

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MORFOLÓGICAS

**JORGE ROBERTO TAVARES ALMEIDA**

**ESTABELECIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE  
ORGANÓIDE PROSTÁTICO HUMANO: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO  
RETINÓICO NA INDUÇÃO DE APOPTOSE.**

**SALVADOR**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JORGE ROBERTO TAVARES ALMEIDA

ESTABELECIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE ORGANÓIDE PROSTÁTICO HUMANO: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO NA INDUÇÃO DE APOPTOSE.

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Ciências Morfológicas  
Do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da  
UFRJ realizada em parceria com o Instituto de  
Ciências da Saúde da UFBA como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Morfológicas. Trabalho realizado no  
Laboratório de Bioengenharia Tecidual e  
Biomateriais do ICS-UFBA**

**Orientador: Prof. Dr. Radovan Borojevic  
Co-orientador: Prof. Dr. Vitor Antonio Fortuna**

SALVADOR

2008

Almeida, Jorge Roberto Tavares.  
Estabelecimento de modelo tridimensional de organóide de  
prostático humano:avaliação do ácido retinóico na indução de  
apoptose. / Jorge Roberto Tavares Almeida.  
Salvador,2008.  
114 f. ; il.  
Orientador: Prof. Dr. Radovan Borojevic  
Co-Orientador: Prof. Dr. Vitor Antonio Fortuna  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de  
Janeiro /Universidade Federal da Bahia. 2008  
1.Modelo tridimensional. 2. Apoptose 3. Ácido Retinóico 4.  
Cultura de Células 5. Cultura de Organóides 6. Próstata.

**TERMO DE APROVAÇÃO****JORGE ROBERTO TAVARES ALMEIDA****ESTABELECIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE ORGANÓIDE PROSTÁTICO HUMANO: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO NA INDUÇÃO DE APOPTOSE .**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ em parceria com o Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, como parte do requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.**

Examinador: Prof. Dr. Marilda de Souza Gonçalves – Fiocruz/BA

Examinador: Prof. Dr. Songeli Menezes Freire – UFBA/EBMSP.

Examinador: Prof. Dr. Maria Isabel Doira Rossi – PCM/UFRJ.

Suplentes:

Prof. Dr. Marcia Cury El-Cheikh – (Revisora e Suplente Interno)PCM/UFRJ.

Porf. Dr. Marcos André Vannier dos Santos – Fiocruz-BA (Suplente Externo).

SALVADOR ..11....de.agosto.....de 2008

## RESUMO

De todas as doenças da próstata, o câncer é o a doença mais frequentemente diagnosticada em homens com idade acima de 60 anos e a segunda em mortalidade em várias partes do mundo. Estudos epidemiológicos têm mostrado que asiáticos têm baixa incidência de câncer de próstata quando comparado com europeus e estes mais baixo que afro-descendentes. Em vários modelos de estudo os retinóides têm se mostrado como poderosos agentes na diferenciação celular, especificamente na inibição e potencial tumorigênico em células de câncer. O objetivo do presente estudo foi estabelecer modelo tridimensional de cultura de organóides prostáticos para avaliar o efeito do ácido retinóico na indução de apoptose de células da próstata humana. O material biológico utilizado neste estudo, veio da doação de seis pacientes, com idades variando entre 63 e 72 anos, sendo 2 brancos , 2 afro-descendentes e 2 pardos, com diagnóstico prévio de Hiperplasia Prostática Benigna e Câncer de Próstata. Realizou-se cultura aderente de células da próstata afim de se analisar a curva de sobrevivência de células incubadas com ácido retinóico de T0 a T 12 e estudo morfológico destas células. Na cultura de células tridimensionais de organóides foi estudada a morfologia destas células. Os organoides foram incubados com ácido retinóico por 48 horas, fixados em paraformaldeído, emblocados em parafina e divididos em dois grupos. Um bloco foi processado histologicamente corado com HE, para posterior análise descritiva da morfologia das células de organóides de tecido normal, hiperplásico e adenocarcinomatoso. Na avaliação histológica notou-se que, tanto a citologia como a citoarquitetura foram mantidas. Para análise quantitativa das células em apoptose, foi usada marcação imunofluorescente pela técnica de TUNEL, sendo contados 20 ácinos com aproximadamente 1600 células, comparando-se com organóides que não receberam a droga teste. O percentual de células em apoptose foi de 2,2% sendo menor que os organóides não tratados com a droga teste 2,8. Concluímos, que o estabelecimento da cultura tridimensional de organóides é um modelo válido para estudo dos tecidos da próstata, válido como modelo de cultura para estudos farmacológicos.

**PALAVRAS – CHAVE:** próstata, ácido retinóico, cultura de células, modelo, organóide.

## ABSTRACT

From all prostate diseases, the cancer is the disease most often diagnosed in men aged over 60 years and the second in mortality in several parts of the world. Epidemiological studies have shown that Asians have low incidence of prostate cancer, compared with Europeans and that these lower afro-descendants. In several models studies the retinoids have been shown as powerful agents in the cell differentiation, specifically in the inhibition and tumorigenic potential in the cancer cells. The purpose of this study was to establish a three-dimensional model of culture of prostate organóides to assess the effect of retinoic acid in the induction of apoptosis in the prostate human cells. The biological material used in this study, came from the six patients donation, with ages ranging between 63 and 72 years, been two white, two afro-descendants and 2 “mulatos”, with previous diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia and prostate cancer. There was realized adherent culture from prostate cells in order to examine the survival curve of cells incubated with retinoic acid from T0 to T12 and morphological study of these cells. In the three-dimensional cells culture of organoids was studied the morphology of these cells. The organoids were incubated with retinoic acid for 48 hours, fixed in paraformaldehyde, blocked in paraffin and divided into two groups. One block was histological processed and stained with HE, for further used to descriptive analysis of morphological organoids cells from normal, Hyperplastic and adenocarcinoma tissue. In histological evaluation it was noted that both the cytology as the cytoarchitecture were maintained. For quantitative analysis of the cells into apoptosis, was used imunofluorescence technique by TUNEL, been counted 20 acinis with approximately 1600 cells, compared with organoids who did not receive the drug test. The percentage of cells in apoptosis was 2.2% lower than the organoids that was not treated with the drug test 2.8. We concluded that the establishment of three-dimensional culture of the organoids is a suitable model for prostate tissues, as well a applicable model of culture for pharmacological studies.

**WORDS -KEY:** prostate, retinoic acid, cell culture, model, organoid.

Dedico este trabalho a Rose, minha esposa e aos meus filhos Jorge Victor, Roberto Cesar e Beatriz. Meu agradecimento pela paciência, compreensão e amor que tiveram comigo, nesse dias de muito trabalho.

Ao professor Carlos Marcello Gomes da Silva in memoriam.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Radovan Borojevic. Obrigado por ter compartilhado suas idéias e sua experiência, por ter confiado a mim o desenvolvimento deste trabalho, e por ter proporcionado momentos únicos para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Dr. Vitor Antônio Fortuna co-orientador por toda a dedicação, amizade e pela orientação dos meus “primeiros passos”.

A Dra. Fabiana Paim Rosa Diretora do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, pelo apoio e entusiasmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Morfologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A CAPES, cujo apoio financeiro possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Antônio Outran Borges, Diretor da Santa Casa de Misericórdia Hospital D. Pedro de Alcântara onde foram capturadas as amostras do tecido biológico para a execução deste trabalho.

Aos meus professores, cuja importância na minha vida é indiscutível. Devo a vocês todas as minhas conquistas. Em especial, agradeço ao professor Dr. Roberto Paulo Corrêa de Araújo, cuja sabedoria e amor à Ciência e ao Desenvolvimento sempre serão exemplo. À professora Dra. Waldecy Lopes Bragança, por todo o carinho, dedicação, amizade.

Ao professor Dr. Edson Luis Camandaroba, o Prof. Antônio José de Alencar Gonçalves pelo apoio, colaboração, entusiasmo e sugestões. Ao professor Francisco de Assis Ribeiro, do Laboratório de Micromorfologia, Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela orientação e disponibilidade na realização de microfotografias.

Ao Biólogo Reinaldo Campos Alves, do Laboratório de Taxonomia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela disponibilidade na realização de microfotografias de imunofluorescência.

A toda a equipe do Laboratório Bioengenharia Tecidual e Biomateriais: Marivaldo Néri Santos, Eliane Souza, Cristóvão Vasconcelos, Cristina Vasconcelos Mota pela ajuda durante o desenvolvimento de todo este trabalho. Agradeço especialmente ao Dr. João Batista de Cerqueira, pela ajuda, amizade surpreendente, companheirismo único e alegria constante. Vocês tornaram estes anos inesquecíveis!

## LISTA DE SIGLAS

ACT -	Antiquimiotripsina
AR -	Ácido Retinóico
AR -	Receptor de Andrógeno do inglês Androgen Receptor
BSS-	Solução Salina Tamponante
CDK -	Cinase Dependente de Ciclina do inglês Cyclin Dependent Kinase
Cap-	Câncer de Próstata
CP-	Câncer de Próstata
CLT-	Linfócitos Cytotóxicos
CRABP-	Proteína Celular Ligante de Ácido Retinóico
CRALBP-	Proteína Celular Ligante de Retinol
CRBP-	Proteína Celular Ligante de Retinol
DBD-	Domínio de Ligação do DNA
DHT-	Dihidrotestosterona
DNA-	Ácido desoxiribonucléico
DRI-	Ingestão Dietética de Referência
EGF-	Fator de Crescimento Epitelial
ERA-	Equivalente de Retinol
FAP-	Fosfatase Ácida Prostática
GAGs-	Glicosaminoglicanas
HPB-	Hiperplasia Prostática Benigna
HPC-	Câncer Hereditário de Próstata do inglês Hereditary Prostate Cancer
HPLC-	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
IBGE-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUB-	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IUPAC-	União Internacional de Química Pura e Aplicada

Ilbps-	Proteínas Intercelulares Ligantes de Lipídios
kDA-	KiloDalton
LBD-	Ligand Brnding Domain
LH-	Hormônio Luteizante
NSE-	Neuron Specific Enolase
PCD-	Morte Celular Programada
PCLR-	Proteína Celular Ligante de Retinol
PCNA-	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDGF-	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PIN-	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PNAD-	Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar
PSA-	Antígeno Prostático Específico
RARs-	Receptores Nucleares para Ácido Retinóico
RBP-	Proteina Ligante de Retinol
RDA-	Ingesta Dietética Recomendada
RNA-	Ácido Ribonucléico
RxR-	Receptor de Retinoides
SHBG-	Globulina Ligante de Hormônio Sexual do inglês Sex Hormon Binding Globuline
TR-	Toque Retal
USTR-	Ultra Sonografia Transretal
ZT-	Zona de Transição

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Localização da próstata</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Divisão da próstata em zonas segundo Mc Neal</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Histologia normal da próstata</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4</b>	<b>As células da próstata</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Células neuroendócrinas</b>	<b>33</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Classificação PIN</b>	<b>38</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Neoplasia Intra - epitelial da Próstata</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Próstata – HPB</b>	<b>40</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Hiperplasia Nodular da Próstata</b>	<b>41</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Próstata com adenocarcinoma</b>	<b>44</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Diagrama com graduação pelo sistema de Gleason</b>	<b>46</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Moléculas de beta – caroteno e retinol</b>	<b>59</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Retinol e caratenóides - Digestão, absorção e transporte</b>	<b>62</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Proteína Ligante de Retinol</b>	<b>66</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Fragmentos de tecido de próstata</b>	<b>75</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Processamento do tecido de próstata</b>	<b>76</b>
<b>Figura 17</b>	<b>Processamento para cultura primária</b>	<b>76</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Morfologia do tecido prostático</b>	<b>84</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Adenocarcinoma da próstata</b>	<b>85</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Cultura aderente de células da próstata</b>	<b>87</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Cultura de organóides</b>	<b>89</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Hiperplasia em organóides</b>	<b>91</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Adenocarcinoma em organóides</b>	<b>93</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Imunofluorescência do experimento inicial com organóides</b>	<b>97</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Imunofluorescência de células totais</b>	<b>99</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Imunofluorescência de células totais e apoptose</b>	<b>100</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	CRBP – Proteína celular ligante de retinol	63
Tabela 2	Dados dos pacientes	74
Tabela 3	Percentual de células em apoptose experimento inicial	96
Tabela 4	Índice apoptose incubadas com meio de cultura e AR	98

**LISTA DE GRÁFICOS**

- Gráfico 1** Curva de proliferação e sobrevivência de cultura de células aderente de próstata humana na presença de AR 83
- Gráfico 2** Curva de proliferação de cultura aderente de tecido prostático na presença ou não de 10 $\mu$ M de ácido retinóico 94
- Gráfico 3** Comparativo entre o número de ácinos, número de células totais e número de células que se encontravam em apoptose no momento da dissociação do tecido por digestão enzimática 97

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>1.1 A Próstata</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Embriologia da próstata</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Anatomia e Fisiologia da próstata</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Histologia da próstata</b>	<b>23</b>
<b>1.5 A organização dos tecidos da próstata</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Cultura tridimensional</b>	<b>34</b>
<b>1.7 As doenças da próstata</b>	<b>36</b>
<b>1.8 Câncer de próstata</b>	<b>43</b>
<b>1.9 Biologia celular e molecular</b>	<b>47</b>
<b>1.10 Apoptose</b>	<b>48</b>
<b>1.11 Receptores</b>	<b>51</b>
<b>1.12 Caratenóides – Beta caroteno</b>	<b>54</b>
<b>1.13 Química</b>	<b>55</b>
<b>1.14 Efeitos biológicos dos caratenóides</b>	<b>56</b>
<b>1.15 Vitaminas</b>	<b>57</b>
<b>1.16 Aspectos epidemiológicos</b>	<b>68</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>72</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b>	<b>72</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>73</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>73</b>
<b>3.1 Casuística</b>	<b>73</b>
<b>3.2 Coleta do tecido</b>	<b>74</b>
<b>3.3 Processamento e digestão enzimática do tecido</b>	<b>75</b>

<b>3.4 Cultura primária aderente de células prostática humana</b>	<b>77</b>
<b>3.5 Cultura primária de organóides prostáticos humano</b>	<b>78</b>
<b>3.6 Processamento histológico</b>	<b>78</b>
<b>3.7. Imunomarcção</b>	<b>79</b>
<b>3.8 Marcação e Identificação de Células totais e em apoptose</b>	<b>79</b>
<b>3.9 Contra -coloração</b>	<b>80</b>
<b>3.10 Meio de montagem</b>	<b>80</b>
<b>3.11 Contagem das células totais e em apoptose</b>	<b>80</b>
<b>3.12 Captura de imagem</b>	<b>81</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>82</b>
<b>4.1 Morfologia de Tecido Prostático</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Cultivo aderente e morfologia de células prostáticas</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Cultivo e morfologia de organóide de tecido prostático</b>	<b>88</b>
<b>4.4 Efeito do ácido retinóico sobre a proliferação de cultura aderente De células prostáticas</b>	<b>94</b>
<b>5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De todas as doenças da próstata, o câncer é o a doença mais frequentemente diagnosticada em homens com idade acima de 50 anos e a segunda em mortalidade em várias partes do mundo.

