaP crescem geralmente em duas diferentes condições, na mesma placa de cultura: agregadas formando grupos de células sobrepostas (“clusters”) ou separadas em monocamada. Esses agrupamentos podem ser vistos macroscopicamente como pontos esbranquiçados quando observamos a placa de cultura contra a luz. Quando a confluência é alta, são observados vários desses pontos. Para a manutenção e expansão das culturas, um manuseio gentil foi necessário em todos os momentos, visto que as células soltavam-se da placa facilmente nos pontos de crescimento por sobreposição.

Quando a confluência das células atingia valores altos (cerca de 80% da superfície do plástico de cultura), as células tendiam a se separar espontaneamente. Esse baixo potencial de ancoragem da linhagem durante as mudanças de meio ou em exposições a longo prazo promoveu grande perda de células em alguns momentos. Assim, para a maioria dos experimentos as células foram tripsinizadas quando a confluência atingia, no máximo, 70%.

Quanto ao aspecto morfológico, ambos os grupos experimentais demonstraram as características evidentes dessa linhagem e não diferiram entre si (Figura 9). As células LNCaP, quando expostas ou não à fibronectina, apresentaram aspecto fusiforme, com presença de finas projeções citoplasmáticas. Nos dois grupos experimentais foi possível visualizar a presença dos aglomerados celulares. Uma característica interessante encontrada

em ambos os grupos experimentais foi a ligação das células LNCaP formando estruturas circulares, lembrando um alvéolo prostático rudimentar (Figura 9, B e D).

A análise das células coradas em H/E chamou a atenção para aspectos morfológicos distintos na região nuclear, mais especificamente no provável maior número de nucléolos do grupo Fibronectina. Essa hipótese foi testada com a utilização da técnica de impregnação por nitrato de prata, conforme será discutido a seguir e pode ser visto na Figura 11.

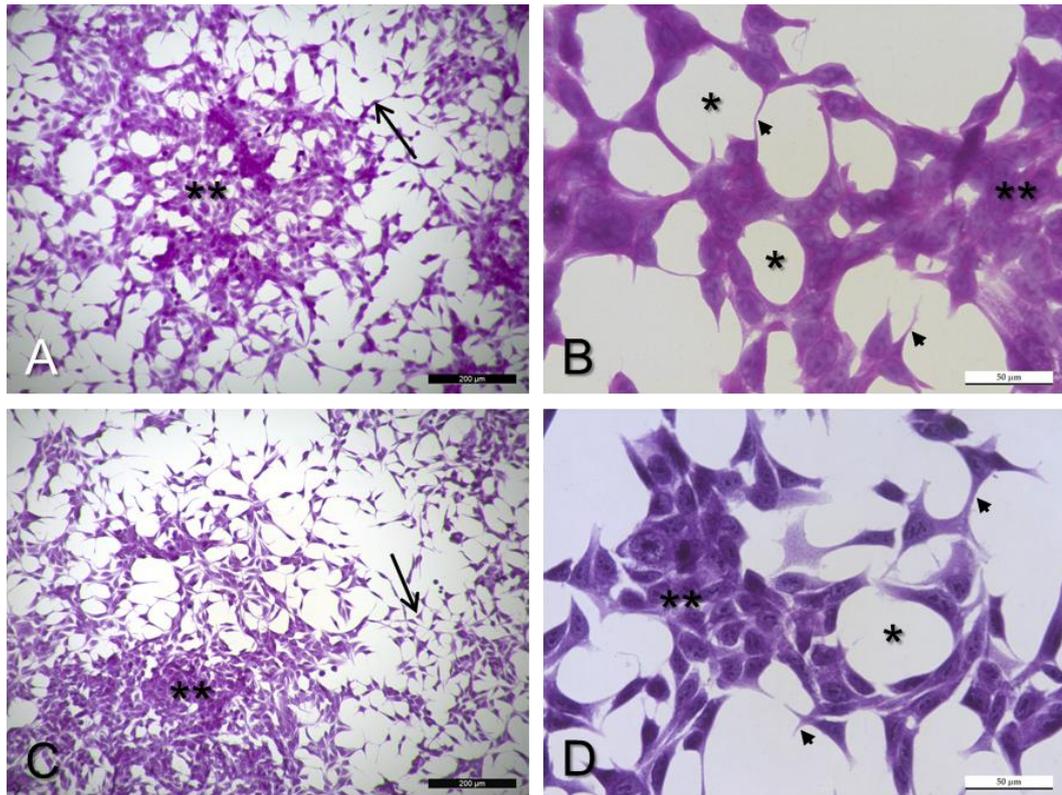


Figura 9: Fotomicrografias de luz das células LNCaP do grupo Controle (A e B) e do grupo Fibronectina (C e D) coradas por H/E. Em ambos os grupos experimentais foi possível observar o crescimento das células sobrepostas (**), ou em monocamada (seta), além da formação de estruturas circulares semelhantes a alvéolos (*). As células da linhagem LNCaP possuem formato fusiforme com finos prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta). Barras: A e C – 200 μm; B e D – 50 μm.

5.3.2 Células PC-3

A morfologia das células PC-3 foi analisada após a coloração de H/E e está ilustrada na Figura 10. Diferente das células da linhagem LNCaP, as células PC-3 crescem em monocamada e rapidamente atingem a máxima confluência na placa de cultura.

Essa linhagem possui múltiplos padrões morfológicos celulares, o que reflete a sua maior indiferenciação e agressividade em relação às suas células de origem (células epiteliais prostáticas normais).

A análise das células PC-3 após a exposição à fibronectina não mostrou diferenças morfológicas entre os grupos e as características peculiares a esse tipo celular foram encontradas tanto no grupo Controle como no grupo Fibronectina.

Durante o acompanhamento da expansão celular e também durante a exposição à fibronectina, foi possível observar que essa linhagem é representada em sua maioria por células mononucleadas, com aspecto fusiforme ou poligonal, mas também por algumas células gigantes multinucleadas. As células maiores, geralmente multinucleadas, apresentam características representativas de alto metabolismo celular, como irregularidade do contorno celular com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos e citoplasma claro e vacuolizado. Outro aspecto que remete ao alto metabolismo dessas células é o aspecto nuclear. Tanto nas células mononucleadas como nas células multinucleadas, os núcleos apresentam contorno bem definido, aspecto homogêneo e cromatina descondensada, permitindo a visualização de múltiplos nucléolos.

