

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos sob efeito de altas concentrações de glicose

Beatriz Pelegrini Bosque

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos sob efeito de altas concentrações de glicose

Beatriz Pelegrini Bosque

Prof.^a Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos sob efeito de altas concentrações de glicose

Beatriz Pelegrini Bosque

Prof.^a Dra. Daniele Lisboa Ribeiro
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __ / __ / __

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos sob efeito de altas concentrações de glicose

Beatriz Pelegrini Bosque

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Inêz e Jair, e meu irmão, Bruno, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

À Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro, que foi minha principal fonte de conhecimento dentro da universidade desde o início do curso, agradeço pelo auxílio nas dificuldades, pela paciência, compreensão e confiança em mim depositadas.

À banca examinadora pela disponibilidade de participação e contribuição à qualidade deste trabalho.

Aos meus amigos, Anna Cecília Vieira, Hugo Almeida, Hugo Lintz, Larissa Thesing e Scarllet Teixeira pela amizade, pelos momentos de lazer, companheirismo e apoio, que fizeram da faculdade uma jornada leve e memorável.

Ao meu grupo de pesquisa pelos momentos de aprendizado e conversa.

Aos demais amigos, que sempre estiveram ao meu lado e contribuíram para que eu concluísse essa importante etapa.

RESUMO

Os efeitos do diabetes na próstata de adultos já são bem conhecidos na literatura, entretanto, o seu impacto na próstata da prole de mães diabéticas ainda é pouco estudado. Devido ao fato da próstata ter um importante desenvolvimento pós-natal e a prole de mães diabéticas tender a ter glicemia mais elevada do que indivíduos nascidos de mães normoglicêmicas, objetivou-se avaliar a influência de altas concentrações de glicose no desenvolvimento prostático. Foram utilizadas próstatas de 45 ratos Wistar machos recém-nascidos, com culturas realizadas durante 1, 2 e 3 dias e divididas em 3 grupos: *Controle* – tratadas com meio basal; *Glicose moderada* - tratadas com o meio basal acrescido de 126 mg/dL de glicose e *Alta glicose* - tratadas com 450 mg/dL de glicose. Após as culturas as próstatas foram incluídas em parafinas ou congeladas. Nos cortes histológicos foram determinou-se o número de brotos prostáticos e figuras mitóticas e imunohistoquímica para a alfa-actina de músculo liso. O conteúdo de ERK fosforilada e metaloproteinase de matriz 2 foi aferido por Western Blotting. Altas concentrações de glicose desestimularam a ocorrência de mitoses, diminuindo assim o número de brotos prostáticos. A fosforilação da proteína ERK 1/2 foi menor após o tratamento com glicose. No estroma, os ambientes com glicose, reduziram o conteúdo de células musculares lisas e de MMP-2. Concluimos que glicose em alta concentração reduz uma importante via de proliferação celular, ERK1/2, podendo ter relação com a reduzida formação de brotos. Ainda, a glicose tem impacto no ambiente estromal interferindo na formação de células musculares e na remodelação tecidual com a redução de MMP2. Assim, é de fundamental importância que o desenvolvimento pós-natal da próstata ocorra em um ambiente adequado, a fim de que ela se desenvolva apropriadamente e possibilite o desempenho normal das funções fisiológicas e sexuais do homem.

Palavras-chave: diabetes, desenvolvimento pós-natal, glicose, próstata

ABSTRACT

The effects of diabetes in the adult prostate are well known in the literature, but its impact on the prostate of diabetic mothers' offspring is still poorly studied. Because the prostate has an important post-natal development and diabetic mothers' offspring tend to have higher glycemia than individuals born to normoglycemic mothers, the objective was to evaluate the influence of high glucose concentrations on prostate development. Prostates of 45 male Wistar rats were used, with cultures performed for 1, 2 and 3 days and divided into three groups: *Control* - treated with basal medium; *Moderate glucose* - treated with basal medium plus 126 mg/dL of glucose and *High Glucose* - treated with 450 mg/dL of glucose. After the cultures, the prostates were included in paraffin or frozen. Histological sections determined the number of prostatic buds and mitotic figures and immunohistochemistry for alpha-smooth muscle actin. The content of p-ERK and MMP-2 was measured by Western blotting. High glucose concentrations discouraged the occurrence of mitoses, thus reducing the number of prostatic buds. Phosphorylation of ERK 1/2 protein was lower after treatment with glucose. Similarly, in the stroma, environments with glucose reduced the content of smooth muscle cells and MMP-2. With these data, we conclude that high concentration glucose reduces an important cell proliferation pathway, ERK1/2, which may be related to reduced bud formation. Furthermore, glucose has an impact on the stromal environment, interfering with muscle cell formation and tissue remodeling, essential for development with the reduction of MMP2. Thus, it is of fundamental importance that the postnatal prostate development occurs in a suitable environment, so that it develops properly and enables the typical performance of the physiological and sexual functions of man.

Key-words: diabetes, glucose, postnatal development, prostate

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações sobre o diabetes.....	1
1.2 Estrutura e desenvolvimento da próstata.....	3
1.3 Funcionamento da próstata e sua relação com o diabetes.....	9
1.4 Vias de sinalização AKT e ERK.....	11
1.5 Justificativa e relevância do tema.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. METODOLOGIA	16
3.1. Animais e protocolo de cultura de órgão inteiro (próstata).....	16
3.2. Processamento do tecido para análise histológica.....	17
3.3 Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso.....	17
3.4 Western blotting	18
3.5 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Os tratamentos com glicose moderada ou alta glicose não alteram a área tecidual.....	20
4.2 A glicose moderada ou alta glicose reduz o número de brotos prostáticos.....	21
4.3 As mitoses foram reduzidas nos tratamento com glicose moderada ou alta.....	22
4.4 Os tratamentos com glicose reduziram a quantidade de alfa-actina	23
4.5 As quantidade de p-ERK1/2 e MMP-2 foram diminuídas pela glicose.....	25
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o diabetes

O *Diabetes mellitus* consiste em um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado, sobretudo, por hiperglicemia crônica resultada da secreção anormal de insulina pelo pâncreas, da ação ineficiente desse hormônio nos tecidos-alvo, ou ambos (DIABETES, 2010). Dentre os sintomas estão polidipsia, poliúria, perda de peso associada ou não à polifagia, e visão turva. A longo prazo, o diabetes pode provocar disfunção e falência de órgãos, retinopatia com potencial perda de visão, neuropatia periférica com consequente amputação de membros inferiores, hipertensão, risco de infarto do miocárdio, aterosclerose e disfunções sexuais (OZOUGWU, 2013).

De acordo com o Atlas Mundial do Diabetes lançado em 2017, 425 milhões de indivíduos possuem diabetes no mundo todo (Figura 1), diagnosticados ou não, com estimativa de um aumento de 48% desse número até o ano de 2045. No Brasil, estima-se a existência de 12 milhões de diabéticos e, atualmente, a prevalência é de 9,9% nas mulheres e 7,8% nos homens (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

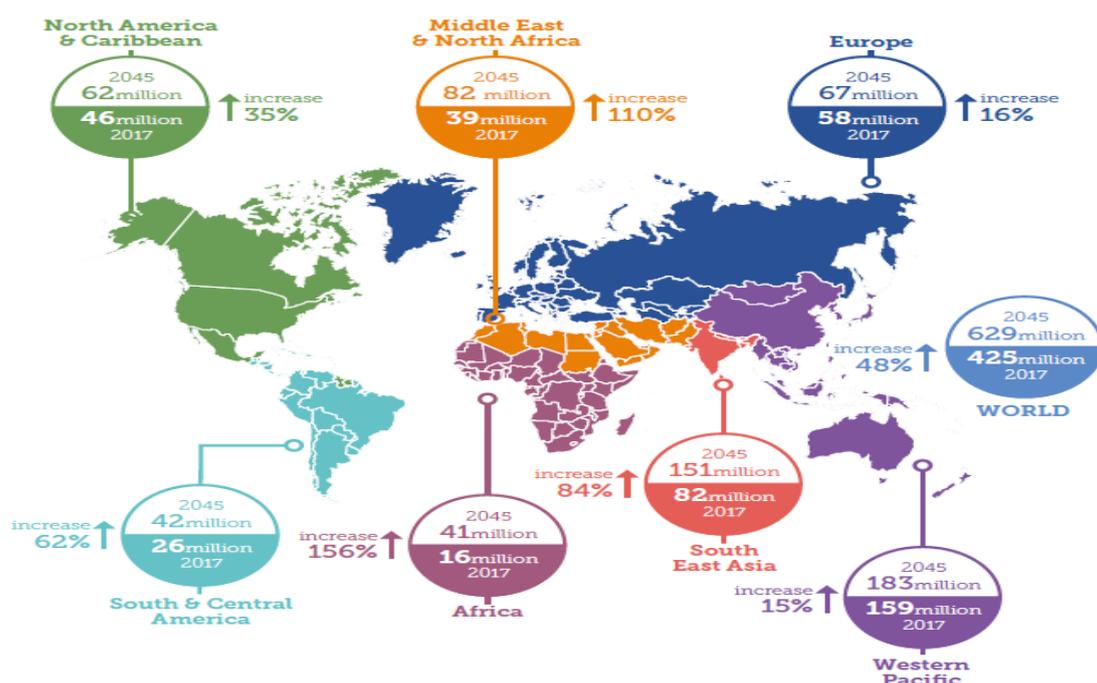


Figura 1 – Número de pessoas com diabetes no mundo e por região em 2017 e 2045, entre 20-79 anos (Fonte: International Diabetes Federation)

Etiologicamente, o diabetes pode ser classificado em tipo 1 ou tipo 2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). O diabetes tipo 1 representa somente 5-10% dos pacientes, em sua maioria jovens, e resulta de um déficit na produção de insulina causado pela destruição das células β do pâncreas por processos autoimunes, os quais tem múltiplas predisposições genéticas e também estão relacionados a fatores ambientais ainda pouco esclarecidos. O tratamento consiste em injeções diárias de insulina, a fim de adequar os níveis de glicose no sangue. Algumas formas de diabetes tipo 1 podem ser idiopáticas, isto é, possuírem causa desconhecida (SELMI, 2014).

Já o tipo 2 é mais comum, representando cerca de 90% dos casos, e é resultado de uma interação gene-ambiente. Nele, a insulina está presente no organismo, porém com ação ineficiente, o que conhecido como resistência insulínica, estado no qual ocorre menor captação de glicose pelos tecidos periféricos (OZOUGWU, 2013). Os níveis de glicemia estimulam as células β do pâncreas, que passam a produzir maior quantidade desse hormônio. Quando tais células falham na adaptação à nova demanda de insulina, a resistência é intensificada, o que ocasiona o diabetes tipo 2. Vários fatores de riscos estão associados a esse tipo, tais como idade, gênero, obesidade, histórico familiar, etnia, sedentarismo e hipertensão (SHULMAN, 2000). Já os mecanismos responsáveis pela resistência insulínica ainda não foram totalmente elucidados, contudo, estudos demonstram diversas alterações moleculares na via de sinalização da insulina e na produção de receptores, as quais determinam sua ação ineficiente nos tecidos periféricos (FRÖJDÖ; VIDAL; PIROLA, 2009).

Visto que, no caso do diabetes tipo 2, a destruição das células β não ocorre e, assim, a insulina continua sendo produzida, o tratamento diário com esse hormônio, como ocorre no diabetes tipo 1, faz-se desnecessário (TAGUCHI; OHTA; TANIZAWA, 2018). Dessa forma, o controle desse tipo de diabetes se dá por meio da adequação da dieta, da realização de

exercícios físicos e, em alguns casos, por meio da utilização de medicamentos sensibilizadores, a exemplo da metformina (TURNER et al., 1999).

Um terceiro tipo de diabetes, menos comum, é denominado diabetes materno ou gestacional, o qual é definido pela Associação Americana de Diabetes como aquele diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez cuja mãe não apresentava alterações glicêmicas claramente evidentes antes da gestação (KRAGELUND NIELSEN; GROTH GRUNNET; TERKILDSEN MAINDAL, 2018). Ele é caracterizado por qualquer grau de redução da tolerância à glicose com hiperglicemia pela mãe e pode ou não persistir após o parto. Geralmente, está associado tanto à atuação ineficiente das células β quanto à resistência à insulina, elevando o risco do surgimento de complicações para mãe, a exemplo de ruptura prematura da membrana coriônica e pré-eclâmpsia, e para o feto, como macrosomia, hipoglicemia de nascimento, hipocalcemia, síndrome de desconforto respiratório, morte perinatal, entre outros (EADES; FRANCE; EVANS, 2018).