Por crescer de forma lenta e silenciosa sem apresentar transtornos evidentes, alguns homens morrem com câncer de próstata e outros morrem de câncer de próstata.

Por não termos entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo início e progressão do câncer de próstata, alguns fatores de riscos foram estabelecidos para melhor estabelecermos estratégias no estudo e prevenção desta patologia.

Há diferenças consideráveis entre as incidências relatadas de câncer clínico de próstata nos diferentes grupos étnicos. As diferenças de incidência e mortalidade entre afro-americanos e brancos têm sido atribuídas a fatores de triagem, ambientais e biológicos. Em comparação com controles brancos, os homens negros apresentam a doença com menos idade, em grau mais elevado e estágio mais avançado e com maior atraso no diagnóstico. Esse quadro tem sido atribuído a importantes diferenças de acesso à triagem, assim como a diferenças na percepção da doença e na consciência do seu tratamento, o que representa barreiras significativas à detecção precoce entre afro-descendentes.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que asiáticos têm baixa incidência de câncer de próstata quando comparado com europeus e estes mais baixa que os africanos.

No Brasil o mais elevado índice de câncer de próstata tem sido registrado nas regiões sul e sudeste. A população desta região está fortemente marcada pela presença de imigrantes de origem européia, de pele clara, cuja dieta alimentar é rica em carnes vermelha e com alto teor de gordura.

Na Bahia, estado da região nordeste, grande parte da população é de afro-descendente, de pele escura com índices altos de câncer de próstata, cuja dieta alimentar é marcadamente influenciada pela culinária africana, que utiliza bastante o óleo de palma (azeite de dendê), sobretudo na região metropolitana e recôncavo baiano, sendo este um dos alimentos mais ricos em beta caroteno.

Em vários modelos de estudo de câncer de próstata, retinóides têm se mostrado como poderoso agente da diferenciação celular especialmente na inibição do crescimento e potencial tumorigênico em células de câncer de próstata humana.

O tratamento com carotenóides, focado na nutrição humana propriamente dita, baseia-se no seu metabolismo e fisiologia animal e humano e em seu benéfico potencial em diversas patologias. Pelo fato de serem facilmente extraídos, apresentaram grande interesse na química e biologia nos últimos séculos.

Neste estudo foi avaliado o efeito do ácido retinóico na indução de apoptose em células de organóides de próstata humana cultivadas *in vitro*, em gel de ágar, e análise de células em apoptose pelo método de TUNEL por imunofluorescência.

### 1.1 - A PRÓSTATA

A próstata é um órgão acessório do aparelho reprodutor masculino, composta por glândulas secretoras que se abrem na uretra, as quais correm ao longo de seu corpo. Contribui com uma fração importante do líquido seminal e com a capacitação e sobrevivência dos espermatozóides, contribuindo com íons, lipídios estruturais de membrana, substâncias imunossupressoras e antiinflamatórias.

A próstata é um órgão sólido, pesando cerca de 20 gramas, sendo constituída de elementos fibrosos, glandulares, musculares e linfáticos, o qual envolve a uretra masculina, entre a bexiga e o diafragma vesical (Figura 1).

### 1.2 - EMBRIOLOGIA DA PRÓSTATA

A determinação e diferença sexual dependem de uma cascata de eventos que se inicia com o estabelecimento do sexo cromossômico durante a fertilização e culmina com a maturação sexual na puberdade e subsequente fertilidade. Até a sexta semana de gestação, independente do sexo cromossômico, os embriões apresentam gônadas primordiais bipotenciais,

genitália externa indiferenciada e dois conjuntos de dutos genitais internos: os dutos de Wolff e os dutos de Muller.

O desenvolvimento e crescimento normal e patológico da próstata são dependentes de hormônios androgênicos. A esteroidogênese testicular é controlada pelo eixo hipotálamo-hipofisário. A testosterona é secretada pelas células de Leydig fetais, estimulada pela gonadotrofina coriônica humana e agindo localmente induz a diferenciação dos dutos de Wolff em epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais entre a 9ª e 13ª semana de gestação. Durante o desenvolvimento embrionário, a produção de andrógeno acontece em torno da oitava semana de gestação. Embriologicamente, a próstata origina-se do seio urogenital. A diferenciação do seio urogenital depende da presença de dihidrotestosterona.

O desenvolvimento destes brotos glandulares conduz, eventualmente, para a formação da estrutura altamente organizada do epitélio prostático. Múltiplas evaginações endodérmicas surgem da parte prostática da uretra e penetram no mesênquima que a circunda. O epitélio glandular da próstata diferencia estas células endodérmicas e o mesênquima associado se diferencia no denso estroma e no músculo liso (MOORE , 2000).

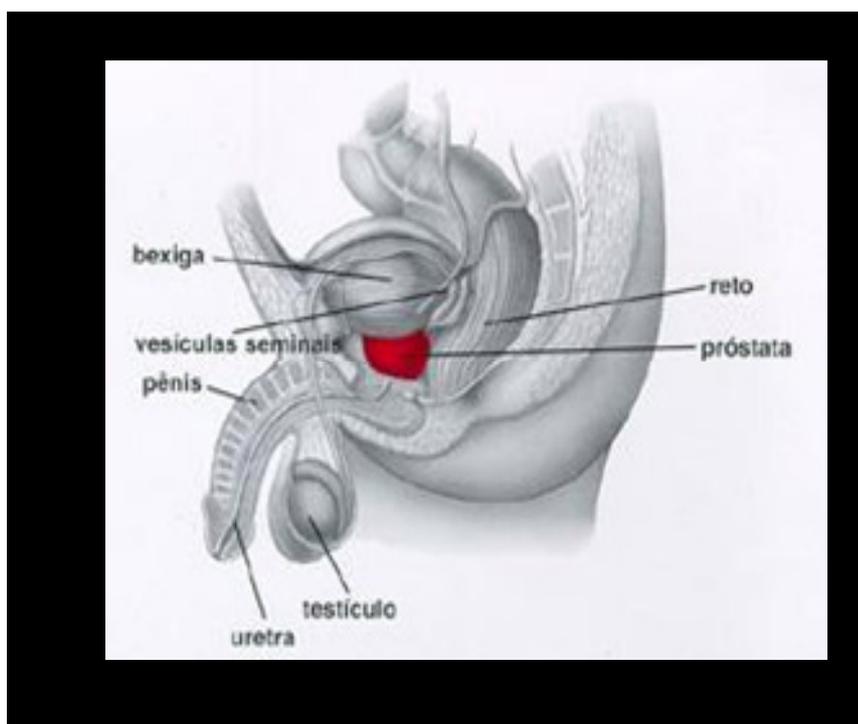
### 1. 3-ANATOMIA E FISILOGIA DA PRÓSTATA

A próstata é um órgão retroperitoneal que envolve a uretra, localizado entre a bexiga urinária e o diafragma pélvico, posterior ao osso púbico e anterior ao reto.

A substância da próstata é de cor cinza – avermelhada pálida, de grande densidade e não se rompe facilmente. Consta de substância glandular e tecido muscular.

Toda a glândula prostática está circundada por uma cápsula fibrocolagenosa da qual se estende septos para o interior da glândula dividindo-a em lobos mal definidos.

A glândula prostática se liga à sínfise púbica pelo ligamento puboprostático e é separada do reto, posteriormente, pelo septo retrovesical (ou fásia de Denovillier) o qual se une, acima pelo peritônio e abaixo, pelo diafragma urogenital. É esta área da fásia prostática que restringe a extensão posterior do carcinoma de próstata para o reto. Na extensão pósterio-superior da próstata localizam-se as vesículas seminais e os vasos deferentes, enquanto que na face anterior, encontram-se o complexo venoso dorsal. Delineadas pelos músculos levantadores do ânus estão às margens laterais da glândula, formando o sulco lateral prostático (McNEALI,1998; SALVAJOLLI et al, 1999 ;GRAY ,1979).



**Figura 1 - Imagem da localização da próstata** Em vermelho a glândula prostática. Fonte: **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA**

Por muitos anos antes e depois dos estudos de Lowsley (1912), se acreditou que a prostata humana, teria estrutura anatômica lobulada formada por 6 lóbulos contínuos e inseparáveis macro ou microscopicamente (SAMPAIO, 1992)

McNeal em 1958 estabelece quatro áreas morfológicas da próstata e define os critérios de extensão dos tumores em cada uma delas, levando-se em consideração dados do toque retal e diferenças histológicas (biópsias), a saber:

a) Zona de transição, a qual circunda a uretra prostática, ocupando cerca de 5% do órgão, apesar de ser o local preferencial da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), é também o sítio de até 20% dos tumores prostáticos.

b) Zona central, que consiste no segmento uretral que circunda os ductos ejaculatórios; constituindo 15 a 20% da glândula, com características histológicas bem peculiares. A incidência de tumores nessa região é de 5 a 10%.

c) Zona periférica, que constitui 70% do volume da próstata e é a porção palpável ao exame dígito-retal. Esta área é sítio de 70% dos carcinomas prostáticos.

d) Estroma fibromuscular anterior, o qual é constituído, primariamente por músculo e forma a superfície anterior da glândula prostática (Figura 2).

Pode-se concluir que as diferentes zonas morfológicas e as áreas de maior incidência de tumores levam à avaliação de que a maioria dos tumores benignos (HPB) se desenvolve na zona de transição, próxima à uretra, levando ao aparecimento de sintomas urinários mais precocemente, enquanto que tumores malignos são mais incidentes na zona periférica, fato que explica porque a maioria dos pacientes portadores de carcinoma prostático é assintomática, nos estágios iniciais da doença (McNEAL, 1998; SALVAJOLLI et al, 1999).

A unidade funcional da glândula prostática é o ácino glandular, formado por constituintes epiteliais (incluindo as células secretoras, epiteliais basais, macrófagos e linfócitos) e células mesenquimais. Na superfície das células epiteliais secretoras estão presentes os receptores androgênicos. Estas células são androgênio - dependente para crescer, sintetizar e secretar o Antígeno

Prostático Específico (PSA) e a Fosfatase Ácida Prostática (FAP), imersos no líquido seminal (ISAACS, 1983; OUDEN, 1994).

Sua secreção representa 20% do volume ejaculado, composto por ácido cítrico, frutose, fosforilcolina, espermina, aminoácidos livres, fosfatase ácida e antígeno prostático específico.

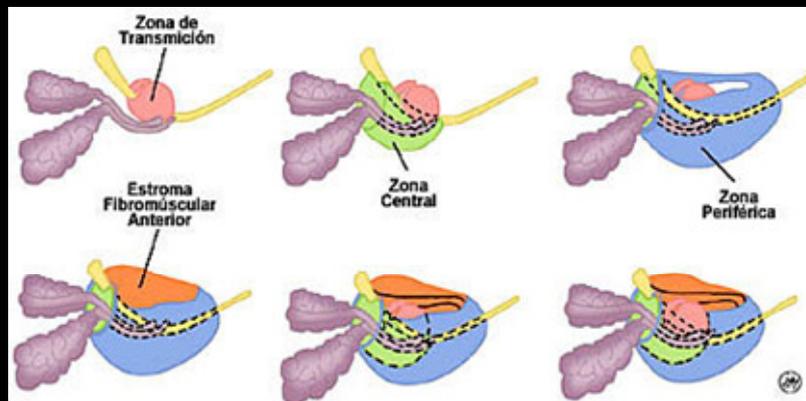
A espermina contida na secreção prostática atua na liquefação do esperma que é coagulado após a ejaculação por substâncias contidas na secreção das vesículas seminais. Além disso, o líquido prostático participa da nutrição e preservação dos espermatozóides produzidos nos testículos; assim sendo a próstata é uma glândula que faz parte do aparelho reprodutor masculino, situando-se no trato urinário inferior (Begliomini, 2005).

Os vasos sanguíneos e feixes nervosos principais que suprem a próstata se estendem ao longo da região postero-lateral da glândula pelo tecido adiposo periprostático até penetrar o órgão próximo à base da bexiga, na qual se distribuem por todo o parênquima. A divisão de McNeal mostra a próstata dividida em 4 regiões ou zonas: anterior, periférica, central e de transição. A zona periférica representa cerca de 70% do volume da próstata normal e nesta região se desenvolve cerca de 80% das neoplasias malignas da próstata. A zona de transição representa de 4 a 5% a 10% do volume da próstata normal e envolve a uretra (Sampaio, 1992). A hiperplasia prostática benigna (HPB) aparece justamente nesta região, em 70% das biopsias e, aproximadamente, 10 a 20% das neoplasias malignas da próstata podem ter origem nesta mesma região (Ro et al., 1997; Saldanha et al., 2000). Quando este processo ocorre, a zona de transição pode ocupar quase todo o volume da próstata. A zona central ocupa de 20 a 25% o volume da próstata normal, sendo o lugar de origem, de cerca de 5% das neoplasias malignas da próstata (Ro et al. 1997).

A musculatura lisa e o tecido conjuntivo somam 40% da próstata. A contração dessas células musculares é estimulada por fibras nervosas simpáticas através da noradrenalina, que estimula receptores alfa-1-adrenérgicos localizados na membrana da célula lisa promovendo aumento do influxo de cálcio e ocasionando a contração muscular.

