

INTRODUÇÃO

A próstata é o órgão masculino mais comumente afetado por neoplasias benignas ou malignas. Essa glândula compreende o segmento mais proximal da uretra. Anatomicamente, a próstata situa-se na pelve verdadeira, separada anteriormente da sínfise púbica pelo espaço retropúbico (Retzius). A superfície posterior da próstata está afastada da ampola retal pela fásia de Denonvilliers. A base da próstata tem continuidade no colo da bexiga e o ápice repousa sobre a superfície superior do diafragma urogenital [1].

Lateralmente, a próstata se relaciona com a musculatura elevadora do ânus. Sua irrigação sanguínea arterial é derivada de ramos da artéria ilíaca interna (artérias vesical inferior e retal média). A drenagem venosa se faz através do complexo venoso dorsal, que recebe a veia dorsal profunda do pênis e ramos vesicais, antes de drenar nas veias ilíacas internas. A inervação provém do plexo pélvico. A próstata normal mede 3 a 4 cm na base, 4 a 6 cm na sua dimensão céfalo-caudal e 2 a 3 cm na sua dimensão ântero-posterior [1].

Foi publicado por McNeal o conceito de anatomia zonal da próstata. Foram identificadas três zonas distintas (Figura 1). A zona periférica representa 70% do volume prostático no adulto jovem, a zona central representa 25%, e a zona de transição, 5%. Essas

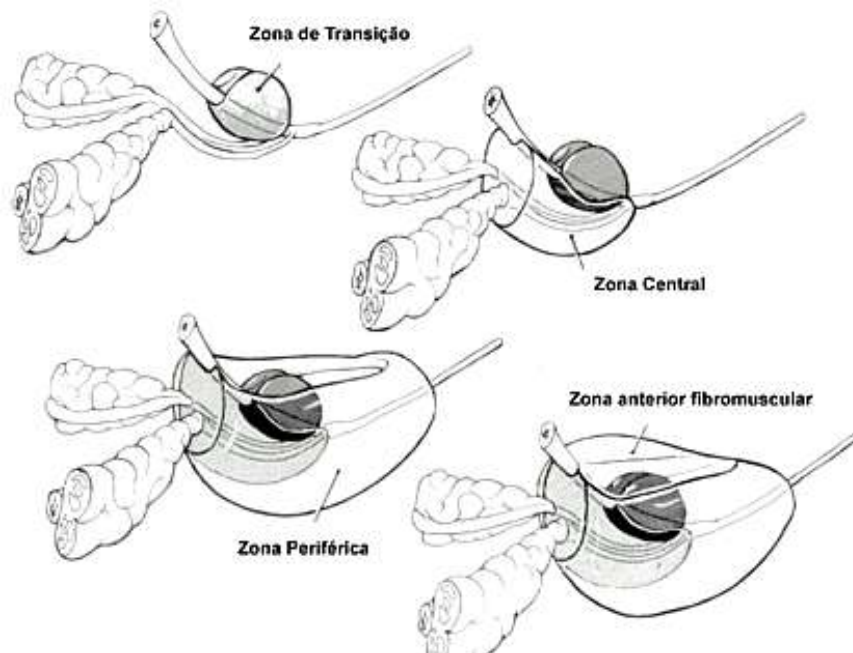


Figura 1: Anatomia Funcional da Próstata, por McNeal [2].

zonas anatômicas possuem sistemas ductais distintos; porém o mais importante é que são diferentemente afetadas por processos neoplásicos. De 60 a 70% dos carcinomas de próstata têm origem na zona periférica, 10 a 20% na zona de transição e 5 a 10% na zona central. A hiperplasia prostática benigna origina-se uniformemente na zona de transição, acometendo também a zona periuretral [1].

O período da adolescência é o que apresenta maior taxa de crescimento da próstata, estabelecido em cerca de 1,6 grama ao ano, atingindo seu peso fisiológico máximo na idade adulta, de aproximadamente 20 gramas. O crescimento da próstata é regulado por uma complexa interação entre o epitélio e estroma prostáticos [3].

O epitélio da próstata humana consiste em três maiores componentes celulares: as células basais, luminais e neuroendócrinas. As células basais são achatadas e pequenas na base da membrana. Elas não demonstram receptores androgênicos, sendo consideradas células precursoras do epitélio prostático [4].

Independentemente do estímulo androgênico, essas células levam ao crescimento das células intermediárias, que se proliferam e se deslocam através do compartimento luminal, em que a diferenciação dá origem a um grupo de células luminais androgênio-sensíveis. As células luminais produzem parte do plasma seminal, incluindo o PSA e a fosfatase ácida prostática. Entre as células epiteliais, estão dispersas células neuroendócrinas, que podem ter uma função regulatória através de diversos peptídeos, assim como somatostatina, calcitonina e neurotensina [5].

O estroma prostático envolve inúmeros tipos de células presas em uma matriz extracelular feita de diversos tipos de colágenos e glicoproteínas. Os fibroblastos e as células musculares lisas são os tipos celulares predominantes, embora as células endoteliais androgênio-sensíveis e células nervosas sejam amplamente representadas [5].

Após o crescimento fisiológico para o tamanho adulto, a próstata entra numa fase de manutenção, na qual a proliferação da célula prostática ocorre em uma taxa diária de 1 a 2%, contrabalançada por igual taxa de morte celular programada. O prejuízo nesse equilíbrio poderia ser a causa para a HPB [6,7].

1- NEOPLASIAS DA PRÓSTATA

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é o tumor benigno mais comum em homens e sua incidência está relacionada à idade. A prevalência de HPB histológica, em estudos de autópsia eleva-se cerca de 20% em homens com idade entre 41 a 50 anos, para 50% em homens com 51 a 60 anos e para mais de 90% em homens com mais de 80 anos. Embora a evidência clínica da doença ocorra menos comumente, os sintomas de obstrução prostática também estão correlacionados à idade. Por volta dos 55 anos, 25% dos homens relatam sintomas de obstrução miccional. Já aos 75 anos, 50% se queixam de diminuição da força e do calibre de seus jatos de urina. Em casos severos pode ocasionar alteração irreversível da estrutura da bexiga, sepse, insuficiência renal e até morte [8].