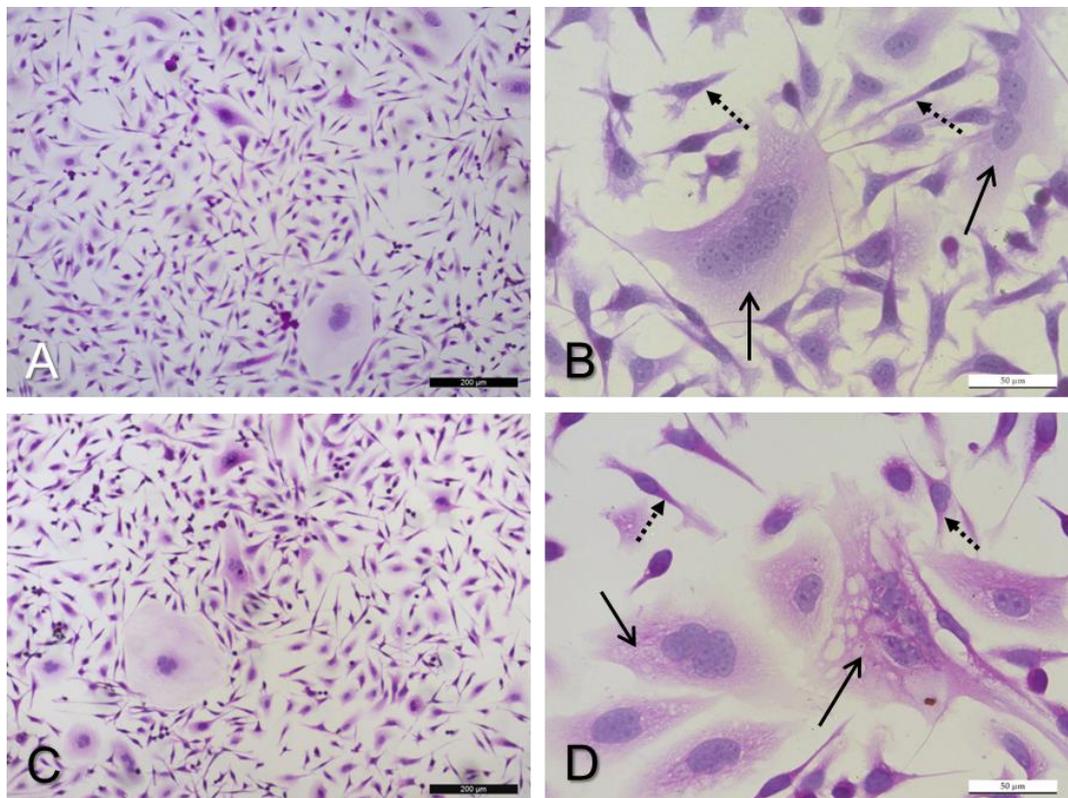


Figura 10: Fotomicrografias de luz das células PC-3 do grupo Controle (A e B) e do grupo Fibronectina (C e D) coradas por H/E. As células da linha PC-3 não possuem padrão morfológico típico, sendo possível visualizar células gigantes e multinucleadas (setas), assim como células menores com aspecto fibroblastóide (setas pontilhadas). Barras: A e C – 200 μm ; B e D – 50 μm .

5.4 Análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) Através da Impregnação com Nitrato de Prata (AgNO_3)

As RONs, por definição, são um conjunto de proteínas nucleolares que possuem afinidade à prata e que quando impregnadas por este metal são chamados de "AgNORs". Estudos demonstraram que a quantidade das RONs nas células representa um parâmetro importante do comportamento celular, sendo significativamente associado com maior proliferação (Treré et al., 1989). No intuito de se confirmar os achados através da análise da coloração de H/E, se a exposição à fibronectina alteraria a RONs, células LNCaP e PC3 expostas ou não a este componente da MEC foram impregnadas com AgNO_3 e as RONs analisadas.

Em microscopia de luz, as "AgNORs" das células LNCaP e PC3 apareciam como pontos castanhos bem-definidos, exclusivamente localizados dentro do núcleo, variando de uma até mais que cinco RONs (Figura 11 C-H). Foi quantificada a frequência de células contendo de uma a mais de cinco RONs por núcleo para se verificar se houve alteração na organização das RONs, podendo conferir um caráter mais ou menos agressivo às células tumorais.

Conforme ilustrado na Figura 11, os gráficos A (LNCaP) e B (PC3) mostram a distribuição do número de nucléolos por célula após exposição à fibronectina em comparação ao grupo controle. A frequência de células contendo mais de cinco RONs aumentou consideravelmente nas duas linhagens celulares após exposição ao componente da MEC, sendo aproximadamente quatro vezes maior nas células LNCaP e duas vezes maior nas células da linhagem PC3.

Adicionado a esse crescimento da frequência de células contendo mais de cinco RONs por núcleo, pode-se observar ainda que a quantidade de células que continham uma ou duas RONs diminuiu nas duas linhagens, sendo duas vezes menor a frequência das células contendo apenas duas RONs na linhagem LNCaP e uma vez menor na linhagem PC3.

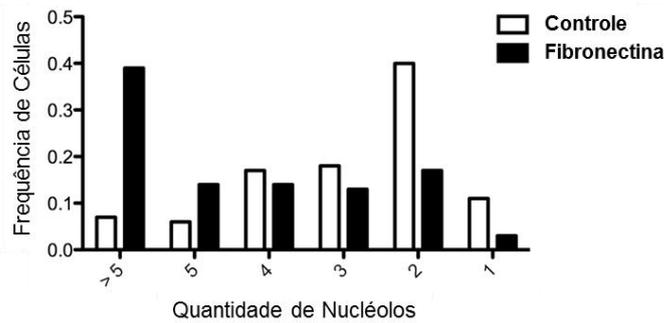
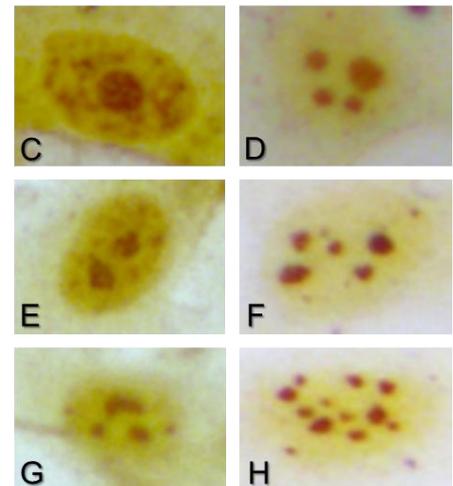
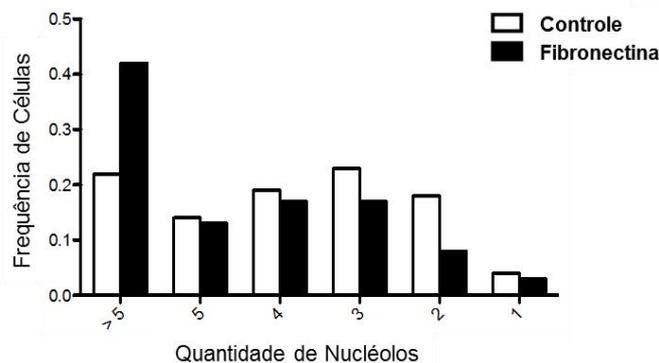
A**Células LNCaP expostas a Fibronectina – 4 Dias****B****Células PC-3 expostas a Fibronectina – 4 Dias**

Figura 11: Quantidade de nucléolos por célula após exposição à fibronectina em células impregnadas por AgNO₃. **A:** Distribuição do número de RONS por células na linhagem LNCaP após exposição à fibronectina (barras pretas), em comparação com células controle (barras brancas). **B:** Distribuição do número de RONS por células na linhagem PC3 após exposição à fibronectina (barras pretas), em comparação com células controle (barras brancas). **C-H:** Fotomicrografias de luz de células PC3 coradas com AgNOR contendo de 1 a mais que 5 nucléolos, respectivamente.