1.2 Estrutura e desenvolvimento da próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória exócrina do trato genital masculino, situada ao redor da uretra e abaixo da bexiga, fundamental ao processo reprodutivo, visto que fornece proteínas e íons para a formação do líquido seminal, imprescindível para a nutrição, motilidade e viabilidade dos espermatozoides durante e após a ejaculação (MACURA, 2008).

A próstata humana, de acordo com a classificação de McNeal (1981), pode ser dividida em três regiões distintas (Figura 2A), sendo elas a zona central, que corresponde por cerca de 25% do volume da glândula, a zona de transição, com 5%, e a zona periférica, que corresponde à maior porção, com 70% do volume total (MCNEAL, 1981). Essa estrutura difere consideravelmente entre as espécies. Em roedores, por exemplo, a próstata é composta

por quatro pares de lobos (Figura 2B), isto é, grupos de ductos prostáticos originados do seio urogenital, bilateralmente simétricos, os quais foram designados lobos anteriores, laterais, dorsais e ventrais, sendo este último o que apresenta resposta androgênica mais semelhante à próstata humana (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

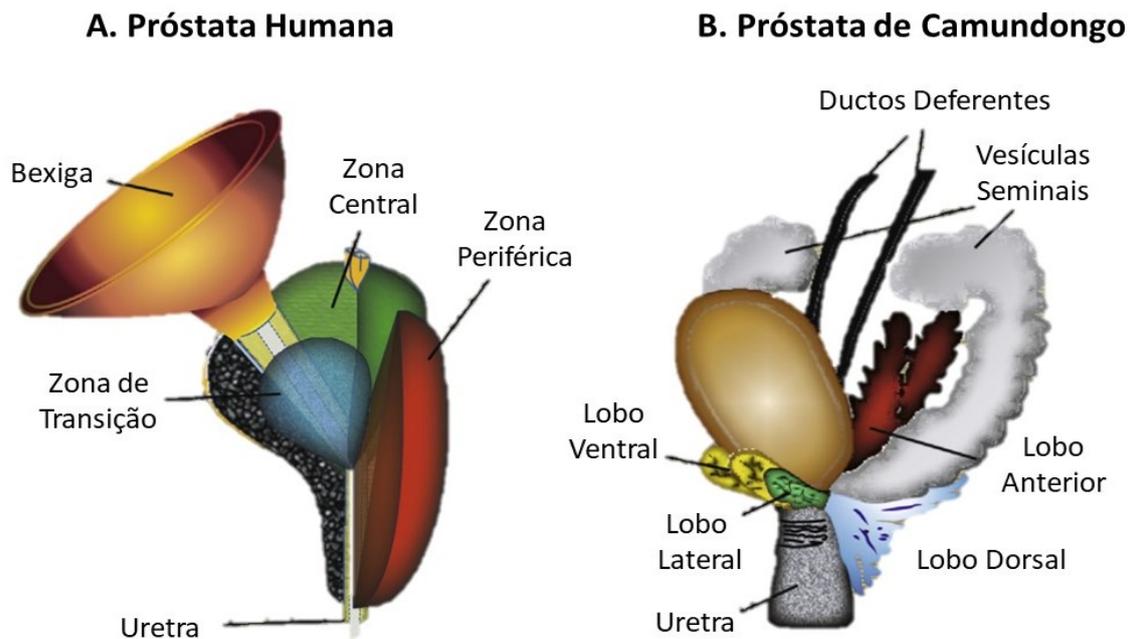


Figura 2 – Estrutura da próstata humana e de camundongo. (A) Diagrama de uma próstata humana adulta mostrando a uretra e a bexiga em relação às três principais regiões glandulares da próstata, como descrito por McNeal: zona central, zona periférica e zona de transição. (B) Diagrama representando os quatro principais lobos prostáticos do camundongo, com uma organização similar: próstata lateral, próstata dorsal, próstata ventral e próstata anterior (Adaptado de AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

Histologicamente, a próstata é composta por túbulos secretores e ácinos, apresentando ácinos que são formados por um epitélio secretor que limita o lúmen onde a secreção fica armazenada imersos num tecido conjuntivo denso classicamente denominado de estroma (ANDRADE, 2017). O epitélio secretor é formado por três principais tipos de células, denominadas células luminiais, basais e neuroendócrinas (RATO et al., 2015). As luminiais são células colunares com características secretoras e produzem glicoproteínas que compõem boa parte do sêmen através de estímulo androgênico. As células basais constituem células-tronco epiteliais putativas e são consideradas precursoras do epitélio prostático, visto que se

proliferam e se deslocam pelo compartimento luminal até a sua diferenciação em células luminais. As células neuroendócrinas estão dispersas entre as epiteliais, podendo exercer função regulatória parácrina por meio de peptídeos sinalizadores (LEE; PEEHL, 2004).

O estroma, por sua vez, consiste numa região subepitelial rica em células musculares lisas que entremeia os ácinos, responsável pela expulsão da secreção no momento da ejaculação, e outra região de matriz extracelular (MEC) (JAMES E. DENNIS; CHARBORBDB, 2002). Possui um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, que formam uma ou duas camadas contínuas, e fibroblastos, sendo estes últimos responsáveis por sintetizar os componentes da MEC (CUNHA; COOKE; KURITA, 2004). A MEC é um ambiente dinâmico composto por um complexo arranjo de proteoglicanos, proteínas fibrilares e glicoproteínas adesivas, a exemplo da laminina e da fibronectina. Ademais, nessa matriz estão presentes fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias das atividades celulares no estroma e também no epitélio (LU; WEAVER; WERB, 2012). Desse modo, ao sintetizarem a MEC, as células influenciam a morfogênese, maturação e homeostase da próstata. Essa síntese, bem como a degradação dos componentes da matriz, originam um processo denominado remodelação estromal que ocorre normalmente durante o desenvolvimento da glândula e em situações patológicas ou de redução androgênica (MAUNEY; OLSEN; VOLLOCH, 2010).

Nesse evento, estão envolvidas as metaloproteinases (MMPs), as quais compreendem uma família de enzimas que degradam a MEC com uma diversa gama de substratos e, por isso, auxiliam de maneira significativa processos fisiológicos normais e estados de patologia da glândula. Dentre as principais MMPs, está a colagenase do tipo IV de 72 KDa ou gelatinase A, também conhecida como MMP-2, que digere colágeno do tipo IV, gelatina e fibronectina (BIRKEDAL-HANSEN, 1995). A clivagem proteolítica dos elementos da MEC pode constituir um fator importante no desenvolvimento pós-natal da próstata e no advento de

patologias na glândula, visto que promove a remodelação estromal e a liberação de sinais que estimulam a angiogênese, migração e proliferação/diferenciação celular (TUXHORN et al., 2002).

A região rica em células musculares lisas do estroma além de ser responsável pela contração da glândula, também promove a interação epitélio-estroma (TIMMS, 2008). A interação entre o epitélio e o estroma prostáticos é parácrina e recíproca, visto que a porção estromal induz o desenvolvimento e proliferação epitelial, enquanto o epitélio induz a diferenciação do estroma (CUNHA, 2008). Esse processo é de fundamental importância para a gênese da próstata fetal, para o seu crescimento e maturação pós-natal, para a manutenção do seu estado diferenciado e para a sua responsividade a hormônios. (CHUNG; ZHAU, 2001).

Quanto ao desenvolvimento, na morfogênese prostática inicial são formados na uretra, a partir de brotos, sólidos cordões epiteliais, os quais, após o nascimento, proliferam, se alongam, bifurcam, enviam ramos laterais e canalizam (Figura 3), o que ocorre concomitantemente à organização estromal (TIMMS, 2008). No período pós-natal, a próstata apresenta um crescimento complexo e progressivo. Vilamaior e colaboradores (2006) constataram que em ratos esse processo era caracterizado por um crescimento inicial com aumento do peso da glândula, um período de repouso entre a quarta e a sexta semana, no qual o crescimento da próstata acompanha o do corpo, e um crescimento puberal a partir da sétima semana até o período adulto (Figura 4).

De acordo com esse estudo, nas três primeiras semanas pós-natais ocorre a formação do lúmen, que é preenchido com material de secreção, além da diferenciação de células epiteliais, acompanhada da formação de cordões na primeira semana e organização gradativa de uma camada epitelial simples. Da terceira à sexta semana pós-natal não há mudança histológica significativa. Na semana seis já é possível observar invaginações epiteliais e

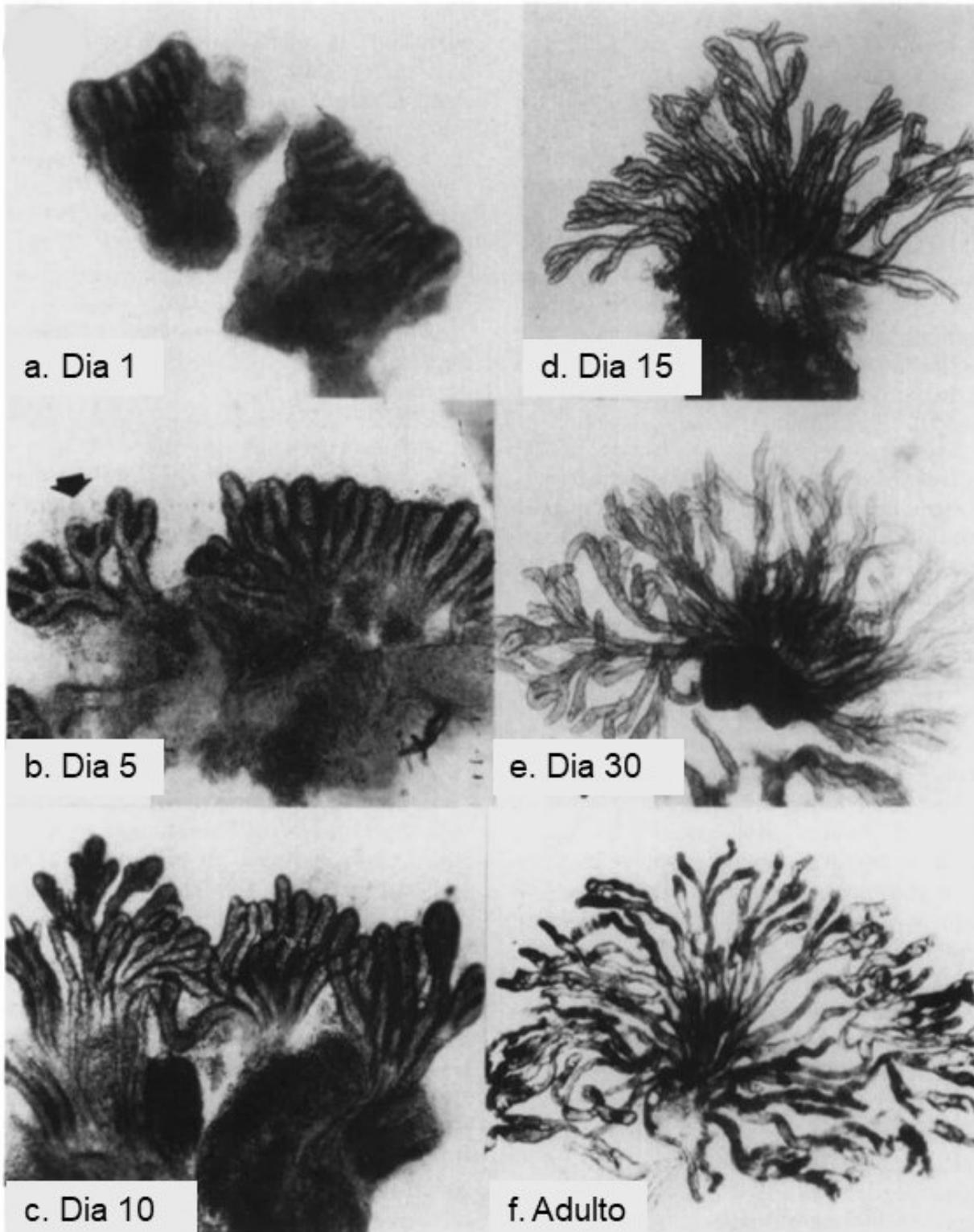


Figura 3 – Morfogênese glandular pós-natal na próstata dorsolateral. No dia 1, vários ductos principais repousam em um mesênquima denso. A ramificação distal começa entre os dias 5-10 pós-natal. Note que a próstata dorsolateral consiste em vários ductos principais, cada um com três a seis ductos terminais (d-f). (Adaptado de CUNHA et al., 1987)

broto acinares. Entre a décima e décima segunda semana acontece um alargamento do lúmen, que faz desaparecer tais invaginações e brotos. A concentração de testosterona permanece baixa até a quinta semana pós-natal, aumenta entre a sexta e oitava semana e atinge seu pico na nona semana, sendo este responsável pela diferenciação da atividade secretora da glândula (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006).

