

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NA PRÓSTATA DE
GERBILOS VASECTOMIZADOS, APÓS INDUÇÃO QUÍMICA PELA
INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO CARCINÓGENO N-METIL-N-
NITROSURÉIA (MNU)

MARCELA DE OLIVEIRA

Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" – UNESP, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Física Médica

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NA PRÓSTATA DE
GERBILOS VASECTOMIZADOS, APÓS INDUÇÃO QUÍMICA PELA
INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO CARCINÓGENO N-METIL-N-
NITROSURÉIA (MNU)

MARCELA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Pereira

Departamento de Anatomia

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Oliveira, Marcela de.

Avaliação da proliferação celular na próstata de gerbilos vasectomizados, após indução química pela injeção intraperitoneal do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU) / Marcela de Oliveira. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Sérgio Pereira.

Capes: 20601000

1. Rato - Controle. 2. Vasectomia. 3. Próstata.

Palavras-chave: Gerbilo; Proliferação Celular; Próstata; Vasectomia.

“ Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem. Quem acredita sempre alcança. “ (Renato Russo)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Roberto de Oliveira e Célia Dionéia de Oliveira, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida sempre com muito amor e carinho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Pereira pela paciência na orientação, apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, que colaboraram no desenvolvimento e conclusão desta monografia.

AGRADECIMENTOS

“O temor do Senhor é o princípio da ciência; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução.” (Provérbios 1:7).

Primeiramente a Deus pelo fim de mais esta etapa e por sempre iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, José Roberto de Oliveira e Célia Dionéia de Oliveira, por acreditarem no meu potencial e sempre me apoiarem em minhas escolhas com tanto amor e compreensão.

Ao Prof. Dr. Sérgio Pereira pela orientação, ajuda, confiança, dedicação, paciência e amizade, as quais foram fundamentais para a minha formação e o desenvolvimento desta monografia.

À Prof. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro pela preocupação e ajuda.

Aos meus amigos do laboratório pela constante convivência e troca de conhecimentos: Gelson, Gio, Cristina, Alessandra, Amanda, Danielle, Leonardo e Gustavo.

Aos meus amigos de sala pela convivência diária. Em especial: Bruna, Mariana, Giovana, Nayana, Tamara, Lucas, Diego e Victor, pelos estudos em grupo e troca de conhecimentos.

Aos meus amigos Vinícius e Bruna pela verdadeira amizade e companheirismo.

A todas as minhas amigas de Catanduva, Ana Elisa, Fabiola, Fernanda Brussi, Fernanda Trindade, Lara, Mariana, Mariele, Raíssa e Tais, que mesmo com a distância sempre me apoiaram e me deram forças para não desistir dos meus objetivos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer de próstata é a segunda causa de morte por câncer no país. Devido a esse fator, surgiu o interesse de mostrar qual a relação existente entre a cirurgia de vasectomia e a incidência do carcinoma prostático. Alguns estudos epidemiológicos apontaram o aumento do risco de câncer de próstata em homens vasectomizados (Emard *et al.*,2001). Por outro lado outros autores defenderam que não existe correlação (Patel *et al.*,2005) e ainda há aqueles que disseram que a vasectomia está relacionada com a redução do risco de câncer de próstata (Ross,1983). Diante de uma análise dos trabalhos publicados, tal discussão permanece até hoje.

A vasectomia ou deferentectomia é um método anticoncepcional masculino, o qual consiste na secção dos ductos deferentes do homem, impedindo que os espermatozóides sejam expelidos juntamente com o líquido seminal durante a ejaculação, e é uma das cirurgias mais simples, econômicas e sem complicações pós-operatórias

Este trabalho tem como objetivo avaliar o processo de proliferação celular e avaliar imuno-histoquimicamente a expressão dos marcadores específicos de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e Ki-67, na próstata de gerbilo, após indução química pela injeção intraperitoneal do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU), pois a regulação do equilíbrio funcional entre os processos de proliferação celular e apoptose, está relacionada com a hiperplasia e o carcinoma prostático.

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório do Departamento de Anatomia, juntamente com a coleta dos dados para análise posterior.

Palavras-chave: próstata, vasectomia, proliferação celular, gerbilo.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death in the country. Due to this factor, the interest of showing what relationship exists between vasectomy surgery and the incidence of prostate carcinoma has started. Some epidemiological studies showed an increased risk of prostate cancer in vasectomized men (Emard et al., 2001). On the other hand other authors have argued that there is no correlation (Patel et al., 2005) and there are those who said that vasectomy is linked to reduced risk of prostate cancer (Ross, 1983). Faced with an analysis of published works, such discussion remains today.

The vasectomy, or deferentectomy, is a contraceptive male method, which is the section of the vas deferens of man by preventing the sperm from being expelled along with the seminal fluid during ejaculation, and is one of the most simple, economical, uncomplicated post-operative.

This study aims to evaluate the process of cell proliferation and to evaluate immuno-histochemically the expression of specific markers of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and Ki-67, in the prostate of the gerbil after chemical induction by intraperitoneal injection of the carcinogen N-methyl -N-nitrosourea (MNU), because the regulation of the functional balance between cell proliferation and apoptosis is associated with hyperplasia and prostatic carcinoma.

The experimental procedure was performed at the Laboratory of the Department of Anatomy, along with collecting the data for later analysis.