5.5 Análise do Processo de Migração Celular

As células LNCaP e PC-3 são células metastáticas e possuem, naturalmente, notável capacidade migratória. Após a exposição dessas duas linhagens à fibronectina durante 24 e 48 horas, os insertos com membranas contendo poros de 8 μ m foram retirados e as células na superfície interior, ou seja, as que migraram, contadas (Figuras 12 e 13).

Na Figura 12 pode-se observar que a exposição à fibronectina retardou significativamente a migração celular da linhagem LNCaP. No período de 24 horas o número de células que migraram no Grupo Fibronectina em relação ao Grupo Controle foi menos do

que a metade. No período de 48 horas o efeito anti-migratório da fibronectina tornou-se ainda mais evidente, pois enquanto o Grupo Controle mais que dobrou quando comparado ao período de 24 horas, a média do Grupo Fibronectina em 48h permaneceu estatisticamente igual ao período de 24h, mostrando o efeito contínuo deste elemento da MEC.

As células PC-3 são consideradas mais agressivas quando comparadas às células LNCaP e possuem potencial de migração maior. Contudo, mesmo com esse maior potencial, a exposição à fibronectina resultou em menor migração celular (Figura 13). No entanto, diferentemente das células LNCaP, houve aumento significativo no Grupo Fibronectina entre os períodos de 24 horas e 48 horas.

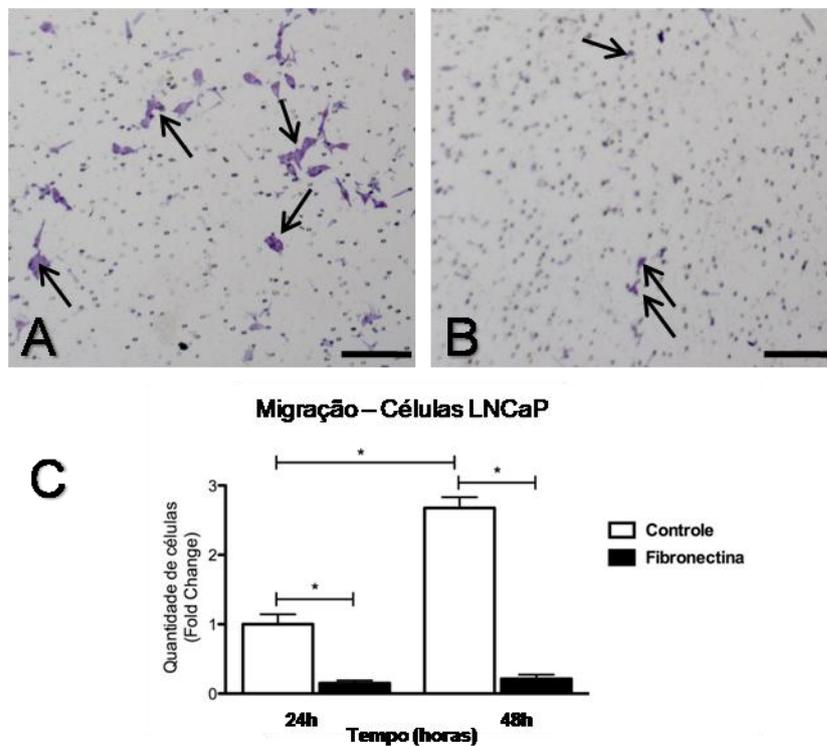


Figura 12: Efeito da Fibronectina no processo de migração das células LNCaP. Fotos representativas do processo podem ser vistas nas Figuras **A** (Grupo Controle) e **B** (Grupo Fibronectina), onde as setas indicam células que atravessaram os poros de 8 µm e foram contadas após coradas. O gráfico representativo dessa contagem (Figura **C**) mostra que a fibronectina inibiu a migração celular, nos dois tempos estudados. Os valores foram estatisticamente diferentes, com $p \leq 0,05$ (*).

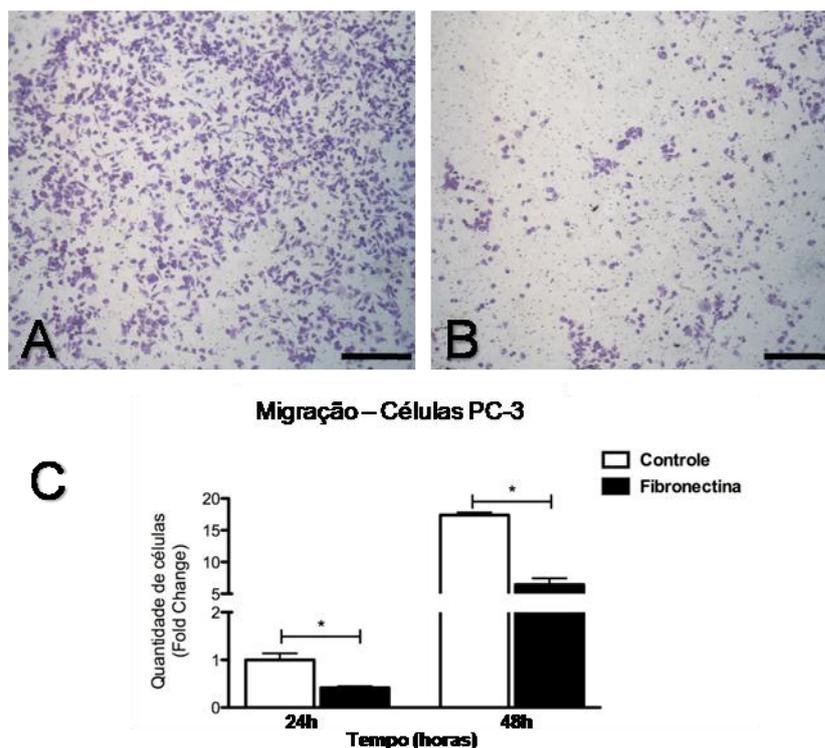


Figura 13: Efeito da Fibronectina no processo de migração das células PC-3. Fotos representativas do processo podem ser vistas nas Figuras **A** (Grupo Controle) e **B** (Grupo Fibronectina), onde as setas indicam células que atravessaram os poros de 8 µm e foram contadas após coradas. O gráfico representativo dessa contagem (Figura **C**) mostra que a fibronectina inibiu a migração celular, nos dois tempos estudados. Os valores foram estatisticamente diferentes, com $p \leq 0,05$ (*).

5.6 Detecção das MMPs -2 e -9 Através de Imunofluorescência

As enzimas MMP-2 e MMP-9 foram detectadas nas células LNCaP e PC-3, de ambos os grupos experimentais, através da técnica de imunofluorescência. A princípio, foram realizadas tentativas de marcação pelo método de imuno-histoquímica tradicional, mas não obtivemos sucesso na amplificação do sinal, que mostrou-se fraco para as duas enzimas.

