



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

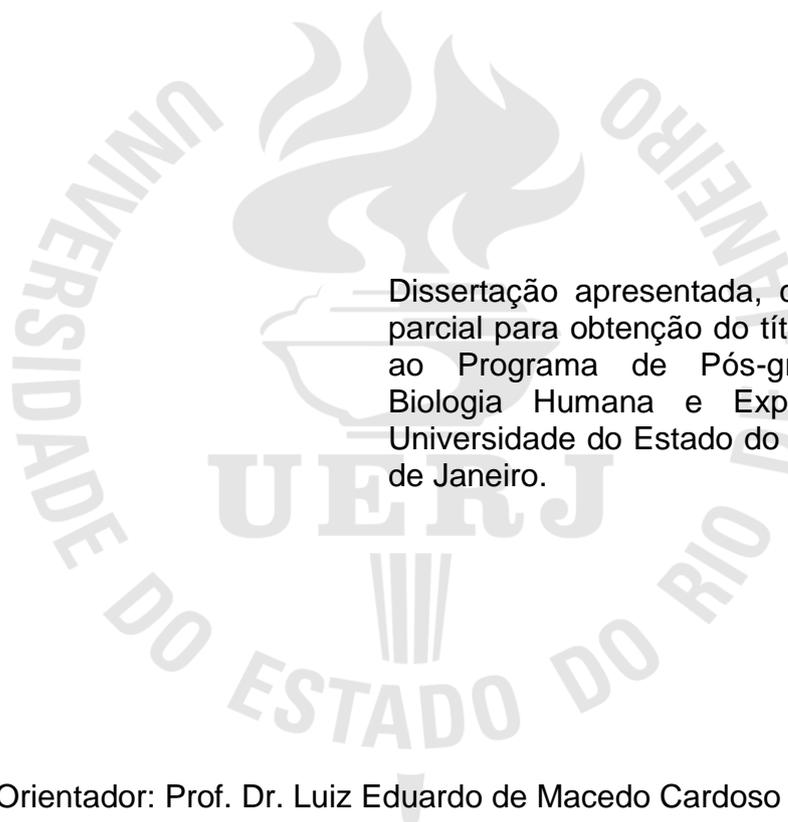
Filipe Gabriel Reis Monteiro

**Expressão proteica de proteoglicanos e outros componentes da
matriz extracelular no estroma das diferentes regiões da próstata
humana normal**

Rio de Janeiro
2018

Filipe Gabriel Reis Monteiro

Expressão proteica de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular no estroma das diferentes regiões da próstata humana normal



—Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Rio de Janeiro
2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M775 Monteiro, Filipe Gabriel Reis.

Expressão proteica de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular no estroma das diferentes regiões da próstata humana normal / Filipe Gabriel Reis Monteiro. – 2018.

64 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hiperplasia prostática – Fisiopatologia – Teses. 2. Neoplasias da Próstata – Fisiopatologia – Teses. 3. Proteoglicanas – Química – Teses. 4. Imuno-Histoquímica – Métodos. I. Cardoso, Luiz Eduardo de Macedo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.65-091.8

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Filipe Gabriel Reis Monteiro

Expressão proteica de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular no estroma das diferentes regiões da próstata humana normal

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de março de 2018

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Fabiane Ferreira Martins
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Márcio Antônio Babinski
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro
2018

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus por toda inspiração, afinal viver histórias diferentes ao longo da vida não seria fácil de outra forma; a minha família pelos bons ideais que me fizeram desenvolver, e pelo meio de cultura que alimentou essa minha vontade de procurar evoluir; aos novos e antigos mestres que me inspiraram, tenho certeza que tive os melhores; aos amigos que sempre me fizeram sorrir, combustível essencial para essa caminhada que hoje faço, jamais esquecerei. Isso tudo é um até logo e não um adeus afinal.

AGRADECIMENTOS

Não cresci em meio a rotina biomédica, tão pouco um dia pestanejei vir a ter carinho pela área da saúde. Cresci no compasso da popularização do mundo tecnológico e bebi dessa fonte até a vida madura; entretanto, esse rio passou. Existem afluentes que mesmo após anos de timidez, despertam com força, e esta é impossível parar. É bem verdade que não sou enfermeiro de assistência, e que minha paixão sempre foi acadêmica, mas ver desta forma não foi de princípio fácil, tão pouco elegante; por isso agradeço a Giovane Oliveira, Rosely Galvão e Andrezza Franco por ver nesta minha característica muito mais que excentricidade, vocês são mestres de verdade.

Hoje eu funciono pois dentro de mim enzimas catalisam energia que me impulsionam cada vez mais longe nessa vida acadêmica, mas entender isso só foi possível através de professores inspiradores e turmas carismáticas; por isso agradeço ao Gustavo Coelho e todas as turmas que fui monitor. Agradeço a oportunidade dada pelo professor Luiz Eduardo, ao qual ampliou minha visão do mundo da bioquímica. Não tem um dia se quer que eu não seja cativado pelos proteoglicanos e glicosaminoglicanos.

Um rio não teria para onde continuar correndo se não fosse a oportunidade de encontrar caminhos abertos, hoje eu encontro e sou incentivado a fluir para mais longe. Diante disso agradeço ao Jorge Luiz por ter me inserido na vida científica e ao professor Carlos Mandarim por deixar que eu subisse mais um degrau, fomentando meus questionamentos e disponibilizando meios para que eu os respondesse.

Apesar de no fim tudo parecer que as coisas contribuíram para dar certo, tudo poderia ter dado errado, mas Deus colocou pessoas boas em minha vida; agradeço ao Ricardo Luzardo por entender minha dedicação ao laboratório, e que esse era meu sonho. Também agradeço a Fabiana Araújo pela colaboração do material para a imunohistoquímica, ao Reginaldo e a Raquel Rosário por terem me acolhido e aberto as portas para a coleta das amostras usadas aqui. Sou imensamente grato a toda equipe de morfologia da Unigranrio, vocês são como família. E por falar em família, sou agradecido por não ter só uma; por isso obrigado a todos do LMMC por esses quase quatro anos de aventuras, em especial a Thatiany Marinho, Fabiane Martins e Priscila Carapeto.

Agora que essa etapa se conclui, estou voltando por um tempo, e é vocês que quero rever e dedicar meu tempo: Loiane Ferreira, Brenno de Freitas, Isabella de Freitas, minha vó Neide, Rodolfo França (que revisou parte da minha dissertação), Fabiano Videira, Denis Tavares, Felipe Stikpursk, Wagner Maurício, Dyanelly Alves, Carine Fernandes e Marcelle Reis

E por último mas não menos importante, aqueles que mantêm o constante ritmo da minha vida, a quem dedico tudo que fui e sou, vocês que sonharam meu futuro bem antes de planejá-lo; Luiz Eduardo (Pai), Rosineide Valerie (Mãe) e Raquel Shadai (Irmã), amo vocês. Não imagino nenhum capítulo da minha vida sem nós quatro juntos.

You're the beginning and the end, more than I can comprehend. There is no one like
You.

Hillsong Worship

RESUMO

MONTEIRO, Filipe Gabriel Reis. **Expressão proteica de proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular no estroma das diferentes regiões da próstata humana normal**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), são consideradas algumas das patologias mais frequentes no homem adulto. A incidência particular destas doenças em regiões específicas da próstata levam a conjectura da existência de heterogeneidade nas zonas propostas por McNeal. Este estudo teve por objetivo analisar a composição do estroma destas diferentes zonas, com foco em proteoglicanos; para isso, foram coletadas amostras de próstata normais de jovens adultos com idade entre 17 e 28 anos, as quais posteriormente foram seccionadas para análises histológicas e bioquímica de colágeno total. Foram usados anticorpos primários contra α -actina, decorin, biglycan, versican V1 e fibronectina. A imunomarcagem foi avaliada a partir do método *colour deconvolution* e as médias entre as zonas foram comparadas usando *one-way* ANOVA seguido pelo método Holm-Sidak, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O material estudado compreendeu a uma amostra homogênea de adultos jovens. O ensaio bioquímico de hidroxiprolina variou significativamente entre as zonas da próstata ($p < 0,001$). O conteúdo de fibronectina, biglycan e decorin também mostraram variações estatisticamente distintas no estroma de cada uma dessas zonas ($p < 0,001$; $p = 0,003$; $p < 0,001$ respectivamente). O versican V1, apesar de não variar em densidade por região ($p = 0,357$), foi caracterizado por sua marcação quase que exclusivamente em nervos. A marcação de α -actina também não variou em quantidade e intensidade ($p = 0,404$). O estudo mostra uma forte evidência da existência de heterogeneidades entre as diferentes zonas da próstata humana normal, a qual podem estar associadas a mecanismos protetores ou fisiopatológicos diferenciados entre elas.

Palavras-chave: próstata; anatomia zonal; proteoglicanos; imuno-histoquímica; bioquímica total de colágeno.

ABSTRACT

MONTEIRO, Filipe Gabriel Reis. *Protein expression of proteoglycans and other components of extracellular matrix in the stroma of different regions of the normal human prostate*. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (CaP) are considered some of the most common pathologies in adult men. The particular incidence of these diseases in specific regions of the prostate leads to the conjecture of the existence of heterogeneity in the areas proposed by McNeal. This study aimed to analyze the stromal composition from this different zones, focusing on proteoglycans; for this, normal prostate samples were collected from young adults aged 17 to 28 years old, as they were sectioned for histological analysis and total collagen biochemistry. Primary antibodies against α -actin, decorin, biglycan, versican V1 and fibronectin were used. Immunohistochemistry assay was evaluated from the color deconvolution method and as means between how zones were compared one-way ANOVA pathway following the Holm-Sidak method, the results were considered significant when $p < 0.05$. The studied material comprised a homogeneous sample of young adults. The biochemical assay of hydroxyproline varied significantly between the zones of the prostate ($p < 0.001$). The content of fibronectin, biglycan and decorin also showed statistically distinct variations in the stroma of each zone ($p < 0.001$, $p = 0.003$, $p < 0.001$ respectively). The versican V1, although not varying in density by region ($p = 0.357$), was characterized by its marking almost exclusively on nerves. The α -actin marking also did not vary in quantity and intensity ($p = 0.404$). The study shows strong evidence of the existence of heterogeneities between different zones of the normal human prostate, which may be associated with different protective or pathophysiological mechanisms.

Keywords: prostate; zonal anatomy; proteoglycans; immunohistochemistry; biochemistry of total collagen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão interna da pelve masculina.....	18
Figura 2 -	Dimensões da próstata humana normal e sua anatomia zonal....	19
Figura 3 -	Diferença estromal das diferentes zonas da próstata humana.....	21
Figura 4 -	<i>Whole mount em plano transversal de uma secção de próstata normal entre a base e o colículo seminal, corada com tricrômico de Masson</i>	36
Figura 5 -	zonas da prostáticas coradas por picrosirius red	40
Figura 6 -	Imunomarcção anti-fibronectina	41
Figura 7 -	Imunomarcção anti-biglycan	42
Figura 8 -	Imunomarcção de decorin	43
Figura 9 -	Imunormação anti-versican v1	44
Figura 10 -	Imunomarcção anti- α -actina	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos e biométricos das amostras de próstata.....	38
Tabela 2 -	Expressão de diferentes componentes do estroma das diferentes zonas da próstata humana.....	46
Tabela 3 -	Análise estatística da expressão dos diferentes componentes do estroma das diferentes zonas da próstata humana.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS	<i>A desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
AFS	Estroma fibromuscular anterior
CaP	Câncer de próstata
CZ	Zona central (do inglês <i>central zone</i>)
DAB	3,3' diaminobenzidina
DABw%	Quantidade relativa de imunomarcção (do inglês DAB weight %)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>Epidermal growth factor</i>)
FGF5	<i>Fibroblast growth factor 5</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IGFBP4	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 4</i>
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase 1</i>
MEC	Matriz extracelular
PGs	Proteoglicanos
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática (do inglês <i>prostatic intraepithelial neoplasia</i>)
PSA	Antígeno prostático específico (do inglês <i>prostate-specific antigen</i>)
PZ	Zona periférica (do inglês <i>peripheral zone</i>)
SLRP	Proteoglicanos ricos em leucina (do inglês <i>Small leucine-rich proteoglycans</i>)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TURP	Ressecção transuretral da próstata (do inglês <i>transurethral resection of the prostate</i>)
TZ	Zona de transição (do inglês <i>transition zone</i>)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	Próstata normal	16
1.2	Patologia da próstata	22
1.2.1	<u>Hiperplasia prostática benigna (HPB)</u>	22
1.2.2	<u>Câncer da próstata</u>	23
1.3	Matriz extracelular e proteoglicanos	25
1.3.1	<u>Proteoglicanos ricos e leucina (SLRP)</u>	26
1.3.2	<u>Versican</u>	27
1.3.3	<u>Fibronectina</u>	28
1.3.4	<u>Colágeno</u>	29
2	OBJETIVOS	31
2.1	Geral	31
2.2	Específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Histologia	32
3.2	Histoquímica	33
3.3	Imunohistoquímica	33
3.4	Quantificação da Imunohistoquímica	34
3.5	Determinação Bioquímica da Concentração de Colágeno Total	35
3.6	Estatística	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Dados demográficos e biométricos	38
4.2	Colágeno total	38
4.3	Fibronectina	41
4.4	Biglycan	42
4.5	Decorin	42
4.6	Versican V1	44
4.7	α-actina para músculo liso	45
5	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS	54
ANEXO - Autorização oficial do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto para a coleta de amostras	64

INTRODUÇÃO

De todos os tumores malignos que acometem indivíduos do sexo masculino, o câncer de próstata tem a mais alta taxa de incidência e é a segunda causa mais frequente de morte por câncer (Tabayoyong e Abouassaly, 2015). Além disso, a hiperplasia prostática benigna (HPB), que afeta acentuadamente a qualidade de vida, é a doença urológica mais prevalente em homens com idade acima dos 50 anos (Mobley *et al.*, 2015).

Anatomicamente, a glândula prostática é dividida em quatro diferentes regiões ou zonas. Com base nos estudos pioneiros de McNeal (1968, 1981) essas regiões têm sido tradicionalmente denominadas de estroma fibromuscular anterior (AFS), caracterizado pela ausência de epitélio glandular; zona central (CZ) e zona periférica (PZ), as quais constituem em torno de 95% do tecido glandular na próstata de adultos jovens; e de menores dimensões a zona de transição (TZ). Posteriormente, outros termos foram propostos para essas regiões, baseados em critérios de terminologia anatômica mais modernos (Wendell-Smith, 2000). Entretanto, de acordo com a recomendação mais recente, os termos tradicionais supre com mais eficiência as necessidades histopatológicas deste órgão e por isso devem ser mantidos (Myers *et al.*, 2010).

Embora essas divisões anatômicas em regiões ou zonas nem sempre sejam aparentes, elas são de qualquer maneira de grande importância na patologia prostática. O câncer de próstata (CaP), por exemplo, ocorre muito mais comumente na zona periférica, enquanto que a HPB é causada basicamente por um crescimento da zona de transição (Myers *et al.*, 2010). A distribuição anatômica diferenciada desses processos patológicos sugere a existência de heterogeneidades morfológicas e/ou importantes heterogeneidades histológicas (Srodon e Epstein, 2002) e funcionais (Terry e Clark, 1996; Li *et al.*, 2001) nas regiões da próstata. Se não levadas em consideração, essas diferenças podem resultar em erros de interpretação, e até mesmo de diagnóstico histopatológico, quando se avalia as alterações no tecido prostático (Srodon e Epstein, 2002).

Além de fornecer suporte para as estruturas glandulares (Babinski *et al.*, 2007), o estroma prostático também expressa fatores parácrinos, como *fibroblast growth factor 5* (FGF5), *insulin-like growth factor 2* (IGF2), *insulin-like growth factor-binding*

protein 4 (IGFBP4), e *matrix metalloproteinase 1* (MMP1), que diretamente afetam a proliferação de células do epitélio glandular, tanto benigno quanto maligno (Wang *et al.*, 2011). Da mesma maneira que o epitélio, ao qual apresenta diferenças entre as zonas da próstata humana, heterogeneidades na distribuição de componentes do estroma das diferentes zonas prostáticas também já foram mostradas em humanos (Zhang *et al.*, 2003). No entanto, as análises do estroma que foram feitas nesses casos se restringiram aos dois tipos mais frequentes de colágeno, e, além disso, as amostras foram obtidas de indivíduos com idade variando entre 18 e 45 anos. Deve-se notar que o tamanho da próstata aumenta com a idade (Roehrborn *et al.*, 2009), e que aos 45 anos aproximadamente 20% dos homens já apresentam algum grau de crescimento da glândula prostática (Epstein *et al.*, 1984; Bostwick *et al.*, 1992).