Keywords: prostate, vasectomy, cell proliferation, gerbil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Manutenção dos gerbilos em biotério.....	15
3.2. Formação dos grupos experimentais, realização dos procedimentos cirúrgicos e aplicação do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU)	15
3.3. Coleta do material biológico	16
3.4. Processamento histológico da próstata	16
3.5. Padronização da técnica de Imuno-histoquímica	16
3.6. Análise de imagens e fotodocumentação	17
3.7. Análise estatística	17
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	23
7. BIBLIOGRAFIA	23

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a correlação entre o câncer de próstata e a vasectomia tem sido o motivo de várias discussões. Alguns estudos epidemiológicos apontaram o aumento do risco de câncer de próstata em homens vasectomizados (Emard *et al.*,2001). Por outro lado outros autores defenderam que não existe correlação (Patel *et al.*,2005) e ainda há aqueles que disseram que a vasectomia está relacionada com a redução do risco de câncer de próstata (Ross,1983). Diante de uma análise dos trabalhos publicados, tal discussão permanece até hoje.

A vasectomia ou deferentectomia é um método anticoncepcional masculino utilizado desde a primeira metade do século passado. Esta cirurgia consiste na secção dos canais deferentes do homem, impedindo que os espermatozóides sejam expelidos juntamente com o líquido seminal durante a ejaculação, e é uma das mais simples, econômicas e sem complicações pós-operatórias (Linnet,1983).

Nos Estados Unidos mais de 15% dos homens acima dos quarenta anos foram submetidos à vasectomia como método anticoncepcional; no mesmo país o câncer de próstata é a segunda causa de morte por câncer. Já nos países desenvolvidos, o câncer de próstata ocupou o primeiro lugar em incidência de neoplasias, correspondendo a aproximadamente 10% de todos os cânceres diagnosticados na população masculina do mundo todo (Cancer Statistics, 2005), e é também o segundo lugar em mortalidade por câncer em homens, perdendo apenas pelo câncer de pulmão (Reiter & Dekemion, 2002).

O câncer de próstata é uma moléstia claramente associada ao envelhecimento masculino. Aos 50 anos de idade, 30% dos homens submetidos à biópsias podem apresentar focos histológicos da neoplasia, com ou sem significado clínico. 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). Das patologias que acometem a próstata, as mais comuns são: Hiperplasia Benigna Prostática (HBP), Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP) e Adenocarcinoma Prostático.

A próstata é um conjunto de glândulas túbulos-alveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática. Tais glândulas são formadas por epitélio cilíndrico simples secretor e por estroma muito vascularizado e rico em células musculares lisas. A secreção prostática é um líquido fino de aspecto leitoso que compõe o volume do sêmen e apresenta

propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito, colaborando com a motilidade e a fertilidade dos espermatozóides (Aumüller *et al.*, 1989).

Os níveis constantes de andrógenos circulantes são responsáveis pelo crescimento normal, pela diferenciação e pela manutenção da integridade funcional (secretora) e estrutural da próstata. Tais atividades ocorrem através da integração recíproca entre o mesênquima e o epitélio (Cunha *et al.*, 2004). A proliferação e morte celular são monitoradas por estes andrógenos que controlam a circulação sanguínea local; os mesmos possuem três funções principais nas células prostáticas: (1) podem estimular a proliferação, especialmente nas células epiteliais; (2) estimulam a diferenciação das células epiteliais secretoras; (3) inibem a apoptose de células prostáticas (Marker *et al.*, 2003).

A testosterona, principal hormônio andrógeno, atua nas células epiteliais secretoras luminais via receptor nuclear. Mas, nas células basais e estromais, esse mesmo hormônio é convertido pela 5- α -rdutase em di-hidrotestosterona, a qual é cerca de 10 vezes mais potente que a testosterona e, também, liga-se ao receptor nuclear de andrógeno (William, 2001).

A testosterona também pode ser convertida através da enzima aromatase em estrógeno, o qual regula o desenvolvimento e função da próstata em varias fases da vida do homem. A produção desse estrógeno na próstata interfere no crescimento prostático. Sua regulação sobre a próstata tem sido considerada um fator hormonal de risco para o desenvolvimento de hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata (Lou *et al.*, 2005).

O desenvolvimento neoplásico é marcado pelos importantes processos de proliferação e de morte celular (apoptose), os quais são atividades biológicas fundamentais tanto para processos fisiológicos, como patológicos. A regulação do ciclo celular é dependente de proteínas quinases (Wang *et al.*, 2003) e outras proteínas como a p16, p27 e p53 (Fernandez, 2002). Assim, o ciclo celular pode ser estudado em diferentes fases através do estudo de marcadores moleculares relacionados à proliferação celular - como Ki67 e PCNA e relacionados à apoptose - como DNA fragmentado, p53 e caspases (Wang *et al.*, 2005).

O PCNA (Poliferation Cell Nuclear Antigen) é a proteína acessória da DNA polimerase e é sintetizada nas fases G1 e S do ciclo celular. Entretanto, o PCNA correlaciona-se com o estado proliferativo da célula. A detecção imuno-histoquímica do mesmo indica que a célula está em divisão e não na fase G0 do ciclo. A proteína Ki-67 é uma proteína nuclear e nucleolar, atua especialmente nos componentes granulares durante as fases G1, G2 e M

(McCormick *et al.*, 1993), e está fortemente associada com a proliferação de células. Anticorpos criados contra a proteína Ki-67 permite avaliar imuno-histologicamente a proliferação celular, a qual é característica de neoplasias humanas. A expressão exclusiva nas células em proliferação, obtida por anticorpos criados contra a proteína Ki-67, tem sido uma grande ferramenta na pesquisa do câncer (Scholzen *et al.*, 2000) e na utilização como marcador diagnóstico em vários tipos de tumores malignos. Anticorpos que reconhecem a Ki-67 encontradas em ratos e camundongos foram descritos recentemente e estão abrindo portas para a investigação sobre a regulação da proteína Ki-67 em modelos animais experimentais (Endl *et al.*, 2000).