## ZONAS DA PRÓSTATA

segundo McNeal



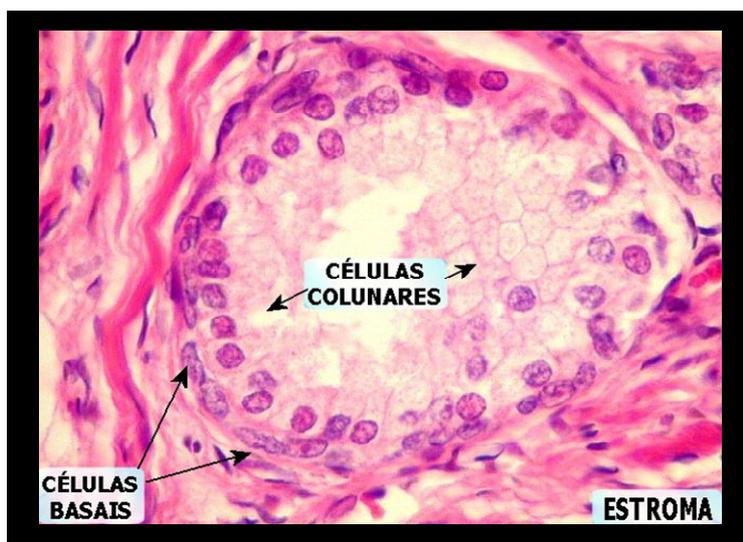
**Figura 2 - Divisão da próstata em zonas, segundo McNeal, 1958**

### 1 . 4- HISTOLOGIA DA PRÓSTATA

A próstata é um órgão glandular constituído por glândulas túbulo-alveolares imersas em estroma fibromuscular liso (CADEDDU et al., 1995).

Na zona central as glândulas são maiores, com contornos irregulares e projeções intraluminares salientes, com estroma denso, enquanto na zona periférica são vistos ácinos pequenos, redondos, e simples em meio a estroma frouxo, os ductos prostáticos podem ser revestidos por urotélio. Os ductos ejaculatórios estão localizados na zona central, próximo à uretra, e apresentam camada dupla ou pseudo-estratificada de epitélio que frequentemente exhibe núcleos aumentados e hiper cromáticos, com pigmento de lipofucsina. Os ácinos e os ductos prostáticos no adulto normal são revestidos por dupla camada; uma camada basal de epitélio cúbico achatado que, por sua vez, é

recoberta por outra camada de células cilíndricas secretantes. Todas as glândulas apresentam uma membrana basal nítida (Figura 3).



**Figura 3 - Histologia Normal da Próstata** O compartimento basal do epitélio glandular está constituído por 1 ou 2 camadas de células basais localizadas entre a membrana basal e a camada de células secretoras. O componente secretor está formado por uma camada de células colunares que se projetam para o lúmen. Fonte : **ANATPAT UNICAMP** (Disponível em <http://anatpat.inicamp.br/lamuro20.html>).

#### 1. 4.1 O TECIDO EPITELIAL:

O epitélio é um dos quatro tipos de tecidos básicos; os outros são o tecido conjuntivo, o muscular e o nervoso. Um tecido é um agregado de células que usualmente compartilham estrutura e função semelhantes. Portanto, o epitélio funciona em atividades importantes e variadas, como a proteção, a recepção sensorial, a secreção, a absorção e o transporte das moléculas bioativas.

Características comuns dos epitélios:

1. As células epiteliais se agrupam densamente.
2. Outra característica comum dos epitélios é que uma matriz extracelular é secretada na base da célula; a matriz extracelular é chamada de lâmina basal.
3. Nenhum dos epitélios contém vasos sanguíneos (KESSEL, 2001).

#### 1. 4.2 - GLÂNDULAS

As glândulas epiteliais representam uma outra forma de epitélio. As glândulas podem-se desenvolver no embrião pela proliferação localizada de células epiteliais, e as células resultantes afundam para dentro do tecido conjuntivo subjacente. As células localizadas mais profundamente no crescimento para baixo se tornam células secretoras (glandulares) enquanto as células mais superficiais se diferenciam nas células dos ductos que conduzem as secreções para a superfície do epitélio. As glândulas com sistema de ductos são chamadas exócrinas. No entanto, em alguns casos, as células dos ductos degeneram, deixando apenas aglomerados de células secretoras. Essas glândulas são chamadas endócrinas; o produto celular é liberado dentro de um extenso sistema de capilares que circundam essas células. (KESSEL, 2001).

As glândulas também são identificadas ou classificadas com base na morfologia de suas unidades secretoras. As células que compõem as unidades secretoras individuais podem ter forma tubular. Ao contrário, as células secretoras podem assumir a forma de unidades em cacho de uva ou saculares; estas unidades secretoras são chamadas de ácinos ou alvéolos.

Algumas glândulas contêm unidades secretoras que são em parte tubulares e em parte acinares ou alveolares quanto à forma. Estas glândulas são chamadas de tubuloalveolares ou tubuloacinares. (KESSEL, 2001).

#### 1. 4.3 - MEMBRANA BASAL

A membrana basal ancora as células epiteliais aos tecidos subjacentes. A adesão das células epiteliais aos tecidos de sustentação subjacentes pelos hemidesmossomos e pelos contatos focais é mediada por uma camada especializada de materiais da matriz extracelular, a membrana basal. A membrana basal contém uma forma especial de proteína matricial chamada

colágeno tipo IV, que é sintetizada pelas células epiteliais. (STEVENS & LOWE, 1997).

#### 1. 4.4 - MATRIZ EXTRACELULAR

Todos os organismos são compostos de células e uma rede complexa de macromoléculas extracelulares, denominada matriz extracelular. Esta matriz extracelular ocupa em torno de um terço ou mais do peso total do corpo. É composta por um grande número de diferentes macromoléculas secretadas localmente e montados em uma rede organizada, associada à superfície celular que os produz, ocupando os espaços que as circundam (ALBERTS et al., 1997).

Três grupos de macromoléculas associam-se fisicamente para formar a matriz extracelular: proteínas estruturais fibrosas, como os colágenos e as elastinas, um grupo distinto de glicoproteínas adesivas, incluindo fibronectina e laminina e um gel formado de cadeias de polissacarídeos da classe glicosaminoglicanas (GAGs), que são em geral encontradas ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanas (ALBERTS et al., 1997; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

#### 1. 4.5 - PROTEINAS ESTRUTURAIS FIBROSAS

As fibras de colágeno reforçam e ajudam a organizar a matriz. O colágeno é uma família de proteínas fibrosas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares. Como componente principal da pele e dos ossos, eles são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo 30% da sua massa protéica total. A característica principal de uma molécula de colágeno típica é sua estrutura longa, rígida, de fita helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias  $\alpha$ \_V ão enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda supertorcida.

##### Glicoproteínas Adesivas e Integrinas

As glicoproteínas adesivas e as integrinas são proteínas estruturalmente diversas, cuja principal propriedade é a sua capacidade de se ligar a outros componentes da matriz extracelular, ligando-os uns aos outros e estes às

células (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). A tenascina é uma proteína da matriz extracelular produzida por fibroblastos e também por células epiteliais e é expresso durante transições da embriogênese, inflamação e tumores malignos (IOACHIM et al., 2002).

A fibronectina é uma proteína adesiva multifuncional, cujo principal papel consiste em fixar as células a uma variedade de matrizes. Trata-se de uma glicoproteína (cerca de 450kDa), que consiste em duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto. A fibronectina, que está associada às superfícies celulares, às membranas e às matrizes pericelulares, é produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e outras células ( HYNES, 1992).

Tenascina e fibronectina são glicoproteínas da membrana basal que possuem funções competitivas (IOACHIM et al., 2002).

A laminina é a glicoproteína mais abundante nas membranas basais (SPRINGER, 1990; TIMPL et al., 1987). Essa família de proteínas de matriz consiste em grandes estruturas (cerca de 820 kDa ) heterotriméricas, em forma de cruz, que atravessam a lâmina basal e ligam-se, por um lado, a receptores específicos na superfície das células e, por outro a componentes da matriz como colágeno tipo IV, e o heparan-sulfato. A molécula de laminina inclui vários domínios que abrigam diferentes oligopeptídeos, motivo responsável por diversos efeitos como adesão, proliferação e migração celular (LOCHTER; BISSELI, 1995).

#### 1. 4.6 - CÉLULAS DO TECIDO CONJUNTIVO

As células do tecido conjuntivo são as seguintes: fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos (glóbulos brancos). Algumas células do tecido conjuntivo se originam localmente, enquanto outras, como os leucócitos, vêm de outros locais e são habitantes temporários desse tecido. As células do conjuntivo têm a capacidade de se multiplicar para regenerar o tecido destruído, pois esse tipo de tecido é dotado de grande capacidade de regeneração, e cicatrização (STITES; TERR;2000).

#### 1. 4.7 - FIBROBLASTO

Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas e elásticas, as glicoproteínas e as proteoglicanas da matriz extracelular. A célula mais ativa é geralmente denominada de fibroblasto, enquanto a quiescente é conhecida como fibrócito (MINOR, 1988).

O fibroblasto tem prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é claro, grande, de forma ovóide, com cromatina fina e nucléolo evidente. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi é desenvolvido. O fibrócito é uma célula menor, fusiforme, e com menor número de prolongamentos do que o fibroblasto. Tem núcleo menor, alongado e mais escuro, apresentando citoplasma acidófilo. Diante de um estímulo como a cicatrização, o fibrócito pode voltar a sintetizar fibras, reassumindo a estrutura de fibroblasto (HEATHCOTE; GRANT, 1981).

Há uma célula que tem características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa, é o miofibroblasto. Este participa do fechamento dos ferimentos, pela contração da cicatriz formada. Essa célula tem a morfologia de um fibroblasto, mas contém maior quantidade de actina (microfilamentos) e de miosina. No tecido conjuntivo de adulto os fibroblastos não se dividem com freqüência, entrando em mitose apenas quando ocorre uma solicitação, como por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo (STITES; TERR, 1992;).

### 1. 5 - A ORGANIZAÇÃO DOS TECIDOS DA PRÓSTATA

A histologia da próstata humana se organiza em dois tecidos distintos: o tecido glandular imerso em outro fibromuscular ou estroma. (CADEDDU et al., 1995).

#### 1. 5.1 - ESTROMA

No estroma encontramos principalmente dois tipos celulares, os miofibroblastos (positivos para vimentina e actina) e as células musculares lisas (positivas para miosina e desmina) com atividades contráteis habituais.

O estroma contribui com 45 a 54% do peso da próstata, conforme a região anatômica da glândula.

A matriz protéica é a parte especializada do estroma prostático, funciona como um esqueleto que posiciona e organiza as células locais mantendo sua polaridade e permitindo a interação entre as mesmas. (SROUGI,1995).

### 1. 5.2 - TECIDO GLANDULAR

O tecido glandular da próstata é formado por uma camada de células basais, células secretoras ou luminal e células neuroendócrinas.

#### 1. 5.2.1 - CÉLULAS BASAIS

As células basais formam uma ou duas camadas de células localizadas entre a membrana basal e a camada de células secretoras. Desde 1994 que uma lista de genes que se expressam na camada de células basais de tecido normal de próstata tem sido publicada. Mais recentemente cientistas trabalhando com células purificadas por digestão enzimática de tecidos identificaram genes expressos nestas células (WANG, 2001).

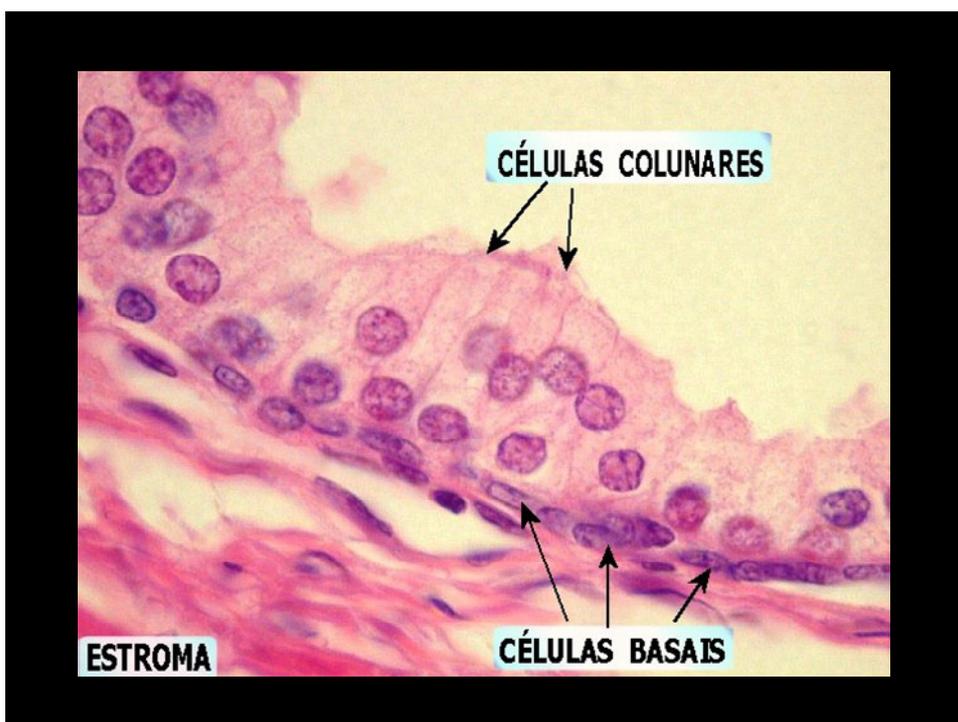
Os trabalhos com cultura primária de células epiteliais derivadas de tecido normal da próstata são consistentes com o fenótipo de células basais: habilidade proliferativa, expressão de citoqueratinas 1, 5, 10, 11 e 14 e expressão de genes associados como ck1, ck5, ck10, ck11 e ck14.

De acordo com TRAN et al (2002), a célula basal expressa o gene P63 e o gene anti-apoptótico bcl-2 e raramente expressam AR ou PSA (Figura 4).

#### 1. 5.2.2 - CÉLULAS SECRETORAS OU LUMINAL

O componente secretor é formado por uma camada de células colunares que se projeta para o lume glandular e sua morfologia depende da zona prostática. Estas células expressam citoqueratinas 8, 18 e 19.