Através do estudo realizado por Cardoso *et al.* (2004) foi mostrado que na HPB a expressão de proteoglicanos de condroitin sulfato, que são outros componentes da matriz extracelular (MEC) do estroma, estava não apenas aumentada, mas também se localizava especificamente na região periacinar. Esses proteoglicanos podem estar assim associados à proliferação epitelial que ocorre na HPB. Nesse estudo, foram utilizadas somente amostras de zona de transição, o que sugere que a expressão desses proteoglicanos pode ser específica para essa região.

Proteoglicanos são glicoconjugados complexos encontrados principalmente nos tecidos conjuntivos e na superfície das células. Eles desempenham diversos papéis na biologia normal das células e tecidos, e estão envolvidos em uma série de processos patológicos, incluindo o câncer (Theocharis *et al.*, 2010). Na verdade, a maioria das investigações sobre o envolvimento de proteoglicanos na patologia da próstata tem-se centrado sobre o câncer. Por exemplo, os sindecans, uma família de proteoglicanos da superfície celular (Bernfield *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 1999), têm sido associados com alterações fenotípicas de epitélio para mesênquima, com o crescimento andrógeno-independente, e com a progressão tumoral (Contreras *et al.*, 2010; Popovic *et al.*, 2010).

Apesar da importância dos proteoglicanos na patologia da próstata, como visto acima, não há dados mostrando a distribuição dos diferentes tipos dessas macromoléculas na matriz extracelular das diferentes regiões da próstata humana.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Próstata normal

As primeiras ilustrações e observações sobre as glândulas sexuais masculinas são datadas do século XVI por Andreas Vesalius, e até mesmo a interação funcional entre testículo e próstata já são conhecidos há anos através dos relatos de John Hunter (Aaron *et al.*, 2016). Entretanto os aspectos morfológicos da próstata ainda vem sendo alvo de estudos e intensas discussões revisitadas ao longo dos anos afim de elucidar os mecanismos fisiopatológicos deste órgão.

A próstata é a maior glândula acessória do sistema genital masculino, é também um órgão retroperitoneal com uma face anterior, separada da sínfise púbica pela gordura retroperitoneal do espaço retropúbico, e uma face posterior, relacionada com a ampola retal pela fáschia retoprostática. Sua base envolve o colo da bexiga, e a mesma se estende até o ápice repouso sobre a face superior do diafragma urogenital, por fim suas laterais se relacionam com o músculo levantador do ânus. A próstata está presente na maioria dos mamíferos e é importante na função reprodutiva pois secreta um líquido leitoso, e ligeiramente alcalino (pH de 7,29) rico em fosfatase ácida, ácido cítrico e fibrinolizina que irão participar na ativação e nutrição dos espermatozoides. Em um adulto jovem e saudável as dimensões dessa glândula variam pouco, entre ± 3 cm no plano vertical (apical-basal), ± 4 cm no plano transversal (esquerda à direita) e $\pm 2,5$ cm no plano sagital (anteroposterior) (Samaratunga *et al.*, 2011), seu peso é de ± 30 g sem as vesículas seminais (Berry *et al.*, 1984; Samaratunga *et al.*, 2011; Wilson, 2011), e seu formato comumente é comparado com o de uma noz.

Em indivíduos geneticamente normais, o sexo genotípico é precocemente determinado uma vez que aja fecundação do espermatozoide X ou Y, entretanto, o sexo gonadal só começa a ser estabelecido após a 7ª semana de desenvolvimento embrionário através da interação de três porções: as gônadas fetais, o seio urogenital, e dois pares de ductos genitais (mesonéfricos e paramesonéfricos). No sexo masculino, a diferenciação sexual é um processo assimétrico, determinado sob a influência dos andrógenos produzidos pelo testículo fetal. Há a regressão do par de ductos paramesonéfricos, sob a influência do hormônio anti-Mülleriano, expressado

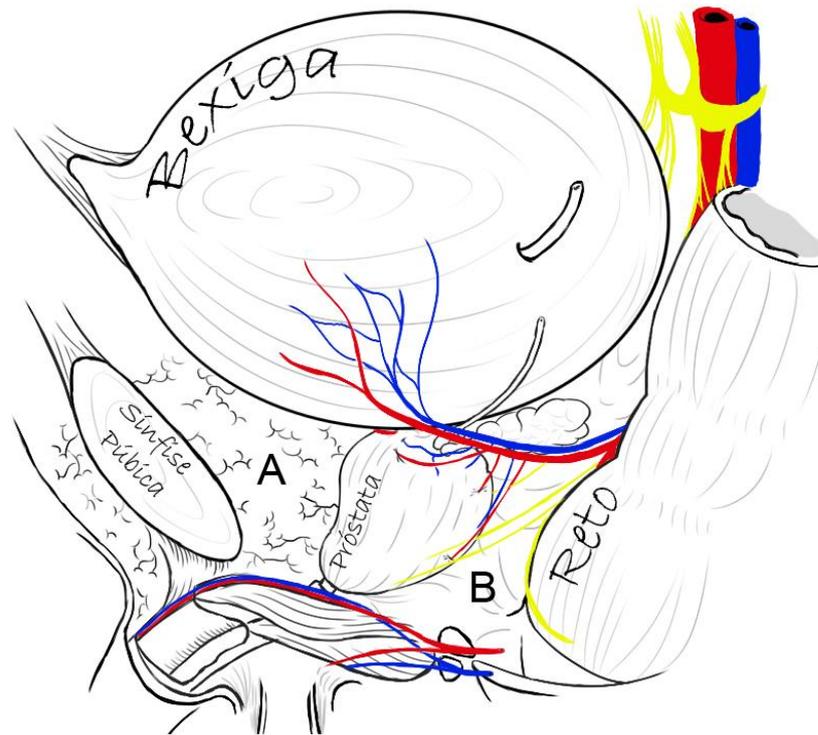
nas células testiculares de Sertoli e a estabilização, pelos andrógenos, do par de ductos mesonéfricos (Aaron *et al.*, 2016).

A diferenciação sexual masculina continua sob a influência da testosterona produzida pelas células de Leydig do testículo fetal. Há o desenvolvimento, a partir dos ductos mesonéfricos, do par de ductos deferentes (que darão origem as vesículas seminais), epidídimos e ductos ejaculatórios. O epitélio da uretra prostática, originado do endoderma, começa a proliferar lateralmente ao seio urogenital e formar brotos no tubérculo paramesonéfrico, na qual penetrarão no mesênquima circunjacente e enfim darão origem a próstata. Sob o controle mesenquimatoso do local, os brotos formarão cordões ramificados e começarão a desenvolver um lúmen que dará origem a uma rede de túbulos e alvéolos característicos das glândulas prostáticas, que aos poucos sofrerão diferenciação (Wilson, 2011; Aaron *et al.*, 2016).

A porção proximal da uretra, envolvida pela próstata, em seu terço médio, mais precisamente na parede posterior, apresenta uma saliência oval denominada colículo seminal (do inglês *Veromontanum*), na qual está próxima ao óstio de desembocadura das glândulas prostáticas, este denominado utrículo prostático, uma estrutura residual embrionária. Esta proeminência apresenta a saída para onde os ductos ejaculatórios, que atravessam a próstata, confluem.

A próstata humana é composta por vários componentes glandulares e não glandulares que estão compactados por uma cápsula fibromuscular em comum. Esta cápsula é densa e neurovascular, incorporando os plexos prostáticos de veias, que drenam para as veias íliacas internas, e nervos que tem origem no plexo hipogástrico inferior. Sua irrigação é feita através das artérias prostáticas que são ramos principalmente das artérias íliacas internas (Figura 1). Histologicamente a próstata consiste em 30 a 50 glândulas tubuloalveolares, a grande maioria delas apresentando epitélio pseudoestratificado cilíndrico, que envolvem a uretra prostática e estão dispostas em três camadas concêntricas: uma camada mucosa, com glândulas que se abrem e secretam seu conteúdo diretamente na uretra, uma camada submucosa e uma camada periférica, ambas com conjuntos de glândulas que secretam seu conteúdo por meio de ductos que desembocam no seio prostático na parede posterior da uretra (McNeal, 1981, 1988).

Figura 1 – Visão interna da pelve masculina



Legenda: (A) espaço retro-púbico preenchido pela gordura retroperitoneal; (B) fásia retoprostática separando a próstata do reto. Em vermelho a artéria ilíaca interna e seus ramos; em azul a veia ilíaca interna e seus ramos; e em amarelo o plexo hipogástrico inferior e seus ramos.

Fonte: O autor, 2018.

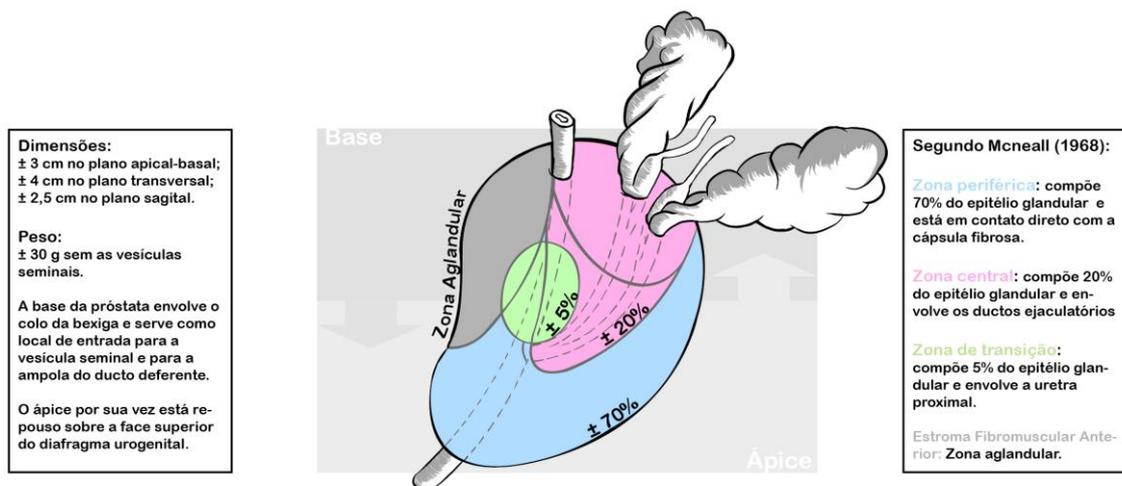
As várias porções tubuloalveolares estão circundadas por um estroma rico em músculo liso, esse está presente de forma distinta e geralmente desorganizada em diferentes zonas da próstata, e conteúdo fibroso, por isso geralmente é descrito como estroma fibromuscular. Durante a ejaculação há a contração dos inúmeros feixes musculares presentes no estroma prostático, forçando a secreção em direção à uretra. O estroma fibromuscular vem sendo alvo assíduo de estudos, já que a distribuição anatômica diferenciada das doenças da próstata sugere a existência de heterogeneidades morfológicas, histológicas (McNeal *et al.*, 1986; Srodon e Epstein, 2002) e funcionais em diferentes zonas da próstata (Terry e Clark, 1996; Li *et al.*, 2001).

Lowsley no começo do século XX começou um debate, que perdura até hoje, sobre a nomenclatura usada para descrever a morfologia prostática (Selman, 2011). De início ele descreveu a próstata humana como sendo um órgão com lobos fusionados e que não podiam ser separados através de dissecação (Lowsley, 1915), o que a distinguia da próstata apresentada pela maior parte dos outros mamíferos, que possuem lóbulos distintos tanto em sua anatomia, quanto histologia e fisiologia,

incluindo a de primatas (Lewis *et al.*, 1981; Robel *et al.*, 1983; Sugimura *et al.*, 1986; Gemzik *et al.*, 1992; Puga *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2015).

Foram os trabalhos de John E. Mcneal na década de 60 que deram força a nomenclatura mais utilizada atualmente, a qual divide a próstata em quatro zonas histologicamente distintas e anatomicamente delimitadas (Figura 2). Apesar dos ácinos dentro de cada zona da próstata terem tamanho e espaçamento distintos, a identificação destas zonas unicamente através destas características não pode ser feita de forma confiável (McNeal, 1968).

Figura 2 – Dimensões da próstata humana normal e sua anatomia zonal



Legenda: a glândula prostática tem diferentes dimensões ao longo de suas extensões; sendo a base mais larga, e o ápice mais fino; por isso sua mensuração deve ser feita considerando os pontos de maiores dimensões (Samaratunga *et al.*, 2011). As cores do esquema representam as zonas segundo (McNeal, 1968), e sua prevalência, que pode aumentar ou diminuir, ao longo das secções.

Fonte: O autor, 2018.

A zona periférica representa cerca de 70% do epitélio glandular da próstata humana, seu estroma é bem característico pois possui feixes de músculo liso desordenados e bem espaçados entre si. Apesar de sua estrutura acinar ser muito parecida com as demais zonas, seus ductos sofrem uma intensa arborização ao passo que se distancia da uretra proximal (McNeal, 1981, 1988). Esta zona é a principal área de desenvolvimento do câncer de próstata e prostatite (Selman, 2011).

A zona central apresenta ductos e ácinos, aos quais representam cerca de 20% do epitélio glandular, envolvendo os ductos ejaculatórios. Está mais presente na base da próstata, desaparecendo gradualmente ao se aproximar do colículo seminal. Seu estroma possui fibras de músculo liso compactas. É reconhecido na literatura que esta zona possui algum mecanismo de proteção, pouco explorado; o aparecimento de

células tumorais nela é considerada incomum, e geralmente quando encontradas são focos secundários originados principalmente da PZ (McNeal, 1981, 1988).

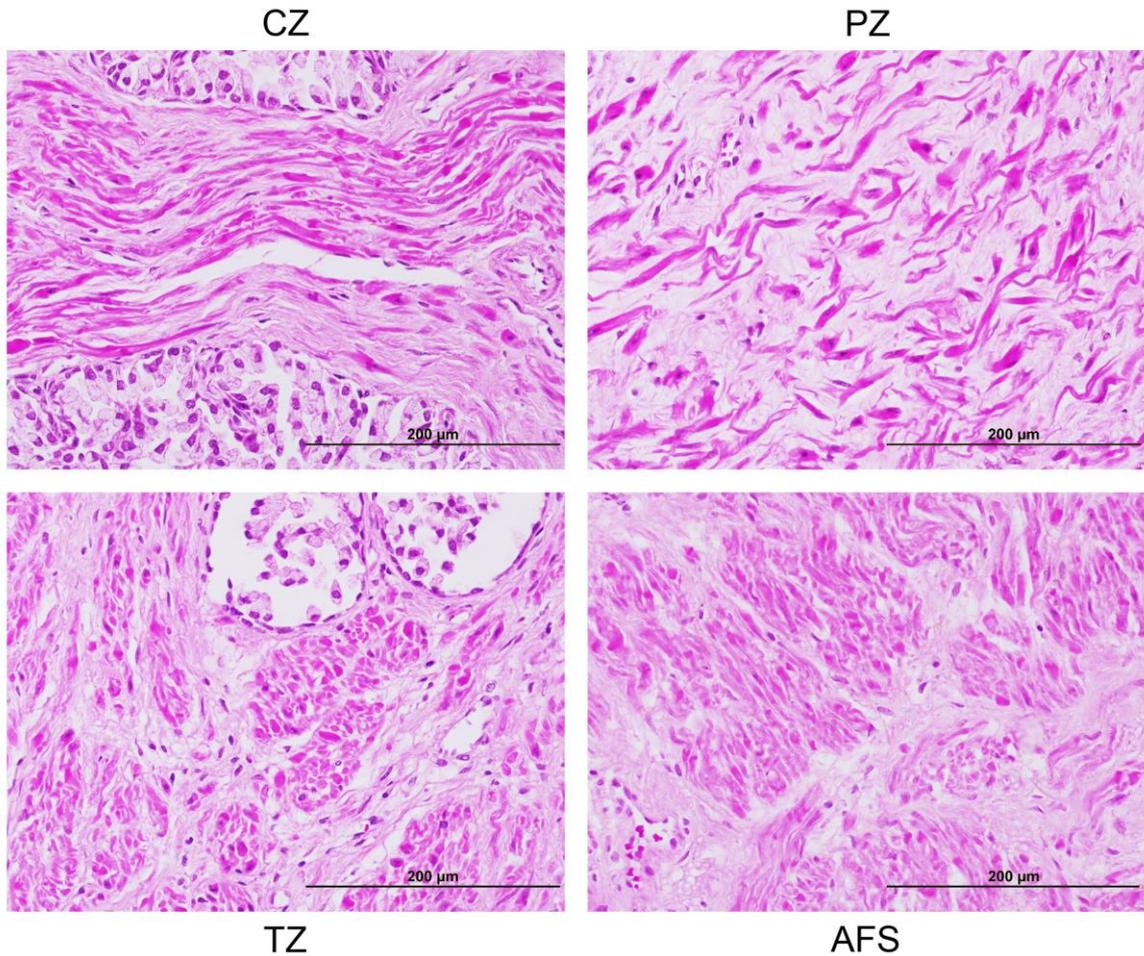
A zona de transição representa uma pequena porção da próstata, ocupando cerca de 5% do epitélio glandular, geralmente apresenta ácinos pequenos e espaçados que envolvem a uretra proximal e são observáveis até a porção terminal do colículo seminal. Seus ductos, a maior parte deles circundados pelo estroma fibromuscular anterior, desembocam na parede anterior da uretra prostática. É a zona que tem a maior prevalência de hiperplasia prostática benigna (McNeal, 1981, 1988; Selman, 2011).