Trata-se de um processo hiperplásico resultante do aumento no número de células. A avaliação microscópica revela um padrão de crescimento nodular composto de quantidades variáveis de estroma e epitélio. O estroma compõe-se de quantidades distintas de colágeno e musculatura lisa. A diferente representação dos componentes histológicos na HPB explica, em parte, a resposta potencial ao tratamento clínico [9].

A repercussão desse crescimento engloba tanto sintomas irritativos como obstrutivos. No primeiro, temos: urgência, polaciúria e noctúria; já no segundo, diminuição da força e do calibre do jato urinário, sensação de esvaziamento incompleto da bexiga, dupla micção (nova micção até duas horas após a primeira), esforço miccional e gotejamento terminal. O grau de obstrução é variável e gradativo, podendo levar a casos de retenção urinária aguda e repercussões ao trato urinário superior [10].

O câncer de próstata (CaP) é a malignidade mais comumente diagnosticada, constituindo-se na segunda causa principal de morte por câncer em homens nos Estados Unidos. Mas, ao contrário da maioria das demais malignidades, que têm idade de pico de incidência, em casos de CaP, a incidência continua a aumentar com o avanço da idade [11]. O risco para toda a vida de um homem com 50 anos de idade para câncer de próstata latente (detectado como achado casual durante a autópsia e não relacionado à causa de morte) é de 40%; para a forma clinicamente aparente, 9,5%; e para morte por CaP, 2,9%. Assim, muitos cânceres de próstata são indolentes e sem maiores consequências para os pacientes, enquanto outros são agressivos e, caso sejam detectados com demasiado atraso, ou não sejam tratados,

resultarão na morte do paciente. Esse amplo espectro de atividade biológica pode dificultar a tomada de decisão para o paciente, individualmente [11].

Mais de 95% dos cânceres da próstata são adenocarcinomas. Dos outros 5%, 90% são carcinomas de células de transição e os restantes são carcinomas neuroendócrinos ou sarcomas [11].

O diagnóstico de CaP se baseia efetivamente na arquitetura citológica. A camada de células basais está ausente nos casos de câncer de próstata, embora esteja presente em glândulas normais, com HPB e nas lesões precursoras de CaP [11].

2- APOPTOSE

O termo “morte celular programada” foi proposto em 1964, para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental [11]. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose (derivado do grego, que se refere à queda das folhas das árvores no outono) para indicar esse tipo de morte celular [12]. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos [13].

De modo geral, a apoptose é um fenômeno rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear [14].

Assim, os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas que possuem o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Esses são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório [14]. Outra característica da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base [15]. As alterações morfológicas observadas na apoptose são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados [15].

Em humanos, o processo de apoptose ocorre através da associação da proteína Bax à Bcl-2, induzindo a liberação da protease associada a apoptose 1 (APAF-1), ativando a caspase 9, levando à apoptose. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos [16,17]. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10) participam da

apoptose. As caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 estão envolvidas na maturação de citocinas e sua contribuição, na apoptose, permanece não esclarecida [18].

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios 3. Após um sinal de morte celular, elas são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*) [17], pois eles se encontram nas caspases e a presença deles permite essa interação. As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos [19]. Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *Bax* [20].

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participa ativamente da regulação da apoptose [21]. Os membros da família Bcl, como Bcl-2 e Bcl-x inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria [22]. A homeostase é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose [23].

Entre as proteínas mais estudadas desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica) que é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais [24]. As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula [23].

Após um estímulo de morte celular, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. A Bax pode promover a apoptose através da

interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas [24].

3- REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO PROSTÁTICO NORMAL

A testosterona representa importante estimulador da proliferação das células prostáticas, exercendo sua ação após se difundir para o interior dessas células. Por ação da enzima 5 α -redutase, localizada ao nível da membrana nuclear, a testosterona é convertida em 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que se liga a receptores androgênicos (RA) presentes no núcleo [25,26]. Essa união produz alteração da conformação dos RA, expondo segmentos de sua molécula, com capacidade de se ligar à cadeia de DNA, em pontos próximos, ou dentro dos genes sensíveis aos andrógenos e denominados HRE (*hormone response element*) [27,28]. A ligação do complexo DHT-RA ao HRE funciona como fator de iniciação na transcrição dos genes sensíveis aos andrógenos, como a síntese de proteínas que modulam a proliferação e a secreção das células prostáticas.

A adição de DHT a meios de cultura, contendo exclusivamente células epiteliais de próstata, não é capaz de estimular a atividade mitogênica, nem a proliferação dessas células [29]. Dessa forma, foi demonstrado um importante grupo de peptídeos, denominados fatores de crescimento (*growth factors* ou GF), que têm importante ação estimuladora sobre a proliferação in vitro dessas células [27,30,31]. Entre eles, temos o *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF- α), o *fibroblast growth factor* (FGF) e os *insulin growth factors* (IGFI e IGFI), todos apresentando atividade mitogênica mais potente que a DHT. Esses peptídeos, com grande capacidade de se difundirem através de espaços intra e intercelulares, estão presentes em grande quantidade no tecido prostático normal, indicando um papel parácrino e autócrino ativo in vivo na proliferação das células prostáticas [27].

Os estudos do desenvolvimento da próstata, no período fetal, demonstram a participação do estroma local sobre a fisiologia dos elementos epiteliais glandulares [32]. Esses conhecimentos permitiram integrar os dados existentes sobre a influência dos andrógenos e dos GF sobre o crescimento da próstata.