As células luminiais ou secretoras da próstata expressam andrógeno receptor (AR) e antígeno específico da próstata (PSA). É andrógeno dependente (Figura 4).



**Figura 4 - As células da próstata normal** O compartimento basal do epitélio glandular está constituído por 1 ou 2 camadas de células basais localizadas entre a membrana basal e a camada de células secretoras. O componente secretor está formado por uma camada de células colunares que se projetam para o lumen. Fonte: **ANATPAT UNICAMP** (Disponível em <http://anatpat.unicamp.br/lamuro20.html>).

#### 1. 5.2.3 - Antígeno Prostático Específico - PSA

O antígeno Prostático Específico (PSA) foi descoberto por Hara e colaboradores em 1917, os quais denominaram esta proteína plasmática seminal inicialmente de gama-semiproteína. Foi isolado e, purificado a partir de tecido prostático por WANG et al. (1979) e incorporado como prova diagnóstica a partir de 1984. O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples, com 237 aminoácidos e peso molecular em torno de 30 kDa.

Este antígeno é secretado no sistema de ductos prostáticos e sua função é a liquefação do fluido seminal no momento da ejaculação.

A molécula do PSA transporta um N – oligossacarídeo simples que compreende cerca de 8% de massa molecular e é uma serinaprotease da família da calicreína. A calicreína humana 2 (human kallikrein 2 – hK2) é uma proteína que apresenta homologia de cerca de 80% ao PSA. Sua expressão aumenta exponencialmente desde o epitélio prostático benigno até o câncer de próstata e as metástases linfonodais. É encontrada em tecidos prostáticos normais, hiperplásicos e cancerosos, e em baixas concentrações nas glândulas periuretrais, no endométrio e glândulas mamárias, fato que levou muitos autores inicialmente a questionar sua especificidade (ARMBRUSTER, 1933, WANG et al.,1981;FRANCO,2000; BOCCON-GIBOD, 2001).

Estudos realizados por Catalona et al., em 1977 foram de grande importância para elucidar a questão cinética do PSA. Eles descreveram que o PSA se encontra na circulação sanguínea sob três formas: a primeira ou PSA livre e a segunda forma complexa ou PSA conjugada à alfa-1 antiqumiotripsina (ACT) e a terceira PSA conjugado à alfa-2-macroglobulina. A proporção do PSA conjugado à alfa- 1-antiquimiotripsina é maior nos pacientes com câncer do que nos pacientes com hiperplasia prostática benigna.(CATALONA et al.,1997).

O teste do PSA no sangue tem contribuído grandemente para a detecção precoce do câncer de próstata, sendo incluído como componente de rotina nos algoritmos de diagnóstico, juntamente com o toque retal (TR) e a Ultra-Sonografia Transretal (USTR) (GLEAVE et al, 2000; CRITZ, 2000 ).

#### 1. 5.2.4 - VALORES DO PSA

Nos homens que não sofrem de nenhuma doença prostática a concentração sérica deste antígeno é extremamente baixa. Recentemente foi demonstrado que o nível sérico nesse tipo de paciente é de 0,07 +/- 0,4 ng/ml.

Os níveis de PSA constatados por faixa etária tem sido os seguintes:

40 - 49 anos 2,5

50 - 59 anos 2,5 a 3,5

60 - 69 anos 3,5 a 4,5

70 - 79 anos 4,5 a 6,5ng/ml.

O ponto de corte do PSA mais utilizado é o de 4,0ng/ml

O metabolismo do PSA permanece em grande parte desconhecido, embora estudos recentes sugiram que o mesmo se processa no fígado (AGHA et al., 1996).

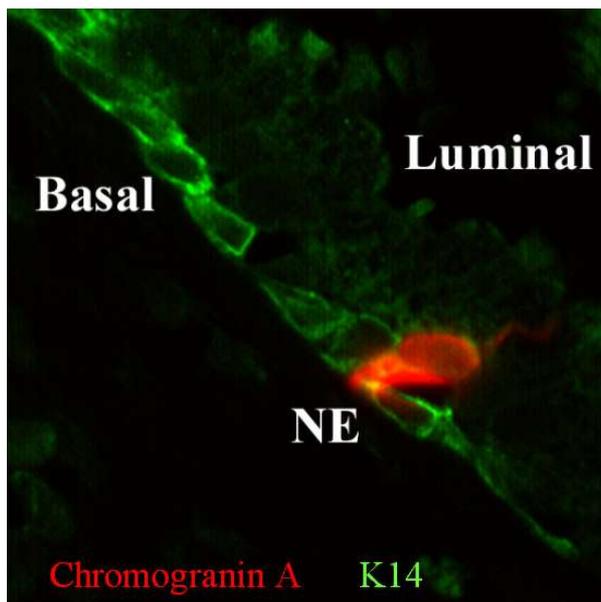
#### 1. 5.2.5 - AS CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

O outro tipo celular encontrado nas glândulas prostáticas, em proporções variáveis, especialmente nas condições patológicas, é a célula neuroendócrina, que é responsável pela produção de grandes quantidades de serotonina e, em menor quantidade de hormônio tireotrófico, calcitonina e somatostatina.

Em todas as zonas da próstata, o epitélio glandular contém uma pequena população de células neuroendócrinas que se localizam sobre a camada de célula basal, disposta de modo aleatório entre as células secretoras. Normalmente não chegam ao lumem glandular.

As células neuroendócrinas constituem uma pequena parcela do epitélio normal da próstata (BANKHOFF, 1998). A biologia das células neuroendócrinas na próstata não é clara mais se tem teorizado que a citoqueratina secretada por estas células influenciam o crescimento ou diferenciação das células epiteliais (ABRAHANSSON ,1999).

As células neuroendócrinas estão dispersas no compartimento basal e são especializadas na produção de cromagramim e outros neuropeptídeos como NSE (neuron specific enolase) (PEEHL, 2001) (Figura 5).



**Figura 5 - Célula neuroendócrina** Célula neuroendócrina dispersa entre as células da camada basal, que se projeta para o lumem da porção glandular. Imunofluorescência ( Hudson ,2000).

Células intermediárias ou de amplificação.

Um pequeno número de células é referido como “transit amplifying cells” ou “intermediate cells” ou células de amplificação. Estas células proliferativas podem originar tanto células basais e secretoras e ou celas neuroendócrinas. Tem sido proposto que estas células são “stem cells” ou células progenitoras.

Stem cells

Tanto câncer de próstata quanto hiperplasia prostática benigna surge como resultado de mudanças no equilíbrio entre proliferação e diferenciação (BONKHOFF et al. 1994; ISAACS et al., 1980).

Descobrir o que controla o processo de diferenciação é vital para a compreensão do desenvolvimento das doenças da próstata.

“Stem cells” na próstata não tem uma identificação definitiva em tecido ou em cultura. Um estudo recente mostrou evidência que “stem cells” em próstata de rato estão localizadas proximal (TSUJIMURA et al., 2002), mas na próstata humana é desconhecido. (PEEHL, 2005).

## 1.6 - CULTURA TRIDIMENSIONAL

Houve avanços significativos em estudos recentes dentro da nossa habilidade para cultivar células de próstata e estudar o stem cell da biologia da próstata humana. Para isto foi mostrado que aproximadamente 2–3% de células epiteliais basais têm características de célula tronco (HUDSON ,2004). Dadas as condições apropriadas, a maior parte das células vegetais e animais podem viver, multiplicar-se e até mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos.

A cultura de tecidos começou em 1907 com um experimento designada para resolver uma controvérsia em neurobiologia. Os experimentos originais envolveram a cultura de pequenos fragmentos de tecidos denominados explants.

Culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, são chamadas de cultura primária.

Nos últimos anos, houve um crescente interesse em pesquisas das causas das doenças da próstata. Vários modelos foram testados e recentemente nos levaram ao desenvolvimento de sistema de cultura de células. Muito embora o uso de animais tenha conduzido a alguns modelos úteis, eles não são ideais para o estudo das doenças humanas. A próstata humana difere consideravelmente da próstata de outros animais, desde o desenvolvimento embrionário, anatomia no adulto e etiologia das doenças. Entre os animais, o rato tem sido o animal mais extensamente utilizado como modelo para estudar o desenvolvimento normal da próstata, fisiologia, iniciação hormonal e promoção do câncer.

As principais características deste modelo de estudo são: a capacidade para a biotransformação isto é a definição das propriedades biológicas das células epiteliais da próstata, as funções tecido específico e as mudanças das células da próstata no desenvolvimento do câncer e outras doenças proliferativas.

A cultura de células consiste na desagregação do tecido que se pretende estudar por meio de substâncias químicas, e atividades mecânicas, mantendo nas células que o constituem, as propriedades biológicas por um

período de tempo, que são mantidas por meio de nutrientes essenciais, para que possam crescer e proliferar.

Cultura de células tridimensionais (3D) foram extensamente usadas em pesquisas biomédicas desde as primeiras décadas deste século. A principal vantagem da cultura de células em 3D é a geometria bem definida delas, que torna possível relacionar a estrutura diretamente à função e que habilita análises por exemplo de campos de difusão.

Um dos principais problemas na investigação das desordens prostáticas é a falta de modelos estabelecidos e que possam ser manipulados facilmente.

As culturas em monocamadas representam um modelo valioso para estudar os processos moleculares dos tecidos organizados. Entretanto, tais culturas de monocamadas têm na confluência, uma circunstância não observada "in vivo". Assim, o crescimento e a atividade das células em monocamadas diferem consideravelmente da situação "in vivo" (WEBER et al, 1986). Os sistemas tridimensionais de cultura foram desenvolvidos para imitar as interações entre células. A matriz extra celular em tais sistemas pode ser mais similar a situação in vivo do que na cultura de monocamada. Um modelo ideal seria aquele que pudesse exibir a função secretora normal da glândula e responder as mudanças no status hormonal. Um modelo deve também permitir a interação entre elementos epiteliais e estromal por causa de sua grande importância na definição e regulamentação da arquitetura e da função do tecido (HAFFEN et al., 1987).

O problema principal com os modelos "in vivo", baseados em animais de laboratórios, é que suas estruturas e função prostática não são réplicas exatas da situação humana. Isto é especialmente verdadeiro com respeito aos testes padrões da doença encontrados em outras próstatas de mamíferos. Assim, os resultados obtidos com sistemas de modelos animais, não são necessariamente aplicáveis às doenças prostáticas humanas tais como hiperplasia prostática benigna (BPH) e o carcinoma da próstata (COFFEY e ISAACS, 1980). Utilizando-se a desagregação de tecidos humanos no sistema de cultura tri-dimensional, após alguns dias de cultivo sua morfologia assemelha-se aquelas células observadas em seções de tecido.

Denominamos de cultura histotípica ou de organóides, a cultura em que o tecido é dissociado por digestão enzimática e ação mecânica, em que as

células são ressociadas de modo que venha a formar uma estrutura tridimensional cuja capacidade biológica tenha comportamento semelhante ao tecido original. A cultura de organóides tem uma vasta gama de aplicações, que vai desde estudos imunológicos, migração celular, adesão celular além de aplicações que se mostram com maior interesse no desenvolvimento deste trabalho, tais como: proliferação celular, resposta celular in vivo, e estudo de sensibilidade a drogas.

A cultura de células histótípicas ou organóides é uma atividade que apresenta alto grau de dificuldade, e requer muitos cuidados, que vão desde a aquisição de material, transporte e manipulação em meio estéril para que as células possam se manter viável. Para a manutenção da viabilidade de cultura de organóides são necessários inicialmente meio de cultura apropriado e suplementado com soro fetal bovino, nutrientes, tais como aminoácidos essenciais, fatores de crescimento, antibióticos, atmosfera adequada com níveis de umidade e índice de CO<sub>2</sub> além de uma superfície de adesão (HUDSON, 2004).

As vantagens principais de culturas primárias são:

1-Capacidade para bio-transformação.

2-Função tecido-específica

Limitações:

A necessidade para isolar células para cada nova experiência.

Procedimentos para isolar células requerem o rompimento do tecido, frequentemente com enzimas proteolíticas. Isto pode resultar em danos para a integridade da membrana e perda de produtos celulares.

## 1. 7 - AS DOENÇAS DA PRÓSTATA.

As doenças prostáticas acompanham proporcionalmente a senescência,

ou seja, quanto mais idoso for o indivíduo, maior será a sua chance de ter afecção dessa glândula.

As principais doenças da próstata são as seguintes relacionadas: infarto prostático, prostatites, hiperplasia prostática benigna, neoplasia intraepitelial prostática -PIN e adenocarcinoma da próstata.

### 1. 7.1 - O INFARTO PROSTÁTICO E OUTRAS DOENÇAS

O Infarto prostático é um fenômeno comum associado à retenção urinária aguda.

A prostatite divide-se em três categorias: prostatite bacteriana aguda e crônica, e prostatite abacteriana crônica. A diferença entre essas entidades baseia-se em culturas bacterianas quantitativas e exames microscópicos de amostras urinárias fracionadas e secreções prostáticas expressas.

A prostatite bacteriana aguda consiste em uma inflamação supurativa focal ou difusa na substância prostática. A maioria dos casos é causada por diversas cepas de *E.Coli*, outros bastonetes Gran-negativos, enterococos e estafilococos. Clinicamente, a prostatite bacteriana está associada a febre, calafrios e disúria. Ao exame retal, a próstata é extremamente dolorosa.

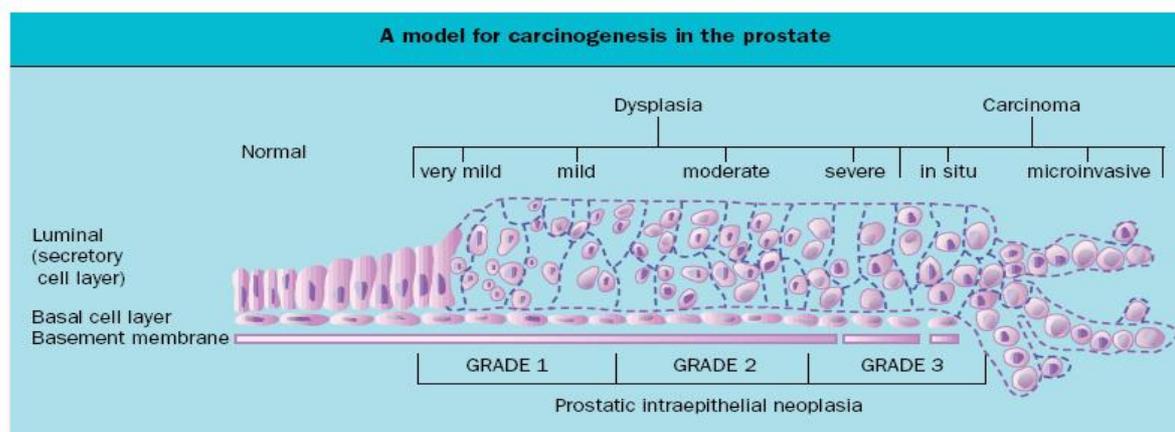
A prostatite bacteriana crônica é difícil de diagnosticar e tratar. Pode apresentar-se como lombalgia, disúria e desconforto perineal e suprapúbico.