Por último, o estroma fibromuscular anterior, é caracterizado por seu denso conteúdo de músculo liso e tecido conjuntivo, e pela ausência de epitélio glandular (McNeal, 1981, 1988). Até há pouco mais de uma década, acreditava-se que esta zona da próstata não desempenhava papel algum em sua fisiologia; entretanto, estudos vem demonstrando que o desenvolvimento de câncer nesta região não é raro, e sim subestimada pelos patologistas devido a sua localização anatômica dificultar a detecção do mesmo (Bouye *et al.*, 2009). As diferenças no estroma destas diferentes zonas é demonstrada com mais clareza na Figura 3.

No final do século XX foi proposta uma revisão da nomenclatura anatômica proposta por Mcneal, alegando que a mesma não atendia às regras de nomenclatura determinadas pelo comitê federativo de terminologia anatômica da federação internacional de associação de anatomistas. De acordo com esta revisão, a zona periférica que estaria abaixo das demais zonas seria dividida em dois lóbulos, denominados inferomedial e posteromedial, separados por um septo denominado comissura prostática; a zona central passaria a ser chamada de lóbulo superomedial, e a zona de transição de anteromedial (Wendell-Smith, 2000).

Apesar de considerar importante a atualização na nomenclatura anatômica proposta por Wendell-Smith (2000), uma revisão publicada em 2010 por Myers e colaboradores na *Clinical Anatomy* afirma que esta não deveria ser tomada de forma radical e sim como uma regra limitada a estrutura macroscópica, já que não supre as necessidades e particularidades histopatológicas (Myers *et al.*, 2010). Assim sendo, a nomenclatura estabelecida por Mcneal continua sendo ainda hoje a mais precisa, e por consequência a mais utilizada nos estudos e na clínica.

Figura 3 – Diferença estromal das diferentes zonas da próstata humana



Legenda: secção transversal da próstata normal corada com hematoxilina e eosina mostrando a diferença no estroma de suas diferentes zonas. (CZ) apresenta feixes transversais de músculo liso, geralmente ordenados, que estão dispostos próximos uns dos outros; (PZ) apresenta feixes de músculo liso dispersos em seu estroma e espaçados uns dos outros, diferente da zona central; (TZ) apresenta seu conteúdo de músculo liso bem compactado semelhante a “pacotes”; (AFS) seu estroma se assemelha bastante ao da zona de transição apesar de também apresentar feixes de músculo liso dispostos transversalmente, sua maior característica está na ausência de epitélio glandular.

Fonte: O autor, 2018.

1.2 Patologia da próstata

Dois processos patológicos acometem a próstata com frequência suficiente para serem discutidos com maior aprofundamento, são eles: HPB e o CaP. A HPB, uma das principais responsáveis pela diminuição da qualidade de vida no homem, é tão comum e ocorre com tanta frequência em idades mais avançadas que é descrita como um processo normal que acompanha o envelhecimento (Mobley *et al.*, 2015). Já o CaP é uma lesão que vem aumentando sua incidência com o passar dos anos, e atualmente é considerado a segunda causa de morte mais comum no homem (Tabayoyong e Abouassaly, 2015). Esses diferentes tipos de lesões possuem frequências significativamente distintas em cada zona da próstata, suficiente para gerar discussões sobre possíveis heterogeneidades entre elas.

1.2.1 Hiperplasia prostática benigna (HPB)

A HPB é um distúrbio que aumenta consideravelmente sua incidência no homem com a progressão da idade (Lim, 2017). É caracterizado pelo aumento do volume da próstata devido hiperplasia do seu estroma e das células epiteliais, resultando na formação de nódulos que podem crescer em direção a uretra e estreitar seu canal; dependendo do grau de agressividade deste crescimento esse processo pode resultar em sintomas urinários obstrutivos como polaciúria, noctúria, disúria, gotejamento por sobrefluxo, esforço miccional e até infecção do trato urinário devido ao aumento do resíduo pós-miccional. O aumento da resistência ao fluxo urinário pode levar a hipertrofia da musculatura da bexiga e conseqüentemente a trabeculação da parede vesical, em casos mais extremos pode haver aumento da pressão intravesical, que ocasiona a elevação retrógrada da pressão no sistema pielocalicial, resultando em hidronefrose e prejuízo da função renal. A próstata com HPB pode chegar a pesar ± 80 g (Mobley *et al.*, 2015).

A HPB acomete quase que exclusivamente a zona de transição, microscopicamente a característica típica desta lesão é a nodularidade. Inicialmente estas lesões são compostas por nódulos fibromusculares, totalmente formados por

células estromais, mas pode haver o aparecimento de nódulos fibroepiteliais com predominância glandular ao longo de sua evolução (McNeal, 1988). A hiperplasia nodular não é considerada uma lesão pré-maligna.

Pesquisas mostram que a rigidez da próstata na HPB pode estar associada a alterações no estroma, como a diminuição do número de fibras elásticas e colágenas (Babinski *et al.*, 2014). Alterações na relação estrogênio:androgênio ao longo dos anos (Bushman, 2009; Song *et al.*, 2016; Filipovski *et al.*, 2017) e até mesmo de macromoléculas extracelulares, como o aumento local de proteoglicanos de condroitin sulfato, podem estar associados com uma maior pré-disposição da zona de transição a desenvolver a patogênese da HPB (Cardoso *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos que levam a essa morbidade ainda não são totalmente compreendidos, e acredita-se que o principal causador do processo hiperplásico seja a redução na taxa de apoptose, que levaria ao acúmulo de células senescentes nesta zona (Untergasser *et al.*, 2005).

Os casos leves de HPB podem ser tratados sem terapia medicamentosa ou cirúrgica, por exemplo, com diminuição da ingestão de líquidos e álcool. Para casos mais graves pode ser necessário procedimentos mais invasivos como a ressecção transuretral da próstata (TURP) que tem sido o padrão ouro na redução dos sintomas (Moblely *et al.*, 2015).

1.2.2 Câncer da próstata

O câncer de próstata é uma das maiores causas de morte entre homens no mundo. É uma doença característica da idade avançada, geralmente acometendo indivíduos com mais de 50 anos. Existe também intrigantes diferenças raciais e nacionais em sua incidência, sendo o mesmo raro em asiáticos e bastante comum entre negros. A maioria dos cânceres prostáticos tem origem na zona periférica, e podem ser detectados ao exame do toque retal; sua localização afastada da uretra caracteriza o quadro, geralmente assintomático, desta morbidade. Os níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA) podem estar elevados nesta condição, entretanto esse parâmetro não chega a ser conclusivo, mas auxilia na detecção do CaP, já que em condições como a HPB o mesmo também pode sofrer alterações (Pernar *et al.*, 2018).

O PSA é produto do epitélio prostático e é secretado normalmente no sêmen. É uma protease cuja a função é clivar e liquefazer o coágulo seminal formado após a ejaculação, entretanto esse produto também pode ser encontrado em quantidades mínimas circulante no soro sanguíneo.

Entre os tumores que acometem a próstata, o adenocarcinoma é o tipo de lesão mais comum, e também o que tem maior incidência de metástase, geralmente se disseminando para o esqueleto axial. É histologicamente caracterizado por células com padrões glandulares, tipicamente menores que as glândulas benignas, revestidas por uma única camada uniforme de epitélio cuboide ou colunar baixo. Estas glândulas malignas são mais aglomeradas, não possuem ramificações nem dobras papilares, apresentam núcleos avantajados e citoplasma escuro. Acredita-se que a maior parte dos CaP sejam precedidos por uma lesão não invasiva chamada de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), isto porque a maior parte de suas características histológicas podem ser consideradas semelhantes ao de células tumorais (Srodon e Epstein, 2002).

O diagnóstico histológico do CaP através de biópsias ainda acontece, entretanto a escassa quantidade de tecido removido pode muitas das vezes vir com poucas amostras de glândulas malignas em meio a muitas glândulas benignas. Este não é o único desafio, já que a classificação e o estadiamento subjetivo através do escore de Gleason, que se baseia grande parte nos padrões glandulares, pode levar a um diagnóstico superestimado submetendo o indivíduo a um tratamento agressivo desnecessário (Leze *et al.*, 2014). Por último, algumas características particulares de zonas próximas a região acometida por lesões tumorais também podem sugerir diagnósticos errôneos (Srodon e Epstein, 2002). Atualmente, o tratamento mais comum para o CaP é a prostatectomia radical, entretanto a radioterapia e manipulações hormonais também são utilizadas em alguns casos.

Mesmo já tendo conhecimento que características biológicas e o estilo de vida possam pré-dispor indivíduos a essa doença (Pernar *et al.*, 2018); assim como a HPB, os mecanismos desencadeadores do CaP ainda não são totalmente conhecidos. Estudos demonstram que estruturas como nervos periféricos (Sakamoto *et al.*, 1999; Coarfa *et al.*, 2018), células neuroendócrinas (Lugnani *et al.*, 2014), e até mesmo macromoléculas como proteoglicanos (Edwards, 2012) podem ter papel chave na fisiopatologia desta doença.

1.3 Matriz extracelular e proteoglicanos

Uma das principais características das células do tecido conjuntivo é a ampla quantidade de material extracelular que separa suas células. Essa complexa rede de macromoléculas constitui a matriz extracelular; que apesar de muito semelhante nos diversos tecidos animais, varia em densidade, composição, organização e função. Por exemplo, a MEC pode tornar-se calcificada para formar estruturas rígidas como os ossos, ou pode formar a matriz transparente que concede proteção a córnea. Entre seus principais constituintes estão: (1) as proteínas fibrosas, como a elastina que confere elasticidade ao tecido, e o colágeno que confere resistência durante o estiramento; (2) e os glicosaminoglicanos (GAGs) de matriz, que estão covalentemente ligados a um núcleo proteico (do inglês *core protein*) formando os proteoglicanos, na qual podem desempenhar diversos papéis (Rnjak-Kovacina *et al.*, 2017; Llacua *et al.*, 2018).

Os GAGs são cadeias de polissacarídeos lineares, não ramificadas, composta de unidades dissacarídicas repetidas que irão compor \pm 80% do peso dessas macromoléculas. Um dos dois açúcares destas unidades de dissacarídeos é sempre uma hexosamina-acetilada (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) e o outro geralmente é um ácido urônico (D-glicurônico ou L-idurônico). Grupamentos de sulfato são encontrados comumente na maioria desses açúcares, o que concede a molécula uma carga negativa característica dos GAGs.

Com exceção da hialuronana, todos os GAGs são covalentemente ligados a um núcleo proteico para formarem proteoglicanos; essa proteína central é produzida pelos ribossomos, e será futuramente ligada a uma cadeia de polissacarídeos dentro do aparelho de Golgi, através de uma ligação tetrassacarídica unida a um resíduo de serina. Os proteoglicanos podem ser classificados pelo tipo de cadeia de glicosaminoglicanos que decora seu núcleo proteico ou sua localização. Muitos deles são secretados para a MEC mas alguns são intracelulares ou proteínas integrais de membrana, isso permite que possuam numerosas funções biológicas como: diferenciação e migração celular (Wight, 2017); regulação do processo inflamatório (Haylock-Jacobs *et al.*, 2011), angiogênese (Schaefer *et al.*, 2017), proteção da matriz (Neill *et al.*, 2012) e interação com fatores de crescimento (Afratis *et al.*, 2017).

1.3.1 Proteoglicanos ricos e leucina (SLRP)

Os SLRP são proteoglicanos compostos por um núcleo proteico contendo unidades repetidas ricas em leucina, com um radical cisteína em cada extremidade, e estão ligados a pelo menos uma cadeia de GAGs. São amplamente expressos em todos os tecidos, sendo decorin e o biglycan os mais estudados desta família (Rnjak-Kovacina *et al.*, 2017).

O decorin apresenta uma cadeia de condroitin sulfato associado a sua proteína central, está ligado as hélices triplas de colágeno, tendo papel importante na estrutura e montagem destas fibras. É notavelmente uma macromolécula protetora da MEC; diversas células tumorais não expressam decorin, sua presença está associada a regulação pra baixo de receptores para tirosina quinases que estão super expressos em células doentes. Além de impedir a progressão da neoplasia, este proteoglicano também diminui a probabilidade de metástase (Neill *et al.*, 2012).

O poder inibidor do decorin sobre crescimento tumoral é corroborado em diversos estudos e alvos diferentes, como por exemplo sua administração intraperitoneal em espécimes de camundongos (Zhang *et al.*, 2012), que mostraram bons resultados na supressão das células tumorais, e inibição da progressão cancerígena nos diferentes lobos da próstata animal. O decorin na próstata humana não só é considerado um potente inibidor do crescimento tumoral, mas também um excelente indutor de apoptose nestas células (Edwards, 2012).

Apesar do decorin ser classificado como um proteoglicano de MEC, um estudo mostrou através de análises imunohistoquímicas que pode haver expressão desta macromolécula dentro de células doentes em alguns tipos de câncer de pulmão (Hong *et al.*, 2016), e que essa expressão estava ligada ao prognóstico da doença.

Considerando os diferentes estudos com decorin e seu poder supressor na progressão de tumores, trabalhos investigativos sobre seu papel funcional na próstata ainda são escassos. Um dos raros estudos encontrados, feito com 42 biopsias de próstata, demonstram que a expressão de decorin pode estar aumentada próximo a lesões do tipo PIN, mas não no CaP, ao qual diminuiria conforme a progressão da doença (Banerjee *et al.*, 2003). Com camundongos, análises imunohistoquímicas e

ensaios de *western blot* mostram que a distribuição sistêmica de decorin sofre drástica redução na presença de células tumorais em associação a regulação pra baixo da atividade dos receptores do fator de crescimento epidérmico, e de andrógeno (Hu *et al.*, 2009).

O biglycan por sua vez, apresenta uma grande similaridade ao decorin quando se trata de estrutura, exceto por suas duas cadeias de condroitin sulfato associadas a proteína central, entretanto sua semelhança para por aqui, uma vez que o mesmo não parece possuir as mesmas propriedades antiproliferativas.

Um estudo bioquímico em cultura de células com foco nas características hematopoiéticas do biglycan demonstraram que a sua presença influencia na atividade de crescimento de células monocíticas em diferentes tecidos, inclusive medula óssea (Kikuchi *et al.*, 1995). Um outro estudo, envolvendo lúpus nefrite, mostra que a superexpressão de biglycan em ratos controle desencadeia a ativação de citocinas como a CXCL13 em macrófagos, que é responsável por recrutar células β para os rins saudáveis levando a danos. Em contrapartida, a deficiência desse proteoglicano levou a um desfecho mais favorável em camundongos com lúpus (Moreth *et al.*, 2010).

Na próstata humana o biglycan tem sido associado a progressão do CaP. Um estudo de 2017 publicado no jornal “neoplasia”, fez uma análise em amostras de 11,050 prostectomias radicais e observou que a alta expressão deste proteoglicano estava associado a um mal prognóstico da doença, relacionado muitas das vez com o aumento da incidência de metástase. Em áreas saudáveis do tecido essa expressão se encontrou diminuída, quase nula, e mostrava um possível sequestro dessas macromoléculas pelo tecido maligno (Jacobsen *et al.*, 2017). Existe grande interesse no estudo de biglycan na próstata humana e seu valor no entendimento da progressão do CaP, já que este, além de estar envolvido com sinalização imunológica, mostra-se estar envolvido também em vias moleculares intimamente ligadas a metástase óssea (Edwards, 2012).