As Figuras 14 e 15 ilustram os resultados da imunofluorescência, onde o núcleo foi marcado em azul pelo marcador fluorescente de DNA DAPI e a região de localização tanto da MMP-2 como da MMP-9 foi identificada em verde pelo fluorocromo FITC.

Após a análise minuciosa das lamínulas em microscópio fluorescente, foi possível verificar marcação muito fraca tanto para MMP-2 como para MMP-9 nas células LNCaP do Grupo Controle (Figura 14 A e C, respectivamente). A exposição à fibronectina promoveu discreto aumento na imunomarcação das duas enzimas, o que pode ser visto na Figura 14 (B e D, respectivamente).

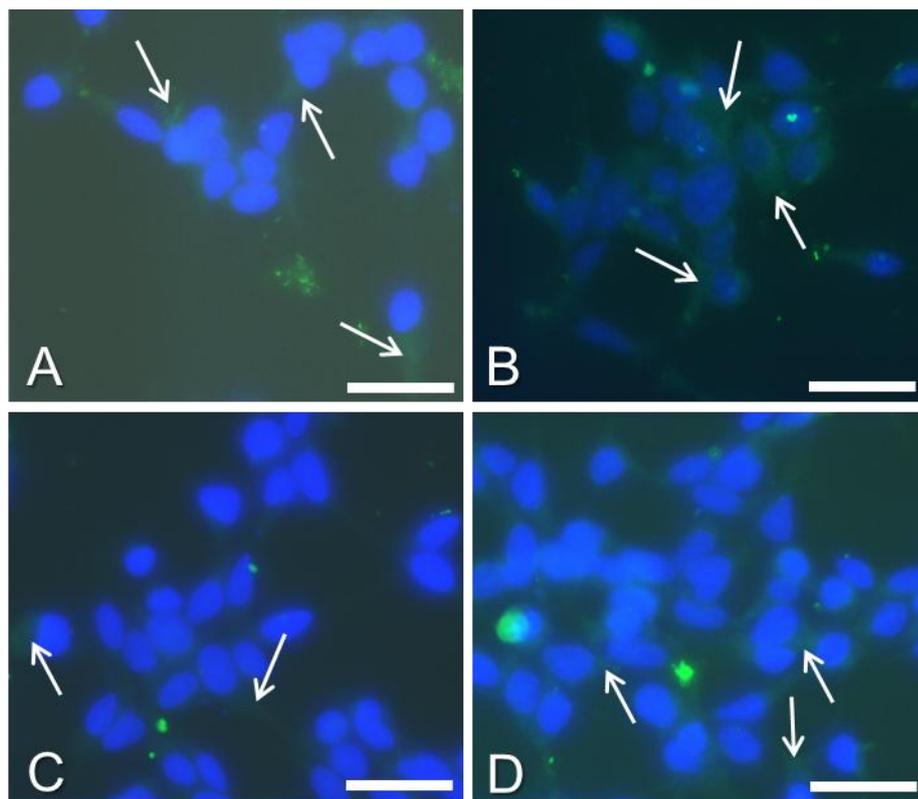


Figura 14 Imunofluorescência das células LNCaP para as proteínas MMP-2 (A e B) e MMP-9 (C e D). Grupo Controle (A e C) e Grupo Fibronectina (B e D). As setas indicam a localização das proteínas, cuja marcação aparece um pouco mais intensa nas células do Grupo Fibronectina. Barras: 50 μ m.

Para a linhagem PC-3, a imuno localização fluorescente das enzimas MMP-2 e MMP-9 também apresentou sinal fraco nas células do Grupo Controle (Figura 15, A e B, respectivamente) e sinal aparentemente mais forte no citoplasma das células expostas à fibronectina (Figura 15 C e D, respectivamente).

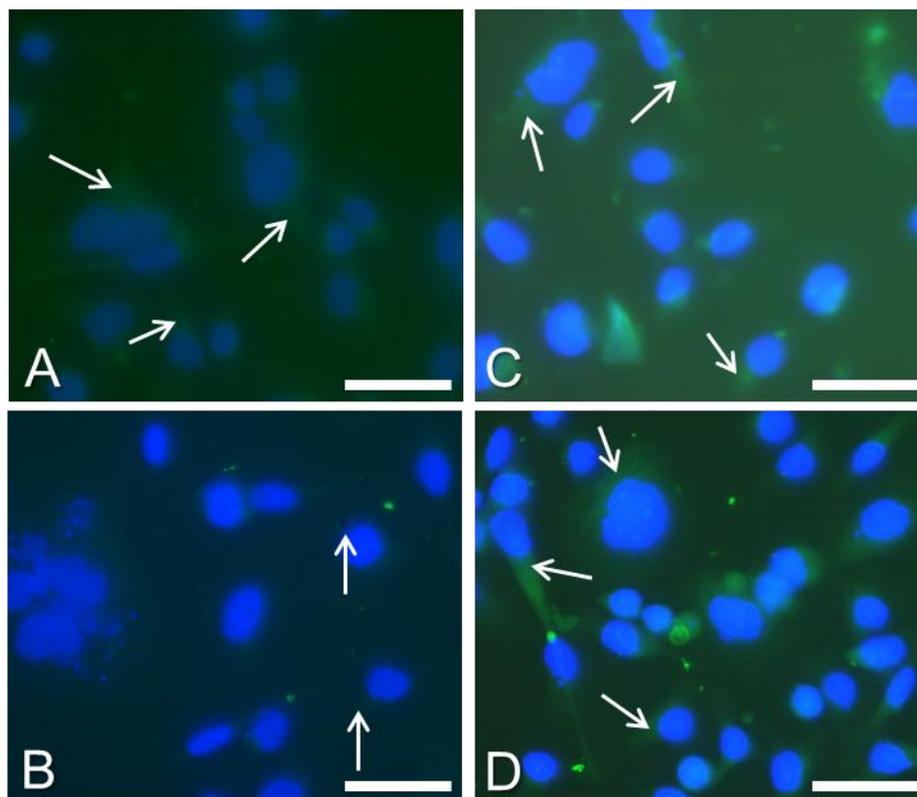


Figura 15 Imunofluorescência das células PC-3 para as proteínas MMP-2 (A e B) e MMP-9 (C e D). Grupo Controle (A e C) e Grupo Fibronectina (B e D). As setas indicam a localização das proteínas, cuja marcação aparece mais intensa nas células do Grupo Fibronectina. Barras: 50 μm.

5.7 Análise da Atividade das MMPs -2 e -9 Através da Técnica de Zimografia

Como padrão de peso molecular, foi utilizado alíquota de SFB para a identificação exata das MMPs -2 e -9. As análises por zimografia revelaram bandas claras típicas da atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 (Figura 16). No sobrenadante das células LNCaP do grupo Controle, puderam ser visualizadas as bandas de 92 e 81 kDa que correspondem, respectivamente, à forma de pró-enzima e enzima ativa da MMP-9. Apenas a banda de 72 kDa, que corresponde à forma de pró-enzima da MMP-2, foi detectada e de maneira intensa no sobrenadante das células LNCaP do grupo Controle. Para as células PC-3 do grupo Controle, foi detectada a presença de todas as formas das enzimas MMP-2 e -9, incluindo a presença da MMP-2 ativa (62 kDa), não detectada no grupo Controle das células LNCaP.