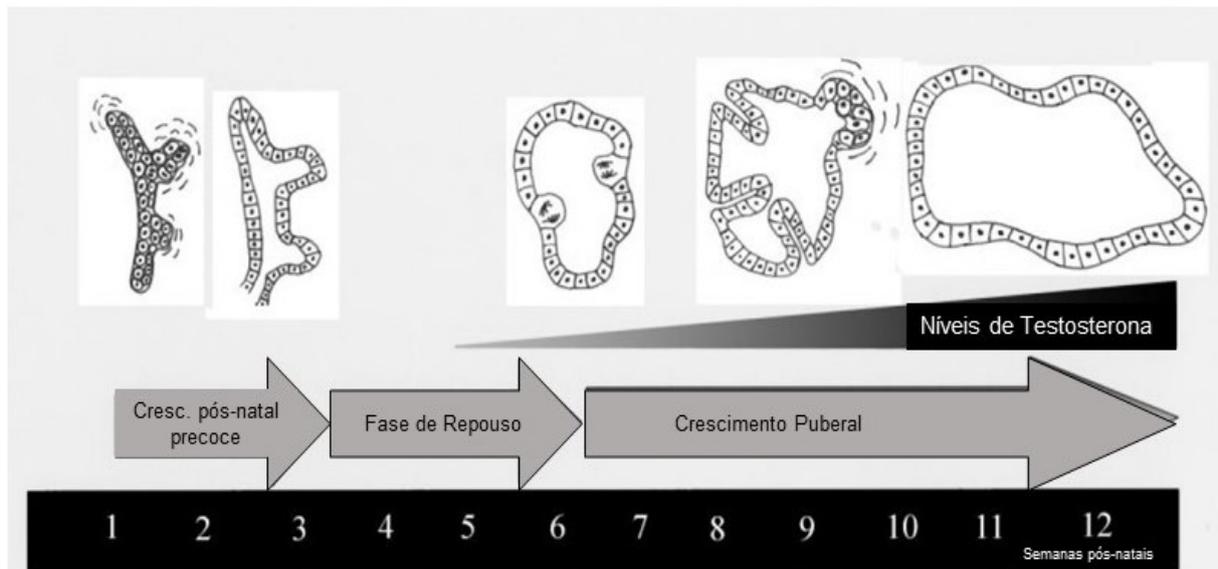


Figura 4 – Diagrama esquemático do desenvolvimento prostático nas primeiras 12 semanas pós-natais (Adaptado de VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006)

A diferenciação epitelial da próstata ocorre concomitantemente ao desenvolvimento do estroma, por meio da atuação de andrógenos nos AR do mesênquima urogenital, o que induz a proliferação epitelial, a ramificação ductal e a diferenciação de células epiteliais já no desenvolvimento intrauterino e alguns dias pós-natal (MARKER et al., 2003). Esse desenvolvimento epitelial, por sua vez, conduz a diferenciação da musculatura lisa do estroma, sendo uma das funções dos andrógenos manter tal musculatura lisa acerca da uretra como uma fina camada, a fim de possibilitar que a floração inicial atinja o mesênquima urogenital e aconteça o desenvolvimento prostático (BRUNI-CARDOSO; CARVALHO, 2007).

Assim, considerando que há um importante período de desenvolvimento da glândula que ocorre pós-natal, qualquer alteração no microambiente glandular durante essa fase pode prejudicar a formação da próstata e ainda impactar no seu funcionamento futuro.

1.3 Funcionamento da próstata e sua relação com o diabetes

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente altamente sensível a distúrbios hormonais e com elevada capacidade de resposta a hormônios androgênicos, os quais são definidos como qualquer substância, natural ou sintética, que estimulam e influenciam o desenvolvimento e a manutenção das características masculinas, por meio da ligação com os receptores androgênicos (AR) (MITCHELL; NEAL, 2015).

Tais andrógenos induzem à diferenciação epitelial durante o desenvolvimento da glândula e à maturação pós-natal, além de auxiliarem na manutenção das secreções, sendo a testosterona, produzida em sua maioria pelos testículos, o principal andrógeno no homem (ZHAO et al., 2010). Contudo, a fim de se tornar biologicamente ativa na próstata e formar complexos mais estáveis com os AR, a testosterona é convertida em 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa-redutase, uma vez que ela apresenta maior afinidade aos AR do que a testosterona (FIANDALO et al., 2018). Os AR, aos quais a DHT se liga, pertencem ao grupo de receptores nucleares de hormônios esteróides, juntamente com os receptores de estrógeno (ER), de glicocorticoide (GR), de progesterona (PR), entre outros, e constituem fatores transcricionais hormônio-dependentes, que atuam controlando a expressão de genes específicos envolvidos na manutenção do estado diferenciado da próstata e no estímulo da secreção prostática (TAN et al., 2015).

Quando o ligante está ausente, o AR encontra-se no citoplasma, associado a proteínas de choque térmico. A ligação com o agonista provoca uma mudança conformacional que transloca o complexo andrógeno/AR para o núcleo, onde este modula a transcrição gênica por

meio da interação com os elementos responsivos aos andrógenos (AREs) (DAVEY, 2016). Visto que é, sobretudo, por meio desses receptores que os andrógenos atuam na próstata, os AR passam a deter um expressivo impacto no desenvolvimento e funcionamento da glândula. Uma vez no núcleo, os ARs estimulam a transcrição de genes para a produção de PSA (proteína específica da próstata), a qual constitui um marcador prostático, bem como daqueles responsáveis por vias de sinalização para proliferação e sobrevivência celular, tais como a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e proteína quinase B (AKT).

Já é bem conhecido na literatura que o diabetes tem impacto negativo no sistema reprodutor masculino (CAGNON et al., 2000; RIBEIRO et al., 2006). Pelo fato de acometer o sistema hipofisário gonadal, o diabetes provoca mudanças de modo a causar um distúrbio na secreção dos hormônios que estimulam a síntese de andrógenos pelos testículos, além de estimular mudanças moleculares nas células responsáveis pela formação desses hormônios, chamadas células de Leydig (FRAYLING; COLHOUN; FLOREZ, 2008). Dessa forma, há diminuição dos níveis de testosterona, o que pode ocasionar atrofia da próstata, alterações na expressão de AR, remodelação do estroma e redução do peso da porção ventral da glândula (RIBEIRO et al, 2006; 2009). Ademais, é comum a diminuição da libido, a presença de impotência sexual e menor qualidade do sêmen (ONITILLO et al., 2014).

Aliada aos baixos níveis de testosterona, a hiperglicemia característica do diabetes pode causar estresse oxidativo, formação de produtos de glicação avançada e ativação de várias vias de sinalização, além de lesões benignas, como a neoplasia intra-epitelial prostática (NIP), a qual pode evoluir para neoplasias malignas (ARCOLINO et al., 2010; CHONG et al., 2016; GOBBO et al., 2012; RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009).

1.4 Vias de sinalização AKT e ERK

A via de sinalização AKT, também conhecida como PKB, é classicamente ativada pela insulina em tecidos periféricos. Ao se ligar com o seu receptor, a insulina provoca uma mudança conformacional no receptor, o qual passa a ser capaz de se autofosforilar e, posteriormente, fosforilar inúmeros substratos proteicos, a exemplos das proteínas IRS-substrato do receptor de insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A fosforilação dessas proteínas origina sítios de reconhecimento para moléculas tais como a fosfatidilinositol 3-quinase, ou PI3K, e a proteína quinase ativada por mitógenos, ou MAPK (Figura 5), a qual era originalmente chamada de ERK (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

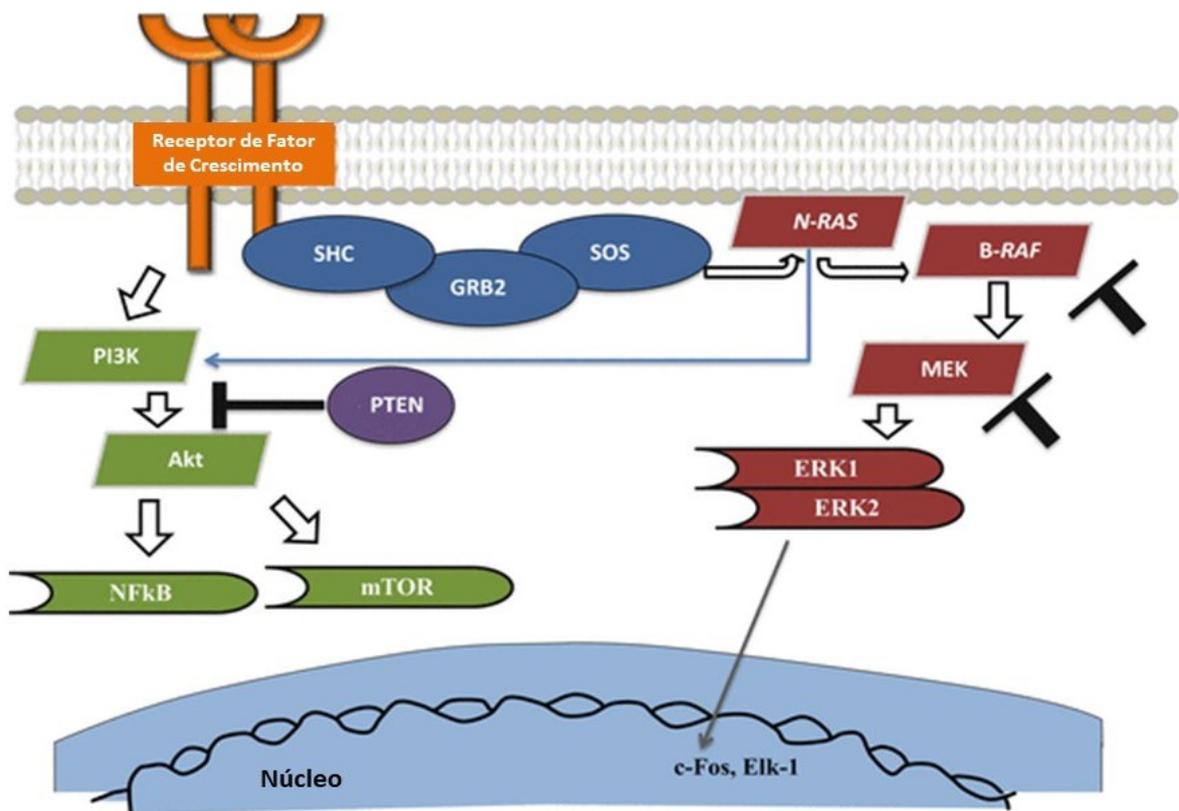


Figura 5 – Vias de sinalização da AKT e MAPK (Adaptado de Torres-Cabala, C.; Curry J. Genetics of Melanoma. Edição 1, New York, NY: Springer-Verlag New York, 2016).

A PI3K atua em vários processos celulares, como a regulação da mitogênese, a diferenciação celular e o transporte de glicose mediado por insulina (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004). Ao interagir com as proteínas IRS, a PI3K é ativada e ativa a AKT, uma serina/treonina quinase também conhecida como proteína quinase B (PKB), que está envolvida na regulação da proliferação, apoptose e crescimento celular, bem como na captação de glicose por meio do estímulo da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana (HEMMINGS; RESTUCCIA, 2012).

Já a MAPK consiste numa proteína quinase específica de serina/treonina, assim como a AKT, que responde a estímulos extracelulares, por exemplo mitógenos, e que regula várias atividades celulares (ROUX; BLENIS, 2004). Ela integra uma via de sinalização conhecida como via MAPK/ERK ou ainda via Ras-Raf-MEK-ERK. Os receptores de membrana do tipo RTK podem ser estimulados por uma variedade de ligantes tais como hormônios, fatores de crescimento epitelial e substâncias promotoras de tumores, que por sua vez ativam a proteína Ras, a qual, em seguida, fosforila e ativa a Raf-1. Posteriormente, a Raf-1 promove a ativação das proteínas MEK1 e MEK2, que incitam a atividade das ERK1 e ERK2 (MAPK). Estas, então, podem fosforilar e ativar alvos tanto no citoplasma quanto no núcleo e, assim, regular a proliferação e promover sobrevivência celular (DENT et al., 2003). A via ERK é de fundamental importância na manutenção de tecidos epiteliais, bem como sua superestimulação se relaciona com a proliferação celular no câncer (TESSIER; MATSUMURA, 2001).