1.3.2 Versican

O versican é um proteoglicano pertencente à família dos hialectanos, presente na matriz extracelular, envolvido na facilitação de processos como a adesão, migração e diferenciação celular (Wight, 2017). Devido ao seu *splicing* alternativo existem cinco isoformas de versican conhecidas (V0, V1, V2, V3, V4), todas elas consistem em um domínio globular N-terminal e C-terminal, denominados G1 e G3 respectivamente, e a quantidade de GAGs ligados a sua proteína central varia de uma isoforma para outra.

É muito comum o estudo do versican em células nervosas, geralmente envolvendo morbidades como gliomas, neurofibromas, meduloblastomas e neurite (Xiang *et al.*, 2006; Arslan *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2015). Entretanto isoformas como V0 e V1 são encontradas em abundância nos diversos tecidos animais, inclusive na próstata humana, onde foram associadas ao desenvolvimento de nódulos neoplásicos na matriz periglandular (True *et al.*, 2009). Estudos com cultura de células de CaP demonstraram também que o versican produzido por fibroblastos prostáticos inibe a ligação das células doentes à fibronectina, permitindo uma maior mobilidade das células tumorais aumentando assim seu poder metastático (Sakko *et al.*, 2001). Além disso a expressão de versican por fibroblastos se mostrou aumentada através do estímulo do fator de crescimento TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor beta*), em associação a diminuição de proteinases da família das ADAMTS (do inglês *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (Sakko *et al.*, 2003; Binder *et al.*, 2017) responsáveis pela clivagem desta macromolécula.

Desta forma estudos com versican, e suas isoformas, vem demonstrando um terreno fértil para o entendimento do seu poderoso papel na progressão e agressividade do câncer de próstata.

1.3.3 Fibronectina

A fibronectina insolúvel, secretada por fibroblastos, é uma importante glicoproteína adesiva presente na matriz extracelular; sua estrutura envolve dímeros ou multímeros onde cada subunidade é composta por até três sequências curtas de 40, 60 e 90 aminoácidos, conhecidos como domínios do tipo I, II e III respectivamente; cada isoforma de fibronectina possui um ou mais destes domínios capazes de interagir

com diversas moléculas como: colágeno, proteoglicanos e receptores de membrana; empregando assim versatilidade a suas funções biológicas (Brotchie e Wakefield, 1990).

Seu papel na adesão celular é tão forte que estudos envolvendo esta glicoproteína na cicatrização, respostas inflamatórias e na continuidade da gravidez não são raros (Bastian *et al.*, 2016; Yanez *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2018); entretanto esta pode estar também envolvida na organização celular de diferentes tecidos. Em um estudo envolvendo placenta, análises imunohistoquímicas demonstraram um aumento de fibronectina em tecidos lesados que estavam em processo cicatricial, sugerindo um importante papel desta molécula no reparo e remodelação tecidual (Tossetta *et al.*, 2016). A síntese de fibronectina pode ser estimulada através de fatores de crescimento como o EGF (do inglês *epidermal growth factor*) e/ou TGF- β , enquanto sua degradação acontece principalmente através de proteases não específicas.

A fibronectina tem se mostrado importante também no processo de migração celular, controlando a motilidade de certos tipos de célula como demonstra estudos com crista neural e melanoma (McCarthy *et al.*, 1986; Strachan e Condic, 2008). Estas funções de adesão e motilidade tem sido relacionadas também com o potencial infiltrativo de células tumorais, levando a conjectura de que a expressão desta glicoproteína em tecidos doentes pode determinar o quão agressivo pode ser a progressão do câncer.

1.3.4 Colágeno

O colágeno é umas das proteínas mais abundantes presente no tecido animal. Atualmente, existem cerca de 28 tipos de colágeno que podem ser classificados e organizados de acordo com suas estruturas moleculares em dois grupos: os clássicos fibrilares, e os não fibrilares, formadores de rede. Sua estrutura geral é formada por três cadeias paralelas de polipeptídeos unidas por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, formando assim uma tripla α -hélice, geralmente rotacionada para esquerda. Dentre os resíduos de aminoácidos encontrados na estrutura dos diversos tipos desta proteína, a prolina e a hidroxiprolina são os mais comuns, se destacando

principalmente por fornecerem estabilidade molecular a sua estrutura helicoidal (Shoulders e Raines, 2009). Essa estabilidade é fundamental para o desempenho de suas funções biológicas, e fornece aos tecidos solidez e resistência mecânica.

Sua estrutura versátil permite ligações com diversas biomoléculas, dentre elas proteoglicanos como decorin, esta interação na próstata humana por exemplo, pode estar associada ao controle da resposta celular a andrógenos e ao gene *hedgehog* o que forneceria proteção contra o CaP ou em outras situações aumento da atividade proliferativa (Montano *et al.*, 2018). As diversas possibilidades de interações são responsáveis pela ampla aplicabilidade do colágeno na biotecnologia.

Ele não só é comumente utilizado na prática clínica, como é aplicado com diversos propósitos, desde estéticos (Avila Rodriguez *et al.*, 2017) até cicatricial. Uma revisão sistemática de 2013, sobre feridas ulcerativas em diabéticos, mostra que o uso de curativos medicamentosos a base de colágeno tem se tornado comum na rotina de enfermagem, pois melhora a cicatrização dos tecidos lesados (Holmes *et al.*, 2013). Na próstata acredita-se que o colágeno, mais especificamente o tipo I, desempenha um importante papel na proliferação de células tumorais e metástase óssea como demonstra estudos com cultura de células de CaP (Hall *et al.*, 2008; Sottnik *et al.*, 2013).

Apesar dos diferentes tipos de colágeno serem empregados em estudos científicos, o tipo I é visivelmente o mais estudado, uma vez que este é o componente mais comum da MEC dos diversos tecidos animais, encontrado principalmente na pele, nos ossos e tendões (Shoulders e Raines, 2009). Os tipos II, encontrado principalmente em cartilagens, e IV, encontrado principalmente na lâmina basal, também são aplicados com frequências em vários estudos para a elucidação de mecanismos fisiopatológicos (Ozegbe *et al.*, 2004; Sun e Cho, 2004; Kim e Kim, 2005; Rider *et al.*, 2013; Mak e Mei, 2017; Matsuura-Hachiya *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar se o estroma das diferentes regiões da próstata normal de adultos jovens apresenta heterogeneidade em sua composição dando maior ênfase a proteoglicanos.

2.2 Específicos

- a) Coletar amostras de próstata humana normal de adultos jovens com idade entre 17 e 28 anos;
- b) Realizar a mensuração das amostras de próstata com auxílio de um paquímetro;
- c) Realizar o processamento, e o *whole mount* do material destinado as análises histológicas;
- d) Determinar o colágeno total das diferentes zonas da próstata através da análise de hidroxiprolina;
- e) Estudar a diferença na expressão dos diferentes componentes da matriz extracelular entre as diferentes zonas prostáticas através de imunohistoquímica do *whole mount* das amostras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de próstata inteiras foram obtidas através da necropsia de 17 homens, com idade entre 17 e 28 anos (média 21). Foram incluídos apenas casos em que o óbito ocorreu por causas acidentais, sendo feita a necropsia até 8 horas *post-mortem*. Para o estudo considerou-se os seguintes critérios de exclusão: indivíduos com (1) índice de massa corpórea extrapolando a faixa de 18,5 a 24,9; (2) sinais macroscópicos de doenças metabólicas; (3) sinais macroscópicos de cirurgias pélvicas; e (4) próstatas que durante análise histopatológica do tecido mostrasse sinais indicando neoplasias e reações inflamatórias. A fixação das amostras aconteceu em dois momentos: ainda *in situ*, através da perfusão de formalina tamponada a 4% pela artéria ilíaca interna; e após remoção, com a imersão das amostras na mesma solução. Afim de garantir uma melhor fixação do material foi realizado uma incisão no plano sagital na porção ventral da próstata com auxílio de uma tentacânula, expondo todo o comprimento do lúmen uretral. A mensuração das dimensões da próstata foi feita após a limpeza das amostras com auxílio de um paquímetro segundo os critérios de (Samaratunga *et al.*, 2011).

3.1 Histologia

As amostras de próstata foram cortadas no plano transversal oblíquo (Weinreb *et al.*, 2016) em intervalos de aproximadamente 5 mm da base até o colículo seminal. A localização das diferentes zonas prostáticas foi feita de acordo com publicações prévias (McNeal, 1988; Wendell-Smith, 2000; Myers *et al.*, 2010; Weinreb *et al.*, 2016). Os fragmentos das amostras foram processados através da técnica histológica de rotina, desidratados em baterias de álcool crescente e clarificados em xilol para então ter sua inclusão em Paraplast (Sigma-Aldrich). A partir destas secções foram preparadas lâminas *whole mount* (Montironi *et al.*, 2011), e de amostras de tecidos separados das zonas periférica, central, e de transição, assim como do estroma fibromuscular anterior. Subsequentemente, as lâminas com secções de tecido com 5

µm de espessura foram armazenados em temperatura ambiente para posteriormente serem usadas nas técnicas de histoquímica e imunohistoquímica.

3.2 Histoquímica

As seguintes técnicas histoquímicas foram realizadas: hematoxilina e eosina para determinação das zonas segundo os critérios de McNeal (McNeal, 1988) e para determinar se a próstata estava livre de processos inflamatórios e outras morbidades; Picrosirius para observar a organização de colágeno presente no tecido, e tricrômico de Masson para a análise de tecido conjuntivo x músculo liso.

3.3 Imunohistoquímica

Os cortes de tecido prostático foram reidratados, e posteriormente lavados em PBS por 10 minutos. Dando continuidade ao protocolo, estas amostras foram tratadas com Tris EDTA + Tween, pH 9,0, por 3 horas em uma temperatura de 60 °C, para a recuperação antigênica por calor. A peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação das lâminas por 15 minutos em câmara escura com uma solução a 9:1 (v/v) de metanol:H₂O₂, e logo após lavado em PBS. Os sítios de ligação inespecífica também foram bloqueados através do tratamento das secções com uma solução de PBS BSA 3% durante 30 minutos e câmara úmida.

Os cortes foram então tratados e deixados *overnight* em câmara úmida com os anticorpos primários direcionados à identificação de células musculares lisas utilizando o anticorpo α -actina de músculo liso (SC-32251; Santa Cruz Biotechnology, Carlsbad, CA, USA), na diluição de 1:75; da proteína fibronectina (Sigma-Aldrich, monoclonal, cat. no. F7387), na diluição de 1:600; e dos proteoglicanos biglycan (R&D Systems, monoclonal, cat. no. MAB2667, Minneapolis, MN); decorin (Calbiochem, monoclonal, cat. no. PC673, Gibbson, USA), ambos na diluição de 1:100; e versican (Abcam, policlonal, cat. no. Ab19345, Cambridge, USA); na diluição de 1:400. Os

controles negativos foram tratados da mesma forma, mas com uma solução de PBS BSA 1% em substituição ao anticorpo primário.

As amostras então foram lavadas em PBS e tratadas com anticorpo secundário biotinilado conjugado a estreptavidina (Dako, Biotinylated Link Universal and Streptavidin-HRP, cat. no. K0690, Carpinteria, California, USA) seguindo as instruções do fabricante. Ao final as marcações foram reveladas através do kit *DAB substrate* (Cell Marque, cat. no. 957D-30, Rocklin, California, USA) em câmara úmida e escura, também seguindo as instruções do fabricante. O excesso de DAB foi lavado com água destilada e as marcações foram contrastadas com hematoxilina. As amostras então foram desidratadas e as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Todas as imagens histológicas foram capturadas em resolução de 4080 x 3072 pixels usando uma câmera digital (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus).

3.4 Quantificação da Imunohistoquímica

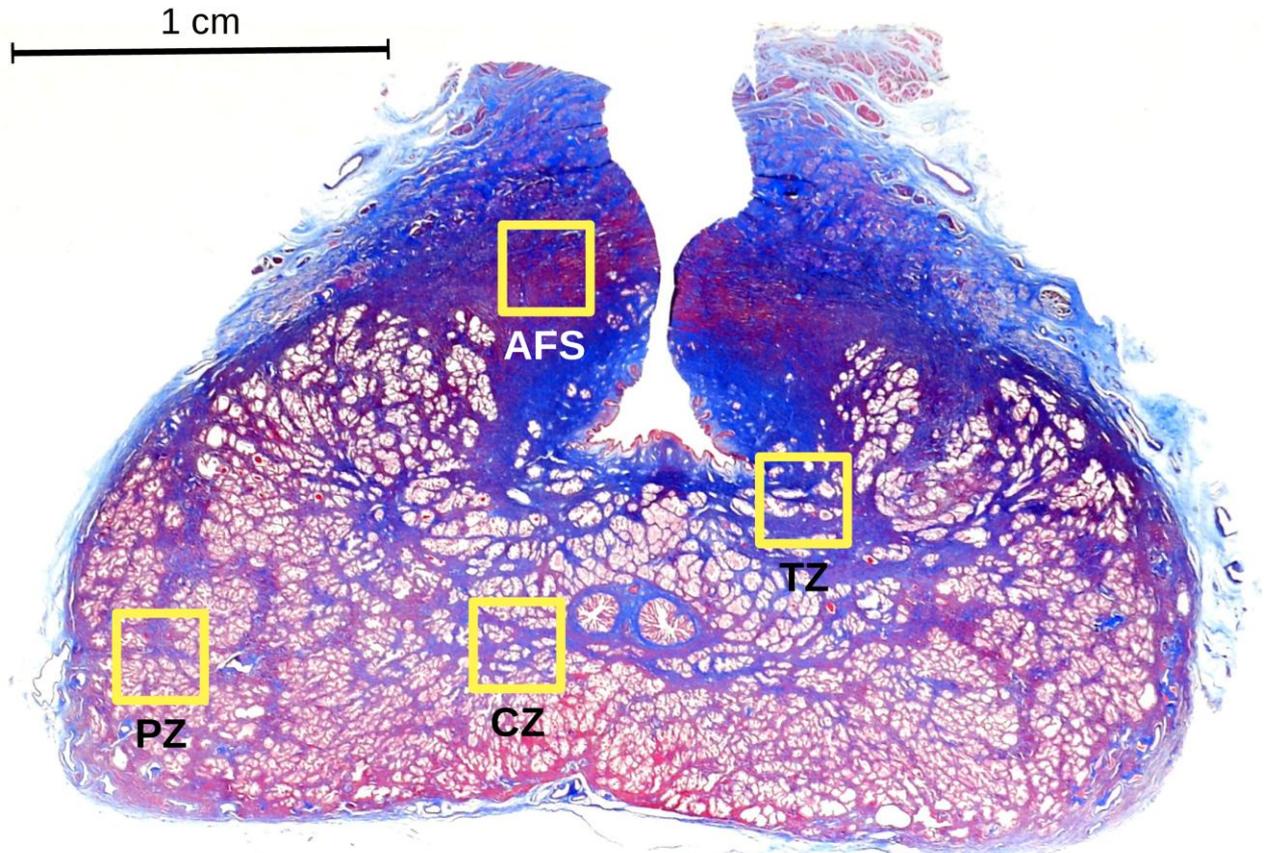
As análises foram feitas através de fotomicrografias capturadas em um aumento final de 200x usando o método *colour deconvolution* (Helps *et al.*, 2012) que leva em consideração tanto a área quanto a intensidade da marcação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB). As imagens então foram carregadas usando o software ImageJ versão 1.50 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) carregado com os plug-ins *Rolling_Ball_Background* e *Colour_Deconvolution* (ambos disponíveis no site do ImageJ) para avaliar somente o estroma. O resultado final foi expresso como quantidade relativa de imunomarcação (DABwt% do inglês *DAB weight %*) na imagem, excluindo o epitélio acinar e lúmens. Este método apresenta vantagens em relações a outros que quantificam imunomarcações (Helps *et al.*, 2012), e tem sido utilizado em diversas investigações, incluindo avaliação de proteoglicanos em tumores (Zhou *et al.*, 2015).

Para cada próstata foram analisados cinco campos por zonas prostáticas, e um valor médio de imunomarcação foi então calculado a partir destes campos.

3.5 Determinação Bioquímica da Concentração de Colágeno Total

A determinação da concentração de colágeno total foi realizada através da dosagem do aminoácido hidroxiprolina. Amostras das diferentes zonas da próstata foram retiradas e fixadas em acetona por 24 horas; posteriormente clivadas em fragmentos ($\pm 2 \times 2$ mm). Esses fragmentos então foram delipidados em duas etapas de 24 horas em clorofórmio:metanol (2:1, v/v), e após secagem a 60 °C, as amostras foram pesadas. Cerca de 10 a 20 mg de tecido seco foram submetidas a hidrólise ácida em 1 mL de HCl 6N por 18 horas a 118 °C, como descrito anteriormente (Cabral *et al.*, 2003). A concentração de colágeno total foi então determinada pela dosagem de hidroxiprolina segundo método colorimétrico (Bergman I, 1963), e o resultado final foi expresso em microgramas de hidroxiprolina por miligramas de tecido seco e delipidado.