O componente central do processo de apoptose é um sistema proteolítico que envolve uma família de proteases chamadas caspases. Essas são uma família de proteínas intracelulares envolvidas na iniciação e na execução da apoptose. Há dois tipos de caspases: inicializadoras (8, 9 e 12) e executoras (2, 3, 6 e 7). As inicializadoras são capazes de ativar as executoras ou amplificar a cascata de caspases pelo aumento da ativação das inicializadoras. Enquanto que as executoras clivam substratos citoplasmáticos (como actina e citoqueratinas) e nucleares (como polimerase e lamininas), culminando na apoptose (Kim *et al.*, 2001).

A falha no mecanismo de regulação do equilíbrio funcional entre os processos de proliferação celular e apoptose está relacionada com a hiperplasia e o carcinoma prostático (Carson & Rittmaster, 2003). Com isso, os marcadores moleculares de proliferação celular e apoptose são alvo de grande interesse, pois sua modificação no padrão de expressão pode provocar um desequilíbrio entre esses processos, fator chave na compreensão da carcinogênese (Davis & Day, 2002). Recentemente verificou-se que a proliferação celular na próstata ventral de ratos aumentou sete dias após vasectomia (Pereira *et al.*, 2006). Isso despertou interesse em estudar a possível influência da vasectomia no estabelecimento de lesões neoplásicas na próstata ventral, porque os novos resultados podem ajudar no entendimento da correlação entre vasectomia e câncer de próstata.

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo da carcinogênese prostática; Bosland (1996) fez ampla revisão da literatura abordando tais modelos para indução (química e hormonal) de tumores prostáticos. A incidência de tumores prostáticos provocados pela administração crônica de testosterona (indução hormonal) é de baixa a moderada em muitas linhagens de ratos (Bosland, 1992), mas não em todas (Shirai, 1991). Na

maioria dos estudos, os carcinomas desenvolvem-se primeiramente na próstata dorsolateral e glândula de coagulação e, posteriormente, na próstata ventral (Shirai, 1991).

A exposição perinatal ao estrógeno é outro modelo experimental de indução hormonal de tumores de próstata. Em 1983 Ari e colaboradores trataram ratos Wistar com dietilestilbestrol (DES), a partir do nascimento até um mês de idade, e encontraram metaplasia escamosa, mas não hiperplasia e lesões neoplásicas. A exposição neonatal ao estrógeno pode conduzir a *imprints* lobo-específicos da próstata pelo processo conhecido como estrogenização, que está associada a várias lesões prostáticas como hiperplasia epitelial, NIP, adenocarcinomas e inflamação crônica, durante o envelhecimento (Huang *et al.*, 2005).

A indução química de tumores prostáticos pode ser feita pela aplicação do carcinógeno químico diretamente no tecido prostático ou pela administração sistêmica. A aplicação direta na próstata do carcinógeno químico provoca sarcomas e carcinomas de células escamosas, porém apenas alguns carcinógenos químicos – como N-nitrosobis-(2-oxopropil)-amina e 3,2-dimetil-4-aminobifenil – são eficientes na indução de tumores de próstata pela administração sistêmica em ratos (Shirai *et al.*, 1991).

O modelo que se torna mais eficiente é o da exposição ao carcinógeno seguida da administração de andrógenos, embora os modelos de indução hormonal e química provoquem lesões na próstata de algumas linhagens de ratos. Em 1992 Pollard obteve experimentalmente próstatas cancerosas a partir de injeções intraperitoneais de N-metil-N-nitrosuréia associadas a injeções intradérmicas de propionato de testosterona. Esse modelo é eficaz, pois em 45 semanas desenvolveu tumores em até 90% dos ratos Lobund-Wistar submetidos ao tratamento.

Por apresentar uma frequência relativamente alta de neoplasias prostáticas espontâneas nove meses depois da indução, o gerbilo também sofreu indução experimental de tumores prostáticos, enquanto que no rato Wistar tais lesões desenvolvem-se quinze meses após indução (Zanetoni *et al.*, 2004).

Os gerbilos têm sido amplamente utilizados para estudos de natureza científica, principalmente pelo fato de terem comportamento extremamente dócil em cativeiro (Domeniconi *et al.*, 2007); outra vantagem desses animais é o fato deles serem consideravelmente menores que os ratos, mas essencialmente maiores que os camundongos e hamsters. O controle da micção é também uma importante característica dos gerbilos, os quais

por serem de origem desértica, consomem pouca quantidade de líquido, facilitando a manutenção da limpeza nas gaiolas em cativeiro e promovendo grande higiene nas salas de biotérios (Scarano *et al.*, 2006). O gerbilo é considerado sexualmente maduro a partir dos 3 meses de idade, quando se inicia o período reprodutivo do gerbilo macho. Esse período termina por volta dos 12 aos 15 meses de vida, quando o gerbilo atinge a senilidade (Harkness & Wagner, 1995).

A próstata ventral do gerbilo está constituída de dois lobos amarelados, imediatamente ventrais à bexiga urinária, exatamente no ponto em que a uretra recebe os dois ductos ampulatórios, tais lobos estão ligados na junção da bexiga urinária com as vesículas seminais (Pinheiro *et al.*, 2003). A próstata desse roedor apresenta glândulas formadas por epitélio simples e altamente secretório. Entre os ductos glandulares, encontra-se o estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com poucas fibras conjuntivas e elásticas, além de abundantes células musculares lisas dispostas concêntricamente. Ultra-estruturalmente o epitélio prostático apresenta heterogeneidade entre os seus tipos celulares (Zanetoni, 2007).

Na próstata do gerbilo senil, na qual podem ocorrer alterações morfológicas espontâneas, foram observadas alterações neoplásicas intra-epiteliais, adenocarcinomas e hiperplasia estromal (Zanetoni, 2007). Lesões proliferativas foram evidenciadas na próstata de gerbilos senis após aproximadamente $18 \pm 5,4$ meses. Recentemente, também, notou-se o aumento da proliferação celular epitelial na próstata ventral de gerbilos vasectomizados, com conseqüente desequilíbrio entre os processos de morte e proliferação celular, em favor desta (Pereira *et al.*, 2009).