Essas vias são majoritariamente ativadas pela sinalização de insulina. Entretanto, devido importância das mesmas na manutenção do estado diferenciado e da proliferação de tecidos como o epitélio, outras vias podem ativá-las de forma independente da insulina, como por exemplo a de integrinas, PTEN e AR (COLELLO et al., 2012). Assim, situações de

alterações androgênicas podem interferir também nas vias de sinalização AKT e ERK na próstata.

Ambas as vias supracitadas estão estritamente relacionadas ao desenvolvimento próstatico. Visto que elas são responsáveis pela regulação da mitogênese e transporte de glicose, no caso da PI3K, e da proliferação e sobrevivência celular, no caso da MAPK/ERK, elas influenciam diretamente o brotamento e a quantidade de mitoses na próstata, o que refletirá no número de células e no volume da glândula. Ademais, essas vias encontram-se envolvidas também no estabelecimento do diabetes. Estudos demonstram que altas concentrações de glicose podem modular a sinalização de insulina em alguns tipos celulares e, assim, afetar os processos que ocorrem no curso normal das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK, contribuindo para o surgimento de resistência insulínica e do diabetes (SCHIEKOFER et al., 2003; VARMA, 2005).

1.5 Justificativa e relevância do tema

Os efeitos do diabetes na próstata de adultos já são bem conhecidos na literatura, entretanto, o seu impacto na próstata da prole de mães diabéticas ainda é pouco estudado. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que o diabetes gestacional promoveu alterações importantes na próstata da prole de ratos que se mantiveram até a idade adulta tais como redução de testosterona e AR, remodelação estromal e proliferação celular aumentada (DAMASCENO et al, 2014).

No entanto, tais resultados não especificam os efeitos do excesso de glicose no desenvolvimento da próstata que podem perdurar até a vida adulta, interferindo no seu correto funcionamento. Considerando que a próstata tem um significativo período de desenvolvimento pós-natal caracterizado por proliferação e diferenciação celular responsáveis

pelo crescimento da glândula e aquisição do padrão secretor, qualquer alteração que ocorra no início da vida pós-natal pode interferir na formação e funcionamento da próstata.

Assim, o fato do diabetes gestacional ser uma desordem cada vez mais frequente na contemporaneidade e o de que os indivíduos nascidos de mães diabéticas tendem a ter glicemia mais elevada do que os nascidos de mães normais, reforça a necessidade de uma investigação detalhada sobre a influência das altas concentrações de glicose no desenvolvimento da próstata, com o intuito de prevenir distúrbios dessa glândula na vida adulta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos recém-nascidos (dia 0) sob o efeito de ambientes com diferentes concentrações de glicose, buscando simular um desenvolvimento glandular de um indivíduo hiperglicêmico, tal como aqueles nascidos de mãe diabética.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Estudar os impactos da glicose no desenvolvimento da glândula através da quantidade de brotos prostáticos
- ✓ Investigar a proliferação celular nos brotos glandulares pela contagem de mitoses nos diferentes ambientes *in vitro*
- ✓ Caracterizar o compartimento estromal por meio da quantificação de células musculares lisas
- ✓ Avaliar os efeitos da glicose na via de proliferação ERK1/2
- ✓ Caracterizar o compartimento estromal por meio da quantificação de MMP-2 no desenvolvimento normal da glândula e sob efeito da glicose

3. METODOLOGIA

3.1. Animais e protocolo de cultura de órgão inteiro (próstata)

Para essa investigação foram utilizados 45 ratos Wistar machos recém-nascidos (dia 0) provenientes do cruzamento de matrizes do CBEA- UFU. Os filhotes foram eutanasiados por decapitação no dia do nascimento e suas próstatas ventrais foram dissecadas com auxílio de microscópio estereoscópio. Imediatamente após digestão com colagenase 1% e separação dos túbulos com uso de estilete, toda a uretra contendo a próstata foi cultivada por 6 dias sobre membranas PTFE (Millipore) imersas em 500 ml de meio basal constituído de DMEM/Ham's F-12 (1:1; vol:vol) suplementado com 100 μ M de insulina-transferrina-selenium (Gibco) e 10 nM de cipionato de testosterona (Novaquímica) de acordo com Lopes et al., 1996 (LOPES et al., 1996). As culturas foram divididas em 3 grupos: *Controle*- tratadas com meio basal acima descrito (17,5 mM de glicose); *Glicose moderada*- tratadas com o meio basal acrescido de 126 mg/dL de glicose (7 mM) e *Alta glicose*- tratadas com 450 mg/dl de glicose (25 mM). Os meios foram renovados a cada 24 horas e a cultura do órgão foi realizada durante 1, 2 e 3 dias nos meios descritos. Para cada ensaio, as imagens do tecido foram capturadas em lupa usando sistema de captura de imagens, no dia 0 (dia do nascimento e início da cultura) e no dia 3 pós-cultura. A área macroscópica de toda a próstata+uretra foi demarcada usando o software Image Pro Plus para a determinação da fração volumétrica do tecido.

Os animais foram tratados de acordo com as normas previstas no CONCEA e o projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal da UFU CEUA (nº 110/16).

3.2. Processamento do tecido para análise histológica

Após os períodos experimentais descritos, a próstata foi retirada da cultura e fixada em Metacarn (metanol, ácido acético, clorofórmio, 6:3:1), por 3 horas em geladeira, lavada em água, desidratada em etanol, clarificada em xilol e, então, incluída em Parafina. Os cortes de 4µm foram obtidos de forma seriada em micrótomo rotativo (Leica) fazendo-se a microtomia de toda a extensão da uretra para a secção de toda a próstata em desenvolvimento. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina para avaliação geral da glândula. Para isso, os cortes foram desparafinizados em xilol por 3 períodos de 10 minutos e, posteriormente, em álcool, por 5 períodos de 2 minutos. Em seguida, eles foram corados com a hematoxilina por 30 segundos, lavados por 10 minutos em água corrente e, então, corados com eosina por 3 minutos. Por fim, os cortes foram desidratados com álcool e xilol e a montagem das lâminas foi realizada. As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio (Leica, DM500), acoplado em Sistema de aquisição e de Imagens com uso de objetiva 10X e 40X.

O número de brotos acinares foi contado usando imagens digitalizadas a partir de objetiva 10X de cortes histológicos corados em HE de 5 animais por grupo e período experimental.

O número de figuras mitóticas foi mensurado através de imagens digitalizadas a partir de objetiva 40X de cortes histológicos de 5 animais por grupo e período experimental.

3.3 Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso

A quantificação de alfa-actina foi realizada por ensaios imunohistoquímicos. Para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e aquecidos a 92°C por 40 minutos em panela de vapor para a recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de peroxidase

endógena foi feito por meio do tratamento dos cortes com H₂O₂ 3% em metanol por 15 minutos, seguido do bloqueio das interações inespecíficas de proteínas com Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA), também por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (Rato anti-humano SMA) diluído em albumina 1% overnight a 4°C, lavados em PBST e incubados com o anticorpo secundário Universal Link (Kit Star Trek Universal HRP Detection System – Biocare) por 45 minutos. Posteriormente, eles foram incubados com o complexo Streptoavidina-HRP StrekAvidin (Biocare) por 45 minutos e a revelação foi feita com diaminobenzidina – DAB (EasyPath).

O número de células musculares lisas foi contado utilizando de 5 a 10 campos visuais de cada corte histológicos, em aumento 40x, com auxílio do software ImageJ e do método de contagem por pontos.

3.4 Western blotting

O conteúdo de ERK1/2 (totais e fosforiladas), bem como de remodelação estromal, como MMP-2, foi avaliado por western blotting. Para isso, um pool com a próstata de 3 animais foi coletado para a amostra de cada n grupo experimental (n=3), os quais foram homogeneizados em tampão Cell Lysis contendo inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail- Sigma Aldrich), reagindo por 30 min a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 18000xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para quantificação do conteúdo de proteínas pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, alíquotas de 10 µg de proteína foram tratadas com solução para corrida de gel (*Laemli* sample buffer) contendo β-mercaptoetanol 5% a 95°C por 10 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE 10% e após a eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em

albumina 5% em tampão Tris contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) por 60 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas overnight com os anticorpos primários diluídos em TBST (ERK, ERKp e MMP2 - 1:1000, Cell Signaling Technology; alfa tubulina - 1:1200, Cell Signaling Technology). Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico à cada primário conjugado à peroxidase, diluído 1:35000 em TBST por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção quimioluminescente ECL (Pierce Company) e a reação luminosa das bandas foi avaliada em sistema de Análise de gel e membrana (Amersham Imager 600). A quantidade de cada proteína estudada foi determinada através da densitometria das bandas com auxílio do Image J (version 1.34; Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Os níveis de proteínas fosforiladas foram normalizados com base na expressão da proteína na sua forma total (fosforilada e não fosforilada). No caso da MMP-2, a normalização das bandas foi realizada com a alfa-tubulina.

3.5 Análise estatística

Os dados de contagem de brotos, de figuras mitóticas e de alfa-actina foram avaliados estatisticamente por meio do software Instat, no qual foram performados o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido de teste t-Student não paramétrico para avaliação da significância na comparação das médias (considerando-se $p < 0,05$), incluindo os valores de desvio padrão no caso da análise dos brotos e das mitoses, e de erro padrão no caso da alfa-actina.

4. RESULTADOS

4.1 Os tratamentos com glicose moderada ou alta glicose não alteram a área tecidual

Ao longo do curso normal (grupo controle) de 3 dias do desenvolvimento não foi notado aumento significativo na área da próstata (Figura 6). Da mesma forma, após os tratamentos com glicose em concentração moderada e alta não foi observado nenhuma alteração na área tecidual, mostrando que esse microambiente não muda a macroscopia da próstata nos tempos estudados (Tabela 1).

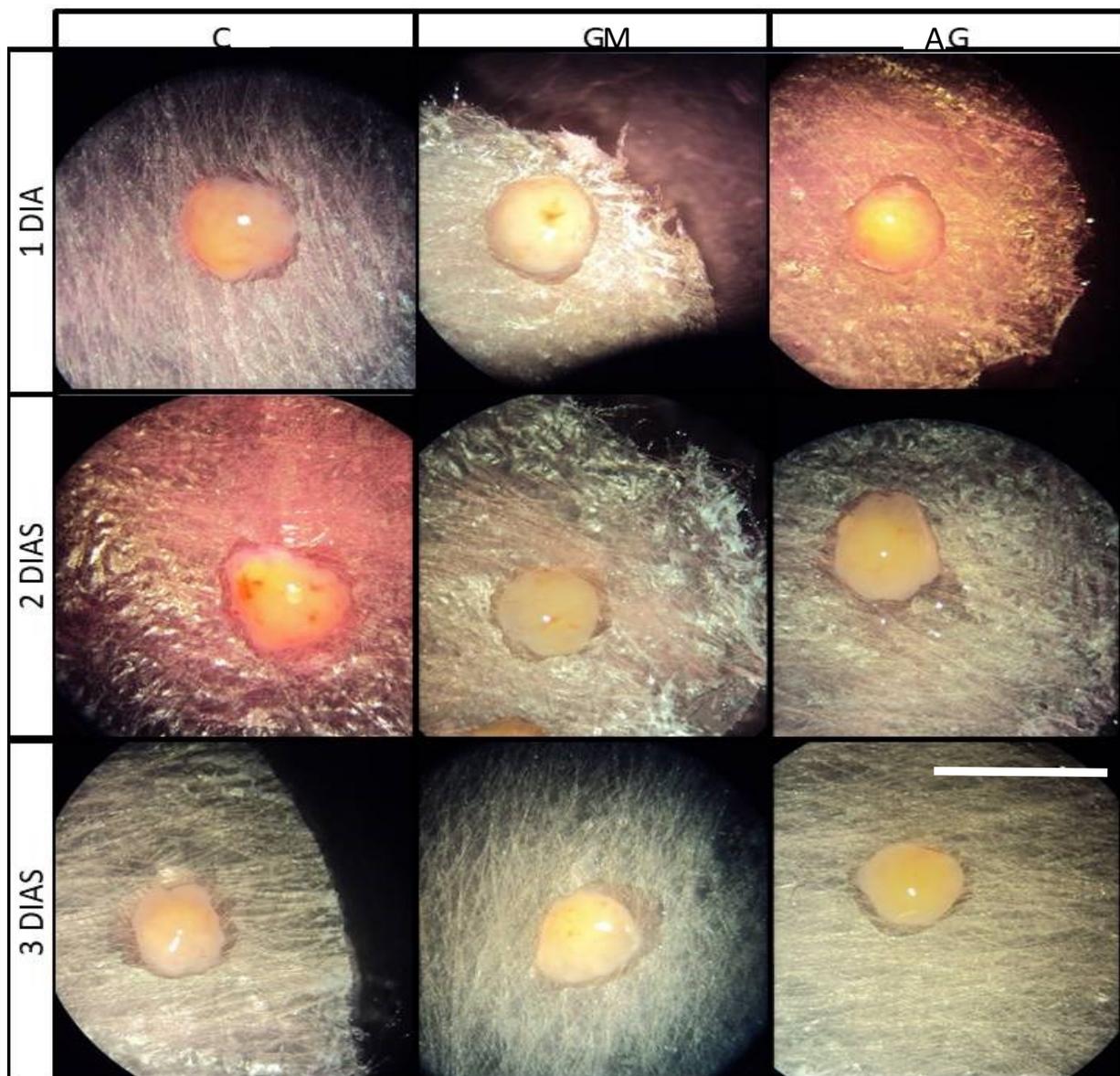


Figura 6 – Fotografias das próstatas após a cultura de órgão inteiro em meio controle (C), glicose moderada (GM) e alta glicose (AG) por 1, 2 e 3 dias pós-natal. Barra de escala: 5mm.