Os RA e 5 α -redutase são encontrados tanto no epitélio glandular como em células do estroma prostático, tornando esses dois compartimentos sensíveis à ação da DHT [27,33]. O crescimento e a diferenciação da próstata parecem resultar do efeito indutivo das células do estroma que, sob influência androgênica, produzem mediadores que atuam sobre os elementos epiteliais da glândula. A presença de EGF, FGF e IGF e de receptores celulares desses fatores

em grande quantidade no tecido prostático [26,34-36] transformou esses GF, principalmente o EGF, em potenciais mediadores da interação estroma-epitelial.

Desse modo, é provável que, por estímulo da DHT, as células do estroma produzam GF, que por mecanismos parácrino e autócrino, estimulam receptores localizados na membrana celular do epitélio glandular e iniciam um processo de sinalização indutiva, com ativação de genes responsáveis pela produção de proteínas e multiplicação celular. A DHT também exerceria diretamente essa mesma ação indutiva sobre as células epiteliais, porém menos relevante que as dos GF.

Evidências experimentais indicam que os estrógenos têm uma ação permissiva sobre o crescimento da próstata [35,36]. Em animais castrados, a administração de estradiol com testosterona produz um aumento da glândula mais acentuado que o emprego isolado da testosterona [37,38]. Como receptores estrogênicos são encontrados principalmente nas células do estroma prostático [38], é possível que, nesse local, tanto o estradiol quanto o estroma tenham a capacidade de induzir a expressão de genes diferentes daqueles influenciados pela DHT, e assim exercer um efeito sinérgico sobre a produção de GF.

Estudos de microdissecção em ratos demonstraram que os ductos prostáticos apresentam três regiões com estrutura morfológica e função distintas [35,39,40]. A porção mais distal e apical dos ductos, constituída por células cilíndricas sem atividade secretora, representa o compartimento em constante proliferação e onde não ocorre apoptose. O segmento intermediário, que corresponde a 90% do contingente glandular, é caracterizado por células cilíndricas sem divisão e sem apoptose e que são responsáveis pela secreção ativa da glândula. Finalmente, a porção mais proximal dos ductos, junto à luz da uretra, é formada por células cubóides, sem atividade mitótica ou secretora, mas que evidenciam constante processo de apoptose. Essa árvore ductal é circundada pelo estroma prostático, onde fibroblastos e outras células especializadas parecem controlar o desenvolvimento e função dos diferentes segmentos glandulares [32,41].

Esse modelo morfofuncional compartimentalizado dos ductos prostáticos tem implicações fisiopatológicas relevantes, já que demonstra que o crescimento da próstata e seu volume final dependem de um equilíbrio entre a proliferação celular presente nos segmentos apicais dos ductos e a velocidade de apoptose, que ocorre nas porções mais proximais do sistema.

A interação estroma-epitelial parece ser distinta em cada segmento ductal. Ao nível da porção apical, a ação indutora das células do estroma sobre a proliferação epitelial parece ser intermediada por GF, principalmente EGF e FGF [27,40].

Nessa região ductal, a DHT não atuaria diretamente sobre as células epiteliais, mas indiretamente, por meio da indução da produção de GF pelas células do estroma. O segmento ductal intermediário é andrógeno-sensível, e suas células respondem diretamente à DHT, que estimula a função secretora dessas células. As porções mais proximais dos ductos prostáticos caracterizam-se pela ocorrência de apoptose, principalmente pelo Bcl-2. A DHT influencia indiretamente às células epiteliais dos ductos proximais, através da produção de TGF- β , um regulador da apoptose [42].

A análise desse modelo permite inferir que a homeostase da prostática é controlada por fatores mitogênicos responsáveis pela proliferação celular e por fatores inibidores, que modulam a morte celular ativa. Esses dois processos são intermediados pelas células do estroma prostático e orquestrados indiretamente pela DHT. Esse esteróide atua de modo diverso sobre as células do estroma, induzindo à produção de fatores estimuladores em algumas áreas e inibidores em outras.

4- LEPTINA

Descoberta, no final de 1994, a leptina (Zhang et al., 1994), um polipeptídeo não glicosilado de 16 kD- produto do gene *ob*- é principalmente produzida e secretada pelo tecido adiposo, numa quantidade diretamente proporcional ao seu volume, a fim de sinalizar ao hipotálamo o grau de energia corporal estocada. É, ainda, capaz de regular a ingestão alimentar e o gasto energético. Sua produção ocorre também em outros sítios como a placenta, a mucosa gástrica, pituitária, hipotálamo, ossos e músculo esquelético [43,44].

Inúmeros efeitos metabólicos alteram a concentração da leptina, mas há maior relação com a insulina. Essa é responsável tanto pelos níveis séricos da leptina, quanto de seu RNAm. Seus níveis são aumentados, de acordo com o pico da insulina, após as refeições e diminuídos, com a queda da liberação insulínica. O tratamento com glicocorticóides aumenta sua liberação tanto *in vivo* quanto *in vitro*, no entanto, há um ritmo diurno inverso entre estes. A administração de leptina reduz os níveis de corticosterona em ratos *ob/ob* e embota seu aumento durante situações de estresse. O bloqueio noradrenérgico causa hiperleptinemia, e aumenta seus níveis de RNAm no tecido adiposo branco [45].

Em humanos, o aumento da leptina coincide ou imediatamente precede a puberdade. Há descrições de que roedores submetidos à administração de leptina tiveram a puberdade precipitada, demonstrando relação desse hormônio com o desenvolvimento sexual. Há, ainda, um aumento desproporcional com relação ao volume do tecido adiposo, conforme a idade progride, devido à resistência periférica. Isso pode justificar o aumento ponderal fisiológico no envelhecimento [45].

Desde sua descoberta, a leptina não tem sido restrita ao campo da obesidade e efeito anorexígeno, mas também em relação ao sistema endócrino, reprodutor, cardiovascular, respiratório, imunológico e cicatricial [45].