Figura 4 – *Whole mount* em plano transversal de uma secção de próstata normal entre a base e o colículo seminal, corada com tricrômico de Masson



Legenda: a identificação das zonas foi baseada nos critérios de (McNeal, 1981) e no diagrama do apêndice II de (Weinreb *et al.*, 2016). Os quadrados amarelos representam a localização e o tamanho aproximado dos tecidos retirados da próstata para a análise bioquímica de colágeno.
Fonte: O autor, 2018.

3.6 Estatística

O objetivo deste estudo foi verificar se a composição do estroma varia entre as quatro zonas da próstata humana, partindo do princípio de que nenhuma destas zonas predominam sobre as outras. Isso exigiu que todas as combinações possíveis de pares fossem comparadas estatisticamente. Portanto, optou-se pelo método de Holm-Sidak, uma vez que esse é menos sensível ao número de comparações, diminuindo assim a probabilidade de erro estatístico do tipo II (Streiner, 2015).

Os resultados numéricos são apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Para cada variável analítica, os resultados para cada uma das quatro zonas da

próstata foram primeiramente analisadas a partir de *one-way* ANOVA, seguido pelo método de Holm-Sidak.

Os dados estatísticos foram gerados através do software GraphPad Prism, v. 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e biométricos

Os dados demográficos e biométricos sobre as amostras de próstata são apresentados na Tabela 1. Os valores para todos os parâmetros numéricos apresentaram baixa variabilidade, demonstrando que o material estudado compreende uma amostra homogênea de adultos jovens.

Tabela 1 – Dados demográficos e biométricos das amostras de próstata.

Dados demográficos e biométricos	Média ± SD
Idade (em ano)	21,6 ± 3,5
Massa corporal	25,7 ± 1,6
Peso da próstata (g)	20,6 ± 2,9
Dimensão vertical da próstata (cm)	2,4 ± 0,3
Dimensão transversa da próstata (cm)	3,3 ± 0,3
Dimensão sagital da próstata (cm)	2,3 ± 0,3
Número de indivíduos	
Cor da pele	Branca, 1; Preta, 6; Parda, 10

Legenda: dimensões e peso referente a próstata sem vesícula seminal (Samaratunga *et al.*, 2011). A classificação racial dos indivíduos foi baseada apenas na cor da pele.

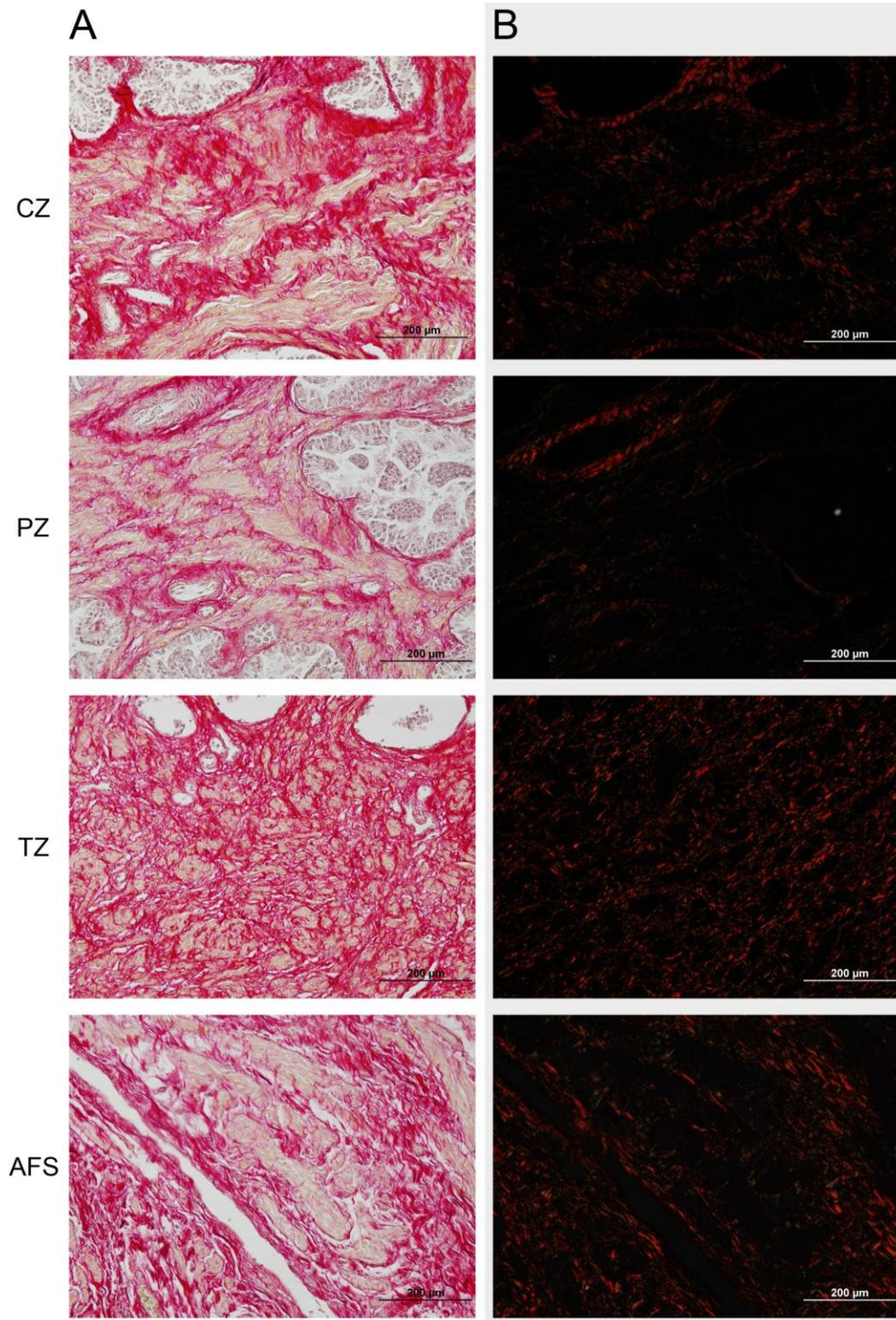
Fonte: O autor, 2018.

4.2 Colágeno total

Os resultados do ensaio bioquímico de hidroxiprolina mostraram que a concentração total de colágeno no tecido da próstata variou significativamente entre suas quatro zonas (Tabela 2). Além disso, a comparação entre as médias dos pares (Tabela 3) mostra que a concentração encontrada no AFS ($32,28 \pm 3,79$), é 43% ($p = 0,004$) e 71% ($p < 0,001$) maior que as da CZ e PZ, respectivamente. Entretanto, o AFS não foi estatisticamente diferente ($p = 0,230$) quando comparado com a TZ ($28,16 \pm 5,32$), que teve o segundo maior conteúdo de colágeno. CZ ($22,57 \pm 7,85$), e notavelmente PZ ($18,77 \pm 4,17$), apresentaram a menor concentração dentre as zonas avaliadas.

A análise qualitativa, sob luz polarizada, das lâminas coradas com Picrosirius corrobora com os resultados do ensaio bioquímico (Figura 6B); além de mostrar que a organização das fibras de colágeno nas diferentes zonas prostáticas apresenta distinções (Figura 6A).

Figura 5 – Zonas prostáticas coradas por picosirius red



Legenda: (A) organização dos feixes de colágeno à partir da técnica histoquímica de picosirius red. (B) Polarização correspondente aos campos apresentados em (A) mostra a densidade do conteúdo desta proteína nas diferentes zonas da próstata. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.

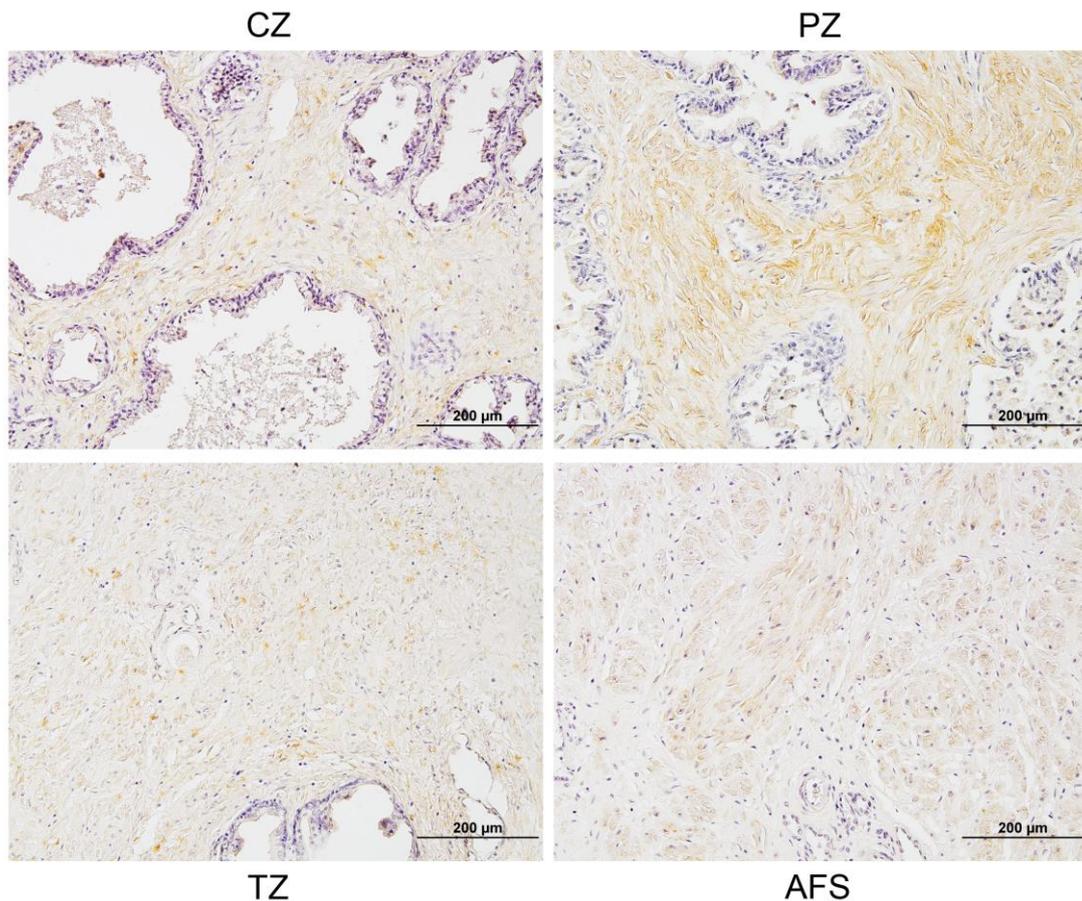
Fonte: O autor, 2018.

4.3 Fibronectina

No estroma da PZ a imunomarcção de fibronectina se mostrou desordenada e frequentemente intensa ao longo dos seus feixes; esta característica não se repetiu nas demais zonas, as quais apresentaram imunomarcções pontuais, geralmente próximas a fibroblastos, ou como no caso do AFS, próximo a células de músculo liso (Figura 6).

A análise de variância mostrou que há diferenças estatisticamente significativas entre as zonas (Tabela 2). A quantidade relativa de imunomarcção desta glicoproteína no estroma da PZ mostrou-se 93% ($p < 0,001$), 81% ($p < 0,001$) e 48% ($p = 0,006$) maior do que no AFS, e nas CZ e TZ, respectivamente (Tabela 3).

Figura 6 – Imunomarcção anti-fibronectina



Legenda: a imunomarcção anti-fibronectina mostra-se mais intensa na PZ. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.

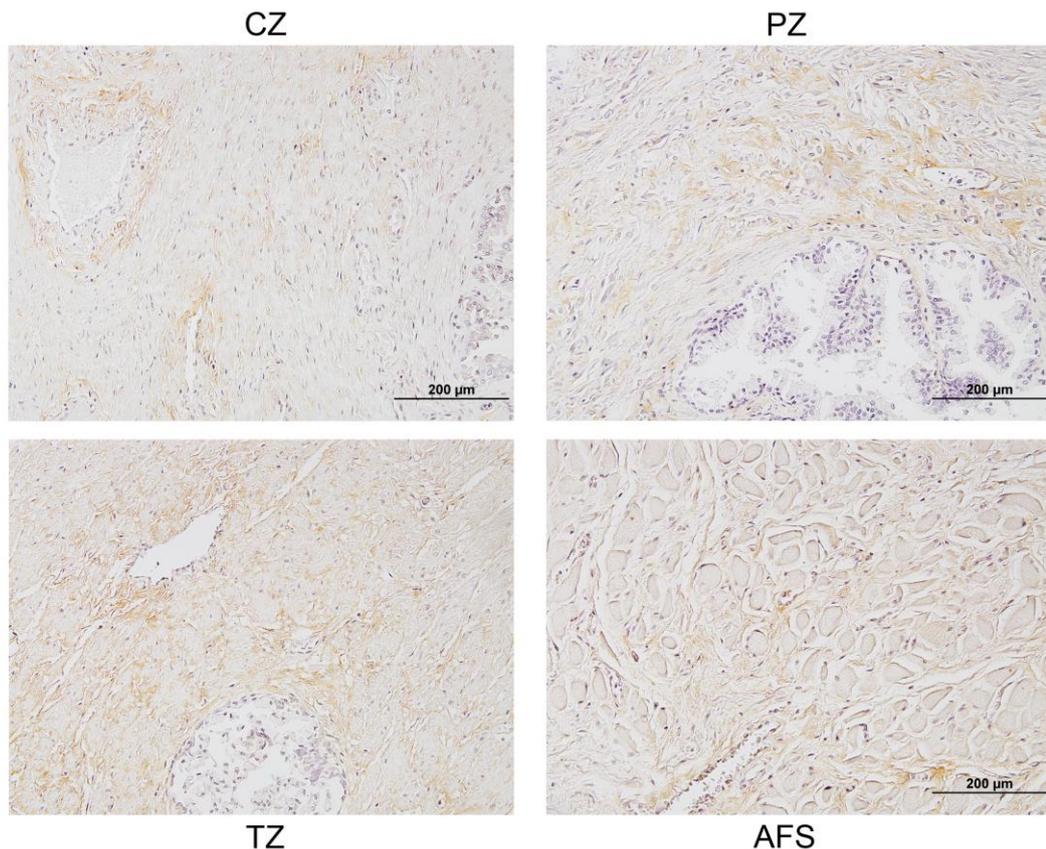
Fonte: O autor, 2018.

4.4 Biglycan

A imunomarcção do biglycan, proteoglicano rico em leucina, se mostrou fraca e raramente difusa no estroma. As regiões em torno de vasos sanguíneos e ácinos parecem ser mais imunorreativas, apresentando marcações frequentes e um pouco mais intensa (Figura 7).

Ao analisarmos as médias entre CZ e PZ, fica evidente que ambas possuem valores quase idênticos de imunomarcção (Tabela 2), que por sua vez não eram significativamente diferentes da TZ (Tabela 3). No entanto, o conteúdo deste proteoglicano no AFS foi em média 45% menor quando comparado com a das três zonas glandulares ($p = 0,005$; $p = 0,007$; $p = 0,033$, respectivamente).