Tabela 1 – Média das áreas prostáticas (mm²) após realização do protocolo de cultura de órgão inteiro para os grupos nos meios controles (C), glicose moderada (GM) e alta glicose (AG).

Grupos/Dias	1 Dia	2 Dias	3 Dias
Controle (C)	4,73±0,77	4,36±0,60	4,01±0,32
Glicose Moderada (GM)	4,63±0,28	4,31±0,60	4,13±0,57
Alta glicose (AG)	3,40±0,32	4,84±0,86	4,12±0,48

4.2 A glicose moderada ou alta glicose reduz o número de brotos prostáticos

Quanto ao tempo de desenvolvimento, o grupo controle apresentou aproximadamente cinco brotos acinares no primeiro dia, com uma leve elevação desse número no dia seguinte e um aumento significativo no terceiro dia de tratamento, no qual o número de brotos foi maior que o dobro quando comparado ao dia 1.

Em relação aos tratamentos, observamos que o brotamento é consideravelmente afetado pela glicose. Pode-se observar que ao longo do curso de 3 dias há uma significativa redução no número de brotos prostáticos, não havendo diferença se a glicose está presente em concentração moderada ou alta no ambiente de cultivo tecidual (Figuras 7 e 8).

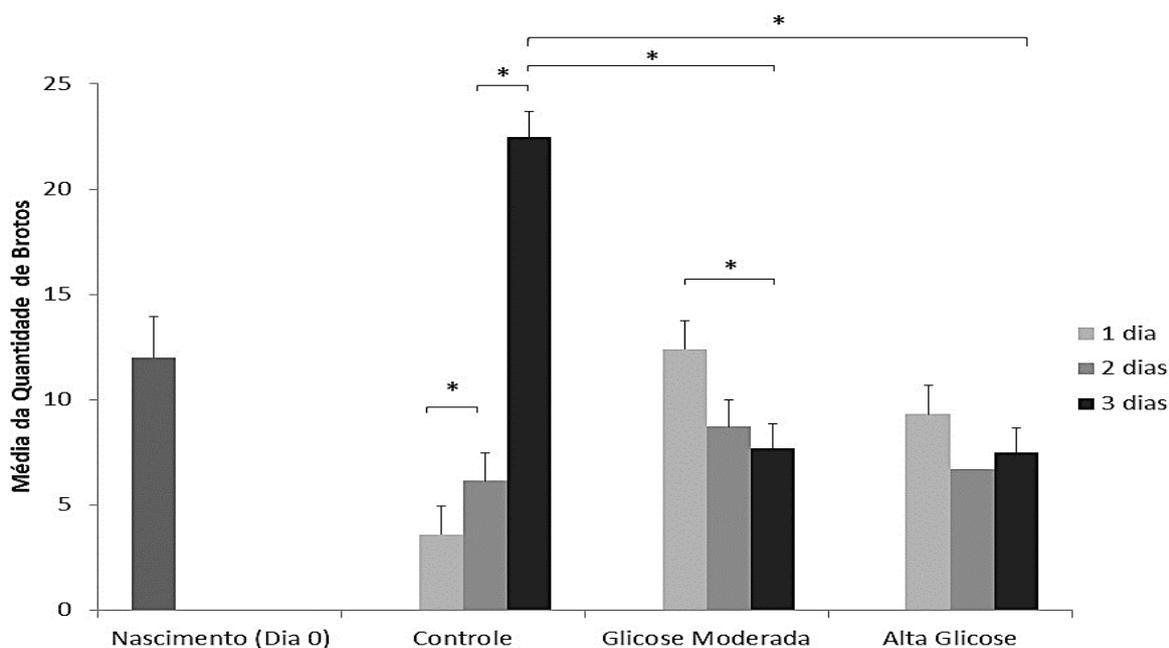


Figura 7 – Representação gráfica do número de brotos acinares na próstata do rato nos dias 1, 2 e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose. *: diferença significativa

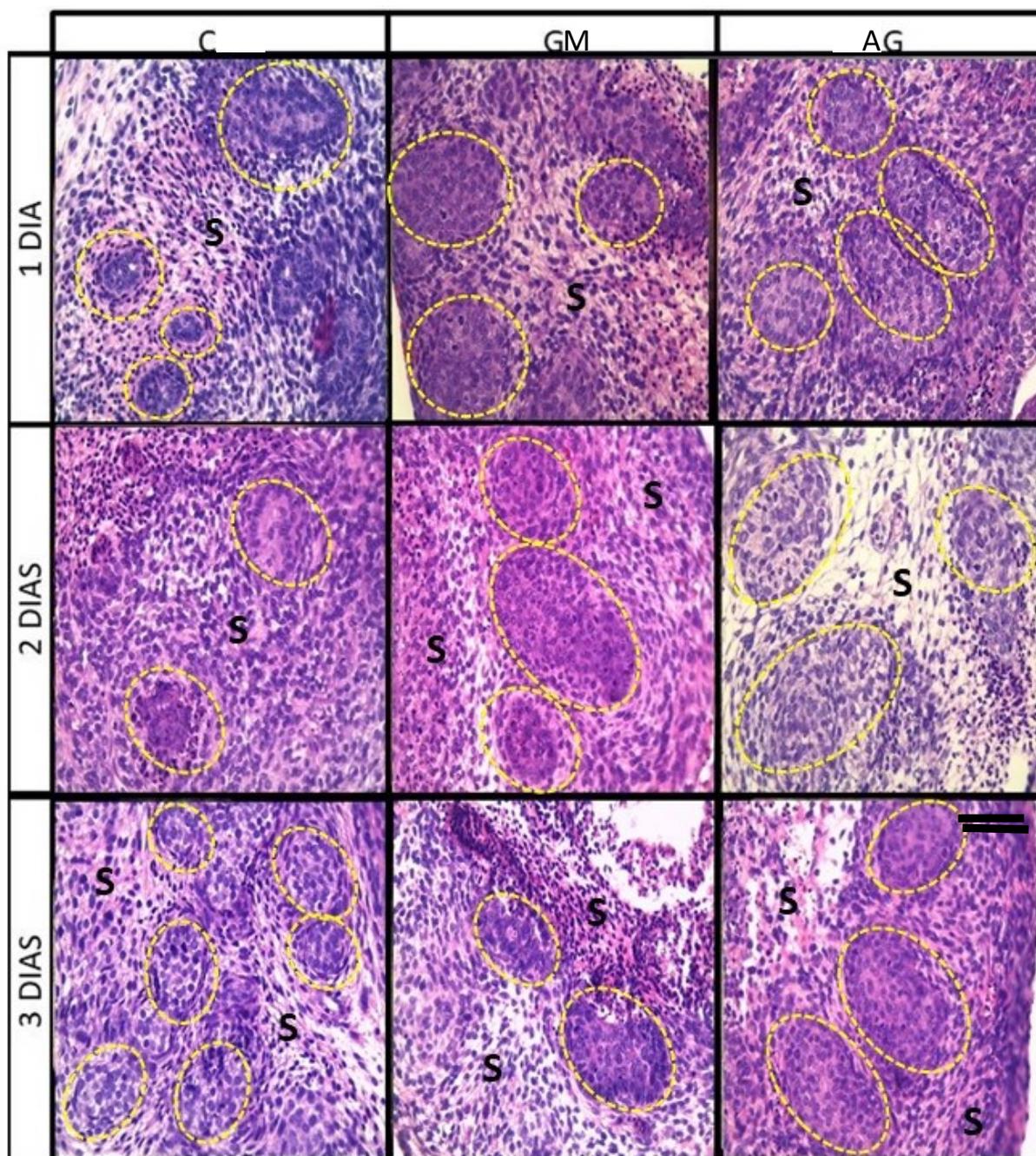


Figura 8 – Imagens obtidas por microscópio de captura, de brotos acinares (tracejados) na próstata do rato nos dias 1, 2 e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose. S = estroma. Barra de Escala: 50µm

4.3 As mitoses foram reduzidas nos tratamento com glicose moderada ou alta

A contagem do número de figuras mitóticas demonstrou que, embora haja uma redução significativa no dia 2, a quantidade de células em divisão é alta no primeiro e terceiro dia de desenvolvimento da próstata (Figura 9).

Quanto aos tratamentos, observa-se que a glicose moderada, a princípio, estimulou o aparecimento de figuras mitóticas, mas que com o decorrer do tratamento, esse perfil não se manteve, de modo que o número de mitoses reduziu até a ausência no dia 3. Já o grupo de alta glicose apresentou uma quantidade inferior de mitose desde o primeiro dia em relação ao grupo controle, a qual se manteve relativamente estável durante os dias seguintes, não havendo diferenças significativas entre elas.

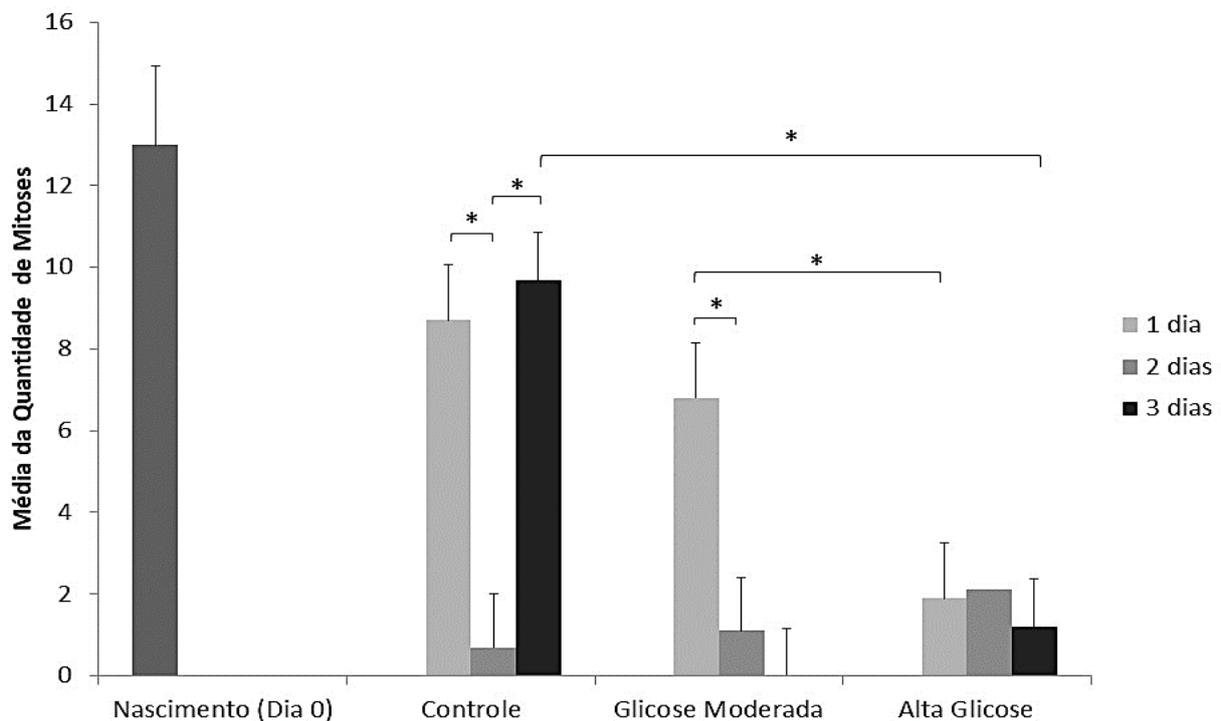


Figura 9 – Representação gráfica do número de figuras mitóticas na próstata do rato nos dias 1, 2 e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose. *: diferença significativa

4.4 Os tratamentos com glicose reduziram a quantidade de alfa-actina

A quantificação de alfa-actina, indicador de células musculares lisas, demonstrou que, em relação ao dia do nascimento (dia 0), o grupo controle mostrou que no curso de desenvolvimento normal há um aumento na quantidade dessa proteína no primeiro que se mantém estável até o 3º dia. Já nos grupos tratados com glicose há uma acentuada redução de alfa-actina após 1 dia de incubação. Embora haja um aumento na expressão dela após 3 dias

de tratamento, em especial com alta concentração de glicose, a alfa-actina se manteve bem abaixo daquela observada para o grupo controle nesse período, apresentando expressão mais próxima à encontrada no dia 0 de desenvolvimento da próstata do que para o padrão esperado de 3 dias (Figura 10).