Perante a morfologia semelhante à próstata humana, a próstata do gerbilo desperta interesse biológico e biomédico, devido a sua compacidade e fusão dos seus lobos. Este tipo de conformação anatômica não está presente no rato e no camundongo, onde os lobos são distintos (Price, 1963). Vale ressaltar que o gerbilo apresenta facilidade e plasticidade de manuseio em laboratório (Zanetoni, 2007).

2. OBJETIVO

Avaliar o processo de proliferação celular e avaliar imuno-histoquicamente a expressão de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e Ki-67, na próstata de gerbilo, após indução química pela injeção intraperitoneal do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos gerbilos em biotério: No Biotério do Departamento de Anatomia – Instituto de Biociências – UNESP – Campus Botucatu, 40 gerbilos machos adultos, *Meriones unguiculatus*, foram mantidos em gaiolas de plástico com tampa de aço inox forradas com maravalha, sob condições ambientais controladas (tais como: temperatura, umidade do ar e 12/12 horas claro/escuro). Os gerbilos receberam dieta sólida e água “ad libitum”.

3.2. Formação dos grupos experimentais, realização dos procedimentos cirúrgicos e aplicação do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU): Os gerbilos foram divididos em dois grupos experimentais (simulado ou “sham” e vasectomizado).

Vasectomizado: os animais desse grupo foram divididos em dois subgrupos – *vasectomizado 01* e *vasectomizado 02*.

Aos 110 dias de idade, os gerbilos do subgrupo *vasectomizado 01* e *vasectomizado 02*, foram anestesiados com 1 ml de Dopalen® (1,16 mg de cloridrato de quetamina/10ml de veículo q.s.p.), 0,5ml de Rompun® (2g de cloridrato de xilazina/100ml de excipiente q.s.p.) e 1ml de solução fisiológico (0,9%) por quilograma (Kg) de peso do animal, via intraperitoneal. A vasectomia foi realizada através de incisão abdominal sagital mediana. Os ductos deferentes, juntamente com os vasos deferentes, foram ligados - com o uso de fios de algodão nº1 - em duas regiões diferentes (0.5 cm de distancia uma da outra). O fragmento entre as duas ligaduras foi removido e desprezado. Posteriormente, foi realizada sutura da incisão em duas etapas: músculo e pele.

Aos 120 dias de idade, os gerbilos do subgrupo *vasectomizado 02* receberam dose única do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU) via intraperitoneal (30mg de MNU/1 Kg de peso corpóreo).

Simulado (sham): os animais desse grupo foram divididos em dois subgrupos – *simulado 01 e simulado 02*.

Aos 110 dias de idade, os gerbilos dos subgrupos *simulado 01 e simulado 02*, foram anestesiados com 1 ml de Dopalen® (1,16 mg de cloridrato de quetamina/10ml de veículo q.s.p.), 0,5ml de Rompun® (2g de cloridrato de xilazina/100ml de excipiente q.s.p.) e 1ml de solução fisiológico (0,9%) por quilograma (Kg) de peso do animal, via intraperitoneal. A simulação foi realizada através de incisão abdominal sagital mediana. Realizou-se manipulação dos órgãos genitais simulando a vasectomia e, em seguida, foi suturada a incisão em duas etapas: músculo e pele.

Aos 120 dias de idade, os animais dos subgrupos *simulado 02* receberam dose única do carcinógeno N-metil-N-nitrosuréia (MNU) via intraperitoneal (30mg de MNU/1 Kg de peso corpóreo).

Após a realização das cirurgias os animais ficaram em observação durante o período de recuperação.

3.3. Coleta do material biológico: Foi realizada eutanásia por decapitação dos gerbilos de todos os grupos experimentais aos 360 dias de idade seguida de laparotomia abdomino-pélvica para coleta da próstata ventral.

3.4. Processamento histológico da próstata: Os fragmentos da próstata foram fixados em solução de formaldeído por 24 h. Após a fixação os fragmentos foram lavados em água corrente por 24h e armazenados em solução de álcool 70% até o momento da inclusão. Durante o processo de inclusão os fragmentos foram desidratados em série de soluções alcoólicas de concentrações crescentes (80, 90 e 100%) e diafanizados em xilol. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em *Paraplast*® e cortados com 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas histológicas silanizadas.

3.5. Padronização da técnica de Imuno-histoquímica: As lâminas histológicas contendo os fragmentos da próstata ventral de gerbilo foram desparafinizadas em dois banhos de 15 minutos de xilol, e em seguida, hidratadas em série decrescente de alcoóis (100, 90 e 70%), seguida de lavagem em água corrente.

A recuperação do antígeno foi realizada em tampão Citrato 10mM pH 6,0 por 40 minutos em panela de pressão (PCNA) e em tampão citrato 10mM pH 6,0 por 5 minutos em

microondas (Ki67). Após o resfriamento natural, as lâminas foram lavadas em água deionizada e, em seguida, incubadas com *Peroxidase Block* (Novocastra®) por 10 minutos para realização do bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, 2 vezes por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com *Protein Block* (Novocastra®) por 10 minutos para realização do bloqueio protéico. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, 2 vezes 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Ki67 (mouse monoclonal antibody Ki-67 – Novocastra® na diluição 1:200 em tampão Fosfato 10mM pH 7,4) ou anti-PCNA (mouse monoclonal antibody PCNA – Novocastra® na diluição 1:100 em tampão Fosfato 10mM pH 7,4) por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, 2 vezes por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com *Post Primary Block* (Novocastra®) por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, 2 vezes por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com *Polimer* (Novocastra®) por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão Tris HCl 0,05M pH 7,6, 2 vezes por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com *DAB cromogen* (Novocastra®) por 5 minutos para revelação. Posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 2 minutos, enxaguadas em água corrente, desidratadas em série alcoóis e montadas com lamínula.