A prostatite abacteriana crônica é a forma mais comum de prostatite observada atualmente. Clinicamente é indistinguível da prostatite bacteriana crônica. Entretanto não há história de infecção do trato urinário recorrente (STANLEY 2000).

### 1. 7.2 - NEOPLASIA INTRA EPITELIAL DA PRÓSTATA - PIN

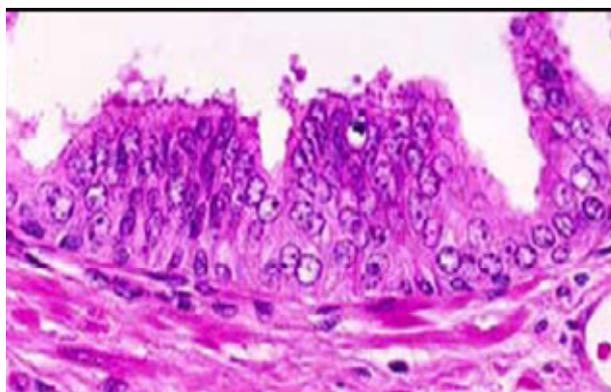
É considerada lesão pré-cancerosa. Como lesão precursora do adenocarcinoma da próstata, foi descrita por Bostwick e Brawer em 1987. O diagnóstico é baseado no desarranjo e proliferação das células epiteliais secretoras que mostram atipias caracterizadas por nucleomegalia e nucléolos evidentes (Figura 6). Não há desarranjo arquitetural acinar e as células basais estão presentes (Figura 7). Em reunião de consenso realizada em 1989, estabeleceu-se que as lesões anteriormente classificadas como PIN graus 2 e 3 seriam chamadas PIN de alto grau, recomendando-se não relatar PIN grau 1

ou baixo grau por não representar um valor prognóstico significativo (SCALETSECKY,2003).



2.19 Model for PIN – carcinogenesis in the prostate. (Reproduced with permission from Bostwick and Brawer<sup>22</sup>.)

**Figura 6** - Modelo para Neoplasia Intra Epitelial Prostática proposto por Bostwick and Brown.1995



**Figura 7 -- Neoplasia intraepitelial prostática (PIN),**  
 Notar nucleomegalia, nucléolos evidentes e presença de células basais. Fonte:  
[www.Portaldeginecologia.com.br/pdf/marcadoresprostata.pdf](http://www.Portaldeginecologia.com.br/pdf/marcadoresprostata.pdf)

### 1. 7.3 - A HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é a doença mais prevalente da

próstata com aproximadamente 50% dos homens apresentando evidências histológicas de HPB aos 50 anos e 90% aos 80 anos de idade. (LEE et.al 1995).

A HPB é considerada uma doença progressiva definida como o crescimento contínuo da próstata levando a intensificação de sintomas e ao aumento de risco de complicações ao longo do tempo, como a retenção urinária aguda e cirurgia devido a HPB. (SALDANHA, 2000).

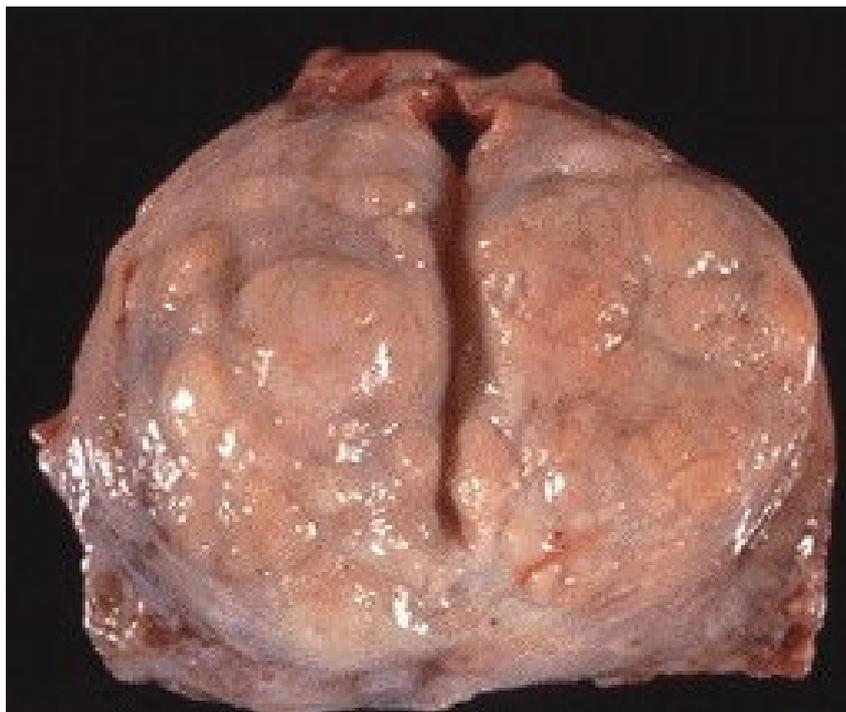
A HPB é de arranjo nodular com participação dos componentes epitelial, fibromuscular e estromal, sem envolvimento de fibras elásticas.

A HPB se instala pelo crescimento tissular desses elementos histológicos que causam profundas modificações na estrutura organizacional da próstata (PRICE et al., 1990). Essas modificações resultam no surgimento de nódulos hiperplásicos que em 70% dos casos, ocorre na zona de transição (lobo mediano) e acabam atingindo as demais regiões periuretrais (McNEAL et al,1997). A proliferação localizada do estroma fibromuscular e aceita como o primeiro passo no desenvolvimento da HPB (PRADHAN & CHANDRA, 1975), isso inclui alterações importantes nos fibroblastos dos capilares (BIERHOFF et al., 1997), do estroma fibromuscular (CHAGAS et al. 2002), e da composição dos glicosaminoglicanos (CARDOSO et al., 2000).

Em adultos jovens a zona periférica representa 70% da glândula, a zona central 25%, a zona de transição 4 a 5% e o estroma 1%, que não contém tecido glandular.

A HPB histológica inicia-se antes dos 30 anos. Apresenta velocidade de crescimento aumentada nas décadas subseqüente e menor após os 70 anos. Em homens de 31 a 50 anos, o seu peso poderá ser dobrado a cada 4,5 anos e de 51 a 70 anos, a cada dez anos (Figura 8).

A HPB em sua evolução pode apresentar-se didaticamente em três estados a saber: histológico, clínico assintomático, clínico sintomático demandando tratamento medicamentoso ou cirúrgico.



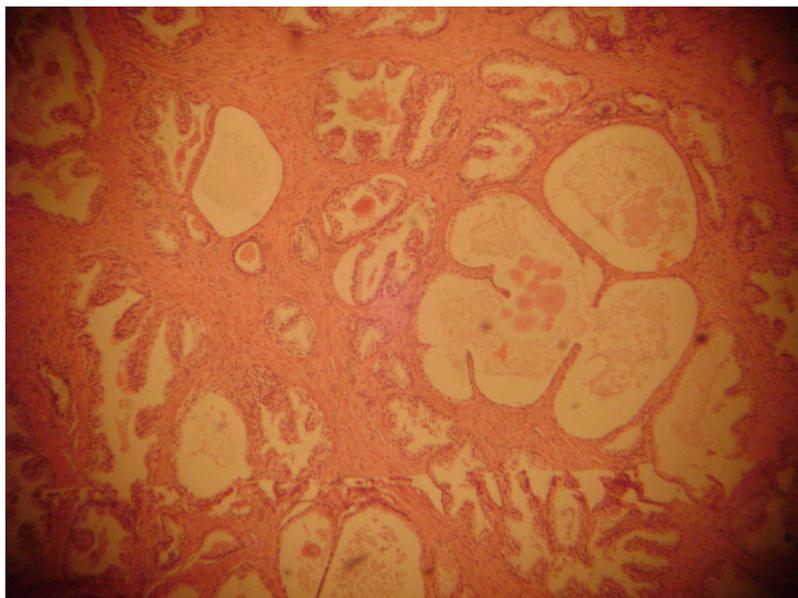
**Figura 8** - HPB, os nódulos se formam na região periuretral da próstata. Os nódulos grandes podem comprimir a uretra prostática levando à obstrução urinária.

Fonte: [http://cc05-](http://cc05-11med.up.pt/biopatologia/práticas/Patologia.Próstata.Bexiga.pdf)

[11med.up.pt/biopatologia/práticas/Patologia.Próstata.Bexiga.pdf](http://cc05-11med.up.pt/biopatologia/práticas/Patologia.Próstata.Bexiga.pdf)

A HPB se faz mais intensamente no estroma, podendo atingir uma proporção estroma /glândula de 5/1. Disso conclui-se que o crescimento prostático nem sempre se acompanha de manifestações clínicas. Estas ocorrem em cerca de um terço dos pacientes com HPB histológica (SAGNIER,1994).

Até a sexta e sétima década, existe um aumento da zona de transição e proliferação quantitativa de nódulos de hiperplasia que são pequenos. Após esse período há crescimento volumétrico à custa desses nódulos que habitualmente é denominada de HPB (SALDANHA,2000).



**Figura 9 - Hiperplasia Nodular da Próstata.** Nódulo prostático constituído por glândulas e estroma prostático, com glândulas cisticamente dilatadas (Coloração por HE, 200 X ).

Além da hiperplasia prostática benigna, existem outras lesões proliferativas da próstata tais como hiperplasia nodular da próstata,(Figura 9), atrofia da próstata, hiperplasia de células basais, hiperplasia cribiforme de células claras, hiperplasia adenomatosa atípica, proliferação atípica de pequenos ácinos, hiperplasia de células claras, adenose esclerosante, hiperplasia estromal atípica (SALDANHA , 2000).

#### 1.7.4 – PATOGENIA

O crescimento e desenvolvimento da próstata ocorrem sob a influência de testosterona e dihidrotestosterona (DTH). A enzima 5 $\alpha$  redutase é a responsável pela conversão intracelular da testosterona em DTH. Duas formas dessa enzima já foram identificadas. A 5 $\alpha$  redutase tipo 1 encontrada na maioria dos tecidos e 5 $\alpha$  redutase tipo 2, codificada pelo gene SRD5A2, com localização no cromossomo 2P23, predomina nos tecidos genitais, como a próstata (LABRIE,1992). Acredita-se que a DTH possa estimular receptores androgênicos celulares, resultando na liberação de fatores de crescimento que por sua vez, promoveriam a hiperplasia estromal e epitelial. No crescimento

prostático também ocorre a apoptose celular, mecanismo necessário para a manutenção do equilíbrio glandular normal.

Outros estudos revelaram que alterações também ocorrem na composição do estroma. Existem evidências, por exemplo, de que a densidade de células de músculo liso está alterada no estroma hiperplásico, e que esse parâmetro pode ser usado para o acompanhamento da resposta farmacológica a medicamentos. As células de músculo liso podem também estar substituídas por fibroblastos, o que provavelmente ocorre como reação a zonas de isquemia.

O estroma da próstata inclui diversos componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibras elásticas, e proteoglicanos. A identificação desses últimos no tecido prostático foi feita por meio de imunohistoquímica em microscopia óptica ou pela detecção de seqüências gênicas e estudos recentes têm mostrado que os proteoglicanos e suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG) desempenham um papel importante na patologia da próstata, principalmente no câncer. (CARDOSO et al ;2000).

#### 1.7.5 - PATOLOGIA

Durante o desenvolvimento da HPB pode ocorrer proliferação predominantemente glandular ou estromal, que dão à glândula respectivamente, menor ou maior consistência.

A partir da quarta década, formam-se nódulos estromais na zona de transição (ZT) que aumentam de volume com o avançar da idade, ocasionando a HPB.

##### 1.7.5.1 - FATORES DE RISCO

###### 1.7.5.1 – IDADE

A etiologia da HPB é pouco conhecida e não costuma manifestar-se clinicamente antes dos 45 anos

A idade avançada e os “testículos funcionantes” do ponto de vista hormonal são os fatores mais importantes para o desenvolvimento da HPB.

###### 1.7.5.2 - HEREDITARIEDADE

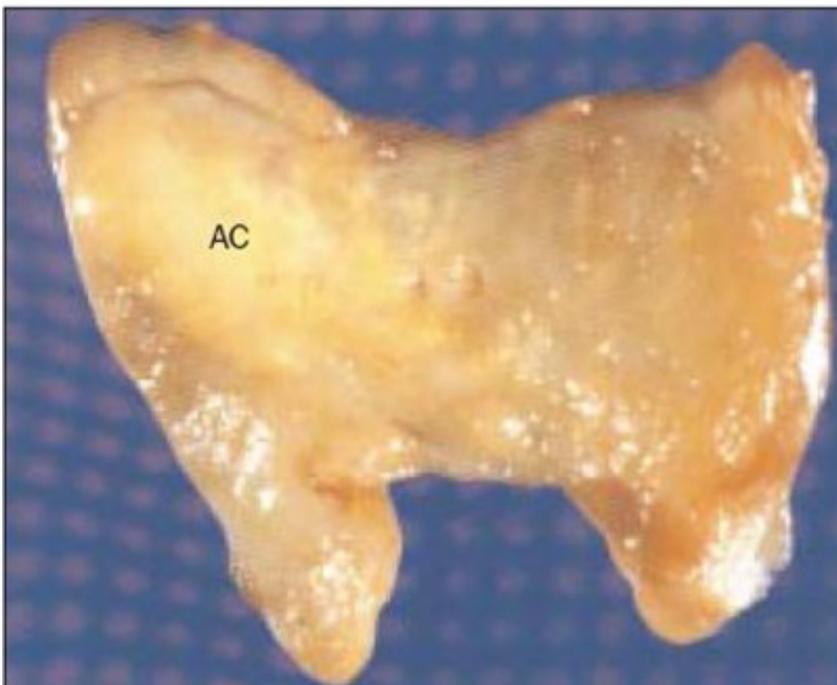
Há também influência hereditária, pois filhos de pacientes com HPB terão maiores chances de desenvolverem a doença (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA).