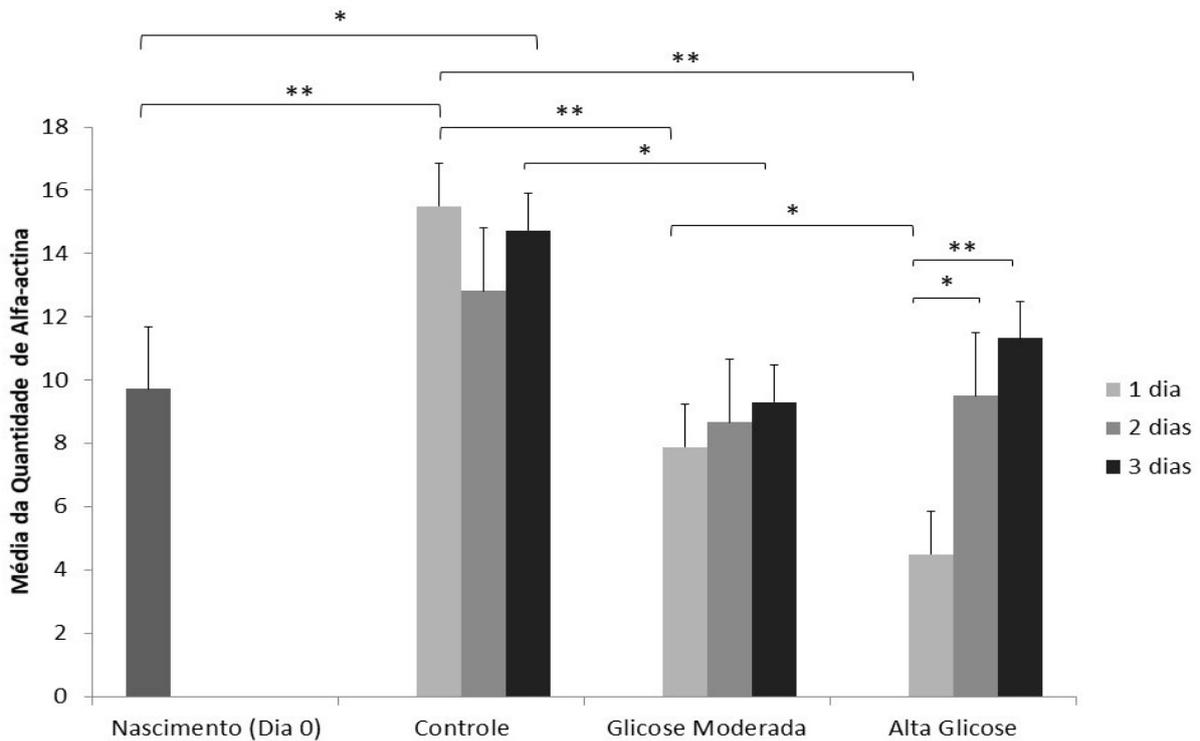


Figura 10 – Representação gráfica da média da quantidade de alfa-actina na próstata do rato nos dias 0 (nascimento) e 1, 2 e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose. *: diferença significativa. **: diferença muito significativa.

A análise histológica comprova os resultados obtidos da quantificação da frequência relativa da alfa-actina e aponta a formação de camada fibromuscular circundando os brotos prostáticos em desenvolvimento (Figura 11). Os tratamentos, embora tenham reduzido a quantidade da alfa-actina, não interferiram no local de distribuição das células musculares na próstata.

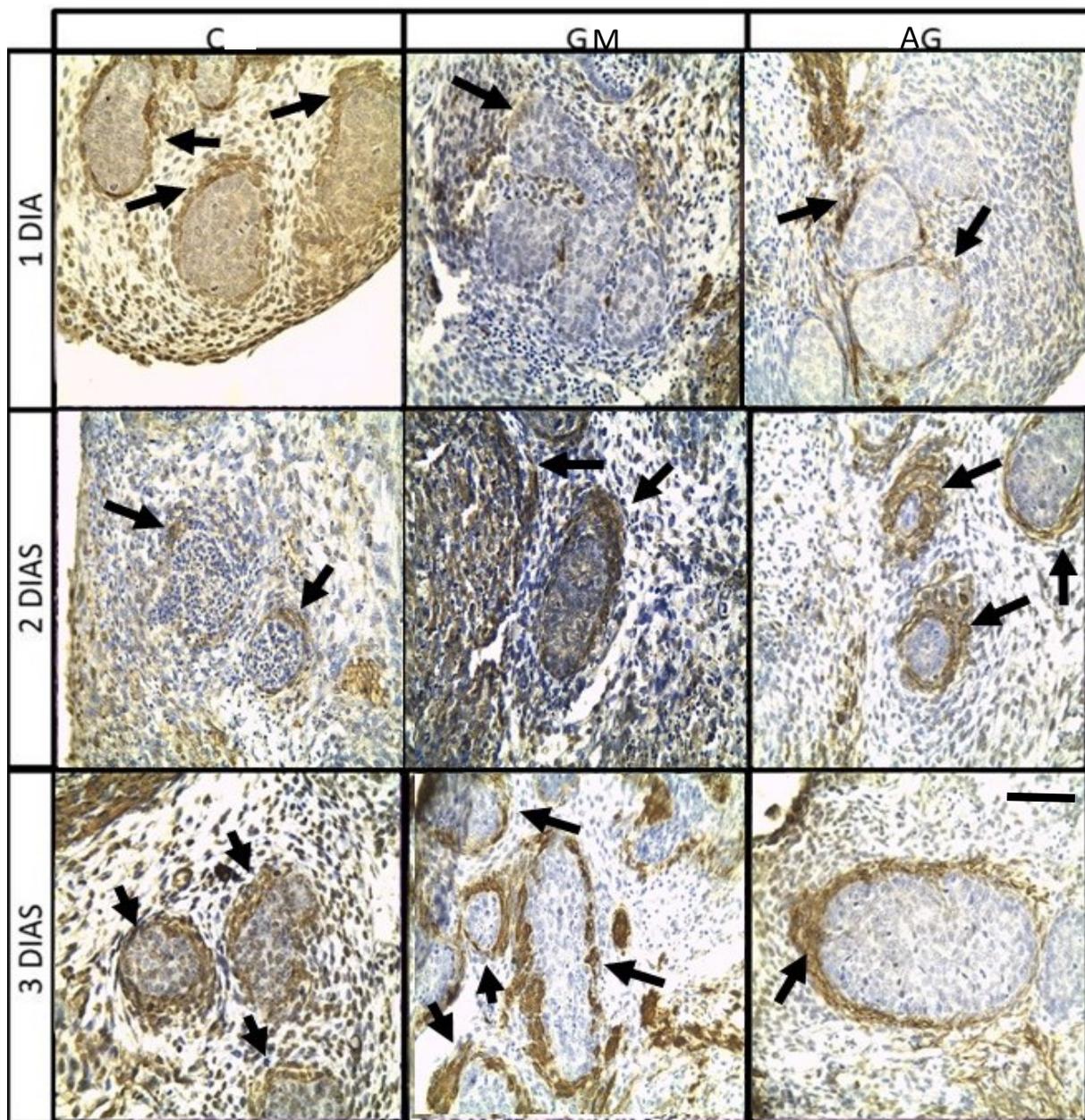


Figura 11 – Imagens obtidas por microscópio de captura, de brotos rodeados por alfa-actina (setas) na próstata do rato nos dias 1, 2 e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose. Barra de Escala: 50 μ M

4.5 As quantidade de p-ERK1/2 e MMP-2 foram diminuídas pela glicose

Os dados da densitometria demonstraram que a quantidade de p-ERK 1/2 e MMP-2 é reduzida no dia do nascimento. Entretanto, seguindo o curso do desenvolvimento, com três dias de tratamento, o grupo controle apresentou elevada expressão de ambas as proteínas.

Os tratamentos com glicose, em contrapartida, desestimularam a expressão de ERK1/2 e MMP2, fazendo com que os grupos tratados com glicose e alta glicose apresentassem médias inferiores ao grupo controle. Vale destacar que, no caso da MMP-2, a redução no seu conteúdo pelo tratamento com alta glicose foi menos acentuada quando comparada aquele com glicose moderada (Figura 12).

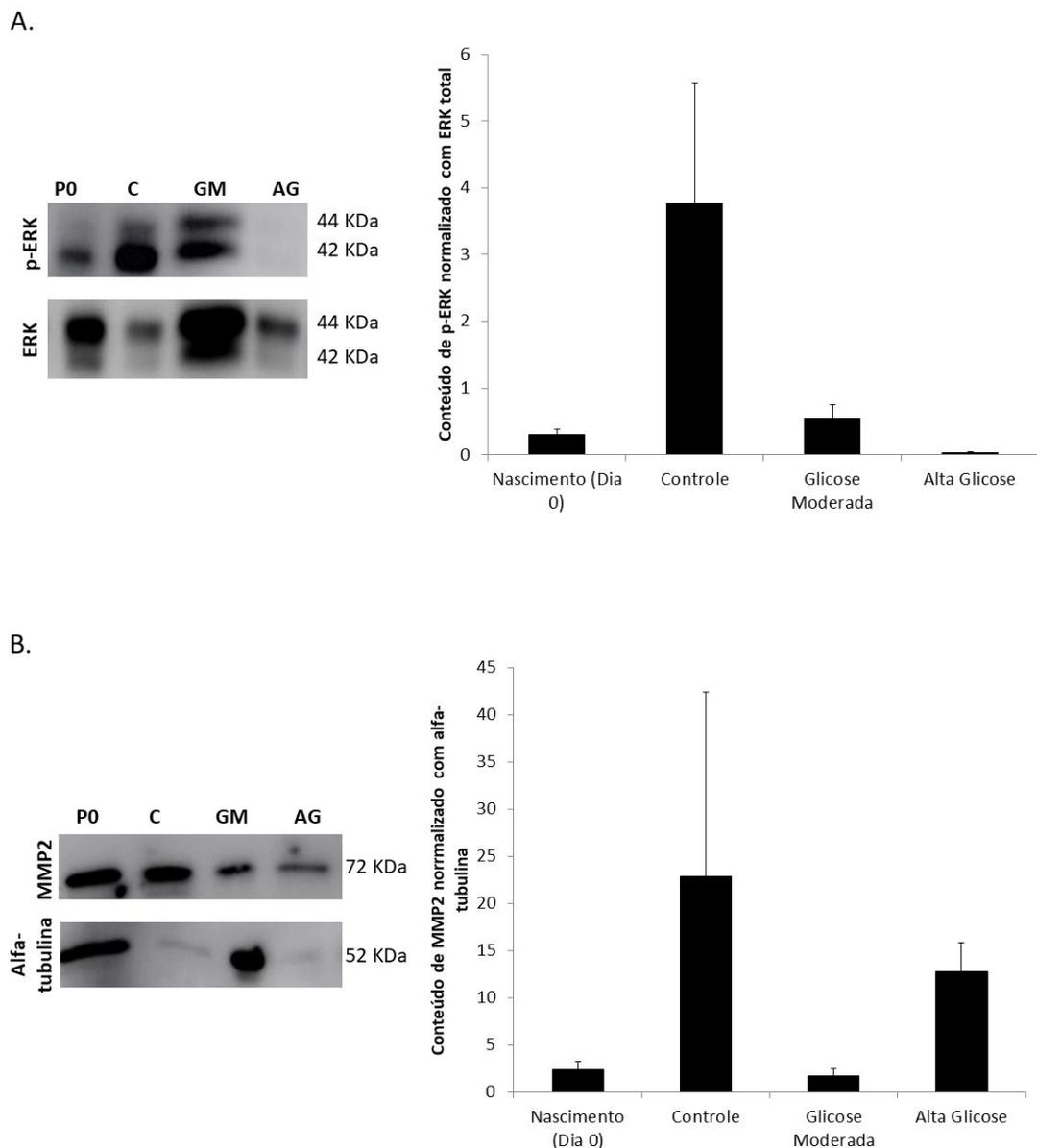


Figura 12 – (A) Representação gráfica do conteúdo de p-ERK normalizado em relação à ERK total na próstata do rato nos dias 0 (nascimento) e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose e (B) Representação gráfica do conteúdo de MMP-2 normalizado em relação à alfa-tubulina na próstata do rato nos dias 0 (nascimento) e 3 de desenvolvimento pós-natal, após o tratamento com controle, glicose moderada ou alta glicose.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento prostático é um processo longo e complexo, que tem início no período intrauterino. De acordo com Cunha e colaboradores, as redes ductais da próstata são derivadas de brotos de sólidos cordões epiteliais que emergem do seio urogenital endodérmico imediatamente abaixo da bexiga em desenvolvimento e crescem no mesênquima circundante, o que, em humanos, ocorre na décima semana de gestação e, em ratos, por volta do décimo nono dia. Nestes últimos, a proliferação e ramificação dos ductos ocorre, sobretudo, no período pós-natal (CUNHA et al., 1987). Conforme os resultados obtidos, em três dias observou-se um aumento significativo no brotamento das próstatas mantidas no meio controle. Entretanto, esse padrão foi altamente modificado pela glicose, de modo que se constatou acentuada diminuição da ramificação nos grupos com ela tratados. Ademais, verificou-se que a área da próstata permaneceu inalterada com 3 dias de desenvolvimento no grupo controle, o que se manteve mesmo após os tratamentos com glicose.