A análise densitométrica das bandas revelou que houve diferenças significativas entre as intensidades das bandas da MMP-2 ativa e da MMP-9 pró e ativa após a exposição com fibronectina no sobrenadante da cultura das células LNCaP (Figura 16, A e B). O grupo

Fibronectina mostrou diminuição na atividade das pró-enzimas MMP-2 e -9 e aumento na atividade dessas enzimas ativas. A fibronectina também promoveu a diminuição significativa das pró-enzimas da MMP-2 e -9 e aumento a atividade das enzimas ativas nas células PC-3 (Figura 16, C e D).

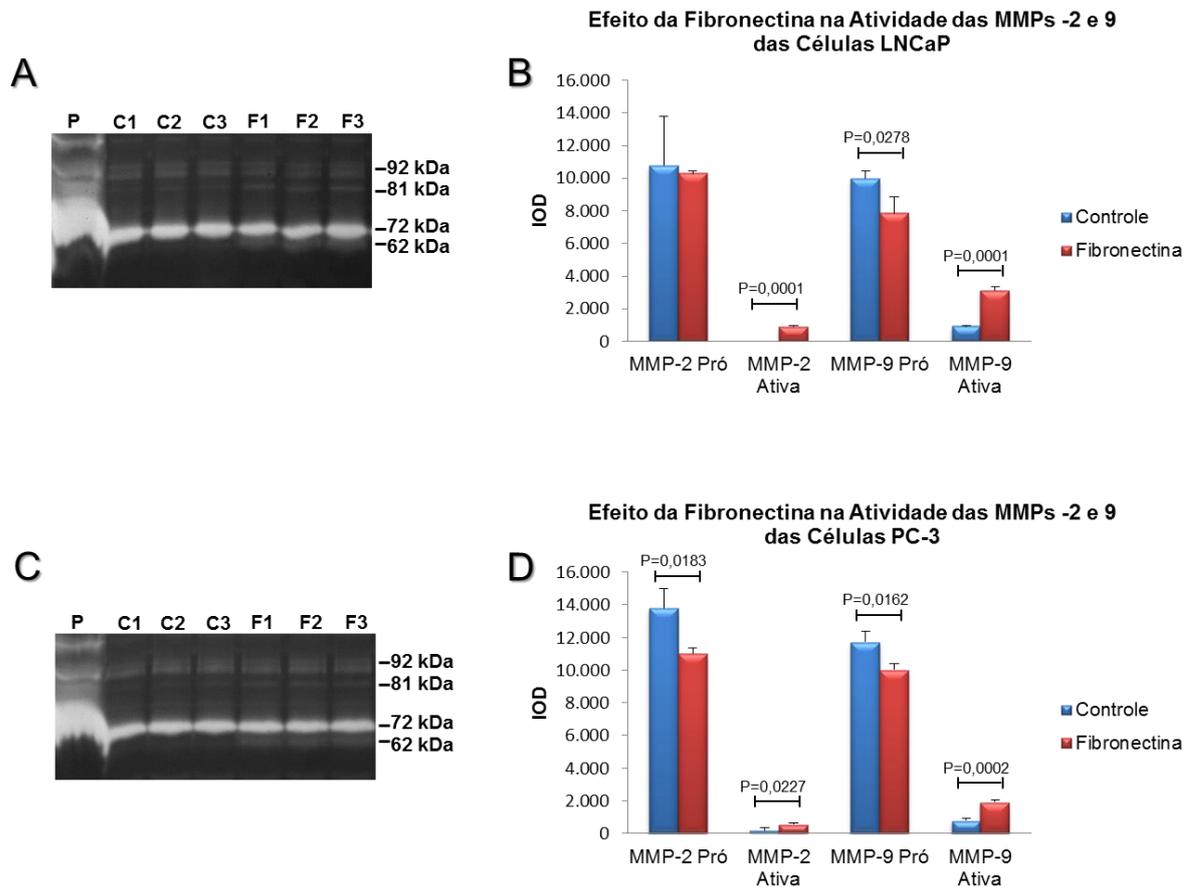


Figura 16: Efeito da fibronectina sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 e da MMP-9 nas células LNCaP (A e B) e PC-3 (C e D) após 2 dias de exposição. As células LNCaP apresentaram índices não detectáveis de atividade da MMP-2. A exposição à fibronectina diminuiu a intensidade das enzimas Pró da MMP-2 (72 kDa) e da MMP-9 (92 kDa) e aumentou a intensidade dessas enzimas na forma ativa, 62 kDa e 81 kDa, respectivamente. O mesmo padrão foi observado para as células PC-3. P (Padrão de peso molecular), C1-C3 (amostras de células do grupo Controle), F1-F3 (amostras de células do grupo Fibronectina). Os valores de p estão demonstrados no gráfico, exceto para a pró-enzima da MMP-2 das células LNCaP, que não foi diferente entre os grupos.

6. Discussão

A fisiologia normal da próstata é mantida por um mecanismo complexo de regulação entre os seus componentes epiteliais e estromais (Chung & Davies, 1996; Cunha et al., 2004). Alterações na composição do estroma prostático podem modificar a homeostasia epitelial, conduzindo a uma disfunção glandular com possibilidade de surgimento de doenças, entre elas o câncer (Wong & Tam, 2002; Barron & Rowley, 2012).

Embora já se saiba que a relação entre os componentes da MEC e o epitélio seja de fundamental importância para a manutenção da homeostasia, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos envolvidos nesses processos (Piccinini & Midwood, 2014).

A fibronectina, uma proteína adesiva da MEC, apresenta expressão desregulada em células tumorais com elevado potencial metastático e como possui papel crucial na adesão celular e na motilidade representa, portanto, um elemento determinante no sucesso metastático de células tumorais (Urtreger et al., 2006). Contudo, ainda não existe consenso se a fibronectina auxilia ou suprime a progressão tumoral. Alguns autores propõem que a fibronectina possui um papel supressor, pois mesmo em baixa concentração poderia diminuir invasão e metástase por aumentar a coesão entre as células e impedir o seu desprendimento da massa tumoral (Zhang et al., 2009; Jia et al., 2012). No entanto, alguns grupos de pesquisa acreditam que a fibronectina ao invés de suprimir o potencial metastático e invasivo pode, pelo contrário, auxiliar na proliferação e invasão celular (Pentyala et al., 1998; Malik et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivos avaliar os índices de viabilidade e morfologia celular, número de nucléolos, migração e localização e atividade das MMPs -2 e -9. Os resultados aqui apresentados sugerem que as modificações fisiológicas e morfológicas induzidas pela fibronectina nas células tumorais LNCaP e PC-3 envolvem alterações no padrão de atividade de MMPs, no número de nucléolos e no processo de migração celular, com diferenças importantes entre o Grupo Controle e o Grupo Fibronectina.