A natureza pleotrópica da leptina é sustentada pelos receptores OB-R, agindo via transmembrana e demonstrando similaridade estrutural com a família de receptores de citocina classe 1, que inclui os receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF, GH, prolactina, eritropoietina e outros [45].

O OB-R é expresso como seis isoformas, que são OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re e OB-Rf. Em humanos e roedores, predominam duas isoformas, o receptor curto OB-

Ra e o receptor longo, o OB-Rb, sendo este último considerado a isoforma sinalizadora completa [46].

OB-Ra e OB-Rc são altamente expressos no plexo coróide e microvasos, demonstrando importância na passagem pela barreira hemato-encefálica. A isoforma secretada OB-Re, parece funcionar como uma proteção à leptina circulante livre. Tem sido estimado que apenas cerca de 5 a 25% do total de isoformas OB-R esteja localizado na superfície da célula, sendo a maioria em concentração intracelular [47].

Embora haja forte evidência, sugerindo o envolvimento da leptina no crescimento ou desenvolvimento de câncer de próstata, estudos, relacionando à expressão da leptina e seu papel no tecido prostático, permanecem pouco claros. Foi demonstrado que a leptina pode estimular a proliferação e migração em linhagens celulares de próstata [48].

Foi demonstrado que a expressão da aromatase na próstata é alterada no câncer, o que sugere um papel do estrogênio nesse órgão [49]. Ainda, foi observada a indução da proliferação celular no câncer de mama, através da inibição da sinalização pró-apoptótica, com favorecimento do aumento à sensibilidade ao estrogênio [50]. A inibição da sinalização da leptina se mostrou uma estratégia efetiva para terapia e prevenção do adenoma e câncer de cólon [51].

5- **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel da leptina na proliferação celular, apoptose e expressão da enzima aromatase em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna humana.

6- MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização de um modelo experimental que correspondesse ao tecido prostático mais fidedigno, poderia ser utilizado segmento da próstata oriundo de cistoprostatectomia radical ou tecido adenomatoso de hiperplasia prostática benigna. Naquele, haveria dificuldades para o desenvolvimento do estudo, como: a zona de transição de difícil isolamento dos demais componentes da próstata e o número de casos baixo para uma amostragem que gerasse resultado confiável.

Dessa forma, para esse experimento foram utilizados fragmentos de tecidos prostáticos, oriundos de pacientes submetidos à prostatectomia transvesical. O tecido extraído corresponde ao adenoma (zonas periuretral e de transição da próstata), porção do órgão implicada na HPB.

Para confirmação histopatológica da HPB, somente um segmento do adenoma era extraído, com conservação desse tecido em meio RPMI mantido sob condicionamento térmico em torno de 4 °C e enviado imediatamente ao laboratório.

No laboratório, o segmento do adenoma foi dividido em quatro fragmentos simétricos e distribuído em duas placas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (1ng/ml de meio). As placas foram separadas como grupo controle- C (somente o meio RPMI com a suplementação descrita) e grupo tratado com leptina- L (16ng/ml de meio), sendo incubadas por 3 horas a 37°C. Ao final da incubação, os fragmentos foram acondicionados a -80 °C até posterior análise.

Para a realização do RT-PCR em Tempo Real, o RNA foi isolado com o método do Trizol conforme protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen). A concentração e pureza do RNA foram determinadas pela razão da absorbância em 260/280 nm, usando espectrofotômetro NanoDrop-1000. O RNA total (1µg) foi tratado com DNase (Invitrogen) antes de ser transcrito reversamente com a enzima Superscript RT (Invitrogen). O cDNA resultante foi usado para amplificação por PCR em tempo real, utilizando termociclador Bio-Rad C-1000, com *primers* (Tabela 1) específicos para cada gene e reagente SyBR Green (Invitrogen). A quantidade relativa de mRNA foi calculada a partir do ponto, onde cada curva emerge da linha de base (Ct), pelo método de delta-delta CT. As reações foram feitas em triplicata e normalizadas pela expressão de GAPDH.

Tabela 1: Sequencia de *primers* utilizados

Gene	Sequencia	
FGF-2	CCGTTACCTGGCTATGAAGG ACTGCCAGTTCGTTTCAGT	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>
Bax	GGGGACGAACTGGACAGTAA CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>
GAPDH	TCGTGGAAGGACTCATGAC CCATCACGCCACAGTTT	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA ACAGTTCACAAAGGCATCC	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>
Aromatase	GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>
Bcl-x	CGTAGACAAGGAGATGCAGGT ACCAGCGGTTGAAGCGCTCCT	<i>forward primer</i> <i>reverse primer</i>

Análise estatística: Foi utilizado teste t-student. Dados são expressos como média \pm erro padrão. $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

6.1- Características do Grupo:

Foram selecionados quinze indivíduos portadores de HPB, com indicação cirúrgica (prostatectomia transvesical) realizada por urologistas do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. Para tentar reproduzir resultados mais homogêneos e fidedignos, os quinze pacientes possuíam características em comum: ausência de hiperglicemia de jejum, resíduo pós-miccional acima do volume fisiológico (até 40 mL)- todos aferidos por ultrassonografia abdominal e não terem sido submetidos a tratamento medicamentoso para os sintomas do trato urinário inferior.

Vale ressaltar que o tratamento cirúrgico não foi recomendado como terapia primária, mas escolhido, em conjunto com os pacientes, pois os mesmos referiram sintomas moderados a intensos através do questionário IPSS (*International Prostate Symptoms Score*- anexo A), com valores acima de 8 e, por não apresentarem condições financeiras para custear um tratamento farmacológico a longo prazo. Também foram excluídos pacientes com passado

de uso de cateter vesical de demora devido à possibilidade de contaminação e estímulo para inflamação dos tecidos utilizados. Outras comorbidades sob controle não foram critérios de exclusão.