3.6. Análise de imagens e fotodocumentação: As lâminas foram fotografadas com a câmera AxioHR Zeiss acoplada ao microscópio AxioPhot 2. O software AxioVision 4.7 foi utilizado para análise de imagens e mensuração das seguintes variáveis: altura do epitélio da próstata de gerbilo (em μm), índice (percentual) de células epiteliais PCNA positivas (em %) e índice (percentual) de células epiteliais Ki67 positivas (em %). Para variável altura do epitélio foram realizadas 500 aferições por grupo experimental. Para as variáveis, índice de células PCNA positivas e índice de células Ki-67 positivas, foram realizadas contagens em 10 campos (fotografados aleatoriamente em objetiva de 40X) por animal por grupo experimental.

3.7. Análise estatística: Os resultados de altura de epitélio, índice de células PCNA positivas e índice de células Ki67 positivas de todos os grupos experimentais, foram apresentados na forma de média e desvio-padrão e submetidos à análise de variância complementada com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

Os dados de média e desvio padrão da altura do epitélio da próstata de gerbilo são apresentados na Tabela 1. Analisando esses resultados, podemos notar que: não houve diferença estatística significativa entre os grupos simulado 01 e simulado 02, mas houve diferença estatística significativa entre os grupos simulado 01 e vasectomizado 01; também houve diferença significativa entre os grupos vasectomizado 01 e vasectomizado 02; e entre os grupos simulado 02 e vasectomizado 02. (**Tabela 1**).

Tabela 1. Altura do epitélio da próstata de gerbilo, em μm .

Grupo	Simulado 01	Simulado 02	Vasectomizado 01	Vasectomizado 02
Altura epitélio	$11,05 \pm 2,79^{a*}$	$11,88 \pm 4,27^{ab}$	$12,17 \pm 2,76^b$	$15,62 \pm 5,87^c$

* Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,001$).

Os dados de índice de células epiteliais PCNA positivas na próstata de gerbilo são apresentados na Tabela 2 na forma de média e desvio padrão. Quando comparamos o subgrupo vasectomizado 01 com o simulado 01, verificamos que o número de células PCNA positivas é maior no vasectomizado 01. Na comparação entre os subgrupos vasectomizado 02 e simulado 02, verificou-se que o número de células PCNA positivas é maior no subgrupo vasectomizado 02 (**Figura 1**).

Quando comparamos os subgrupos simulado 01 e simulado 02, verificamos que o número de células PCNA positivas é maior no simulado 02. Na comparação entre os subgrupos vasectomizado 01 e vasectomizado 02, verificou-se que o número de células PCNA positivas é maior no subgrupo vasectomizado 02 (**Figura 1**).

Os dados de índice de células epiteliais Ki-67 positivas na próstata de gerbilo são apresentados na Tabela 2 na forma de média e desvio padrão. Quando comparamos o subgrupo vasectomizado 01 com o simulado 01, verificamos que o número de células Ki-67 positivas é maior no vasectomizado 01. Na comparação entre os subgrupos vasectomizado 02

e simulado 02, verificou-se que o número de células Ki67 positivas é maior no subgrupo vasectomizado 02 (**Figura 2**).

Quando comparamos os subgrupos simulado 01 e simulado 02, verificamos que o número de células K-i67 positivas é maior no simulado 02. Na comparação entre os subgrupos vasectomizado 01 e vasectomizado 02, verificou-se que o número de células Ki-67 positivas é maior no subgrupo vasectomizado 02 (**Figura 2**).

Ao compararmos o índice de células PCNA positivas com o índice de células Ki67 positivas de um mesmo subgrupo, notamos que o índice de células Ki-67 positivas foi maior.

Tabela 2. Índice de células epiteliais PCNA positivas e Índice de células Ki-67 positivas na próstata de gerbilo, em %.

Grupo	Simulado 01	Simulado 02	Vasectomizado 01	Vasectomizado 02
Índice PCNA	$3,19 \pm 0,015^{Ba*}$	$10,90 \pm 0,041^{Bb}$	$11,58 \pm 0,040^{Bc}$	$19,71 \pm 0,072^{Bd}$
Índice Ki-67	$1,69 \pm 0,013^{Aa}$	$3,41 \pm 0,016^{Ab}$	$3,65 \pm 0,019^{Ac}$	$3,76 \pm 0,022^{Ad}$

* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os índices e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,001$).