Trabalhos que verificam o efeito direto da glicose na próstata são ausentes. Contudo, um estudo conduzido por Stout e colaboradores, que avaliava o efeito da glicose na replicação de células endoteliais, demonstraram que quando tratadas com 11.2, 16.8 ou 22.4mmol/L de glicose (sendo essa última concentração próxima ao nosso grupo de alta glicose) estas apresentavam progressivas depressões na síntese de DNA, o que está associado diretamente com a proliferação e com o número de células (STOUT; IRELAND, 1982). Adicionalmente, avaliando o efeito da glicose na proliferação de células mesangiais glomerulares humanas em cultura, as quais foram cultivadas em meios com 5, 20, 50 ou 115mM dessa substância, Nahman e colaboradores constataram que, quando comparadas com as células cultivadas em 5mM, aquelas na presença de 20mM de glicose reduziram em quantidade ao longo de 8 dias. Esse efeito foi ainda mais pronunciado em altas concentrações de glicose, de modo que o

meio com 115mM teve o mesmo efeito com apenas dois dias de tratamento, o qual persistiu até o décimo quarto dia. Isso sugere que o efeito da glicose na proliferação celular é dose-dependente, isto é, doses moderadas podem estimular a proliferação, enquanto doses mais altas podem, ao contrário, inibi-la.

Da mesma forma, ao analisar o efeito da hiperglicemia em células epiteliais, Lorenzi e colaboradores constataram o mesmo padrão ao cultivá-las em meios com 5, 20 ou 40mM de glicose, observando que os níveis de mitoses neste último meio encontravam-se depreciados (LORENZI; CAGLIERO; TOLEDO, 1985). Visto isso, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o curso normal de desenvolvimento exige um aumento no número de mitoses, notado de 1 para 3 dias no grupo controle. O tratamento com glicose em concentração moderada, a princípio, estimulou esse efeito. No entanto, este estímulo não se manteve com o avanço do tratamento, e assim, notamos que tanto a glicose moderada quanto a alta glicose diminuíram a divisão celular nos brotos prostáticos. Considerando a importância dos picos de proliferação celular nos dias iniciais pós-natais, responsáveis pela fase de brotamento da próstata, essa diminuição de mitose causada pela glicose tem impacto direto na formação da glândula. Esperava-se que esse resultado influenciasse a área prostática, de modo que a mesma sofresse uma diminuição nos grupos tratados com glicose, uma vez que a divisão celular esteve menos presente nesses meios, no entanto, isso não foi observado no presente trabalho.

Essa diminuição no número de mitoses pode estar relacionada à menor ativação da proteína ERK 1/2, a qual é responsável por regular a proliferação e sobrevivência celular. Nossos resultados demonstraram que no grupo controle, tal proteína encontra-se extremamente fosforilada nos primeiros três dias pós-natais, o que justifica a grande quantidade de mitoses notadas nesse início do desenvolvimento. Todavia, sua fosforilação sofreu significativa redução no tratamento com glicose moderada, a qual foi ainda mais

significativa naquele grupo tratado com alta glicose. Chalobrolle e colaboradores investigaram a produção de esteróides nos ovários e os níveis de proteínas-chave envolvidas na esteroidogênese por meio do tratamento de células granulosas primárias de rato com altas concentrações de glicose (5 ou 10g/L) e constatou, de maneira similar, que a fosforilação de ERK1/2 foi significativamente reduzida após 120 minutos de incubação com os supracitados meios (CHABROLLE et al., 2008). Dessa forma, a menor ativação da ERK1/2 e a consequente diminuição do número de mitoses explica a redução na quantidade de brotos observada nas próstatas tratadas com adição de glicose. A atenuação na quantidade desses brotos, por sua vez, implica em uma menor ramificação, o que originará uma próstata menos volumosa e com reduzida quantidade de ácinos secretores. Esse cenário pode influenciar diretamente a quantidade de secreção que será produzida e liberada, impactando de modo negativo as funções sexuais do indivíduo.

O modo como a glicose influencia na diminuição da quantidade de p-ERK ainda é desconhecido. Diversos estudos sugerem que a glicose é capaz de ativar a via MAPK/ERK e isso pode se dever ao fato de que essa substância induz a atividade da proteína quinase C (PKC), bem como a maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tanto a PKC quanto as EROs são capazes de promover a fosforilação de ERK1/2 e, assim, incitar a atividade dessa proteína (INGRAM et al., 1999; UEDA et al., 1996; WANG et al., 2011). Em contrapartida, alguns trabalhos exploram os mecanismos pelos quais essa via pode ser inativada. Cao e colaboradores levantaram a hipótese de que um desses mecanismos envolve a inativação da Raf-1 por meio de um *looping* de *feedback* entre essa proteína e a ERK. A Raf-1 tem se mostrado ser um substrato da ERK, podendo ser fosforilada por essa última em diversos sítios, incluindo a Ser289, Ser296 e Ser301. A fosforilação desses sítios poderia induzir a Raf-1 para um estado inativo e dessensibilizado, o que, por sua vez, levaria à inativação da ERK (CAO et al., 2011). Visto isso, os resultados obtidos no presente estudo

para os grupos tratados com glicose moderada e alta glicose poderiam ser devido a esse modo de atuação, uma vez que a glicose promove a ativação de ERK, a qual passa a fosforilar a Raf-1, provocando a inativação da mesma e, conseqüentemente, a diminuição nos seus próprios níveis de fosforilação.

Em se tratando da quantificação de alfa-actina, que consiste em um indicador de células musculares lisas, os resultados alcançados mostraram que, em relação ao dia do nascimento (dia 0), o grupo controle apresentou elevação da quantidade dessa proteína, a qual se manteve estável até o 3º dia, enquanto que nos grupos tratados com glicose, mesmo com um aumento na expressão da alfa-actina após os três dias de tratamento, os níveis dessa proteína se mantiveram bem abaixo do observado no grupo controle no mesmo período.

As células musculares lisas são um dos principais tipos celulares que compõe o estroma prostático, sendo responsáveis por promover a contração da glândula no momento da ejaculação, por sintetizar componentes estruturais e regulatórios da matriz extracelular a fim de criar um microambiente que regula o crescimento e a diferenciação de outros tipos celulares e, ainda, por possibilitar a ocorrência da interação epitélio-estroma (ANTONIOLI; DELLA-COLLETA; CARVALHO, 2004). Segundo Cunha, essa interação é recíproca, de modo que o mesênquima induz a edificação epitelial, ao passo que o epitélio estimula a diferenciação mesenquimal, e essencial tanto para o desenvolvimento prostático quanto para a manutenção da glândula no estado adulto, período no qual a principal interação entre o estroma e o epitélio se dá por meio das células musculares lisas. A importância desse processo foi comprovada pelo supracitado autor quando, ao separar o seio urogenital e a vesícula seminal em seus componentes mesenquimais e epiteliais, observou que os componentes cultivados separadamente não geravam desenvolvimento prostático, quadro esse revertido quando as porções do epitélio e do mesênquima de cada estrutura foram unidas novamente (CUNHA, 1972).

Dada a importância das células musculares lisas para o desenvolvimento e manutenção prostáticos, diversos estudos visam entender os efeitos de variados compostos sobre tais células. Peiró e colaboradores, por exemplo, analisaram a influência de altas concentrações de glicose nas taxas de crescimento e morte de células musculares lisas aórticas humanas. Ao cultivá-las em meio DMEM suplementado com 5.5 ou 22mM de glicose, foi observado que aquelas na presença da alta concentração de glicose apresentaram uma média final do número de células por poço aproximadamente 20% menor quando comparadas com as mantidas no meio com baixa glicose, resultado similar ao obtido no presente estudo. Dentre os possíveis mecanismos pelo qual a glicose atua para causar tal resposta está a hipótese de que ela retarda o crescimento celular e a de que ela não altera a taxa de proliferação, mas sim aumenta a ocorrência de morte celular, sobretudo, por meio do estresse oxidativo (PEIRÓ et al., 2001). Visto isso, apesar de a glândula avaliada no atual trabalho ser imatura e, assim, não sofrer influências significativas quanto à deficiência de células musculares lisas, caso um padrão com pouca quantidade dessas células seja mantido até a vida adulta, a liberação do sêmen no momento da ejaculação e a manutenção da próstata podem ficar comprometidas.

Outro fator imprescindível para o desenvolvimento, a manutenção e a homeostasia da próstata são as metaloproteinases, em especial a MMP-2. A MMP-2 é uma endopeptidase que cliva proteínas da MEC, a qual é abundante no estroma. A MEC da próstata é composta por um complexo arranjo de proteínas distribuídas no tecido conjuntivo e também na lâmina basal do epitélio que cerca os ácinos dessa glândula. De acordo com Bruni, essa matriz e as moléculas a ela relacionadas são componentes-chave durante a morfogênese e diferenciação celular de vários órgãos ramificados, desempenhando funções essenciais ao desenvolvimento, migração, adesão, diferenciação e sobrevivência das células. Ademais, moléculas específicas da MEC podem se ligar e sequestrar fatores de crescimento, formar ligações entre células epiteliais e estromais e, além disso, transmitir sinais entre seus sítios de interação (BRUNI-

CARDOSO et al., 2010). Assim, a MEC, juntamente com as células estromais, criam um ambiente responsável por regular o crescimento e diferenciação funcional das células ao seu redor. Embora estável, a MEC pode ser intensamente modificada em um processo denominado remodelação estromal, o qual é mediado, essencialmente, pelas metaloproteinases, a exemplo da MMP-2.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o conteúdo dessa enzima foi elevado na próstata após os três dias de tratamento no grupo controle, o que é esperado, visto que a glândula está em fase de desenvolvimento e requer uma remodelação da MEC a fim de possibilitar a ramificação dos brotos dentro do estroma e o crescimento epitelial. Entretanto, seus níveis foram reduzidos nas próstatas tratadas com glicose quando comparados aquelas do grupo controle. Da mesma forma, Singh e colaboradores, ao investigarem a influência de altas concentrações de glicose em células mesangiais de glomérulos de ratos, constataram que aquelas tratadas em meios com 30mM de glicose exibiram atividade de MMP-2 cerca de 20% menor do que a observada para o grupo tratado com 5mM. O autor observou ainda que a glicose em excesso estimulava a expressão de TIMP-2, um inibidor específico da metaloproteinase em questão (SINGH et al., 2001).

Alguns estudos sugerem ainda que a expressão de MMP-2 esteja relacionada com a fosforilação de ERK1/2. Sabe-se que a ERK é capaz de fosforilar o fator de transcrição Elk-1 e, assim, ativá-lo. Este, por sua vez, se liga ao promotor do gene c-fos, que passa então a codificar uma proteína que forma um heterodímero com a proteína c-jun, originando um complexo denominado AP-1 (BABU et al., 2000). Tal complexo é tido como um inibidor da expressão de MMP-2 e, por isso, a quantidade de p-ERK poderia influenciar os níveis observados para essa enzima (ZHANG et al., 2009). Contudo, no caso do presente estudo, ambas as vias se encontraram depreciadas nos grupos tratados com glicose, portanto, o mecanismo responsável pela diminuição na quantidade de MMP-2 provavelmente é

independente da via MAPK/ERK. A diminuição na atividade da MMP-2, no caso da próstata, pode prejudicar a remodelação e, conseqüentemente, a estrutura da glândula, uma vez que o estroma é responsável por manter as unidades secretoras estáveis em suas respectivas localizações. Ademais, a digestão da MEC seria afetada e fatores de crescimento por ela liberados, que atuam na manutenção dos fibroblastos, deixariam de atuar, contribuindo para a alteração estromal (Figura 13).