O grupo analisado era predominantemente formado por idosos, com próstatas volumosas e de grande capacidade obstrutiva (resíduo pós-miccional médio de 188mL). Os valores de PSA total e PSA livre possuíam relações condizentes com o critério de benignidade (maior que 15%), sem necessitar de biópsia prévia à cirurgia. Nenhum caso possuiu diagnóstico histopatológico de malignidade após a cirurgia.

As características dos indivíduos analisados seguem abaixo:

Tabela 1: Parâmetros relevantes para a escolha dos pacientes inseridos no experimento (apêndice).

Parâmetros	Média	Valor mínimo	Valor máximo
Idade (anos)	70,8	59	77
IMC (Kg/m ²)	21	19	24
Próstata (g)	98	87	164
PSA total (ng/mL)	3,84	1,28	6
Resíduo pós-miccional (mL)	250	63	570

7- RESULTADOS

Após o tratamento com leptina, foram analisados através da técnica de RT-PCR os marcadores Bax (pró-apoptótico), Bcl-2 e Bcl-x (anti-apoptóticos), FGF-2 (estímulo ao crescimento celular) e aromatase (realiza a conversão de testosterona em estrogênio).

A figura abaixo mostra que o tratamento com leptina leva a um aumento da expressão de Bax (gene pró-apoptótico), quando comparado ao grupo controle.

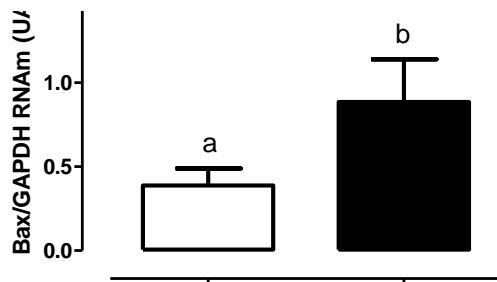


Figura 2: Expressão do gene Bax em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

A figura abaixo mostra que o tratamento com leptina leva a uma diminuição da expressão de Bcl-2 (gene anti-apoptótico), quando comparado ao grupo controle.

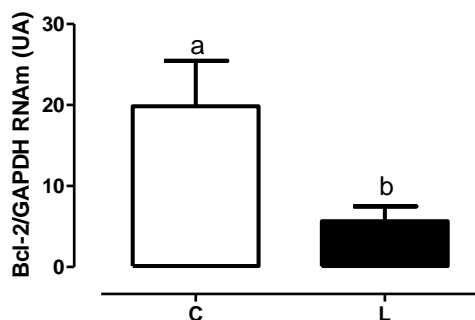


Figura 3: Expressão do gene Bcl-2 em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

Na figura 4, podemos observar que o tratamento com leptina leva a uma diminuição da expressão de Bcl-x (gene anti-apoptótico), em relação ao grupo controle.

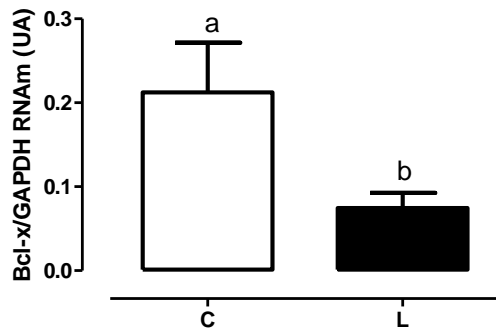


Figura 4: Expressão do gene Bcl-x em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

A figura 5 expõe a diminuição da expressão de aromatase, quando o tecido foi estimulado com leptina, em comparação com o grupo controle.

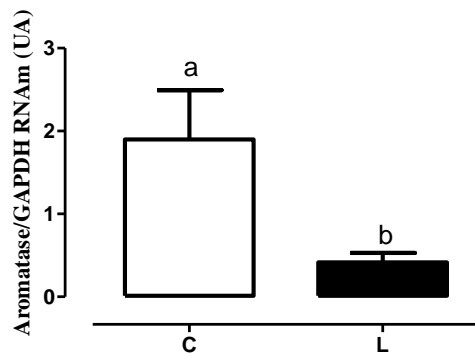


Figura 5: Expressão da aromatase em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

Na figura 6, podemos observar que o tratamento com leptina não alterou a expressão de FGF-2, em relação ao grupo controle.

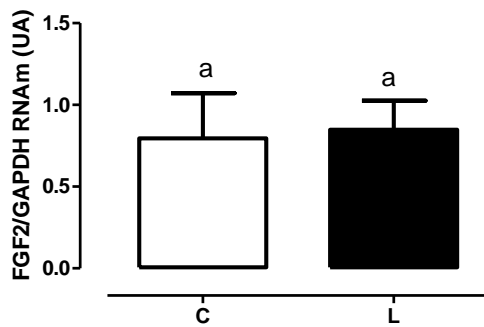


Figura 6: Expressão do gene FGF-2 em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

A figura 7 demonstra o resultado da quantificação morfométrica da imunohistoquímica para PCNA. Houve maior marcação no tecido tratado com leptina, quando comparado com o grupo controle.

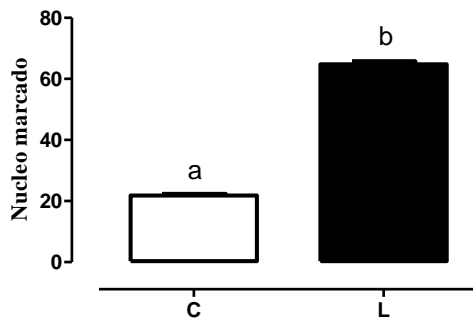


Figura 7: A marcação nuclear avaliada pela técnica de PCNA por imunihistoquímica, em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna após tratamento com leptina a 16ng/mL (L) ou não (C) por 3 horas. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de 15 amostras. Letras diferentes significam diferença significativa.