### 1.7.5.3 - COMPLICAÇÕES

Entre as complicações maiores da HPB têm-se: Infecções urinárias de repetição, litíase vesical, hematúria macroscópica, retenção urinária aguda, comprometimento do trato urinário inferior, predispondo a insuficiência renal pós-renal. Tais achados são indicações para o tratamento cirúrgico (SROUGI, 1995).

## 1.8 - CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata normalmente se inicia como uma lesão pequena e bem diferenciada. Alguns carcinomas se mantêm assim, enquanto outros aumentam de tamanho e produzem lesões moderadamente diferenciadas. As características do carcinoma invasivo são: desagregação progressiva da camada de células basais, núcleos e nucléolos anormais, aumento da proliferação com variação no conteúdo do DNA e perda aléica. A anormalidade fundamental resultante no desenvolvimento do câncer é a contínua proliferação desregrada das células cancerosas (Figura 10). Em vez de responderem apropriadamente aos sinais que controlam o comportamento celular normal, as células cancerosas crescem, dividem-se de maneira descontrolada, invadindo os tecidos normais e órgãos e, por fim, espalham-se através do corpo. (COOPER, 2001).



**Próstata com Adenocarcinoma**

**Ac = Adenocarcinoma.**

**Reproduzido de Weiss MA, Mills SE. Atlas of Genitourinary Tract Disorders Gower, 1988.**

### **Figura 10 - Próstata com Adenocarcinoma.**

#### **1. 8.1 - SINTOMAS**

O Câncer de Próstata, na maioria das vezes, não tem sintomas em seu estágio inicial, no entanto, em estágios mais avançados poderá apresentar os seguintes sintomas:

- obstrução urinária: obstrução da uretra prostática por compressão tumoral, dificultando (fluxo urinário lento) ou impedindo a micção;
- dor urinária
- dor na ejaculação;
- aumento do volume prostático;
- anemia, indisposição, perda de peso, inapetência: causadas por substâncias químicas produzidas pelas células malignas. A anemia se deve principalmente à invasão da medula óssea, que é o sítio responsável pela elaboração das células sanguíneas;

- dores ósseas: de forte intensidade e difícil controle com analgésicos comuns. Estas dores se localizam normalmente na coluna vertebral (parte de baixo das costas), área pélvica ou superior às coxas;
- fraturas patológicas: (fraturas ósseas desencadeadas por traumas pouco intensos em virtude da fragilidade e desmineralização provocadas pelas metástases) são comuns. Também poderá haver fratura espontânea do fêmur;
- perda de força muscular e paraplegia: em fase muito avançadas da doença, as metástases ósseas da coluna podem causar compressão da medula espinal e culminar com a perda de força muscular e, finalmente, paraplegia;
- insuficiência renal obstrutiva: obstrução progressiva da drenagem da urina dos ureteres para a bexiga, causando acúmulos de substâncias tóxicas ao organismo não eliminadas;(INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER –INCA).

### 1.8.2 – PATOLOGIA

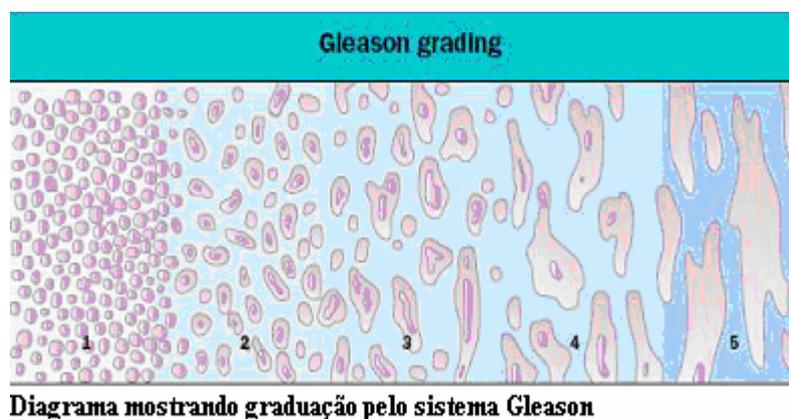
Cêrca de 95% dos cânceres prostáticos são representados pelo adenocarcinoma, e no restante têm-se sarcomas, carcinoma epidermóide e carcinoma de células transicionais. Os adenocarcinomas localizam-se na zona periférica (ZP) em 75% dos casos, 25% na zona transicional e menos de 5% na zona central.

O comportamento biológico do tumor e a sobrevida do paciente estão relacionados ao grau histológico do adenocarcinoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER –INCA).

#### 1. 8.2.1 - GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

A maior parte das classificações se baseia na aparência e no arranjo glandular e /ou no grau de anaplasia das células malignas. O sistema Mastofi leva em conta a diferenciação glandular e a anaplasia (atipia) nuclear, e o tecido neoplásico poderá ser graus 1, 2, ou 3. O sistema Böcking tem ampla aceitação na Alemanha e associa diferenciação glandular com anaplasia nuclear. A contagem final é a soma dos graus histológicos (diferenciação glandular) e citológico (anaplasia nuclear), podendo ser de 2 a 7. A graduação

de Gleason é uma das classificações mais em voga e leva em consideração apenas o grau de diferenciação glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Não há consideração para a anaplasia celular. Em decorrência de haver mais de um padrão num mesmo tumor, o grau predominante na área neoplásica é denominado grau primário, e o padrão menos representativo, grau secundário. Há cinco graus representativos, sendo o grau 1 representado pelas lesões mais diferenciadas e o grau 5 pelo mais indiferenciado. O diagnóstico é dado pela soma dos graus primário e secundário. A escala varia de 2 ( 1+1 ) a 10 (5+5) (Figura 11). Quanto maior o grau, mais indiferenciado é o tumor e pior o prognóstico. A classificação de Gleason apresenta boa correlação clínica entre a graduação e a evolução da neoplasia. ( HUMPHEY, 2004).



**Figura 11 - Diagrama graduação pelo sistema Gleason**

#### 1. 8.2.2 - A DOENÇA LOCALMENTE AVANÇADA

A neoplasia atinge, por continuidade, a porção prostática da uretra, trígono vesical que poderá ocasionar hidronefrose, bem como as vesículas seminais.

#### 1. 8.2.3 – DISSEMINAÇÃO - METÁSTASE

O câncer de próstata dissemina-se por via hematogênica e linfática. Nas metástases hematogênicas, as metástases ósseas estão presentes em 85% dos pacientes que morrem de CP. Os locais mais comuns é a coluna lombar, e a torácica (74%), as costelas (70%), a pelvis (60%), o fêmur (40%) e os membros (41%). Dentre os órgãos mais atingidos têm-se pulmão, fígado e

glândulas supra-renais. As metástases pulmonares podem ocorrer em até 38% dos pacientes que morrem devido à neoplasia.

A via linfática é o principal meio de disseminação inicial dos carcinomas, sendo atingidos os linfonodos obturador, hipogástricos, pré-sacrais e para-aórticos (BOGLIOLO, 2000).

Outra característica do carcinoma é o aumento dos níveis de colagenase IV, uma enzima proteolítica que digere as fibras de colágeno do estroma durante o processo de invasão.

## 1. 9 - BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

### 1. 9.1 - O CICLO CELULAR

O ciclo celular é definido como a alternância de mitose e intérfase e é composto por duas fases funcionais (fase S ou síntese e fase M ou mitose) e duas fases preparatórias (G1 e G2) (BRENTANI et al., 1998; COTRAN; et al; 1999).

O maior tempo da vida de uma célula é na intérfase, que corresponde a 90% do tempo total do ciclo celular. Esta tem início imediatamente após a mitose, quando a célula entra numa fase em que não há síntese de DNA. Essa fase inicial chama-se G1 e nela ocorre síntese de RNA e proteínas. A seguir inicia a duplicação do DNA, correspondente a fase S, na qual cada cromossomo se duplica, ficando com duas cromátides. A etapa seguinte é a fase G2, que consiste na preparação celular para a mitose. Esta fase tem término com o início da mitose. A mitose, por sua vez, é dividida em seis fases, que iniciam com a condensação dos cromossomos e terminam com a descondensação destes com subsequente origem de duas células-filhas. Academicamente, a seqüência de eventos na mitose é dividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (BRENTANI et al., 1998; COTRAN et al; 1999). Por outro lado, a célula que não irá se duplicar entra na fase intitulada G0.

Um fator crucial dos complexos eventos bioquímicos da célula diz respeito ao fato de a maior variação de tempo no ciclo celular ser em G1, porque nesta fase existe um ponto específico denominado ponto de restrição. A importância deste local reside no fato de que, ultrapassando-o, o ciclo celular torna-se independente de estímulos mitogênicos (BRENTANI et al., 1998).

O controle do ciclo celular é dado por sinais mitogênicos oriundos do meio ambiente, que são introduzidos por fatores de crescimento, tais como Fator de Crescimento Epitelial (EGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). Tendo recebido estes sinais via receptores de membrana, a célula usa uma maquinaria intracelular complexa para transduzi-los e iniciar sua divisão. Para entrar em um ciclo celular de divisão, as células recrutam um grupo de proteínas regulatórias e enzimas. As enzimas-chaves são as Quinases Dependentes da Ciclina (CDKs), assim chamadas pelo fato de suas concentrações subirem e descerem durante o ciclo, sendo reguladas especificamente por proteínas da família das ciclinas. A expressão das ciclinas e sua associação às CDKs permite que as células passem através do ponto de restrição (BRENTANI et al., 1998; COTRAN et al.; 1999;).

O inibidor universal da CDK é a proteína p21, cuja expressão gênica é regulada pela proteína p53. A proteína p21 inibe também o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), exercendo, dessa forma, um papel inibitório duplo. Outras proteínas que inibem especificamente as ciclinas são p15, p16 e p27 (BRENTANI et al., 1998;).

## 1 - 10 – APOPTOSE

A homeostase tecidual é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente acoplados. Alguns reguladores do ciclo celular participam em ambos os processos, morte celular programada e divisão celular. A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- $\kappa$ B, CDK, ciclinas e CKI. Após estimulação, estas proteínas podem induzir proliferação celular, parada do ciclo ou morte celular. O “background” genético e o micro-ambiente celular são importantes, assim como a extensão de danos ao DNA e o nível de diferentes proteínas (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Apoptose ou morte celular programada é um processo rápido, que se completa em aproximadamente 3 horas e não é sincronizado por todo o órgão, portanto diferentes estágios de apoptose coexistem em diversas secções dos tecidos. Devido à taxa rápida de destruição celular é necessário que apenas 2 a 3% das células estejam em apoptose em determinado momento para que se obtenha uma regressão substancial de tecido, atingindo mesmo a proporção de 25% por dia.

Evidências recentes suportam o conceito de que o crescimento tumoral "in vivo" depende da evasão dos mecanismos homeostáticos de controle que operam via indução de morte celular por apoptose. A indução de apoptose seja através de mecanismos imunológicos, seja por outros mecanismos homeostáticos específicos, parecem ser extremamente importante no processo de eliminação de células sofrendo transformação maligna.

O câncer surge quando células recém-formadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Estes defeitos, se pouco extensos, podem ser corrigidos por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose.

A Morte Celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose também chamada de Morte Celular Patológica ou acidental ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas (como hipertermia, hipoxia, etc.) danificando a membrana plasmática e conseqüentemente levando a morte celular. a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN et al ; 2002).

Já a apoptose é um importante mecanismo celular, tanto no desenvolvimento quanto na homeostase de tecidos adultos com o objetivo de

remover células infectadas, danificadas ou transformadas, pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco e controlado.

A morte da célula por apoptose pode ser induzida por uma variedade de estímulos, como inanição, fatores de crescimento, DNA danificado, infecção viral, linfócitos citotóxicos (CLT), drogas anticâncer, irradiação ultravioleta, fatores mortais (uma família das citocinas), privação de fatores de sobrevivência e ligações de indutores químicos a determinados receptores de morte presentes na superfície celular. A indução da apoptose por agentes quimioterápicos é um importante aspecto da terapia do câncer. Estímulos externos, genotóxicos com danos no DNA, em geral levam à parada do ciclo celular e à morte da célula por apoptose (VU et al ; 1999, MOHSIN et al; 2005). Como o processo apoptótico possui um importante significado biológico, disfunções nos mecanismos de controle do sistema (apoptose deficiente ou excessiva) resultam numa variedade de condições patológicas, tais como imunodeficiência, doença auto-imune, doença degenerativa (Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson), câncer e infecções virais, lesões secundárias após isquemia, osteoporose, entre outras patologias (KUSIAK et al; 1996; DEIGNER et al; 2000; FOSSLIEN, 2001; SHELTON et al; 2004).

Células apoptóticas podem ser identificadas pelas seguintes mudanças morfológicas: encolhimento celular, condensação e marginalização da cromatina nuclear, fragmentação do DNA, vacuolização citoplasmática e lise celular. Subseqüentemente, a célula é fragmentada em compactas estruturas membranosas e posteriormente fagocitadas por macrófagos e então removidas do tecido sem gerar uma resposta inflamatória (em contraste com outros mecanismos de morte celular).

A morte celular programada (PCD), observado durante o desenvolvimento e o tecido homeostático pode ser classificada morfológicamente em três tipos principais:

Tipo I: também conhecido como nuclear ou apoptótico (caspase-dependente e independente);

Tipo II: autofágico;

Tipo III: degeneração não-lisossomal vesiculada;

A apoptose é a melhor forma caracterizada de morte celular programada, na qual as células mostram características como formação de vesículas membranosas, troca de lado da fosfatidilserina da membrana plasmática, fragmentação nuclear e ativação de uma família da protease cisteína chamada de caspases. A ativação bioquímica da apoptose pode ocorrer por dois caminhos: a apoptose iniciada via receptores de morte tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral), requerem pró-caspase 8 ou 9 no complexo, e a via mitocondrial ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl2 (Bax, Bid). Membros pró- e antiapoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a morte celular por apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, conseqüentemente, inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol (GOTTLIEB, 2000). Este associa-se com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando o apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (ANURADHA et al.; 2001).