Visto que o diabetes gestacional tem se tornado cada vez mais ocorrente, é de fundamental importância que sejam concentrados esforços para elucidar os vários mecanismos envolvidos no estabelecimento dessa enfermidade e, sobretudo, os modos de atuação da glicose nas células e como ela interfere nas vias de proliferação e sobrevivência celular. Estudar as demais vias que se relacionam com a MAPK, como a p38 e a JNK1/2, bem como avaliar genes pró-apoptóticos, a exemplo do Bax e Bad, e anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL, poderia auxiliar no entendimento dos fenômenos ocorridos na condição de altas concentrações de glicose. Da mesma forma, são imprescindíveis o desenvolvimento e a aplicação de terapias que visem prevenir o diabetes tanto durante a gravidez quanto após o parto, a fim de proporcionar melhor qualidade de vida para a mãe e o feto.

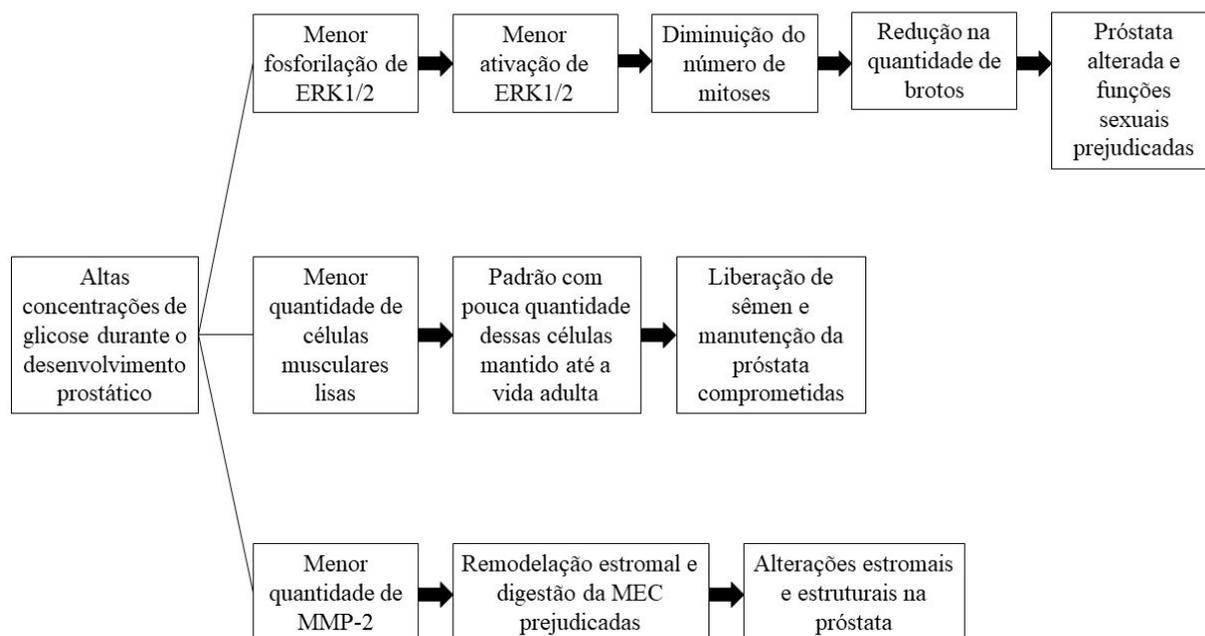


Figura 13 – Representação esquemática dos efeitos de altas concentrações de glicose durante o desenvolvimento prostático de acordo com os resultados obtidos no presente estudo

6. CONCLUSÃO

1) O presente estudo demonstrou que altas concentrações de glicose diminuem consideravelmente o número de mitoses no desenvolvimento inicial da próstata e, conseqüentemente, a quantidade de brotos acinares, o que poderá impactar enormemente o volume e capacidade secretora da glândula formada. Sugerimos que tal resultado esteja relacionado a diminuição de ativação da via da MAPK: ERK1/2, importante via de sinalização para a proliferação celular e que esteve reduzida na próstata cultivada nesse ambiente.

2) Além disso, a glicose alterou o ambiente estromal, reduzindo a quantidade de células musculares lisas e também a expressão de MMP-2 o que implicará em alterações em prejuízos na capacidade contrátil da glândula bem como nas sinalizações mediadas pela remodelação estromal.

3) Visto a importância do período pós-natal no desenvolvimento da próstata e os efeitos que altas concentrações de glicose podem acarretar, conclui-se que é de fundamental importância que esse processo ocorra em um ambiente adequado e equilibrado, a fim de que a próstata se desenvolva apropriadamente, atingindo um arranjo tecidual final que possibilite o desempenho normal das funções fisiológicas e sexuais do homem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, L. T.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 279–288, 2016.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). 2. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, 2016.

ANDRADE, A. F. P. **UTILIDADE DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NO ESTUDO DA PRÓSTATA**. [s.l: s.n.].

ANTONIOLI, E.; DELLA-COLLETA, H. H. M.; CARVALHO, H. F. Smooth Muscle Cell Behavior in the Ventral Prostate of Castrated Rats. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 50–56, 2004.

ARCOLINO, F. O. et al. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 2, p. 144–154, 2010.

BABU, G. J. et al. Phosphorylation of Elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 8, p. 1447–1457, 2000.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 728–735, 1995.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRUNI-CARDOSO, A. et al. MMP-2 regulates rat ventral prostate development in vitro.

Developmental Dynamics, v. 239, n. 3, p. 737–746, 2010.

BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **Anatomical Record**, v. 290, n. 10, p. 1223–1232, 2007.

CAGNON, V. H. A. et al. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). **Tissue and Cell**, v. 32, n. 4, p. 275–283, 2000.

CAO, Q. et al. Negative feedback regulation of Raf/MEK/ERK cascade after sublethal cerebral ischemia in the rat hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 1, p. 153–162, 2011.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CHABROLLE, C. et al. Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 1–14, 2008.

CHONG, R. W. et al. Metformin Has a Positive Therapeutic Effect on Prostate Cancer in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 351, n. 4, p. 416–419, 2016.

CHUNG, L. W. K.; ZHAU, H. E. Stromal-Epithelial Interaction. **Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics**, p. 341–362, 2001.

COLELLO, D. et al. Integrins regulate microtubule nucleating activity of centrosome through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n.

4, p. 2520–2530, 2012.

CUNHA, G. R. Epithelio-mesenchymal Interactions in Primordial Gland Structures Which Become Responsive to Androgenic Stimulation. **Anat Rec**, v. 172, p. 179–196, 1972.

CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.

CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions: Past, present, and future. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 578–586, 2008.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 5, p. 417–34, 2004.

DAVEY, R. A. M. G. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **Clin Biochem Rev**, v. 37, n. January, p. 3–15, 2016.

DENT, P. et al. MAPK pathways in radiation responses. **Oncogene**, v. 22, n. 37 REV. ISS. 3, p. 5885–5896, 2003.

DIABETES, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 30, n. SUPPL. 1, 2010.

EADES, C. E.; FRANCE, E. F.; EVANS, J. M. M. Postnatal experiences, knowledge and perceptions of women with gestational diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 35, n. 4, p. 519–529, 2018.

FIANDALO, M. V et al. Inhibition of dihydrotestosterone synthesis in prostate cancer by combined frontdoor and backdoor pathway blockade. v. 9, n. 13, p. 11227–11242, 2018.

FRAYLING, T. M.; COLHOUN, H.; FLOREZ, J. C. A genetic link between type 2 diabetes and prostate cancer. **Diabetologia**, v. 51, n. 10, p. 1757–1760, 2008.

FRÖJDÖ, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 2, p. 83–92, 2009.

GOBBO, M. G. et al. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 326–333, 2012.

HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. PI3K-PKB / Akt Pathway. p. 1–4, 2012.

INGRAM, A. et al. Mesangial cell signaling cascades in response to mechanical strain and glucose. **Kidney International**, v. 56, p. 1721–1728, 1999.

JAMES E. DENNIS, A.; CHARBORD, P. Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma. **Stem Cells**, v. 20, n. 3, p. 205–214, 2002.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KRAGELUND NIELSEN, K.; GROTH GRUNNET, L.; TERKILDSEN MAINDAL, H. Prevention of Type 2 diabetes after gestational diabetes directed at the family context: a narrative review from the Danish Diabetes Academy symposium. **Diabetic Medicine**, v. 35, n. 6, p. 714–720, 2018.

LEE, K. L.; PEEHL, D. M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 172, n. 5 I, p. 1784–1791, 2004.

LOPES, E. S. et al. Initiation of Secretory Activity of Rat Prostatic Epithelium in Organ Culture. **Endocrinology**, v. 137, n. November, 1996.

LORENZI, M.; CAGLIERO, E.; TOLEDO, S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture: Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. **Diabetes**, v. 34, n. 7,

p. 621–627, 1985.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.

MACURA, K. J. Editorial: Advancements in magnetic resonance imaging of the prostate. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 19, n. 6, p. 259–260, 2008.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 2003.

MAUNEY, J.; OLSEN, B. R.; VOLLOCH, V. Matrix remodeling stem cell recruitment: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 29, n. 8, p. 657–663, 2010.

MCNEAL, J. E. The Zonal Anatomy of the Prostate. **The Prostate**, v. 29, n. 2, p. 35–49, 1981.

MITCHELL, T.; NEAL, D. E. The genomic evolution of human prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 2, p. 193–198, 2015.

ONITILO, A. A. et al. Type 2 diabetes mellitus, glycemic control, and cancer risk. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 2, p. 134–140, 2014.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667–676, 2004.

OZOUGWU, O. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, 2013.

PEIRÓ, C. et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle

cells through the formation of hydrogen peroxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 7, p. 967–974, 2001.

RATO, L. et al. Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycogenesis in mature rat Sertoli cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 66, p. 1–10, 2015.

RIBEIRO, D. L. et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 1, p. 421–430, 2006.

RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 4, p. 400–411, 2009.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 320–344, 2004.

SCHIEKOFER, S. et al. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor κ B in PBMCs. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 621–633, 2003.

SELMI, C. Diagnosis and classification of autoimmune uveitis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 591–594, 2014.

SHULMAN, G. I. On diabetes: insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171–176, 2000.

SINGH, R. et al. High glucose decreases matrix metalloproteinase-2 activity in rat mesangial cells via transforming growth factor-beta(1) 57. **Experimental Nephrology**, v. 9, n. 4, p. 249–257, 2001.

STOUT, R. W.; IRELAND, N. Glucose Inhibits Replication of Cultured Human Endothelial Cells. **Diabetologia**, v. 199, p. 436–439, 1982.

TAGUCHI, A.; OHTA, Y.; TANIZAWA, Y. Molecular clock as a regulator of β -cell function. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 9, n. 3, p. 453–456, 2018.

TAN, M. E. et al. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3–23, 2015.

TESSIER, D. M.; MATSUMURA, F. Increased ErbB-2 tyrosine kinase activity, MAPK phosphorylation, and cell proliferation in the prostate cancer cell line LNCaP following treatment by select pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 1, p. 38–43, 2001.

TIMMS, B. G. Prostate development: A historical perspective. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 565–577, 2008.

TORRES-CABALA, C.; CURRY, J. **Genetics of Melanoma**. Edição 1, New York, NY: Springer-Verlag New York, 2016

TURNER, R. C. et al. Glycemic Control With Diet, Sulfonylurea, Metformin, or Insulin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **American Medical Association**, v. 281, n. 21, p. 2005–2012, 1999.

TUXHORN, J. A. et al. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. **Cancer Research**, v. 62, n. 11, p. 3298–3307, 2002.

UEDA, Y. et al. Protein Kinase C Activates the MEK-ERK Pathway in a Manner Independent of Ras and Dependent on Raf. v. 271, n. 38, p. 23512–23519, 1996.

VARMA, S. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1744–

H1751, 2005.

VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 8, p. 885–892, 2006.

WANG, X. et al. ROS-activated p38 MAPK / ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. v. 51, p. 539–551, 2011.

ZHANG, H. W. et al. AP-1 Inhibits Expression of MMP-2/9 and Its Effects on Rat Smooth Muscle Cells. **Journal of Surgical Research**, v. 157, n. 1, p. e31–e37, 2009.

ZHAO, H. et al. Tissue slice grafts: An in vivo model of human prostate androgen signaling. **American Journal of Pathology**, v. 177, n. 1, p. 229–239, 2010.