Figura 7 – Imunomarcção anti-biglycan



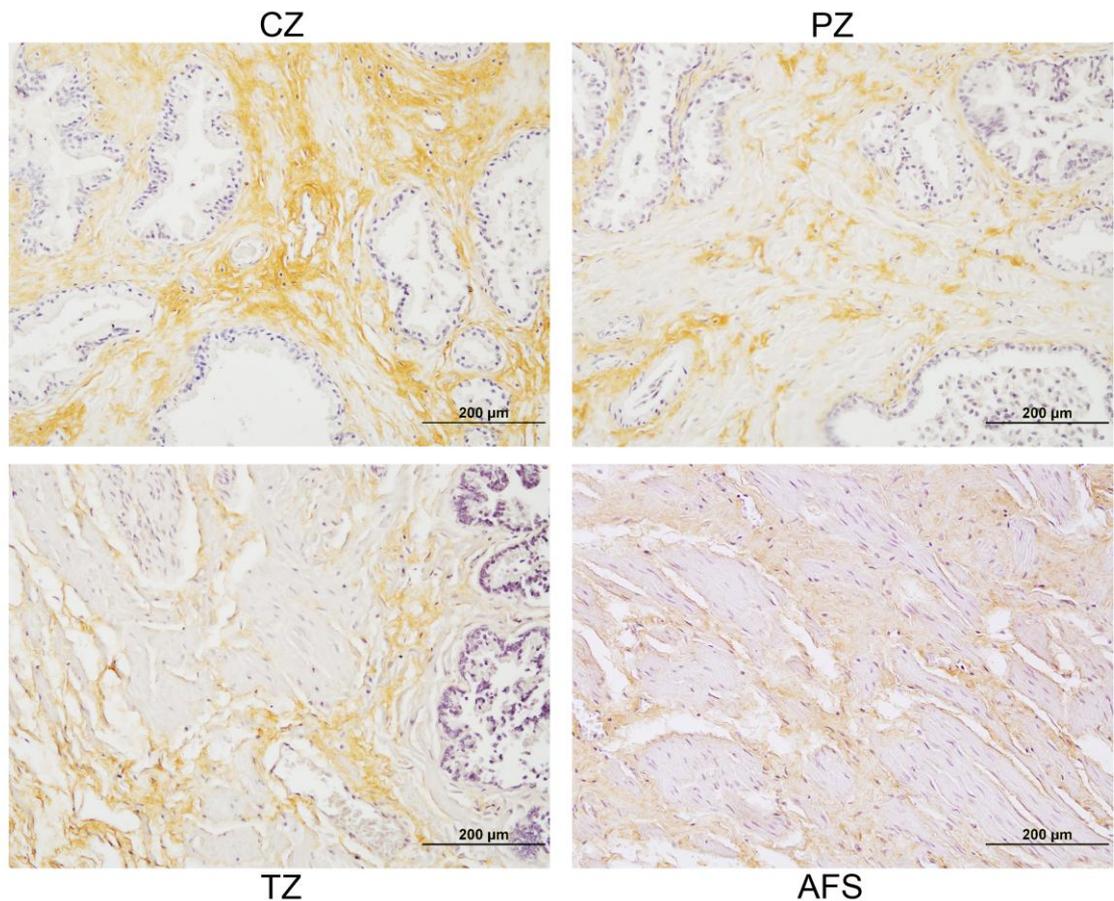
Legenda: a imunomarcção anti-biglycan mostra menor densidade de marcações no AFS quando comparado as demais zonas. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.
Fonte: O autor, 2018.

4.5 Decorin

Em contraste ao biglycan, o decorin que também é um proteoglicano intersticial rico em leucina teve uma distribuição caracteristicamente heterogênea (Tabela 2). Sua imunomarcação, encontrada ao longo do tecido conjuntivo das diferentes zonas, foi notavelmente mais intensa na CZ, com feixes espalhados preenchendo quase todo estroma (Figura 8). O AFS por sua vez, mostrou uma marcação mais clara, e frequente apenas quando em regiões próximas a cápsula fibrosa.

Assim o conteúdo de decorin na CZ foi 97% ($p < 0,001$), 87% ($p < 0,001$) e 132% ($p < 0,001$) maiores que os da TZ, PZ e AFS, respectivamente (Tabela 3). Por outro lado, TZ, PZ bem como AFS, tinham todas o conteúdo similar deste proteoglicano.

Figura 8 – Imunomarcação de decorin



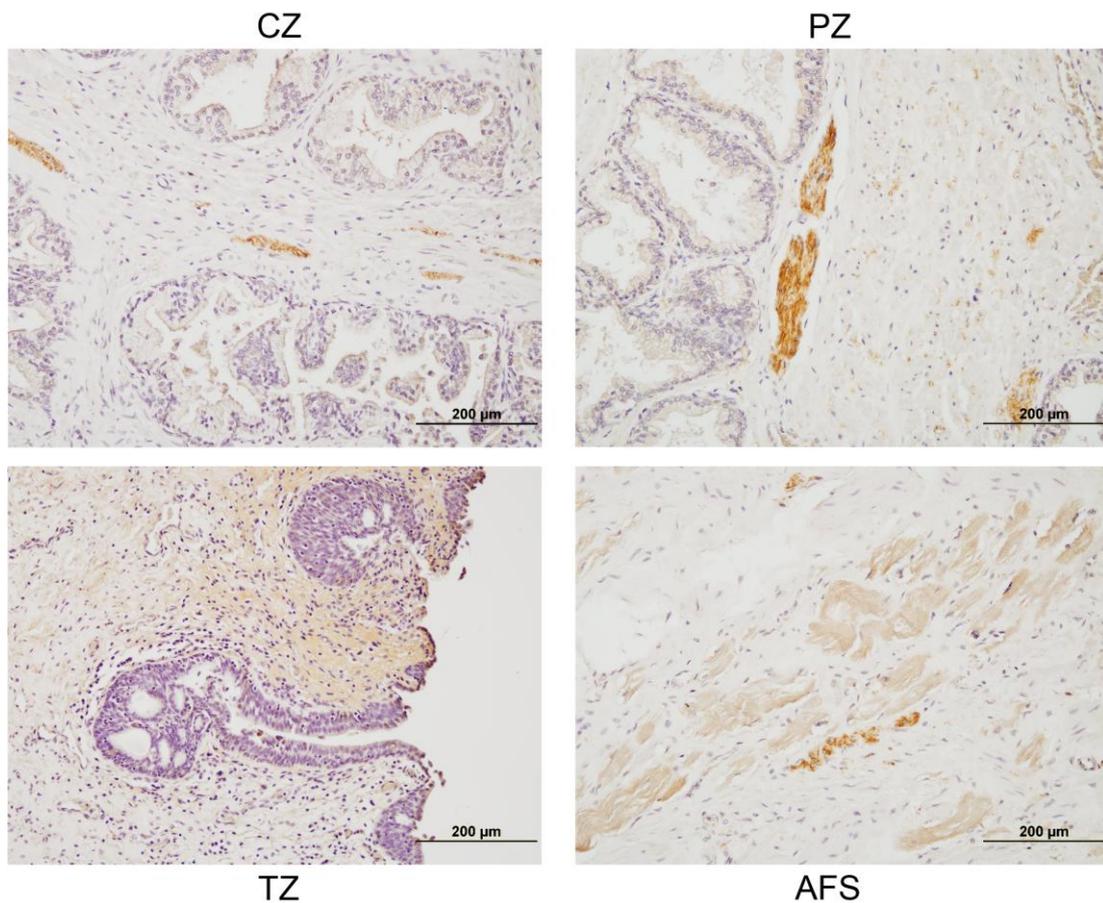
Legenda: a imunomarcação de decorin chama atenção pela sua presença e intensidade serem maiores na CZ quando comparadas as outras zonas. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.

Fonte: O autor, 2018.

4.6 Versican V1

A análise de variância não detectou diferença estatística na marcação de versican V1 nas diferentes zonas da próstata como mostra a tabela 2 e 3. Entretanto, deve-se notar que a imunomarcação deste foi associada principalmente a nervos, com exceção da TZ onde também mostrou-se distribuído de forma difusa, principalmente em região periuretral; e no AFS onde também mostrou reatividade em células musculares (Figura 9).

Figura 9 – Imunormação anti-versican v1



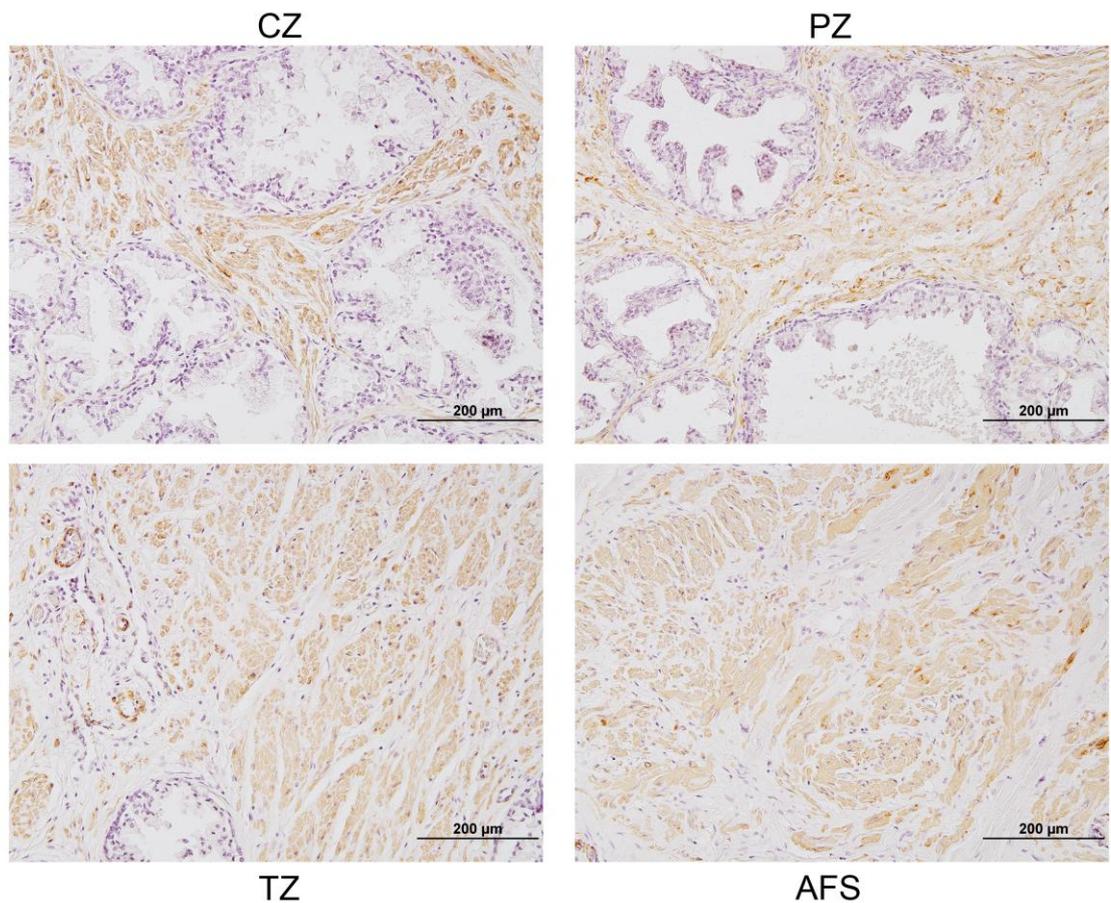
Legenda: a imunormação anti-versican v1 mostra afinidade na maior parte das vezes por nervos, excetuando na TZ e no AFS, onde tiveram marcações presentes em regiões pontuais do estroma. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.

Fonte: O autor, 2018.

4.7 α -actina para músculo liso

As análises imunohistoquímicas de α -actina para músculo liso mostraram marcações notavelmente distribuídas de forma a preencher quase todo o estroma das diferentes zonas da próstata. Assim como a distribuição, a quantidade e intensidade dessas marcações, como mostra a figura 10, não apresentaram distinção entre as zonas. Assim como o versican V1, a análise estatística não encontrou diferença significativa entre as amostras (Tabela 2 e 3).

Figura 10 – Imunomarcção anti- α -actina



Legenda: a imunomarcção anti- α -actina mostra uma distribuição homogênea no estroma das diferentes zonas da próstata. Não houve destaque na intensidade nem quantidade de marcação. Fotomicrografias correspondentes ao aumento final de 200x.

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 2 – Expressão de diferentes componentes do estroma das diferentes zonas da próstata humana.

Componentes Estromais	Zonas da Próstata				one-way ANOVA
	TZ	PZ	CZ	AFS	
Colágeno total	28,16 ± 5,32	18,77 ± 4,17	22,57 ± 7,85	32,28 ± 3,79	< 0,001
Fibronectina	15,89 ± 5,62	23,55 ± 7,51	13,02 ± 3,75	12,18 ± 3,25	< 0,001
Biglycan	14,13 ± 3,62	15,51 ± 3,80	15,98 ± 6,70	8,33 ± 2,51	0,003
Decorin	21,51 ± 4,81	22,64 ± 5,24	42,27 ± 10,36	18,25 ± 5,77	< 0,001
Versican V1	18,72 ± 3,65	18,58 ± 3,07	16,35 ± 4,17	18,21 ± 4,07	0,357
α-actina de músculo liso	19,20 ± 2,71	20,06 ± 4,14	20,17 ± 4,81	17,50 ± 3,61	0,404

Legenda: a concentração de colágeno total foi determinada bioquimicamente como microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido prostático. A concentração das outras proteínas foi determinada como a quantidade relativa de imunomarcção (DABwt%) na imagem. Estes resultados são mostrados como média ± desvio padrão (SD) a partir de 17 próstatas. Para cada componente, a média das zonas foi analisada por *one-way* ANOVA, e os valores de *p* são mostrados na tabela.

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 3 – Análise estatística da expressão dos diferentes componentes do estroma das diferentes zonas da próstata humana.

Componentes estromais	TZ vs		AFS	PZ vs		CZ vs
	PZ	CZ		CZ	AFS	
Colágeno total	0,004	0,114	0,230	0,230	< 0,001	0,004
Fibronectina	0,006	0,379	0,292	< 0,001	< 0,001	0,711
Biglycan	0,747	0,746	0,033	0,820	0,007	0,005
Decorin	0,679	< 0,001	0,414	< 0,001	0,299	< 0,001
Versican V1	0,980	0,521	0,980	0,523	0,980	0,622
α-actina de músculo liso	0,925	0,925	0,808	0,949	0,580	0,580

Legenda: a média de cada componente do estroma (Tabela 2) também foi analisada pela comparação entre pares, utilizando método Holm-Sidak, e os resultados de *p* são mostrados na tabela.

Fonte: O autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

Apesar de certas patologias da próstata parecerem ter maior incidência em certas raças e etnias, suas dimensões em adultos jovens parecem não depender destas características, e desta forma, pouco variam. Considerada a maior glândula sexual masculina, este órgão em condições saudáveis mede entorno de 3 cm no plano vertical (apical-basal), 4 cm no plano transversal (esquerda à direita), e 2,5 cm no plano sagital (anteroposterior). Amostras normais e não hiperplásicas pesam em média 30 g sem as vesículas seminais (Berry *et al.*, 1984; Samaratunga *et al.*, 2011; Wilson, 2011).

Os valores de peso e dimensões das amostras usadas no presente estudo, além de possuírem pouca variabilidade, são consistentes com aqueles que foram previamente relatados como normais para a próstata de adultos jovens (Berry *et al.*, 1984; Wilson, 2011). O estabelecimento de critérios de exclusão apropriados, em associação com dados demográficos homogêneos e localização das zonas prostáticas apoiada pela literatura (McNeal, 1981), dão força ao objetivo desse estudo em estabelecer as características morfológicas e heterogeneidade na composição da próstata de adultos jovens saudáveis.

Apesar dos limites entre as zonas da próstata por vezes não ser evidente, e de suas organizações estruturais se mostrarem muito parecidas, estudos recentes vem demonstrando que elas desempenham papéis diferenciados na fisiologia prostática (Terry e Clark, 1996; Li *et al.*, 2001). Este conhecimento é importante uma vez que direciona os estudos e possibilita uma maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos por qual essa glândula passa. Atualmente já se sabe, por exemplo, que a TZ é a principal zona acometida pela HPB (Selman, 2011). Também é bem estabelecido que a PZ pode possuir características particulares que a pré-dispõe ao CaP e as diferenciam da CZ, na qual mostra-se pouco susceptível a neoplasias (Selman, 2011). Nossos resultados mostraram que o estroma das diferentes zonas glandulares possui composições distintas no conteúdo de colágeno total ($p < 0,001$), fibronectina ($p < 0,001$), biglycan ($p = 0,003$) e decorin ($p < 0,001$), o que reforça a hipótese de que essa heterogeneidade está envolvida com os processos fisiopatológicos distintos existentes nestas regiões (Schauer e Rowley, 2011; Kruslin *et al.*, 2015).

Devido à ausência de tecido glandular o AFS foi originalmente considerado uma estrutura de suporte sem envolvimento em transtornos funcionais da próstata (McNeal, 1981). No entanto, descobertas posteriores, mostraram que esta região desempenha um importante papel na patologia prostática (Fine *et al.*, 2007). Isso se tornou cada vez mais evidente com as tentativas incansáveis de melhorar o diagnóstico de CaP. Estudos mostram que altos níveis de PSA, e a biópsia negativa da ZP podem ser indicativos de crescimento tumoral no estroma fibromuscular anterior (Radtke *et al.*, 2015; Schouten *et al.*, 2015; Villers *et al.*, 2017). Não obstante a esses fatos, o AFS geralmente não está incluído em estudos sobre a composição e morfologia do tecido prostático humano normal (Laczko *et al.*, 2005; True *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2018).