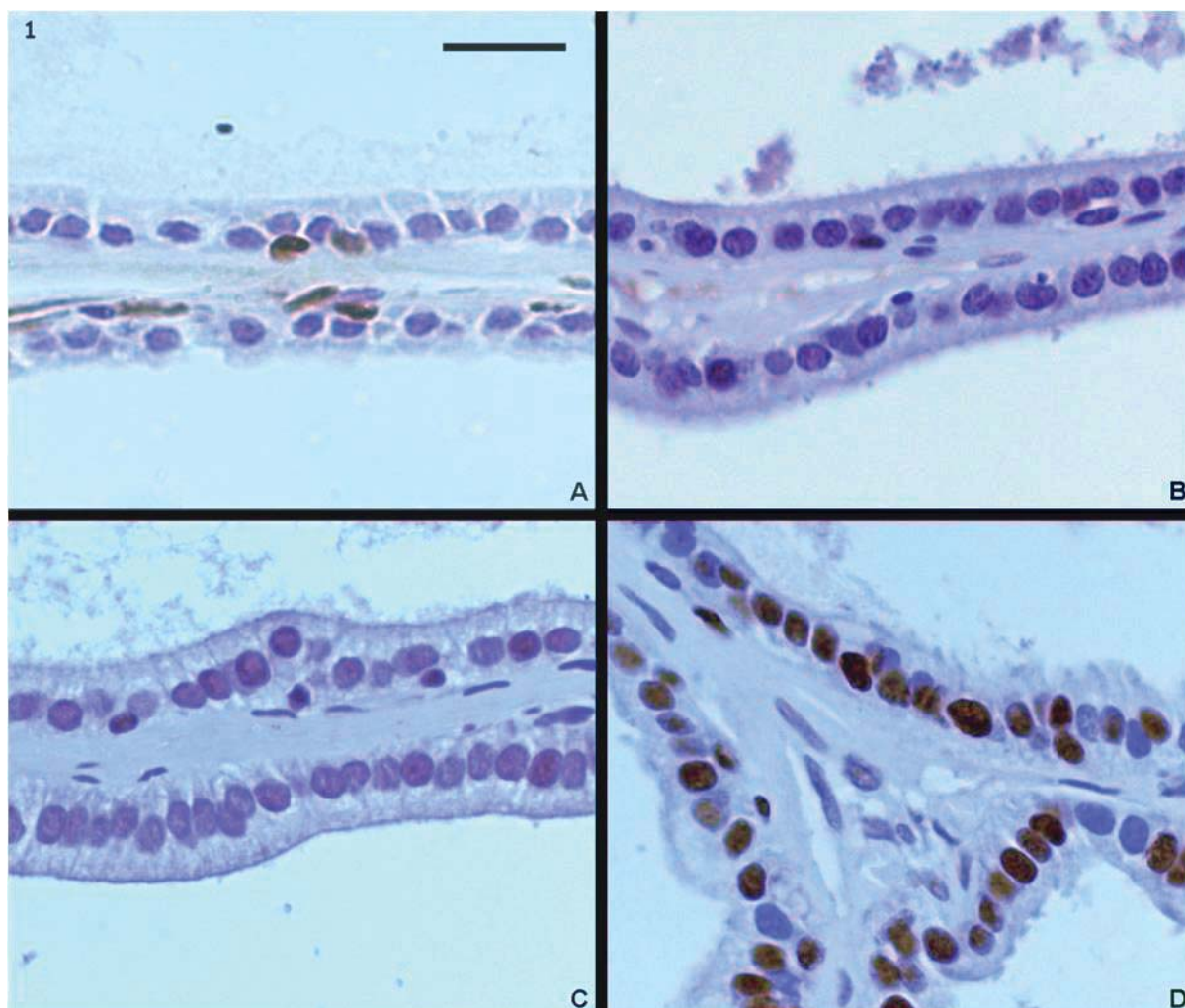


Figura 1. Fotomicrografias da próstata de gerbilos submetidos a reação imuno-histoquímica anti-PCNA. A) subgrupo Simulado 01. B) subgrupo Simulado 02. C) subgrupo Vasectomizado 01. D) subgrupo Vasectomizado 02. As células coradas em marrom (castanho) são células PCNA-positivas, as demais são PCNA-negativas. Barra=20 μ m.