Após 4 dias de exposição à fibronectina, as células LNCaP e PC-3 apresentaram menor viabilidade em comparação ao Grupo Controle, porém essa diferença não foi significativa. Essa exposição também não promoveu alterações na morfologia geral das células. Os nossos achados para viabilidade celular corroboram com aqueles encontrados por Liberio e colaboradores (2014), que também verificaram diminuição da viabilidade das

células LNCaP após 96 horas de exposição à fibronectina. Os autores ainda relatam que a exposição à fibronectina aumentou a área celular em 18%, a área nuclear e a produção da proteína do citoesqueleto F Actina nas células LNCaP. Liberio e colaboradores (2014) utilizaram a fibronectina como uma cobertura em lamínulas de vidro, onde posteriormente plaquearam as células LNCaP. Em nosso experimento, a fibronectina foi diluída no meio de cultura, o que difere o modo como as células entraram em contato com a fibronectina e essa pode ser a explicação para a ausência de alterações no formato e tamanho das células em nossos resultados.

Apesar de não promover alteração na morfologia geral das células tumorais prostáticas, a fibronectina aumentou o número de nucléolos dessas células. O aumento em número e tamanho nucleolar são características marcantes de muitos tipos de câncer (Derenzini et al., 1998; Derenzini et al., 2009) e sabe-se que o aumento do número de RONS está associado com maior malignidade da célula tumoral por estar envolvido com maior capacidade proliferativa. No CaP tais modificações são algumas das primeiras alterações morfológicas associadas com o desenvolvimento de lesões pré-malignas, de neoplasia intraepitelial prostática e lesões presentes em adenocarcinomas invasivos (Hansen & Ostergård, 1990; Bostwick et al., 1996). Adicionado a esse crescimento da frequência de células contendo mais de cinco RONS por núcleo, pode-se observar ainda a diminuição da quantidade de células que continham uma ou duas RONS, ou seja, células com caráter menos agressivo. Desta forma, é possível afirmar que células das duas linhagens expostas à fibronectina, demonstraram um caráter mais agressivo, por apresentarem mais células com mais de cinco RONS em seu núcleo, sugerindo, portanto, uma maior capacidade proliferativa. O processo de migração celular, também avaliado neste estudo, requer o controle da adesão ao substrato. Assim, um nível mínimo de adesão é necessário para fazer com que as células permaneçam aderidas fortemente a esse substrato (Akiyama et al., 1995). Albrecht e colaboradores (1999) mostraram que as células LNCaP e as células estromais prostáticas hPCPs expressam fibronectina e secretam a proteína no meio de cultura de forma tempo-dependente, sendo essa secreção 2.5 vezes maior na cultura das células estromais do que na cultura de células LNCaP. Os mesmos autores demonstraram a importância da fibronectina para o processo de adesão das células LNCaP, utilizando anticorpos contra fibronectina, cujo bloqueio promoveu diminuição na adesão dessas células. Em nosso estudo, realizamos a análise do evento de migração celular, utilizando insertos com membranas contendo poros de

8 μm e visualizamos que a fibronectina diminuiu a migração de ambas as linhagens tumorais e em dois tempos estudados. Esse ensaio realizado demonstrou que a fibronectina possui papel importante na prevenção da migração das células tumorais, visto que após um período de 48 horas a quantidade de células expostas que migraram foi cerca de três vezes menor na linhagem LNCaP e mais de dez vezes menor na linhagem PC-3, quando comparadas as células do grupo controle. Isso sugere que a fibronectina promoveu aumento da adesão dessas células à superfície do inserto, minimizando a sua migração e está em acordo com resultados demonstrados por Liberio e colaboradores (2014), que também verificaram diminuição da migração de células tumorais prostáticas cultivadas em superfície com cobertura de fibronectina.

Uma característica das células tumorais metastáticas em adaptar-se a diferentes tecidos é a habilidade em remodelar os componentes da matriz extracelular (MEC) do tecido invadido. Essa característica é atribuída à secreção de uma variedade de proteases, principalmente as MMPs (Stamenkovik, 2000). Além do aumento na quantidade de nucléolos, este estudo mostrou também que a fibronectina induziu aumento na marcação e na atividade das enzimas MMPs -2 e -9 nas duas linhagens tumorais estudadas. Estudos anteriores também descrevem que, em cultura, a fibronectina foi capaz de promover aumento na expressão da MMP-2 em células de fibrosarcoma (Stanton et al., 1998), em células de câncer cervical (Mitra et al., 2006), em células MCF7 de câncer de mama (Das et al., 2008) e em células de câncer prostático (Moroz et al., 2013). Moroz e colaboradores (2013) mostraram que a fibronectina foi capaz de alterar a atividade da MMP-2 já no curto período de exposição de 4 horas. É possível observar em nossos resultados, que a exposição à fibronectina por um período maior (4 dias) permitiu a visualização do aumento de atividade não só da MMP-2, como também da MMP-9 em ambas as linhagens celulares. Assim, apesar de não serem totalmente inéditos, os nossos achados sobre a influência da fibronectina no aumento da atividade das MMPs -2 e -9 em células tumorais prostáticas fortalecem os demais resultados e a eficiência dos demais experimentos deste estudo.

Dados recentes e ainda não publicados do nosso laboratório mostram que a exposição das células LNCaP à fibronectina reforça o seu papel bivalente na carcinogênese, já que induziu aumento nos níveis de expressão do microRNA-145 (um supressor tumoral) e reduziu os níveis dos microRNAs 21 (um oncogene) e 29 e 34a (ambos supressores tumorais).

Apesar de não serem totalmente conclusivos e indicarem um papel específico da fibronectina na tumorigênese, os nossos resultados demonstram a importância que a fibronectina tem no CaP, seja no papel de auxiliar ou suprimir o desenvolvimento desse câncer, pois a simples exposição em células tumorais prostáticas menos agressivas (LNCaP) ou e em células tumorais prostáticas mais agressivas (PC-3) resultou em modificações no processo de migração celular, na expressão e atividade das MMPs -2 e -9 e na alteração no número de nucléolos. Juntos, os nossos resultados corroboram com a atual falta de um consenso na literatura de que esse elemento da MEC pode possuir tanto propriedades supressoras como propriedades oncogênicas no desenvolvimento de um tumor.

7. Conclusões Gerais

- ✓ A fibronectina é uma proteína adesiva da MEC que revela um papel oncogênico, estimulando alterações no núcleo de células tumorais prostáticas que levam ao aumento no número dos nucléolos e aumentando a marcação e a atividade das MMPs - 2 e -9 em. Por outro lado, a fibronectina também atua como supressor tumoral quando diminui a taxa de migração nessas mesmas células.
- ✓ Novos estudos *in vitro* devem investigar a atuação da fibronectina em outros tipos de células tumorais isoladas e em co-cultura com células estromais.

8. Referências Bibliográficas

Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. 1995. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 173-89.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª edição. Editora Artes Médicas Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil. 2064p.