Nossos resultados corroboraram com os estudos que concedem ao estroma fibromuscular anterior papel na homeostase do tecido prostático, uma vez que as análises mostraram um estroma cuja composição, principalmente de biglycan, diferiu marcadamente das zonas que apresentavam epitélio glandular.

Diversos estudos vem concedendo destaque ao papel do estroma na regulação e progressão dos diversos tipos de câncer (Hanahan e Weinberg, 2011), uma vez que este expressa diversas macromoléculas responsáveis por promover um meio ideal para o crescimento tumoral, ou suprimir a atividade neoplásica. O estroma fibromuscular da próstata é formado basicamente por dois tipos de células: as de músculo liso, e os fibroblastos (Kassen *et al.*, 1996). A distribuição homogênea de músculo liso encontrada em nossa análise qualitativa corrobora com estudos previamente publicados (Kassen *et al.*, 1996; Laczko *et al.*, 2005), os quais demonstram que estas células são comuns no estroma prostático.

O músculo liso da próstata é considerado uma estrutura mecânica que auxilia no processo de ejaculação, impulsionando o conteúdo seminal em direção a próstata durante sua contração. Sabe-se que a organização de seus feixes varia entre as diferentes zonas das próstata, se apresentando organizados na CZ, desordenados e espaçados na PZ, e compactos na TZ e no AFS (McNeal, 1981); entretanto a quantidade de músculo liso nestas zonas parece não ter diferenças. Em nosso estudo a quantidade e intensidade da marcação para α -actina entre as quatro zonas se mostrou semelhante diante da análise estatística ($p = 0,404$). De modo diferente, no estudo de Laczko e colaboradores (2005) com próstata de doadores de órgãos, o conteúdo para α -actina apesar de se mostrar homogêneo entre as diferentes regiões

analisadas; apresentou uma pequena, mas significativa, diferença entre CZ e TZ. Porém, é necessário considerar, que além do baixo número de amostras ($n=9$) analisadas pelo referido estudo, a presença de próstatas advindas de indivíduos acima de 30 anos, os quais já apresentam um pequeno grau de variabilidade no tamanho da glândula (Bostwick *et al.*, 1992), pode comprometer a precisão do resultado.

Apesar de não apresentar diferença no conteúdo de α -actina, futuras análises dos tipos de célula marcadas para este anticorpo podem nos dar novas pistas na caracterização destas zonas; uma vez que miofibroblastos, aos quais pré-dispõe tecidos saudáveis a processos inflamatórios e estão aumentados em condições com a HPB (Hanahan e Weinberg, 2011; Leimgruber *et al.*, 2011), podem estar presentes nestas marcações (Zhang *et al.*, 2003).

O colágeno é o conteúdo mais abundante no tecido conjuntivo de diversos órgãos animal, é referenciado como sustentador da arquitetura epitelial (Banerjee e Shanthi, 2016). Tanto sua ausência (Chen *et al.*, 2012), quanto seu excesso (Mak *et al.*, 2016) estão correlacionados a processos patológicos. Na próstata esta proteína está comumente associada a prostatite, e ao adenocarcinoma de próstata, onde não é raro haver a deposição de micronódulos fibrilares invadindo o lúmen do ácino (Bauman *et al.*, 2014). Estudos comparativos de conteúdo de colágeno na próstata normal e na HPB não mostram diferença entre as amostras, entretando, há de se destacar a presença de feixes mais espessos no tecido hiperplásico. Análises estereológicas envolvendo a densidade de colágeno entre as CZ, TZ, e PZ além de se mostrarem conflitantes, excluem o AFS.

Amin e colaboradores (2010) mostraram que a zona periférica apresenta maior densidade de colágeno quando comparada a zona central; obstante a esses resultados, o recente estudo de Alves e colaboradores (2017) apresentou resultados inversamente proporcionais nestas duas regiões. Nosso ensaio bioquímico de hidroxiprolina, mostra que apesar de haver diferença estatística entre zona fibromuscular anterior, quando comparada com PZ ($p < 0,001$) e CZ ($p = 0,004$), e de TZ quando comparada com PZ ($p = 0,004$), PZ e CZ não mostram diferença na quantidade de colágeno total ($p = 0,230$). Esses resultados corroboram com as análises imunohistoquímicas feita por Zhang e colaboradores (2003) que avaliaram os componentes estromais das diferentes zonas da próstata, exceto AFS. Os dados

conflitantes relatados no presente estudo, podem ser provenientes do emprego de técnicas de quantificação inadequadas para análises histológicas.

Células do estroma fibromuscular da próstata também dividem espaço com macromoléculas conhecidas como proteoglicanos, essas desempenham papéis importantes em inúmeros processos celulares no tecido animal. Suas características regulatórias na migração, adesão, diferenciação, crescimento e morte celular são comumente exploradas na literatura. Mudanças no equilíbrio destas macromoléculas podem comprometer a homeostase tecidual e desencadear diversos processos fisiopatológicos (Edwards, 2012). Estudos na próstata ainda não são conclusivos; todavia, já são mostrados alguns vislumbres de características que podem estar associadas a alguns proteoglicanos como o biglycan, decorin e versican no tecido prostático.

A imunohistoquímica realizada com uso de anticorpo anti-biglycan neste estudo mostra que a intensidade das marcações são fracas ou ausentes na maior parte do estroma prostático, a incidência destas marcações foi maior em torno de vasos sanguíneos e ácinos. Entre CZ, PZ, e TZ não houve diferença estatística, entretanto o AFS apresentou menor expressão deste proteoglicano quando comparado as demais zonas ($p = 0,005$; $p = 0,007$; $p = 0,033$, respectivamente). Estes dados corroboram em alguns aspectos a estudos anteriormente realizados.

O biglycan é um proteoglicano exclusivo de matrix extracelular, faz parte dos grupos dos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP), e é considerado na literatura uma macromolécula multifuncional (Nastase *et al.*, 2012). Jacobsen et al (2017) mostrou que a expressão deste proteoglicano está diminuída ou ausente nas regiões saudáveis da próstata. Em contraste, as áreas acometidas com CaP apresentaram imunomarcações muito mais intensas, e estavam associadas a metástase. Chen e colaboradores (2007), concluíram em seu estudo que o acúmulo de biglycan no CaP seria proveniente de células ósseas, as quais sofreriam retroalimentação por ErbB3 (do inglês *Receptor tyrosine-protein kinase 3*) encontrado em células neoplásicas da próstata.

Apesar de também fazer parte dos SLRP, o decorin parece desempenhar um papel muito distinto do proposto para o biglycan. Postula-se que o mesmo tenha um papel protetor da matriz extracelular (Neill *et al.*, 2012), impedindo possíveis metástases, inibindo o crescimento tumoral e induzindo a apoptose dessas células (Banerjee *et al.*, 2003), isto porque ele bloqueia o fator de crescimento EGF e de

receptores androgênicos, diminuindo assim a síntese do PSA (Hu *et al.*, 2009). Estudos mostram que a baixa expressão desse proteoglicano pode ser permissiva para o desenvolvimento do câncer (Banerjee *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2009; Henke *et al.*, 2012). Análises imunohistoquímicas de Decorin em amostras histopatológicas, mostra marcações fracas em tecidos acometidos pela HPB, enquanto no CaP estas marcações são raras ou ausentes dependendo da agressividade da doença (Banerjee *et al.*, 2003).

No presente estudo, a imunomarcção para decorin no estroma da CZ foi estatisticamente maior ($p < 0,001$) que a da PZ, TZ e AFS. Este resultado configura um importante achado no estudo da próstata humana, uma vez que dentre as zonas que a compõe, a CZ é a que menos tem incidência de crescimento tumoral, corroborando com atual papel do decorin em proteção contra processos neoplásicos.

O versican é um hyalectano envolvido na facilitação de processos como adesão, migração e diferenciação celular. Geralmente é empregado em estudos envolvendo o tecido nervoso. Existem cinco isoformas de versican conhecidas, sendo V0 e V1 as mais comuns na próstata humana (True *et al.*, 2009). Sua marcação na próstata humana normal é dita como focal, mas não são fornecidos detalhes adicionais sobre a distribuição real deste proteoglicano (True *et al.*, 2009). Análises imunohistoquímicas mostram que as isoformas V0 e V1 estão localizadas no estroma periglandular em amostras de HPB e CaP (Ricciardelli *et al.*, 1998), e sua intensidade está associada a progressão da doença.

Descobrimos que a isoforma V1 localiza-se principalmente em nervos, que geralmente estão dispostos periacinares, e apesar de não haver diferença estatística entre as zonas ($p < 0.357$), alguns pontos devem ser discutidos; estudos mostram que a densidade de nervos se diferencia em algumas zonas da próstata. A TZ é caracterizada por ter a menor densidade (Iwata *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 2005), talvez por isso nossas marcações tenham se mostrado mais frequente no estroma desta zona. A PZ por sua vez, é caracterizada por ter a maior densidade de nervos (Powell *et al.*, 2005), e considerando seu volume na próstata, claramente pode ficar mais susceptível a ação do versican V1 (Iwata *et al.*, 2001).

Estudos *in vitro* mostram que o desequilíbrio na expressão de versican impede o ancoramento das células tumorais a glicoproteína fibronectina, facilitando sua motilidade e possibilitando a invasão de tecidos adjacentes (Ricciardelli *et al.*, 2007).

A fibronectina está intimamente envolvida na adesão celular e em processos inflamatórios; sua síntese é estimulada através de fatores de crescimento como o EGF e o TGF- β 1 (Suzuki *et al.*, 2006), evidências apoiam a hipótese que a alta densidade desta glicoproteína na matrix extracelular de diversos tecidos, potencializa as reações locais. Na TZ a fibronectina é apresentada como um possível protagonista na progressão da hiperplasia; a densa concentração de fibronectina periacinar encontrada em amostras de HPB, pode estar atuando como barreira à difusão de moléculas, aumentando as respostas celulares nas quais caracterizam essa morbidade (Manaia *et al.*, 2015). Em contrapartida, amostras normais de próstata mostram marcações dispersas e até pouco reativas a esta glicoproteína (Manaia *et al.*, 2015).

Nossos resultados também mostram imunomarcações desordenadas e pouco reativas em amostras da CZ, TZ e AFS. Entretanto, a marcação no estroma da PZ foi significativamente mais frequente e intenso que as demais zonas ($p < 0,001$), o que poderia contribuir para o sequestro de fatores de crescimento que aumentariam a probabilidade da aparição de processos neoplásicos, uma vez que, macromoléculas protetoras como o decorin estão diminuídas nesta região. Não podemos deixar de lado também as evidências que a PZ é marcadamente a região mais acometida pela prostatite.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que existem heterogeneidades na expressão de colágeno, fibronectina, decorin, e biglycan entre as diferentes zonas da próstata. Esse achado é compatível com a literatura, a qual mostra que o microambiente existente em cada uma dessas zonas pode ser o diferencial no processo de adoecimento desse tecido.

A fibronectina chamou nossa atenção por sua elevada concentração no estroma da zona periférica, condição que poderia expor essa região a moléculas responsáveis pela indução de diversas atividades celulares. A expressão de decorin, por sua vez, aqui encontrada intensamente elevada na zona central, quando comparada as demais, pode explicar a razão desta região ser resistente a maior parte dos processos patológicos que acometem o tecido prostático. Já a marcação para versican V1 apresentou uma característica peculiar em nosso estudo, marcando principalmente nervos periféricos presentes na próstata, apesar de não mostrar variações entre as zonas.

Apesar de ficar claro que cada uma das zonas possui elementos e características próprias, são necessários mais estudos conclusivos afim de compreender o papel destes componentes na homeostase da próstata humana.

REFERÊNCIAS

- Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am* 2016; 43: 279-288.
- Afratis NA, Nikitovic D, Multhaupt HA, Theocharis AD, Couchman JR, Karamanos NK. Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J* 2017; 284: 27-41.
- Alves EF, de Freitas Ribeiro BLM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Histological and quantitative analyzes of the stromal and acinar components of normal human prostate zones. *Prostate* 2018; 78: 289-293.
- Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl-Jockschat T, Doerfelt A, Bogdahn U, Hau P. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta2. *Br J Cancer* 2007; 96: 1560-1568.
- Avila Rodriguez MI, Rodriguez Barroso LG, Sanchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol* 2017; (em impressão, doi: 10.1111/jocd.12450).
- Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ, Cardoso LE. Structural organization of fibrous connective tissue in the periacinar region of the transitional zone from normal human prostates as revealed by scanning electron microscopy. *BJU Int* 2007; 100: 940-944.
- Babinski MA, Manaia JH, Cardoso GP, Costa WS, Sampaio FJ. Significant decrease of extracellular matrix in prostatic urethra of patients with benign prostatic hyperplasia. *Histol Histopathol* 2014; 29: 57-63.
- Banerjee AG, Liu J, Yuan Y, Gopalakrishnan VK, Johansson SL, Dinda AK, Gupta NP, Trevino L, Vishwanatha JK. Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA. *Mol Cancer* 2003; 2: 34.
- Banerjee P, Shanthi C. Cryptic Peptides from Collagen: A Critical Review. *Protein Pept Lett* 2016; 23: 664-672.
- Bastian OW, Koenderman L, Alblas J, Leenen LP, Blokhuis TJ. Neutrophils contribute to fracture healing by synthesizing fibronectin+ extracellular matrix rapidly after injury. *Clin Immunol* 2016; 164: 78-84.
- Bauman TM, Nicholson TM, Abler LL, Eliceiri KW, Huang W, Vezina CM, Ricke WA. Characterization of fibrillar collagens and extracellular matrix of glandular benign prostatic hyperplasia nodules. *PLoS One* 2014; 9: e109102.
- Bergman I LR. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 1963; (em impressão, doi: 1961-1965).

Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 729-777.

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 1984; 132: 474-479.

Binder MJ, McCoombe S, Williams ED, McCulloch DR, Ward AC. The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyalectan proteoglycans and ADAMTS enzymes. *Cancer Lett* 2017; 385: 55-64.

Bostwick DG, Cooner WH, Denis L, Jones GW, Scardino PT, Murphy GP. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer* 1992; 70: 291-301.

Bouye S, Potiron E, Puech P, Leroy X, Lemaitre L, Villers A. Transition zone and anterior stromal prostate cancers: zone of origin and intraprostatic patterns of spread at histopathology. *Prostate* 2009; 69: 105-113.

Brotchie H, Wakefield D. Fibronectin: structure, function and significance in wound healing. *Australas J Dermatol* 1990; 31: 47-56.

Bushman W. Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 2009; 36: 403-415, v.

Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol* 2003; 170: 2512-2516.

Cardoso LE, Falcao PG, Sampaio FJ. Increased and localized accumulation of chondroitin sulphate proteoglycans in the hyperplastic human prostate. *BJU Int* 2004; 93: 532-538.

Chen M, Kim GH, Prakash L, Woodley DT. Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen. *Autoimmunity* 2012; 45: 91-101.

Chen N, Ye XC, Chu K, Navone NM, Sage EH, Yu-Lee LY, Logothetis CJ, Lin SH. A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 6544-6548.

Coarfa C, Florentin D, Putluri N, Ding Y, Au J, He D, Ragheb A, Frolov A, Michailidis G, Lee M, Kadmon D, Miles B, Smith C, Ittmann M, Rowley D, Sreekumar A, Creighton CJ, Ayala G. Influence of the neural microenvironment on prostate cancer. *Prostate* 2018; 78: 128-139.

Contreras HR, Ledezma RA, Vergara J, Cifuentes F, Barra C, Cabello P, Gallegos I, Morales B, Huidobro C, Castellon EA. The expression of syndecan-1 and -2 is

associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol* 2010; 28: 534-540.

Dos Santos F, Daru J, Rogozinska E, Cooper NAM. Accuracy of fetal fibronectin for assessing preterm birth risk in asymptomatic pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2018; (em impressão, doi: 10.1111/aogs.13299).

Edwards IJ. Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 196-206.

Epstein JI, Berry SJ, Eggleston JC. Nuclear roundness factor. A predictor of progression in untreated Stage A2 prostate cancer. *Cancer* 1984; 54: 1666-1671.

Filipovski V, Kubelka-Sabit K, Jasar D, Janevska V. Androgen Receptor Expression in Epithelial and Stromal Cells of Prostatic Carcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Open Access Maced J Med Sci* 2017; 5: 608-612.

Fine SW, Al-Ahmadie HA, Gopalan A, Tickoo SK, Scardino PT, Reuter VE. Anatomy of the anterior prostate and extraprostatic space: a contemporary surgical pathology analysis. *Adv Anat Pathol* 2007; 14: 401-407.

Gemzik B, Jacob S, Jennings S, Veltman J, Parkinson A. Species differences in 5 alpha-androstane-3 beta,17 beta-diol hydroxylation by rat, monkey, and human prostate microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1992; 296: 374-383.