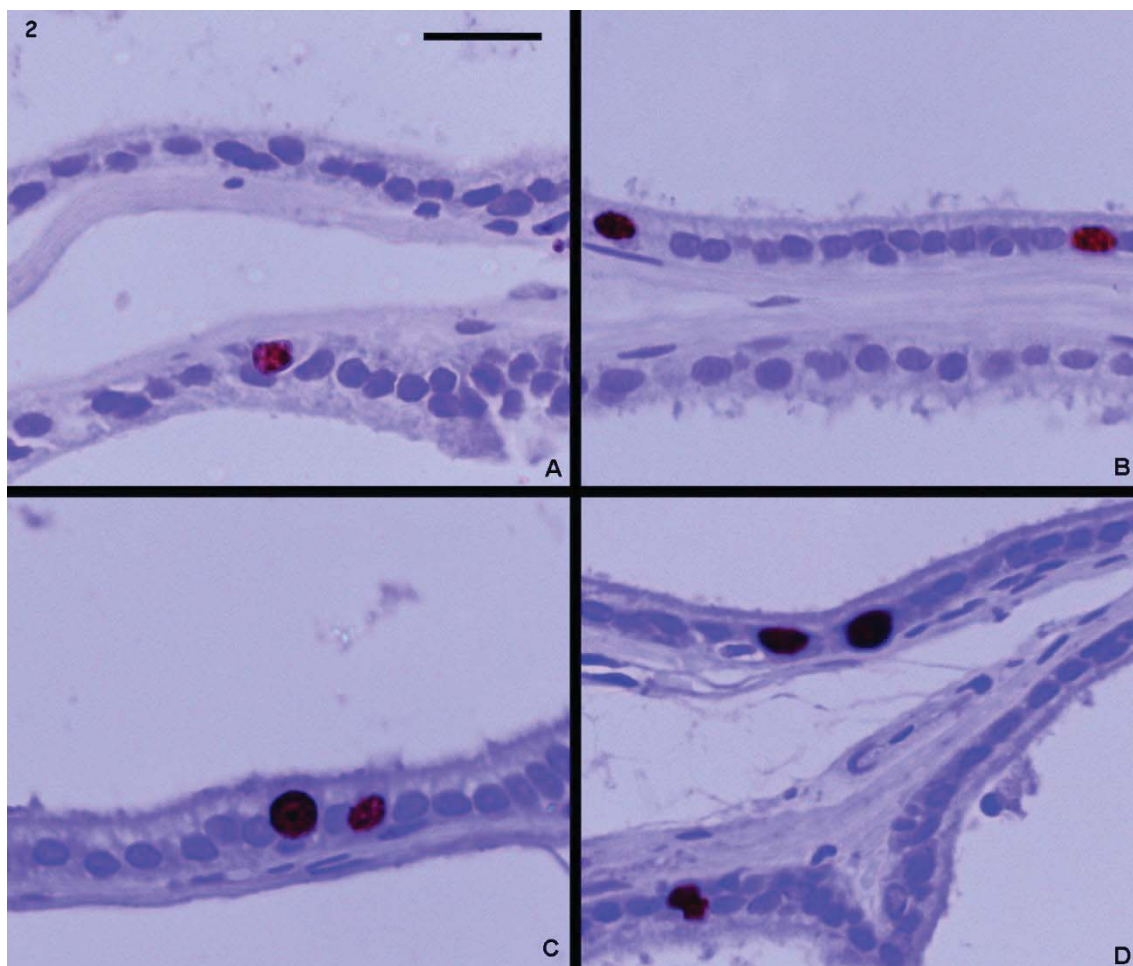


Figura 2. Fotomicrografias da próstata de gerbilos submetidos a reação imuno-histoquímica anti-Ki67. A) subgrupo Simulado 01. B) subgrupo Simulado 02. C) subgrupo Vasectomizado 01. D) subgrupo Vasectomizado 02. As células coradas em marrom (castanho) são células Ki67-positivas, as demais são Ki67-negativas. Barra=20µm.

5. DISCUSSÃO

De acordo com as análises feitas em relação à altura do epitélio de todos os grupos, podemos notar que os subgrupos que receberam a aplicação do carcinógeno MNU apresentaram altura do epitélio maior do que os subgrupos que não receberam. Também podemos notar que os subgrupos que foram submetidos à vasectomia também apresentaram altura do epitélio maior do que os subgrupos simulados. Possivelmente a vasectomia, bem como o carcinógeno MNU, promovem uma pequena hipertrofia celular epitelial.

Comparando os índices de células PCNA-positivas e células Ki-67-positivas, há maior especificidade para o Ki-67 e verifica-se que a interpretação dos resultados é igual para ambos os marcadores, porém o valor absoluto para cada marcador foi diferente. Esses resultados corroboram com dados da literatura que relatam imunoreatividade para o PCNA em todas as fases do ciclo celular, exceto G0; e imunoreatividade para Ki-67 somente nas fases G1, G2 e M do ciclo celular (Esposito et al., 2000). Assim, pode-se afirmar que a expressão do Ki-67 ocorre por um período menor do ciclo celular que a do PCNA, constituindo um marcador mais seletivo. Esses dados corroboram com dados da literatura. Esposito e colaboradores (2000) concluíram que os índices de PCNA foram mais elevados do que os de Ki-67 em cada espécime estudado, fato explicável pela meia-vida de até 20 horas do primeiro antígeno.

Com base nos resultados podemos notar que os subgrupos que foram submetidos à cirurgia de vasectomia apresentaram maior índice de células PCNA positivas e Ki-67 positivas. Esses resultados corroboram com Pereira e colaboradores (2006), que verificaram o aumento dos índices de células PCNA e Ki67 positivas na próstata de ratos 7 dias após vasectomia. Já em relação à aplicação do carcinógeno MNU, os subgrupos que receberam aplicação de MNU apresentaram maior índice de células PCNA positivas e Ki-67 positivas. Esposito e colaboradores concluíram que a determinação da imunoreatividade dos marcadores Ki-67 e PCNA é um método objetivo e quantificável para avaliar a proliferação celular que pode subsidiar as informações prognósticas.

O aumento dos índices de células PCNA e Ki-67 positivas na próstata de gerbilos 8 meses após a cirurgia também está de acordo com a literatura. Pereira e colaboradores (2010) verificaram que os índices de células PCNA e Ki-67 positivas na próstata de gerbilos são maiores quando a análise é realizada 8 meses após a cirurgia do que quando é realizada 4 meses após. Esses resultados também corroboram com dados da literatura que evidenciam

aumento do risco relativo de câncer de próstata em homens quando a vasectomia é realizada precocemente (Cox et al., 2002). Fatores ainda não determinados podem estar envolvidos na alteração prostática pós-vasectomia, quando essa é realizada no início do período reprodutivo.

6. CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que:

- A vasectomia promove aumento da proliferação celular no epitélio da próstata ventral de gerbilo;
- O carcinógeno MNU promove aumento da proliferação celular no epitélio da próstata ventral de gerbilo;
- A interação entre vasectomia e MNU promove aumento da proliferação celular na próstata de gerbilo maior do que os dois fatores isoladamente.

7. BIBLIOGRAFIA

- ARAI, Y.; MORI, T.; SUZUKI, Y. et al. Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. *Int. Rev. Cytol.*, v.84, p.235-68, 1983.
- AUMÜLLER, G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat. Embryol.*, v.179, p.519-31, 1989.
- BILLIS, A. Uropatologia: Próstata. Guia prático para o diagnóstico anatopatológico. Editora UFG, 1997.
- BOSLAND, M.C. Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *J. Cell Biochem. Suppl.*, v16(H), p.89-98, 1992.
- BOSLAND, M.C. Chemical and hormonal induction of prostate câncer in animal models. *Urol. Oncol.*, v.2, p.99-128, 1996.