A fotomicrografia referente à imunomarcação está apresentada abaixo, na figura 8.

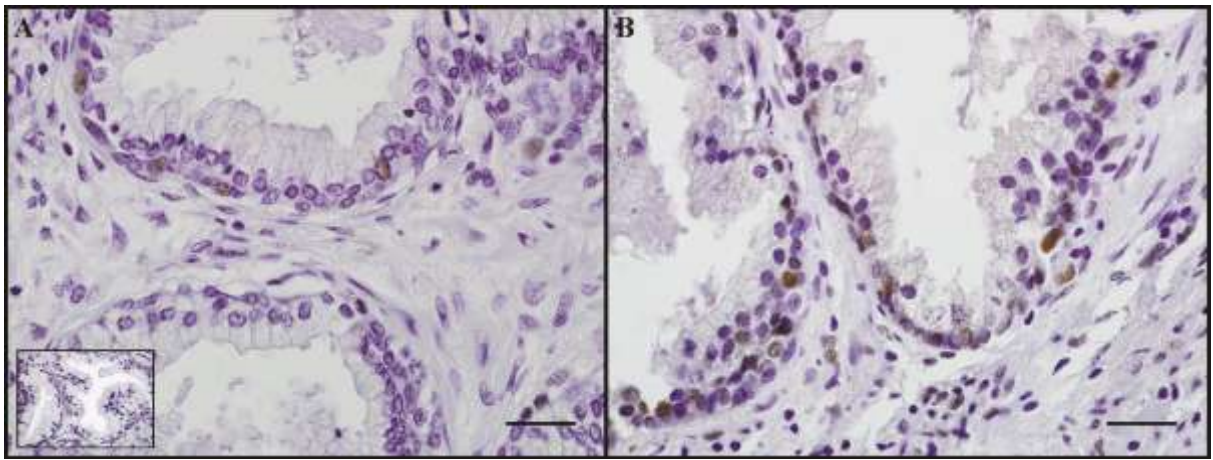


Figura 8: A fotomicrografia da técnica de PCNA por imunohistoquímica, em tecido oriundo de hiperplasia prostática benigna, após tratamento com leptina a 16ng/mL (A) ou não (B) por 3 horas, em 15 pacientes. Aumento de 600X. Controle negativo à esquerda (A).

8- DISCUSSÃO

A próstata é um órgão sexual acessório que produz substâncias fundamentais para a eficácia do esperma, na fertilização dos óvulos, no trato reprodutivo feminino. É capaz de produzir, através das células neuroendócrinas, peptídeos como a somatostatina, calcitonina e neurotensina. Sua secreção é um fluido que contém cálcio, citrato, fosfato, enzima de coagulação e profibrinolisinase. O fluido prostático possui uma característica alcalina que é importante para o sucesso da fertilização do óvulo, principalmente para a manutenção da vitalidade dos espermatozoides no trato genital feminino [52].

É demonstrado por trabalhos recentes que a leptina, apesar de ter sua concentração mais presente no tecido adiposo, com efeito de saciedade alimentar via hipotálamo, possui ação importante, no desenvolvimento do sistema reprodutivo, além de influenciar no crescimento dos órgãos sexuais na idade adulta [53].

Sabe-se que após o crescimento fisiológico para o tamanho adulto, a próstata entra numa fase de manutenção, em que a proliferação da célula prostática ocorre numa taxa diária de 1 a 2%, contrabalançada por igual taxa de morte celular programada. Esse equilíbrio é importante para um crescimento normal da glândula e é mantido pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas.

A leptina é um dos fatores mais importantes, além do hormônio folículo estimulante e o hormônio luteinizante, na regulação do sistema reprodutivo [54]. Assim como em outros tecidos do sistema reprodutivo, a próstata não somente expressa receptores da leptina, como também sintetiza esse hormônio [55,56]. A leptina foi associada com doenças da próstata, mas o papel desse hormônio no tecido prostático normal ou patológico ainda não foi elucidado.

Diversos artigos demonstram que existe uma ligação entre a obesidade e neoplasias da próstata, como a HPB e o CaP [57,58]. Um aumento na expressão da leptina no tecido prostático é atribuído tanto na progressão, quanto no aumento do grau de malignidade do CaP [59]. Ainda, é relatado que a concentração sérica de leptina, assim como o montante de leptina no tecido, podem ser atribuídos à progressão de diversos tipos de câncer além da próstata. [60,61]. Apesar de artigos que demonstram que a leptina estimula a proliferação celular na HPB, não se tem conhecimento sobre os efeitos diretos da leptina na próstata

humana. Dessa forma, acredita-se que esse projeto seja o primeiro a demonstrar o efeito direto da leptina na próstata humana, utilizando um ensaio de cultura *in vitro*.

O equilíbrio entre a proliferação e a apoptose é muito importante para manter o crescimento fisiológico da próstata de um adulto [6,7]. Baseado nisso, qualquer fator que altere esse equilíbrio pode resultar em um crescimento desordenado da próstata. O tratamento com leptina levou a um importante aumento na expressão do gene pró-apoptótico Bax e uma redução na expressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x, sugerindo que uma das funções da leptina na próstata é a de favorecer a reação apoptótica. Corroborando com a literatura [62], os resultados obtidos demonstram que Bcl-2 é mais expresso que outros genes apoptóticos. O tratamento com leptina não mudou essa relação. A imunohistoquímica com a técnica de PCNA demonstrou ainda, que leptina estimulou a proliferação celular, de acordo com um estudo em que a leptina levou à proliferação e migração em linhagens celulares de próstata [48]. A combinação desses resultados sugere que na próstata, a leptina é importante para manter seu tamanho fisiológico na fase adulta, pelo estímulo tanto a apoptose quanto a proliferação celular.