Hall CL, Dubyk CW, Riesenberger TA, Shein D, Keller ET, van Golen KL. Type I collagen receptor (alpha2beta1) signaling promotes prostate cancer invasion through RhoC GTPase. *Neoplasia* 2008; 10: 797-803.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.

Haylock-Jacobs S, Keough MB, Lau L, Yong VW. Chondroitin sulphate proteoglycans: extracellular matrix proteins that regulate immunity of the central nervous system. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 766-772.

Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 82-90.

Henke A, Grace OC, Ashley GR, Stewart GD, Riddick AC, Yeun H, O'Donnell M, Anderson RA, Thomson AA. Stromal expression of decorin, Semaphorin6D, SPARC, Sprouty1 and Tsukushi in developing prostate and decreased levels of decorin in prostate cancer. *PLoS One* 2012; 7: e42516.

Holmes C, Wrobel JS, Maceachern MP, Boles BR. Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013; 6: 17-29.

Hong X, Yang Z, Wang M, Wang L, Xu Q. Reduced decorin expression in the tumor stroma correlates with tumor proliferation and predicts poor prognosis in patients with I-IIIa non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2016; (em impressão, doi: 10.1007/s13277-016-5431-1).

Hu F, Dzaye OD, Hahn A, Yu Y, Scavetta RJ, Dittmar G, Kaczmarek AK, Dunning KR, Ricciardelli C, Rinnenthal JL, Heppner FL, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro Oncol* 2015; 17: 200-210.

Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, Perry D, O'Flaherty JT, Edwards IJ. Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia* 2009; 11: 1042-1053.

Iwata T, Ukimura O, Inaba M, Kojima M, Kumamoto K, Ozawa H, Kawata M, Miki T. Immunohistochemical studies on the distribution of nerve fibers in the human prostate with special reference to the anterior fibromuscular stroma. *Prostate* 2001; 48: 242-247.

Jacobsen F, Kraft J, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang DS, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Clauditz TS, Luebke AM, Hinsch A, Wilczak W, Wittmer C, Buscheck F, Hoflmayer D, Minner S, Tsourlakis MC, Huland H, Graefen M, Budaus L, Thederan I, Salomon G, Schlomm T, Melling N. Up-regulation of Biglycan is Associated with Poor Prognosis and PTEN Deletion in Patients with Prostate Cancer. *Neoplasia* 2017; 19: 707-715.

Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, Sensibar JA, Kozlowski JM, Lee C. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate* 1996; 28: 89-97.

Kikuchi A, Iwakami N, Takahashi K, Suzuki J, Kondo J, Yamada E, Nonaka I, Kamo I. Immunological and biochemical characterization of biglycan-like haemopoietic factor. *Immunology* 1995; 85: 131-139.

Kim WU, Kim KJ. T cell proliferative response to type II collagen in the inflammatory process and joint damage in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 225-230.

Kruslin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci* 2015; 15: 1-8.

Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate* 2005; 62: 260-266.

Leimgruber C, Quintar AA, Sosa LD, Garcia LN, Figueredo M, Maldonado CA. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *Prostate* 2011; 71: 1097-1107.

Lewis RW, Kim JC, Irani D, Roberts JA. The prostate of the nonhuman primate: normal anatomy and pathology. *Prostate* 1981; 2: 51-70.

Leze E, Maciel-Osorio CF, Mandarim-de-Lacerda CA. Advantages of evaluating mean nuclear volume as an adjunct parameter in prostate cancer. *PLoS One* 2014; 9: e102156.

Li SC, Chen GF, Chan PS, Choi HL, Ho SM, Chan FL. Altered expression of extracellular matrix and proteinases in Noble rat prostate gland after long-term treatment with sex steroids. *Prostate* 2001; 49: 58-71.

Lim KB. Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian J Urol* 2017; 4: 148-151.

Llacua LA, Faas MM, de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia* 2018; (em impressão, doi: 10.1007/s00125-017-4524-8).

Lowsley OS. The Prostate Gland in Old Age. *Ann Surg* 1915; 62: 716-737.

Lugnani F, Simone G, Biava PM, Ablin RJ. The role of neuroendocrine cells in prostate cancer: a comprehensive review of current literature and subsequent rationale to broaden and integrate current treatment modalities. *Curr Med Chem* 2014; 21: 1082-1092.

Mak KM, Mei R. Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *Anat Rec (Hoboken)* 2017; 300: 1371-1390.

Mak KM, Png CY, Lee DJ. Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis. *Anat Rec (Hoboken)* 2016; 299: 613-629.

Manaia JH, Cardoso GP, Babinski MA. Stereological evaluation of fibronectin in the periurethral region of the transitional zone from normal human prostates compared with benign prostatic hyperplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 4143-4147.

Martins FF, Puga CC, Beguelini MR, Morielle-Versute E, Vilamaior PS, Taboga SR. Comparative analysis of the male reproductive accessory glands of bat species from the five Brazilian subfamilies of the family Phyllostomidae (Chiroptera). *J Morphol* 2015; 276: 470-480.

Matsuura-Hachiya Y, Arai KY, Muraguchi T, Sasaki T, Nishiyama T. Type IV collagen aggregates promote keratinocyte proliferation and formation of epidermal layer in human skin equivalents. *Exp Dermatol* 2017; (em impressão, doi: 10.1111/exd.13328).

McCarthy JB, Hagen ST, Furcht LT. Human fibronectin contains distinct adhesion- and motility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *J Cell Biol* 1986; 102: 179-188.

McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 1968; 49: 347-357.

McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 1981; 2: 35-49.

McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 619-633.

McNeal JE, Reese JH, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Cribriform adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1986; 58: 1714-1719.

Mobley D, Feibus A, Baum N. Benign prostatic hyperplasia and urinary symptoms: Evaluation and treatment. *Postgrad Med* 2015; 127: 301-307.

Montano M, Dinnon KH, Jacobs L, Xiang W, Iozzo RV, Bushman W. Dual Regulation of Decorin by Androgen and Hedgehog Signaling During Prostate Morphogenesis. *Dev Dyn* 2018; (em impressão, doi: 10.1002/dvdy.24619).

Montironi R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Cheng L. Handling of radical prostatectomy specimens: total embedding with whole mounts, with special reference to the Ancona experience. *Histopathology* 2011; 59: 1006-1010; author reply 1010-1001.

Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, Gretz N, Spieker T, Zeng-Brouwers J, Pfeilschifter J, Young MF, Schaefer RM, Schaefer L. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest* 2010; 120: 4251-4272.

Myers RP, Cheville JC, Pawlina W. Making anatomic terminology of the prostate and contiguous structures clinically useful: historical review and suggestions for revision in the 21st century. *Clin Anat* 2010; 23: 18-29.

Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem* 2012; 60: 963-975.

Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol* 2012; 181: 380-387.

Ozegbe P, Foey AD, Ahmed S, Williams RO. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen. *Immunology* 2004; 111: 35-40.

Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; (em impressão, doi: 10.1101/cshperspect.a030361).

Popovic A, Demirovic A, Spajic B, Stimac G, Kruslin B, Tomas D. Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 78-82.

Powell MS, Li R, Dai H, Sayeeduddin M, Wheeler TM, Ayala GE. Neuroanatomy of the normal prostate. *Prostate* 2005; 65: 52-57.

Puga CC, Beguelini MR, Martins FF, Falleiros LR, Jr., Morielle-Versute E, Vilamaior PS, Taboga SR. Seasonal changes in the prostatic complex of *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Gen Comp Endocrinol* 2014; 197: 33-42.

Radtke JP, Boxler S, Kuru TH, Wolf MB, Alt CD, Popeneciu IV, Steinemann S, Huettenbrink C, Bergstraesser-Gasch C, Klein T, Kesch C, Roethke M, Becker N, Roth W, Schlemmer HP, Hohenfellner M, Hadaschik BA. Improved detection of anterior fibromuscular stroma and transition zone prostate cancer using biparametric and multiparametric MRI with MRI-targeted biopsy and MRI-US fusion guidance. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2015; 18: 288-296.

Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Horsfall DJ. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 963-971.

Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwivat S, Byers S, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *J Biol Chem* 2007; 282: 10814-10825.

Rider L, Oladimeji P, Diakonova M. PAK1 regulates breast cancer cell invasion through secretion of matrix metalloproteinases in response to prolactin and three-dimensional collagen IV. *Mol Endocrinol* 2013; 27: 1048-1064.

Rnjak-Kovacina J, Tang F, Whitelock JM, Lord MS. Glycosaminoglycan and Proteoglycan-Based Biomaterials: Current Trends and Future Perspectives. *Adv Healthc Mater* 2017; (*em impressão*, doi: 10.1002/adhm.201701042).

Robel P, Eychenne B, Blondeau JP, Jung-Testas I, Groyer MT, Mercier-Bodard C, Hechter O, Roux C, Dadoune JP. Androgen receptors in rat and human prostate. *Horm Res* 1983; 18: 28-36.

Roehrborn CG, Siami P, Barkin J, Damiao R, Becher E, Minana B, Mirone V, Castro R, Wilson T, Montorsi F, Comb ATSG. The influence of baseline parameters on changes in international prostate symptom score with dutasteride, tamsulosin, and combination therapy among men with symptomatic benign prostatic hyperplasia and an enlarged prostate: 2-year data from the CombAT study. *Eur Urol* 2009; 55: 461-471.

Sakamoto N, Hasegawa Y, Koga H, Kotoh S, Kuroiwa K, Naito S. Presence of ganglia within the prostatic capsule: ganglion involvement in prostatic cancer. *Prostate* 1999; 40: 167-171.

Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Suwivat S, LeBaron RG, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ. Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican. *Cancer Res* 2003; 63: 4786-4791.

Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Tilley WD, Lebaron RG, Horsfall DJ. Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta1. *Cancer Res* 2001; 61: 926-930.

Samaratunga H, Montironi R, True L, Epstein JI, Griffiths DF, Humphrey PA, van der Kwast T, Wheeler TM, Srigley JR, Delahunt B, Egevad L, Group IPC. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 1: specimen handling. *Mod Pathol* 2011; 24: 6-15.

Schaefer L, Tredup C, Gubbiotti MA, Iozzo RV. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. *FEBS J* 2017; 284: 10-26.

Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* 2011; 82: 200-210.

Schouten MG, Hoeks CM, Bomers JG, Hulsbergen-van de Kaa CA, Witjes JA, Thompson LC, Rovers MM, Barentsz JO, Futterer JJ. Location of Prostate Cancers Determined by Multiparametric and MRI-Guided Biopsy in Patients With Elevated Prostate-Specific Antigen Level and at Least One Negative Transrectal Ultrasound-Guided Biopsy. *AJR Am J Roentgenol* 2015; 205: 57-63.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. *Urology* 2011; 78: 1224-1228.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929-958.

Song L, Shen W, Zhang H, Wang Q, Wang Y, Zhou Z. Differential expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia. *Bosn J Basic Med Sci* 2016; 16: 201-208.

Sottnik JL, Daignault-Newton S, Zhang X, Morrissey C, Hussain MH, Keller ET, Hall CL. Integrin alpha2beta 1 (alpha2beta1) promotes prostate cancer skeletal metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2013; 30: 569-578.

Srodon M, Epstein JI. Central zone histology of the prostate: a mimicker of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 2002; 33: 518-523.

Strachan LR, Condic ML. Neural crest motility on fibronectin is regulated by integrin activation. *Exp Cell Res* 2008; 314: 441-452.

Streiner DL. Best (but oft-forgotten) practices: the multiple problems of multiplicity—whether and how to correct for many statistical tests. *Am J Clin Nutr* 2015; 102: 721-728.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA, Bigsby RM, Brody JR. Whole-mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod* 1986; 34: 985-995.

Sun S, Cho M. Human fibroblast migration in three-dimensional collagen gel in response to noninvasive electrical stimulus. II. Identification of electrocoupling molecular mechanisms. *Tissue Eng* 2004; 10: 1558-1565.

Suzuki K, Obara K, Kobayashi K, Yamana K, Bilim V, Itoi T, Takahashi K. Role of connective tissue growth factor in fibronectin synthesis in cultured human prostate stromal cells. *Urology* 2006; 67: 647-653.

Tabayoyong W, Abouassaly R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surg Clin North Am* 2015; 95: 1023-1039.

Terry DE, Clark AF. Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 653-658.

Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2010; 277: 3904-3923.

Tossetta G, Avellini C, Licini C, Giannubilo SR, Castellucci M, Marzioni D. High temperature requirement A1 and fibronectin: two possible players in placental tissue remodelling. *Eur J Histochem* 2016; 60: 2724.

True LD, Hawley S, Norwood TH, Braun KR, Evanko SP, Chan CK, LeBaron RC, Wight TN. The accumulation of versican in the nodules of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2009; 69: 149-158.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005; 40: 121-128.

Villers A, Puech P, Flamand V, Haber GP, Desai MM, Crouzet S, Leroy X, Chopra S, Lemaitre L, Ouzzane A, Gill IS. Partial Prostatectomy for Anterior Cancer: Short-term Oncologic and Functional Outcomes. *Eur Urol* 2017; 72: 333-342.

Wang YC, Yu SQ, Wang XH, Han BM, Zhao FJ, Zhu GH, Hong Y, Xia SJ. Differences in phenotype and gene expression of prostate stromal cells from patients of varying ages and their influence on tumour formation by prostate epithelial cells. *Asian J Androl* 2011; 13: 732-741.

Weinreb JC, Barentsz JO, Choyke PL, Cornud F, Haider MA, Macura KJ, Margolis D, Schnall MD, Shtern F, Tempany CM, Thoeny HC, Verma S. PI-RADS Prostate Imaging - Reporting and Data System: 2015, Version 2. *Eur Urol* 2016; 69: 16-40.

Wendell-Smith C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin Anat* 2000; 13: 207-213.

Wight TN. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol* 2017; 60-61: 38-56.

Wilson JD. The critical role of androgens in prostate development. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011; 40: 577-590, ix.

- Xiang YY, Dong H, Wan Y, Li J, Yee A, Yang BB, Lu WY. Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2006; 281: 19358-19368.
- Yamashita Y, Oritani K, Miyoshi EK, Wall R, Bernfield M, Kincade PW. Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J Immunol* 1999; 162: 5940-5948.
- Yanez D, Izquierdo M, Ruiz-Perez F, Nataro JP, Giron JA, Vidal RM, Farfan MJ. The Role of Fibronectin in the Adherence and Inflammatory Response Induced by Enteroaggregative Escherichia coli on Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 166.
- Zhang Y, Nojima S, Nakayama H, Jin Y, Enza H. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. *Oncol Rep* 2003; 10: 207-211.
- Zhang Y, Wang Y, Du Z, Wang Q, Wu M, Wang X, Wang L, Cao L, Hamid AS, Zhang G. Recombinant human decorin suppresses liver HepG2 carcinoma cells by p21 upregulation. *Onco Targets Ther* 2012; 5: 143-152.
- Zhou S, Parham DM, Yung E, Pattengale P, Wang L. Quantification of glypican 3, beta-catenin and claudin-1 protein expression in hepatoblastoma and paediatric hepatocellular carcinoma by colour deconvolution. *Histopathology* 2015; 67: 905-913.

ANEXO – Autorização oficial do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto para a coleta de amostras



Governo do Estado do Rio de Janeiro
Secretaria de Estado de Segurança Pública
Polícia Civil do Estado do Rio de Janeiro
Departamento de Polícia Técnico-Científica
Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto

OF nº 010145-1540/2015

Rio de Janeiro, 21 de janeiro de 2016.

Para: Universidade Estadual do Estado do Rio de Janeiro

Destino: Departamento de Anatomia - IBRAG - Centro Biomédico

Assunto: Resposta (presta)

Ilmo. Sr. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso,

Considerando que a solicitação se trata de pesquisa de interesse médico e de saúde pública;

Considerando que a pesquisa não tem conotação econômica, promocional ou sensacionalista;

Considerando que a pesquisa de campo desde a colheita de amostras e processamento serão realizados no IMLAP;

Considerando que o IMLAP além de ser um órgão da Secretaria de Segurança Pública é também indiretamente de saúde pública, pois é uma casa de ciência;

Considerando que toda a colheita será acompanhada pelo perito legista;

Considerando o nada a opor do Departamento de Polícia Técnico-Científica;

Delibero favorável ao projeto.

Conclusão: Deferido.

Atenciosamente,

Reginaldo Franklin Pereira
Diretor do IMLAP
888.507-1

Reginaldo Franklin Pereira
Diretor do IMLAP - CRM 528238/8
Mat. 888.507-1 ID.570.896-E