Albrecht M, Renneberg H, Wennemuth G, Möschler O, Janssen M, Aumüller G, Konrad L. 1999. Fibronectin in human prostatic cells in vivo and in vitro: expression, distribution, and pathological significance. *Histochem Cell Biol* 112: 51-61.

Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. 2006. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters* 580:2294–300.

Atlas eletrônico de Histologia. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/ur000002.pdf>. Acessado em 17/04/2015.

Aumüller G, Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *International review of cytology* 121:127–231.

Barcellos-Hoff, MH, Ravani SA. 2000. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer research* 60:1254–60,

Barron DA, Rowley DR. 2012. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 19: R187-204.

Billis, A. 2003. *Patologia Cirúrgica da Próstata*. Campinas ; p. 20.

Billis, A. 1997. *Uropatologia: Próstata. Guia prático para o diagnóstico anatopatológico*. Editora UFG.

Bosland MC, Chung LW, Greenberg NM, Ho SM, Isaacs JT, Lane K, Peehl DM, Thompson TC, van Steenbrugge GJ, van Weerden WM.. 1996. Recent advances in the development of animal and cell culture models for prostate cancer research a minireview. *Urologic oncology* 2:99.

Bosman FT, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J.Pathol* 200:423-428.

Brawley OW, Giovannucci E, Kramer BS. 2000. Epidemiology of prostate cancer. In Vogelzang, N. J.; Shipley, W. U.; Scardino, P. T.; Coffey, D. S. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins 2: 533-44.

Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. 1996. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29: 117-34.

- Byron A, Humphries, JD, Humphries MJ. 2013. Defining the extracellular matrix using proteomics. *Int J ExpPathol* 94: .75-92.
- Caputo, L. F. G. 2008. Manual da disciplina de histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo *Cruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 112 p.
- Carson C, RittmasterR. 2003. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61: 2–7.
- Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. 2012. International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol*.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. 2003.Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J. Pathology* 200: 488–499.
- Chung LW, Davies R. 1996. Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma. *Mol Biol Rep* 23: 13-9.
- Copetti, N. 2004. Manual de técnicas citológicas da Faculdade de Medicina da UFRGS. Porto Alegre: UFRGS. 31 p.
- Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. 2000. Patologia estrutural e funcional. Guanabara Koogan, 6º ed.
- Coulson-Thomas VJ, Gesteira TF, Coulson-Thomas YM, Vicente CM, Tersariol IL, Nader HB, Toma L. 2010. Fibroblast and prostate tumor cell cross-talk: fibroblast differentiation, TGF- β , and extracellular matrix down-regulation. *Experimental cell research* 316: 3207–26.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y.1987.The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine reviews* 8: 338–62.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA.1996.Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta anatomica*155: 63–72.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. 2002. Role Of Stroma In Carcinogenesis Of The Prostate. *Differentiation* 70: 473-485.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 92: 221–36.
- Cunha GR, Chung LW. 1981. Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *Journal of steroid biochemistry*, v. 14, n. 12, p. 1317–24.

Damodarasamy M, Vernon RB, Chan CK, Plymate SR, Wight TN, Reed MJ. 2015. Hyaluronan in aged collagen matrix increases prostate epithelial cell proliferation. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 51: 50–8.

Datasus/SIA. Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acessado em 14/02/2014.

Das S, Banerji A, Frei E, Chatterjee A. 2008. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life sciences* 82: 467–76.

De Carvalho HF, Line SR. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell biology international* 20:809–19.

De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. 1998. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *The Journal of urology* 160 2381–92.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7(4):256-69.

Derenzini M, Trerè D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL. 1998. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152: 1291-7.

Derenzini M, Montanaro L, Trerè D. 2009. What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology* 54: 753-62.

Duarte, AHA. 2010. Expressão do colágeno I, III e metaloproteinase nos diferentes graus de Gleason e es tadio patológico do câncer prostático: UFRJ. 02p.

Ekman P. 2000. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *The Prostate. Supplement* 10: 14–8.

Elliott JT, Woodward JT, Langenbach KJ, Tona A, Jones PL, Plant AL. 2005. Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen. *Matrix Biol* 24: 489–502.

Farnsworth WE. 1999. Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *The Prostate* 41: 263–74.

Franco OE, Hayward SW. 2012. Targeting the tumor stroma as a novel therapeutic approach for prostate cancer. *Advances in pharmacology* 65: 267–313.

Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda M. 2003. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *The Prostate* 55: 206–1.

Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. 2003. *Tratado de Histologia em Cores*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Glass AS, Cary KC, Cooperberg MR. 2013. Risk-based prostate cancer screening: who and how? *Current urology reports*14: 192–8.
- Golbano JM, López-Aparicio P, Recio MN, Pérez-Albarsanz MA. 2008. Finasteride induces apoptosis via Bcl-2, Bcl-xL, Bax and caspase-3 proteins in LNCaP human prostate cancer cell line. *International journal of oncology*32: 919–24.
- Gordon, MK, Hahn RA. 2010 .Collagens. *Cell Tissue Res*339: 247-257.
- Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Rivera HN, Roman J. 2006. Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 281: 29614–24.
- Hansen AB, Ostergård B. 1990. Nucleolar organiser regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417: 9-13.
- Hayward SW, Cunha GR. 2000. The prostate: development and physiology. *Radiologic clinics of North America*38: 1–14.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *British journal of urology* 79: 18–26.
- Hidalgo M, Eckhardt SG. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancertherapy. *J Natl Cancer Inst* 93: 178-193.
- Hoekstra R1, Eskens FA, Verweij J.2001 .Matrix metalloproteinase Inhibitors: current developments and future perspectives. *The Oncologist*6: 415-427.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA.1980. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in clinical and biological research* 37:115–32.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36(8):1014-5.
- Hynes RO. 1992. Integrin: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Incidência de câncer no Brasil [citado em 2014]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.
- Jesik CJ, Holland JM, Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate* 3:81–97.
- Jia D, Entersz I, Butler C, Foty RA. 2012. Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 20: 12:94.

- Junqueira LC, Carneiro J. 2012. *Biologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* 17:16–23.
- Karp; Gerald. 2005. *Biología celular y molecular*. 4ª. Ed.México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Kaspar M, Zardi L, Neri D. 2006. Fibronectin as target for tumor therapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 118: 1331–9,
- Kierszenbaum, A. 2008. *Histologia e Biologia Celular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Kindblom; J. Role of prolactin in the prostate gland - studies in transgenic mouse models. Tese de Doutorado, 2003 (78 fls.). Goteborg University, Gothenburg, Suécia.
- Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, Nagle RB. 1994. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *The American journal of pathology* 145: 167–74.
- Kyprianou N, Isaacs JT. 1988. Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology* : 2124–31.
- Kyprianou N, Tu H , Jacobs S C. 1996. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Human pathology* 27: 668–75.
- Lee MA, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, Miller K.1999.Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A Longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 122:191- 197.
- Lejeune B, Van Hoeck J, Leroy F.1981.Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *Journal of reproduction and fertility* 61: 35–40.
- Li G, Rivas P, Bedolla R, Thapa D, Reddick RL, Ghosh R, Kumar AP. 2013. Dietary resveratrol prevents development of high-grade prostatic intraepithelial neoplastic lesions: involvement of SIRT1/S6K axis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 6: 27–39.
- Liberio MS, Sadowski MC, Soekmadji C, Davis RA, Nelson CC. 2014. Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior. *PLoS One* 9: e112-122.
- Lin CQ, Bissell MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7:737–43.