Sabe-se que a próstata é fortemente influenciada pelos andrógenos, cujos efeitos são mediados por interações entre os componentes epitelial e estromal, através dos fatores parácrinos e autócrinos. O FGF foi o primeiro fator de crescimento isolado na próstata, com efeitos mitogênicos nas células estromais e epiteliais [3]. A DHT é o androgênio mais potente no estímulo da próstata. Esse hormônio possui uma importante função na modulação do crescimento da próstata, já que possui influência em sua homeostase, que é controlada por fatores mitogênicos e inibidores, que são responsáveis pela proliferação celular e morte celular, respectivamente [63]. No trabalho apresentado, como não houve alteração na expressão do gene FGF2 pelo tratamento com a leptina, pode-se sugerir que esse hormônio possui um efeito direto e local na proliferação, que não é mediado pelo FGF.

A regulação do estrogênio pode ser considerada como um fator de risco no desenvolvimento da HPB e do CaP [64-66]. Um aumento na expressão da aromatase é demonstrado em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de próstata [49] e de mama [67]. Foi demonstrado que a leptina aumenta a expressão da aromatase, da atividade do hormônio luteinizante [68] e na linhagem celular MCF-7 [69]. Nesse estudo, foi observado que o tratamento com leptina levou a um decréscimo na expressão da aromatase, sugerindo que, na

próstata, a leptina teria um efeito protetor contra o crescimento anormal, considerando os efeitos de proliferação celular e apoptose desse hormônio.

Foi demonstrado em um modelo animal que a próstata é dependente dos efeitos androgênicos e estrogênicos associados para evocar um padrão de crescimento anormal ou resultante de malignidade [70]. De acordo com o efeito protetor que a leptina parece ter nesse modelo *in vitro*, pode-se sugerir que, *in vivo*, a ação da leptina na próstata é dependente de outros hormônios. Dessa forma, a falta de interação com outros hormônios, no estudo *in vitro*, pode ser responsável pela diferença entre os efeitos *in vitro* e *in vivo* da leptina.

9- CONCLUSÃO

A leptina, de forma isolada na próstata humana, parece possuir um importante papel na manutenção do crescimento fisiológico desse órgão. Esse efeito pode ser alcançado, pelo fato da leptina estimular, tanto o crescimento celular, quanto a apoptose, assim como a diminuição na expressão do gene da aromatase.

REFERÊNCIAS

- 1 Tanagho, Emil A., McAninch Jach W. *Urologia Geral de Smith-* 16 ed.- Barueri, SP: Manole, 2007. p 406-414.
- 2 Walsh P C, Retik A B, Stamey T A et al. eds. *Campbell's Urology*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992; 342–393.
- 3 Lee C, Cockett A, Cussenot O, Griffiths K, Isaacs W, Schalken J. Regulation of prostate growth. In: Chatelain C, Denis L, Foo JKT, editors, et al. *Fifth International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia*. Plymouth, United Kingdom: Health Publications; 2001. p. 81–106.
- 4 Lee KL, Peehl DM. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 2004;172:1784–91.
- 5 Roehrborn CG, McConnell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Campbell's urology*. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins; 1297–1336.
- 6 Kyprianou N. Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance. *J Urol*, 2003;169:1520–5.
- 7 Shariat SF, Ashfaq R, Roehrborn CG, Slawin KM, Lotan Y. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 2005;174:2046–50.
- 8 Ziada A, Rosenblum M, Crawford ED. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology* 53:1–6.
- 9 Marberger M, Harkaway R, Rosette J. Optimising the medical management of benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 45:411–419.
- 10 McConnell JD et al: Benign prostatic hyperplasia; Diagnosis and Treatment. Clinical Practice Guideline No8. AHCPR Publication No. 94-0582.
- 11 Kyprianou N, Isaacs JT: Expression of transforming growth factor β in rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Mol Endocrinol*, 1989;3:1515-1522.
- 12 Rotello RJ, Lieberman R, Purchio AF: Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming factor in cultured urine epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;3412-3415.
- 13 Yanagihara K, Tsumuraya M: Transforming growth factor β induces apoptotic cell death in cultured human gastric cells. *Cancer Res*, 1992;52:4042-4045.
- 14 Arrends MJ, Wyllie AH: Apotposis: Mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp*

- Pathol, 1991; 32:233-250.
- 15 Martikainen P, Kyprianou N, Isaacs JT: Effect of transforming growth factor β 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology*, 1990;127:2963-2968.
 - 16 McDonnell T, Troncoso P, Brisbay SM: Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its associations with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, 1992;52:6940-6944.
 - 17 Brronner MB, Culin C, Reed JC: The bcl-2 protooncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol*, 1995;146:20-26.
 - 18 Tu H, Jacobs SC, Kyprianou N: Significance of apoptosis in prostate cancer progression: Relationship with cell proliferation, TGF- β 1 and bcl-2 expression. *Int J Cancer*, 1996.
 - 19 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992;119:493-501.
 - 20 Wijsmans JH, Jonker RR, Keiger R: A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end labeling of fragmented DNA. *J Histochem*, 1993;41:7-12.
 - 21 Cattoretti G, Becker MH, Key G: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen detect proliferation cells in microwave processed formalin fixed paraffin sections. *J Pathol*, 1992;168:357-36.
 - 22 Krajewski S, Tanaka S, Takayama S: Investigations of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, 1993;53:4701-4714.
 - 23 Sutkowski DM, Fong C-J, Sensibar JA: Interaction of epidermal growth factor and transforming growth factor β in human prostatic epithelial cells in culture. *The Prostate*, 1992;21:133-143.
 - 24 Griffiths K, Akaza H, Eaton CL: Regulation of prostatic growth. The 2nd International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia. *Scientific Communication International*; 1993. P.49-83.
 - 25 Habib FK, Chem C: Pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Whitehouse Station*; 1994. P. 19-31.
 - 26 Page MJ, Parker MG: Effect of androgen on the transcription of rat prostatic binding protein genes. *Mol Cell Endocrinology*. 1982;27(3):343-55.
 - 27 Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW: Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrinology review* 1990;11(2):201-20.
 - 28 Chaproniere DM, McKeehan WL: Serial culture of single adult human prostatic

- epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. *Cancer Res.* 1986;46(2):819-24.
- 29 Steiner MS: Review of peptide growth factors in benign prostatic hyperplasia and urological malignancy. *Journal of Urology* 1995;153(4):1085-96.
 - 30 Cohen DW, Simak R, Fair WR: Expression of transforming growth factor receptor in human prostate tissues. *Journal of Urology* 1994;152(6 Pt 1):2120-4.
 - 31 Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS: The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinology Review* 1987;8(3):338-62.
 - 32 Coffey DS, Walsh PC: Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 1990;11(2):201-20.
 - 33 Gregory H, Willshire IR, Kavanagh JP: Urogastrone-epidermal growth factor concentrations in prostatic fluid of normal individuals and patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin Sci.* 1986;70(4):359-63.
 - 34 Cohen P, Peehl DM, Lamson G: IGF receptors and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(2):401-7.
 - 35 Lee C, Sensibar JA, Dudek SM: Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod.* 1990;43 (6):1079-86.
 - 36 Walsh PC, Wilson JD: The induction of prostatic hypertrophy in the dog androstanediol. *J Clin Invest.* 1976;57(4):1093-7.
 - 37 DeKlerk DP, Coffey DS, Ewing LL: Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. *J Clin Invest.* 1979;64(3):842-9.
 - 38 Lee C, Bushman W: Prostatic duct biology. *Prostatic duct biology. Prospectives.* 1995;3(1):1-4.
 - 39 Rouleau M, Leger J, Tenniswood M: Ductal heterogeneity of cytokeratins, gene expression and cell death in the rat ventral lobe. *Mol Endocrinol.* 1990;4(12):2003-13.
 - 40 Tenniswood M: Role of epithelial-stromal interactions in the control of gene expression in the prostate: an Hypothesis. *Prostate* 1986;9(4):375-85.
 - 41 Martikainen P, Kyprianou N, Isaacs JT: Effect of transforming growth factor-beta 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. *Endocrinology* 1990;127(6):2963-8.
 - 42 Mantzoros CS: The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann. Intern. Med.*, 1999; 130: 671.
 - 43 Ahima, RS, and Flier, JS: Leptin. *Annu. Rev. Physiol*, 2000; 62: 413.

- 44 Ponnandai Somasundar, David McFadden, Stanley Hileman: *Leptin Is a Growth Factor in Cancer*. West Virginia University, Department of Surgery, 2003.
- 45 Bjorbaek, C, Uotani, S, da Silva, B, Flier, J. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 32686.
- 46 Murakami, T, Yamashita, T, Iida, M, Kuwajima, M, and Shima, K: A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997;231: 26.
- 47 Fei, H, Okano, HJ, Li, C, Lee, GH, Zhao, C: Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997.94: 7001.
- 48 Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G: Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res*; 2004 May 1;118(1):71-82.
- 49 Ellem, SJ et al: Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2434–2441.
- 50 Jardé T, Perrier S, Vasson, MP, Caldefie-Chézet, F: Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 2011; Volume 47 Issue 1.
- 51 Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M: Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*, 2011 Mar 15.
- 52 Walsh PC, Retik AB, Vaughan D. *Campbell's urology. Physiology and pharmacology of the bladder and urethra*, Philadelphia 2002.
- 53 Susann B, Mantzoros, CS. Leptin in Reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:458-464.
- 54 Teerds KJ, de Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update*, 2011 May 4.
- 55 Malendowicz W, Rucinski M, Macchi C, Spinazzi R, Ziolkowska A, Nussdorfer GG and Kwias, Z. Leptin and leptin receptors in the prostate and seminal vesicles of the adult rat. *Int. j. mol. med.* 2006; 18: 615-618.
- 56 Kim JH, Lee SH, Myung SC, Kim YS, Kim TH, Kim MK. Clinical significance of the leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues. *Asian J Androl* 2008; 10 (6): 923–92.
- 57 Ribeiro R, Lopes C, Medeiros, R. The link between obesity and prostate cancer: the leptin pathway and therapeutic perspectives. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2006; 9, 19–24.

- 58 Parsons JK, Sarma AV, McVary K, Wei JT. Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions. *J Urol*. 2009 Dec;182(6 Suppl):S27-31.
- 59 Saglam K, Aydur E, Yilmaz M, Goktas S. Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. *J Urol* 2003; 169: 1308–11.
- 60 Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A.. Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview. *J. Cell*, 2008; 105:956–964.
- 61 Zhao L, Shen ZX, Luo HS, Shen L. Possible involvement of leptin and leptin receptor in developing gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7666–70.
- 62 Kyprianou N, Tu H, Jacobs SC. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol*, 1996;27:668–75.
- 63 Carson III C, Rittmaster R. The Role of Dihydrotestosterone In Benign Prostatic Hyperplasia. *UROLOGY*, 2003; Suppl 4A: 2–7.
- 64 Bosland M.C., The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 39–66.
- 65 Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 2000; 427–433.
- 66 Griffiths K. Estrogens and prostatic cancer. *Prostate*, 2000; 87–100.
- 67 Reed, MJ, and Purohit, A. Aromatase and Breast Cancer. *Clin. Endocrinol*, 2001 54, 563–571.
- 68 Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba. Expression of Leptin Receptor in Human Endometrium and Fluctuation during the Menstrual Cycle *Mol. Hum. Reprod*, 1999; 8, 708–713.
- 69 Catalano S, Marsico S, Giordano C. Leptin Enhances, via AP-1, Expression of Aromatase in the MCF-7 Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278 28668–28676.
- 70 Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, McPherson SJ. Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2003; 10 187–191.