- BRAWLEY, O. W.; GIOVANNUCCI E.; KRAMER, B. S. Epidemiology of prostate cancer. In Vogelzang, N. J.; Shipley, W. U.; Scardino, P. T.; Coffey, D. S. Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, 2nd ed., Lippincott Williams & Wilkins, p.533-44, 2000.
- CANCER STATISTICS. *Ca. Cancer J. Clin.*, v.53(1), p.5-26, 2005.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urol.*, v.61 (4A1), p.2-7, 2003.
- CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L. Collagen type IV is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue Cell*, v.29, p.163-170, 1997.
- CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A. et al., Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, v.92, p.221-36, 2004.
- DAVIS, J.N.; DAY, M.L. The convergence of hormone regulation and cell cycle prostate physiology and prostate tumorigenesis. *Mol. Biotechnol.*, v.22 (2), p.129-38, 2002.
- DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; BEU, C.C. et al. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell*, p. 47-57 (39-1). 2007.
- EMARD, J.F.; DROUIN, G.; THOUÉZ, J.P. et al. Vasectomy and prostate cancer in Quebec, Canada. *Health & Place*, v.7, p.131-139, 2001.
- ENDL, E.; GERDES, J. The Ki-67 Protein: Fascinating Forms and an Unknown Function. Department of Immunology and Cell Biology, Division of Molecular Immunology, Research Center Borstel, D-23845 Borstel, Germany, 2000.
- ESPOSITO, J.P.E.; CAMARGO, R.S.; FILHO, A.L.; LORETO, C.; KANAMURA, C.T.; TOLOSA, E.M.C. Immunohistochemical expression of markers pcna, ki67 and p53 in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. 2000
- FERNANDEZ, P.L.; HERNANDEZ, L.; FURRE, X. et al. Alterations of cell cycle-regulatory genes in prostate cancer. *Pathobiol.*, v.70 (1), p.1-10, 2002.

- HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. The biology and medicine of rabbits and rodents. 372p, 1995.
- HAYWARD, S. W.; HAUGHNEY, P. C.; ROSEN, M. A.; et al. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. *Differ.*, v. 63, p.131-40, 1998.
- HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.*, v.153(2), p. 333-39, 1998.
- HOWARDS, S.S. Possible biological mechanism for a relationship between vasectomy and prostatic cancer. *Eur. J. Cancer*, v.29A, p.1060-2, 1993.
- HUANG, L.; PU, Y.; ALAM, S.; et al. The role of Fg/10 signaling in branching morphogenesis and gene expression of the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev. Bio.*
- KIM, J.M.; GHOSH, S.R.; WEIL, A.C.P. et al. Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinol.*, v.142(9), p.3809-16, 2001.
- LINDER, S.; HAVELKA, A.M.; UENO, T. et al. Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Letters*, v.214, p.1-9, 2004.
- LINNET, L. Clinical immunology of vasectomy and vasovasostomy. *Urol.*, v.22, p.101-14, 1983.
- LOU, Y.; MURTOLA, T.; TUOHIMAA, P. Regulation of aromatase and 5- α -reductase by 25-hydroxyvitamin D₃, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, dexamethasone and progesterone in prostate cancer cells. *Ster. Biochem. & Mol. Biol.*, v.94, p.151-57, 2005.
- MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R. et al. Hormonal, cellular and molecular control of prostate development. *Develop. Biol.*, v.253, p.165-74, 2003.
- MCCORMICK D, YU C, HOBBS C, HALL PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of all proliferation associated antigens. *Histopathology* 22: 543-7, 1993.

- PATEL, D.A.; BOCK, C.H.; SCHWARTZ, K. et al. Sexually transmitted diseases and other urogenital conditions as risk factors for prostate cancer: a case-control study in Wayne Country, Michigan. *Cancer Causes Control*, v.16(3), p.263-73, 2005
- PEREIRA, S.; ROFATTO, H.K.; CAMARGO, A.E.B.; MARTINEZ, M.; PINHEIRO, P. F. F.; MARTINEZ, F.E.; MELLO JÚNIOR, W. Proliferative alterations in the gerbil ventral prostate induced by vasectomy. *Cell Biology International*, 2009 (artigo em submissão).
- PINHEIRO, P.F; ALMEIDA, C.C.; SEGATELLI, T.M. et al. Struture of the pelvis and penile uretra-relationship with the ducts of the sex accessory glands oh the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Anatomy*, p. 431-44 (202-5). 2003.
- POLLARD, M. The Lobund-Wistar rat model of prostate cancer. *J. Cell Biochem.*, v.16(H), p.84-88, 1992.
- PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v.12, p.1-27, 1963
- REITER R. E.; DEKERNION, J. B. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In Walsh P. C.; Retik, A. B.; Vaughan E. D.; Wein, A. J. *Campbell's Urology*. 8th ed. Saunders Philadelphia, p.3003-24, 2002.
- ROSS, R.K.; PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, B.E. The etiology of prostate cancer: what does the epidemiology suggest? *Prostate*, v.4, p.333-44, 1983.
- SCARANO, W.R.; VILAMAIOR, P.S.; TABOGA, S.R. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, p. 1190-200 (288-11). 2006.
- SCHOLZEN, T.;GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322, 2000.
- SHIRAI, T.; FUKUSHIMA, S.; IKAWA et al. N. Induction of prostate carcinoma in situ at high incidence in F344 rats by a combination of 2,3' –dimethyl-4-aminobifhenyl and ethinyl estradiol. *Cancer Res.*, v.46, p.6423-26, 1991.
- WANG, H.; YU, S.; DAVIS, A.T. et al. Cell cycle dependent regulation of protein kinase CK2 sinaling to the nuclear matrix. *J. Cell Biochem.*, v.88 (4), p.812-22, 2003.

WANG, Z.B.; LIU, Y.Q.; CUI, Y.F. Pathways to caspase activation. Cell Biol. Int., in press, 2005.

WILLIAM, D. S. 5- α -reductase activity in the prostate. Urol., v.58(6A), p.17-24, 2001.

ZANETONI, C. Carcinogênese na prostate ventral do gerbilo da Mongólia: desenvolvimento espontâneo e induzido por N-metil-N-nitrosuréia. [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 2007.

ZANETONI, C.; CAMPOS, S.G.P.; GÓES, R.M.; et al. Experimental prostate carcinogenesis in the gerbil. In: XII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, Campinas. Abstracts, p.69, 2004.