- Lochter A, Bissell M J. 1995. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Seminars in cancer biology* 6:165–73.
- Lodish H, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. 2004. *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman and Company5: 973.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: 12.
- Maity G, Choudhury PR, Sen T, Ganguly KK, Sil H, Chatterjee A. 2011. Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. *Tumour Biol* 32: 129-38.
- Malik G, Knowles LM, Dhir R, Xu S, Yang S, Ruoslahti E, Pilch J. 2010. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res* 70:4327-34.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR.2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental biology* 253: 165–74.
- Mcneal JE. 1981. Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology* 17: 11–6.
- Mitra A, Chakrabarti J, Banerji A, Das S, Chatterjee A. 2006. Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2. *Journal of cancer research and clinical oncology* 132: 505–513.
- Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, Deffune E, Felisbino SL.2013. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 430: 1319–21.
- Myung JK, Sadar MD. 2012. Large scale phosphoproteome analysis of LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular bioSystems* 8: 2174–82.
- Nemeth JA, Lee C. 1996. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *The Prostate* 28:124–8.
- Nelson DJ, Jow B, Jow F. 1990. Whole-cell currents in macrophages. Human monocytes-derived macrophages. *J Membr Biol* 117: 29-44.
- Obralic N1, Kulovac B, Aganovic D, Junuzovic D. 2009. Values of prostate specific antigen in patients with operable prostate carcinoma. *Medicinski arhiv* 63: 34–7.
- Oldridge EE, Pellacani D, Collins AT, Maitland NJ. 2012. Prostate cancer stem cells: are they androgen-responsive? *Molecular and cellular endocrinology* 360:14–24.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer research* 59: 5002–11.

Peehl DM. 2005. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-related cancer*, v. 12, n. 1, p. 19–47.

Pentyala SN, Whyard TC, Waltzer WC, Meek AG, Hod Y. 1998. Androgen induction of urokinase gene expression in LNCaP cells is dependent on their interaction with the extracellular matrix. *Cancer Lett* 130: 121-6.

Piccinini AM, Midwood KS. 2014. Illustrating the interplay between the extracellular matrix and microRNAs. *Int J Exp Pathol* 95: 158-80.

Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Völker W. 2003. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 166: 1-11.

Pour PM, Stepan K. 1989. Comparative carcinogenicity of N-nitrosobis(2-oxopropyl)-amine and N-nitrosomethyl(2-oxopropyl)amine following subcutaneous or oral administration to rats. *Cancer letters* 45: 49–57.

Racioppi M, Palermo G, D'Addressi A, Pinto F, Sacco E, D'Agostino D, Vittori M, Bassi PF. 2012. Hot topics in urological health economics. A mini review. *Arch Ital Urol Androl* 84: 47-52.

Ramirez AG. 2010. Comparación de 12 contra 18 muestras en la biopsia de próstata para el diagnóstico de cáncer de próstata: estudio prospectivo aleatorizado. *Bol Colégio Mexicano de Urología* XXV(1): 12-16.

Rittmaster RS, Fleshner NE, Thompson IM. 2009. Pharmacological approaches to reducing the risk of prostate cancer. *Eur Urol* 55:1064–1074.

Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrine-related cancer* 11: 225–54.

Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Suwiwat S, LeBaron RG, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ. 2003. Modulation of Prostate Cancer Cell Attachment to Matrix by Versican. *Cancer Research* 63: 4786–4791.

Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP. 1994. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In vivo (Athens, Greece)* 8: 439–43.

Sampson N, Neuwirt H, Puhr M, Klocker H, Eder IE. 2013. In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 20: 49–64.

Sánchez JM, Domínguez GG, Sánchez MLC. 2007. Características clínicas al tacto rectal y niveles de APE, comparados con resultado histopatológico en BTRUS. *Bol Colégio Mexicano de Urología* XXII(2): 70-6.

- Schuurmans AL, Bolt J, Veldscholte J, Mulder E. 1991. Regulation of growth of LNCaP human prostate tumor cells by growth factors and steroid hormones. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40: 193–7.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 64: 9–29.
- Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JR JW. 2004. CXCL12–CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Labor. Invest* 84: 1666–76.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38 :73-83.
- Sonnenschein C, Soto AM. 2008. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Seminars in cancer biology* 18: 372–7.
- Spans L, Atak ZK, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Lerut E, Aerts S, Claessens F. 2012. Variations in the exome of the LNCaP prostate cancer cell line. *The Prostate* 72: 1317–27.
- Springer TA. 1990 .Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425–34
- Srougi M, Ribeiro LA, Piovesan AC, Colombo JR, Nesrallah A. 2008. Prostate diseases. *Rev Med (São Paulo)* 87(3):166-77.
- Stamenkovic, I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10: 415-33.
- Stanton H, Gavrilovic J, Atkinson SJ, d’Ortho MP, Yamada KM. 1998. The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *Journal of cell science* 111: 2789–2798.
- Sthebens WE. 1996. Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anat* 157: 261-274.
- Taylor RA, Risbridger, GP. 2008. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Current cancer drug targets* 8: 490–7.
- Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. 2006. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res* 39: 907-14.
- Timms BG, Mohs TJ, Didio LJ. 1994. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J. Urol* 151: 1427-32.
- Timpl R, Paulsson M, Dziadek M, Fujiwara S. 1987. Basement membranes. *Methods in enzymology* 145: 363–91.

- Titus MA, Li Y, Kozyreva OG, Maher V, Godoy A, Smith GJ, Mohler JL. 2014. 5α -reductase type 3 enzyme in benign and malignant prostate. *The Prostate* 74: 235–49.
- Torbenson M, Wang J, Choti M, Ashfaq R, Maitra A, Wilentz RE. 2002. Hepatocellular carcinomas show abnormal expression of fibronectin protein. *Mod Pathol* 15: 826–30.
- Trerè D, Pession A, Derenzini M. 1989. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 184(1):131-7.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. 2002. Reactive stroma in human prostate cancer: Induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8:2912–2923.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of urology* 166: 2472–83.
- Urtreger AJ, Werbajh SE, Verrecchia F, Mauviel A, Puricelli LI, Kornblihtt AR, Bal de Kier Joffé ED. 2006. Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential. *Oncol Rep* 16:1403-10.
- Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. 2006. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cell (PC3). *Mol Cell Biochem* 287:109-16.
- Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell biology international* 29:809–16.
- Wang X, Ma D, Olson WC, Heston WD. 2011. In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen. *Mol Cancer Ther* 10: 1728-39.
- Wong YC, Tam NN. 2002. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation* 70: 633-45.
- Xie W, Wong YC, Tsao SW. 2000. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *The Prostate* 44: 31–9.
- Zhang X1, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 2009 50: 490-9.