#### 1. 11 - RECEPTORES

A sinalização entre as células ocorre através da secreção de centenas de tipos de moléculas sinalizadoras, incluindo proteínas, pequenos peptídios, aminoácidos, nucleotídios, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e gases como óxido nítrico e monóxido de carbono. As células alvo respondem por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores (ALBERTS 2004).

Os receptores estão divididos em dois grandes grupos: receptores localizados na superfície da membrana plasmática das células alvo. As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície celular que medeia fixação da célula à matriz extracelular; e receptores localizados no interior da célula alvo e requer a entrada do ligante sinalizador dentro da célula, a fim de ativar seus componentes.

### 1.11.1 - RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares é um conjunto de proteínas e fatores de transcrição, que foram agrupados em uma superfamília de receptores, que interagem com o DNA. Esta família está em todo o reino animal e se encontra envolvida em diversos aspectos da vida, de maneira essencial para múltiplas funções fisiológicas como: homeostase, reprodução, crescimento, diferenciação, morfogênese, metabolismo e apoptose (TANEJA, 2005). Os receptores nucleares são geralmente proteínas de 50 a 100 kDa que agem através a regulação da transcrição de genes alvo ativados pela ligação de uma molécula lipofílica.

### 1. 11.2 A SUPERFAMILIA DOS RECEPTORES NUCLEARES

A superfamília dos receptores nucleares evoluiu a partir de um receptor ancestral comum. (ARANDA, et al., 2001).No genoma humano sabe-se que existem 48 proteínas que regulam a transcrição de seus respectivos genes alvo. (GRONEMEYER, et al.,2004).

Esta superfamília é formada pelos receptores de hormônios lipofílicos (esteróides, retinóides, vitamina D e tireoidianos), de metabólitos endógenos (ácidos biliares e graxos, cicosanóides e oxisterol), e de xenobióticos ( que induzem a produção de citocromo P450, facilitando processos de desintoxicação). Nessa superfamília também são encontrados um grande número de receptores cujos ligantes naturais ainda não foram identificados, sendo estes receptores denominados “receptores órfãos”, (KLIOWER et al; 1999) como o receptor de retinóide X (RXR, Retinoid X Receptor).

### 1. 11.3 ESTRUTURA DOS RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares são constituídos de uma única cadeia, que se organiza estruturalmente em módulos ou domínios com funções específicas

apesar de poderem também interagir entre si para executar uma determinada ação biológica do receptor. Todos os membros desta família são proteínas modulares com três domínios principais: região amino-terminal, outro domínio (70 a 80 resíduos de aminoácidos) conhecido como domínio de ligação ao DNA (DBD) e o terceiro domínio (cerca de 250 resíduos de aminoácidos) denominado domínio de ligação do ligante (LBD, Ligand Binding Domain). (GRONEMEYER et al., 2004 ).

#### 1. 11. 4 - RECEPTORES ANDROGÉNICOS

É bem conhecido que os andrógenos são necessários para a diferenciação sexual no feto, o desenvolvimento sexual durante a puberdade e manutenção da função sexual e fertilidade no adulto. Adicionalmente contribui para o crescimento da próstata.

A testosterona é o principal andrógeno circulante no sexo masculino e é secretada pelas células de Leydig no testículo e sua síntese é controlada pelo hormônio luteizante (LH).

A adrenal produz uma pequena quantidade de testosterona, diretamente ou por conversão periférica dos hormônios androtenediona e dehidroepiandrosterona após a ação de enzimas esteroidais.

Lubahn e cols. (1998) demonstraram que o gene do AR está localizado no braço longo do cromossomo X entre os fragmentos Xq 11-13 e Brown e cols. (1998) localizaram mais precisamente o gene do AR entre os fragmentos Xq11 e 12.

As ações da testosterona e do dihidrotestosterona requerem a presença de receptores androgênicos funcionais, os quais após a ligação com estes hormônios, ativam a transcrição de genes específicos em tecidos alvos (KUPFER , 1992).

Na próstata, a enzima  $5\alpha$  redutase transforma a testosterona em diidrotestosterona um metabólito de maior androgenicidade que a testosterona.

A testosterona e a diidrotestosterona estão presentes no sangue em concentrações de 10 a 100 vezes acima do nível necessário para saturação do receptor androgênico. Entretanto aproximadamente 95 a 97% da testosterona

circulam na corrente sanguínea unida a uma globulina, a globulina transportadora de hormônio sexual (SHBG) e só a fração de testosterona livre pode se difundir para o interior da célula alvo. A SHBG é uma glicoproteína sintetizada no fígado, cuja síntese é modulada por vários fatores fisiológicos e patológicos. Estrógenos, hormônios tireoidianos estimulam sua síntese, enquanto andrógenos, glicocorticóides, hormônio de crescimento e insulina a inibem (NESTLER et al., 1991) A porção livre dos androgênios atravessa a membrana celular das células alvo por difusão e liga-se com alta afinidade ao AR, uma proteína que possui sítios de ligação específicos para andrógenos.

### 1.12 - CARATENOIDES - BETA CAROTENO

Os carotenóides consistem mais de 600 componentes, inclusive de isômeros, todos os quais são polisoprenóides, possuem um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, geralmente contendo 40 átomos de carbono, normalmente apresentando isomeria interna, e sempre tem uma ou duas estruturas cíclicas que terminam em ligações conjugadas. Eles são encontrados em algumas espécies na maioria dos seres vivos, incluindo animais, plantas, e microorganismos. Eles são necessários para sobrevivência em algumas formas de vida. Eles e seus metabólitos possuem várias ações na natureza, inclusive envolvimento como pigmentos auxiliares da luz e como agente protetor da fotossíntese. Eles são preponderantes na coloração dos pássaros, e outros seres e em flores, possivelmente como um atrativo para insetos que realizam a polinização. São coloridos, possuindo um espectro que vai do amarelo ao vermelho. O tratamento com carotenóides, focado na nutrição humana propriamente dita, baseia-se no seu metabolismo e fisiologia animal e humano e em seu benefício potencial em diversas patologias. Pelo fato de serem facilmente extraídos, apresentaram grande interesse na química e biologia nos últimos séculos (OLSON, et al. 1995).

### 1.13 - QUÍMICA:

Alguns carotenóides são encontrados em alimentos. Entretanto, as formas mais prevalentes de carotenóides encontram-se na forma de isômeros

trans, e alguns na forma cis. Entretanto, o composto simétrico beta caroteno pode teoricamente formar 272 isômeros diferentes, enquanto seu análogo assimétrico, alfa-caroteno, pode formar 512. (OLSON, et al.,1995). Os carotenóides, em grande parte, são moléculas hidrofóbicas e conseqüentemente interagem com a parte lipofílica da célula. Os carotenóides hidrocarbono se solubilizam nos lipídios das membranas. Sendo moléculas rígidas, elas se dispõem paralelamente a superfície da membrana. Os oxocarotenoides (xantofilos) como a luteína e zeaxanthin expõem seus grupos hidroxila na superfície da membrana. Eles podem se dispor perpendicularmente a superfície e servir como agente transmembrana . (BRITTON,1995). Os Carotenóides apresentam duas outras características importantes: (a) a propriedade de extinguir o oxigênio silglete e (b) propriedades antioxidante / pró-oxidante. O Oxigênio Singleto, o qual é muito mais reativo que o oxigênio tripleto presente no ar, pode interagir com muitos componentes celulares, produzindo produtos oxidativos inativados.

Os métodos mais utilizados para separação e quantificação dos carotenóides envolvem a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) em colunas de fase-reversa ou fase-reta, combinado com detecção espectrofotométrica e pico de integração (FURR, et al, 1992.).

As fontes mais ricas em carotenóides são os óleos de palmeira, os quais contém  $\beta$ -caroteno (4,7 mg/100 ml),  $\alpha$ -caroteno (3,7 mg/100 mL), e pouco de outros carotenoides. Proveniente do Afeganistão, as cenouras são nossa fonte mais abundante de beta caroteno. Uma cenoura grande fornece 17mg de betacaroteno e mais de 6 vezes a RDA (Ingesta Dietética Recomendada) de vitamina A. Como já indicado, a biodisponibilidade dos carotenóides nos vegetais, e menos amplo em frutas, é a consideração chave na avaliação do conjunto atual de carotenóides absorvidos.

Composição de Carotenóides de algumas Frutas e Vegetais ( $\mu$ g/100 g porção).

Vegetais: cenouras (6,6mg), agriões (5,6mg), espinafres (4,9mg), brócolos (1,5mg).

Frutas: mangas (2,9mg), melões (2,0mg), alperces (1,6mg), pêssegos (0,5mg).

## 1.14 - EFEITOS BIOLÓGICOS DOS CAROTENOÍDES

Os carotenóides possuem vários papéis na natureza. Para os mamíferos eles servem como precursores da vitamina A. Mas nas últimas décadas, os carotenóides foram implicados em muitos processos biológicos.

### 1.14.1 – FUNCIONAIS

O nutriente funcional tem um papel essencial no crescimento, desenvolvimento e maturação. Como os carotenóides não são necessários para mamíferos com adequada ingestão de vitamina A na dieta, então não são considerados essenciais. Mas na ausência de adequada ingestão de vitamina A na dieta, elas tornam-se essenciais ou, “condicionalmente essenciais,” como no caso de certos aminoácidos. Como os carotenóides são as maiores fontes de vitamina A, seu papel como nutriente “condicionalmente essencial” é muito importante.

A descoberta da vitamina A ocorreu, quase simultaneamente, em 1931, por dois grupos independentes de pesquisadores Mc Collun & Davis na Universidade de Wisconsin, e Osborne & Mendel na Universidade de Yale.

A estrutura química, no entanto, foi identificada em 1931 por P. Karrer.

### 1.14.2- FONTES

As fontes dietéticas de vitamina A pode ser a vitamina A pré-formada e a pró - vitamina A, representada pelos carotenóides. As verduras de folhas verdes escuro, os frutos amarelos, as raízes de cor alaranjado, os óleos de palma. Assim, todos os retinóides dos animais superiores são provenientes, ultimamente, de carotenóides pró-vitamina A presente nos alimentos vegetais ou de retinóides pré-formados nos alimentos de origem animal. Dentre os 50 dos 600 carotenóides que podem ser convertidos para vitamina A, o  $\beta$ -caroteno é o precursor mais eficiente na produção de retinol. Para produzir o equivalente a 1  $\mu$ g de retinol, são necessários 6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno ou 12  $\mu$ g de uma mistura de outros carotenóides (BLOMHOFF, 1994).

## 1.15 - VITAMINAS

As vitaminas são compostos orgânicos, essenciais em quantidades muito pequenas para dar suporte ao funcionamento fisiológico normal, que

geralmente não pode ser sintetizada em taxas muito rápidas o suficiente para atingir as necessidades do corpo.

As vitaminas são usualmente classificadas em dois grupos com base nas suas solubilidades: as vitaminas hidrossolúveis (B,C) e vitaminas lipossolúveis (A, D, E , K ). As vitaminas lipossolúveis são geralmente absorvidas passivamente e devem ser transportadas com o lipídio da dieta. Tendem a ser encontradas nas porções lipídicas das células tais como membranas e gotículas de lipídios. As vitaminas lipossolúveis são geralmente excretadas com as fezes através da circulação êntero-hepática.

#### 1.15.1 - A VITAMINA A

A vitamina A também conhecida pela designação de retinol (ou retinóides) refere-se aos três componentes pré-formados que exibem atividade metabólica: o álcool (retinol), o aldeído (retinal ou retinaldeído) e o ácido (ácido retinóico). O retinol é um álcool primário, polietilênico e lipossolúvel, apresentando grande capacidade reativa. Essa vitamina é instável aos processos oxidativos e a temperatura de 34°C (COWARD 1927).

Atualmente, a natureza química dos retinóides e compostos relacionados é bem conhecida. A característica estrutural das moléculas de retinóides naturais é a cadeia lateral de quatro unidades isoprenóides em série com duplas ligações conjugadas acompanhada, de um lado, por um anel não-aromático beta-ionona e de outro lado, por um grupamento terminal polar com uma função orgânica oxigenada. Este grupo funcional terminal pode apresentar-se com graus de oxidação distintos, podendo ser uma hidroxila, como no retinol; um aldeído, no retinal; e um grupamento carboxílico como no ácido retinóico. O ácido retinóico é um metabólito do retinol, no qual o grupo álcool sofreu oxidação, apesar de ser mais potente que o retinol na promoção da diferenciação e crescimento do tecido epitelial na deficiência da vitamina A. O retinol tem a fórmula empírica  $C_{20}H_{30}O$  e peso molecular 286,4 (GUILLAND & LEQUEU, 1995).

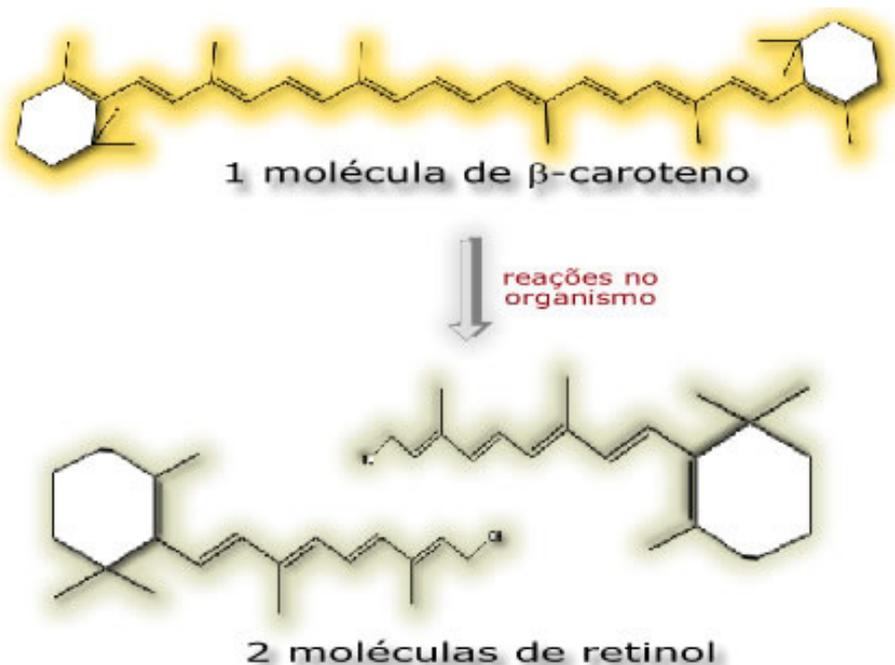
O retinol armazenado é com freqüência estereificado em um ácido graxo (normalmente palmitato) e é chamado de retinil palmitato. Estes ésteres de retinil são também encontrados complexados com as proteínas nos alimentos.

Estas formas ativas da vitamina A existem apenas em produtos de origem animal.

No interior da célula intestinal, o retinol é re-estereificado principalmente sob a forma de palmitato de retinol, sendo incorporado aos quilomícrons e é excretado na linfa (QUILLAND & LEQUEU, 1995).

Além da vitamina A pré-formada encontrada nos produtos de origem animal, os vegetais contém um grupo de compostos coletivamente conhecidos como retinóides, os quais podem produzir retinóides quando metabolizados no organismo.

Foram as observações experimentais, e não apenas as clínicas, que levaram à identificação da vitamina A. Após a descoberta por Steenbock (1919) que pigmentos carotenóides amarelos e óleos levemente amarelados de origem animal possuíam atividade de vitamina A, gerou um conflito entre hipóteses acerca do precursor da vitamina A. Em 1930 foi demonstrado que o pigmento amarelo  $\beta$ -caroteno era convertido para vitamina A, de coloração menos intensa, nos animais. Após este dilema, Karrer em 1931, determinou a estrutura da vitamina A e de seu precursor principal, o  $\beta$ -caroteno (Figura 12).



## Figura 12 - Molécula de beta caroteno e retinol

Os retinóides são compostos hidrofóbicos, instáveis na presença de oxigênio e em meio ácido, e fluorescem quando excitados por um comprimento de onda. Algumas propriedades químicas dos retinóides, muitas vezes indesejadas, é a ação detergente que os retinóides exercem nas membranas celulares, e sua extrema facilidade de destruição pela radiação ultravioleta e oxidante (BLOMHOFF et al., 1994).

Outro retinóide igualmente importante no organismo é o retinaldeído, reconhecido principalmente como cromóforo do pigmento visual rodopsina.

O all-trans ácido retinóico e seu estereoisômero 9-cis-ácido retinóico são os retinóides mais ativos biologicamente, através do qual a maioria das ações da vitamina A é expressa. Estão presentes em vários tecidos e em quantidades menores que as do all-trans retinol. Aproximadamente todos os órgãos são capazes de formar ácido retinóico pela oxidação irreversível do retinol, do retinaldeído ou do beta-caroteno.

### 1.15.2 - IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DOS RETINOIDES

Os retinóides de ocorrência natural, são considerados, há algum tempo, como fundamentais na manutenção e desenvolvimento fisiológico.

Por volta de 1500 a.C., no Egito, a cegueira noturna foi descrita, aparentemente pela primeira vez. Embora, à época, esta doença não fosse associada a uma deficiência alimentar, recomendava-se sabiamente, o tratamento tópico com fígado assado ou frito, e posteriormente, Hipócrates sugeriu a ingestão de fígado bovino para recuperar a afecção. No entanto, a relação com a deficiência nutricional só foi reconhecida definitivamente dois séculos atrás.

Além de sua função classicamente definida na visão, os retinóides naturais participam de outros processos celulares. A vitamina A protege o organismo da cegueira noturna e melhora a visão (TOLONEN, 1950).

O papel dos retinóides como morfogênico tem sido elucidado no desenvolvimento dos membros dos vertebrados, por exemplo (OLSAN, 1999).

Os análogos da vitamina A, representados principalmente pelo all-trans ácido retinóico e seu isômero 13-cis ácido retinóico, por seus efeitos proeminentes na diferenciação epitelial, encontraram uma aplicação terapêutica importante no tratamento de uma variedade de condições dermatológicas, especialmente acne, e estão sendo avaliados na quimioprevenção do câncer.

#### 1.15.2.1 – MECANISMO DE AÇÃO DOS ESTEROISÔMEROS DO ÁCIDO RETINÓICO.

A molécula de ácido retinóico, relativamente simples e pequena, pode regular a expressão de vários genes em momentos e locais específicos, para produzir resultados complexos, como a morfogênese dos membros e a especificação axial do corpo (OLSON,1999). Tais eventos puderam ser explicados a partir da descoberta dos receptores nucleares para ácido retinóico (RARs) (GIGUERE et al., 1987; PETKOVICH et al., 1987). Estes receptores intracelulares ativados por estereoisômeros do ácido retinóico, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , são fatores transcricionais, cada um codificado por um gene distinto.

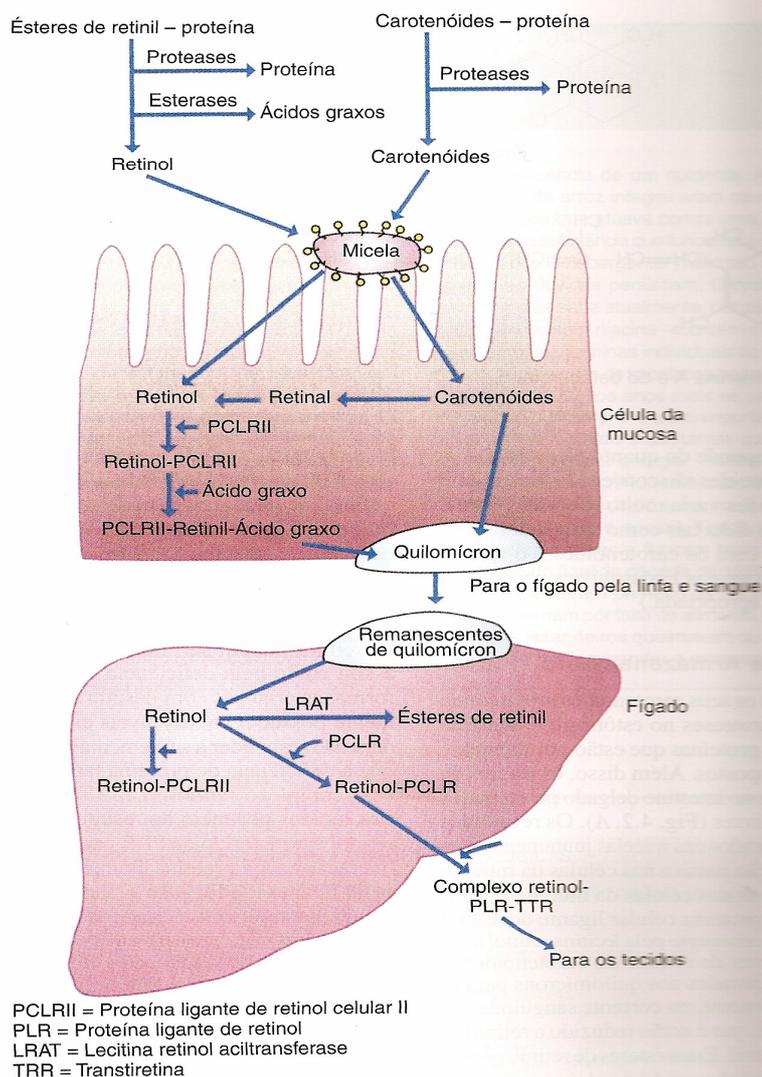
#### 1. 15.2.2 - METABOLISMO DOS RETINOIDES

A síntese de novos compostos com atividade de vitamina A é uma habilidade limitada às plantas e aos microorganismos. Assim, todos os retinóides dos animais superiores são provenientes, ultimamente, de carotenóides pró-vitamina A presente nos alimentos vegetais ou de retinóides pré-formados nos alimentos de origem animal. Dentre os 50 dos 600 carotenóides que podem ser convertidos para vitamina A, o  $\beta$ -caroteno é o precursor mais eficiente na produção de retinol. Para produzir o equivalente a 1  $\mu$ g de retinol, são necessários 6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno ou 12  $\mu$ g de uma mistura de outros carotenóides (BLOMHOFF, 1994).

A principal forma de retinóide pré-formado na dieta são os ésteres de retinila. Estes devem ser hidrolisados no meio extracelular do lúmen do intestino antes de serem absorvidos como retinol. A hidrólise destes ésteres pode ser catalisada por enzimas lipases secretadas pelo pâncreas e por enzimas hidrolases associadas diretamente com as vilosidades intestinais (Figura 13)

Entretanto, os carotenóides procedentes da dieta são absorvidos por mecanismo de difusão passiva pelas células da mucosa intestinal, isto é, dentro dos enterócitos. Nesta etapa, devido a insolubilidade em água, os ésteres são emulsionados pelos sais biliares e ácidos graxos livres dentro do lúmen intestinal convertendo-se por fim em micelas, para que possam ser absorvidas e transferidas para dentro da mucosa. Em condições normais, mais de 90% da vitamina A ingerida é absorvida (HARRISON, 2005).

## Princípios Nutricionais



– Retinol e carotenóides. (A) Digestão. (B) Absorção. (C) Transporte.

**Figura 13** – Fonte: **Krause Alimentos, Nutrição & Dietoterapia. Cap 4 pag. 76 11<sup>a</sup> ed. 2005.**

### 1. 15.2.3 - PROTEÍNAS LIGANTES DE RETINOÍDES

Várias proteínas ligantes têm sido identificadas, tanto no ambiente extracelular como no intracelular, capaz de associarem formas isômericas e químicas diferentes de retinóides. Nos animais in vivo, os retinóides são descobertos associados tanto às membranas celulares quanto às proteínas ligantes de retinóides. As proteínas ligantes de retinóides compartilham um papel comum que é o de solubilizarem e estabilizarem seus ligantes, que são hidrofóbicos e lábeis, no ambiente aquoso. No entanto, um grande número de

informações indica que, além desta função geral, as proteínas ligantes de retinóides têm participação distinta na regulação do transporte, metabolismo e ação dos seus ligantes. As proteínas ligantes de retinóides associam seus ligantes com altas afinidades, na ordem do nanomolar. As informações disponíveis na literatura sugerem que além de servirem de carreadoras liberando seus ligantes lentamente, criando gradientes de concentrações, algumas das proteínas ligantes de retinóides podem transferir os seus ligantes para proteínas específicas através de reconhecimento proteína-proteína.

As proteínas ligantes de retinóides mais conhecidas pertencem a duas famílias de proteínas que foram inicialmente classificadas como proteínas transportadoras de moléculas hidrofóbicas: as lipocalinas e as proteínas intracelulares ligantes de lipídios (iLBPs) (KRAUSE: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia, 2005). O ácido retinóico se liga a duas famílias de receptores nucleares, os receptores do ácido retinóico (RAR) e os receptores X para retinóides (RXR) (KASTNER et al., 1995).

#### 1.15.2.4 PROTEÍNAS LIGANTES DE RETINOÍDES INTRA CELULARES

A natureza hidrófoba e a labilidade da vitamina A são contornados no ambiente intracelular por proteínas que especificamente associam-se aos retinóides. As proteínas CRBP (tipo I e II) e CRABP (tipo I e II) possuem a característica principal de solubilizar as moléculas de retinóides, seqüestrando-os do meio aquoso intracelular (BLOMHOFF, 1994).

Os mecanismos específicos de ação extracelulares dos retinóides ainda estão sendo identificados (CHEN et al., 1996).

	Peso molecular kD aproximado	Ligante principal	Função sugerida
CRBP (1)	16	Retinol	Doadora para reações LRAT e enzimas oxidativas, regula a hidrólise de ésteres de retinila

CRBP (II)	16	Retinol	Doadora para reação LRAT
CRABP (1)	16	Ácido retinoico	Regula a concentração de ácido retinóico livre;doadora para enzimas catabolizantes
CRABP (11)	15	Ácido retinóico	Regula a concentração de ácido retinóico livre;doadora para enzimas catabolizantes
CRALBP	36	Retinal	Reações enzimáticas no ciclo visual

**Tabela 1 – CRBP** =Proteína celular ligantede retinol; **CRABP**= Proteína celular ligantede ácido retinoico;**CRALBP**=Proteína celular ligante de retinal;**LRAT**= Lecitina aciltransferase de retinol.

#### Funções das CRBPs: Modulação dos efeitos do ácido retinóico

As funções biológicas das proteínas CRABP-I e CRABP-II no organismo ainda não são claras, mas podem ser melhores compreendidas em termos da afinidade pelo seu ligante. Experimentos com camundongos transgênicos que não expressam CRABP-I ou II demonstraram que os animais crescem normalmente, com alguns defeitos apenas no desenvolvimento dos membros. O ácido retinóico age como morfógeno através de um gradiente de concentração induzindo a formação dos membros (CHAMBON, 1996), Talvez as CRABPs estejam envolvidas na formação deste gradiente e portanto afetando o brotamento do membros. Por outro lado, células modificadas que expressam CRABP em grandes quantidades, possuem uma sensibilidade menor ao ácido retinóico, com proporcional aumento de metabólitos polares de excreção do ácido retinóico sugerindo que uma das funções da CRABP seja proteger as células do excesso do hormônio .

Tanto CRABP-I e II são encontradas no núcleo, o que sugere que estas proteínas executem a função de dispensar ácido retinóico para os fatores transcripcionais RAR.

O retinil só pode ser encontrado em tecidos animais, tendo como fontes alimentares principais, o fígado, o óleo de fígado de peixes, o leite integral e seus derivados, os ovos e as aves. (GUILLAND & LEQUEU 1995).

O teor de vitamina A dos alimentos é medido como equivalentes da atividade de retinol (ERA). Um ERA é equivalente à atividade de 1µg de retinol. 1µg de retinol é igual a 333 unidades internacionais (UI).

As ingestões dietéticas de referência (DRI) foram determinadas para a vitamina A e são expressas em microgramas por dia (µg/dia).

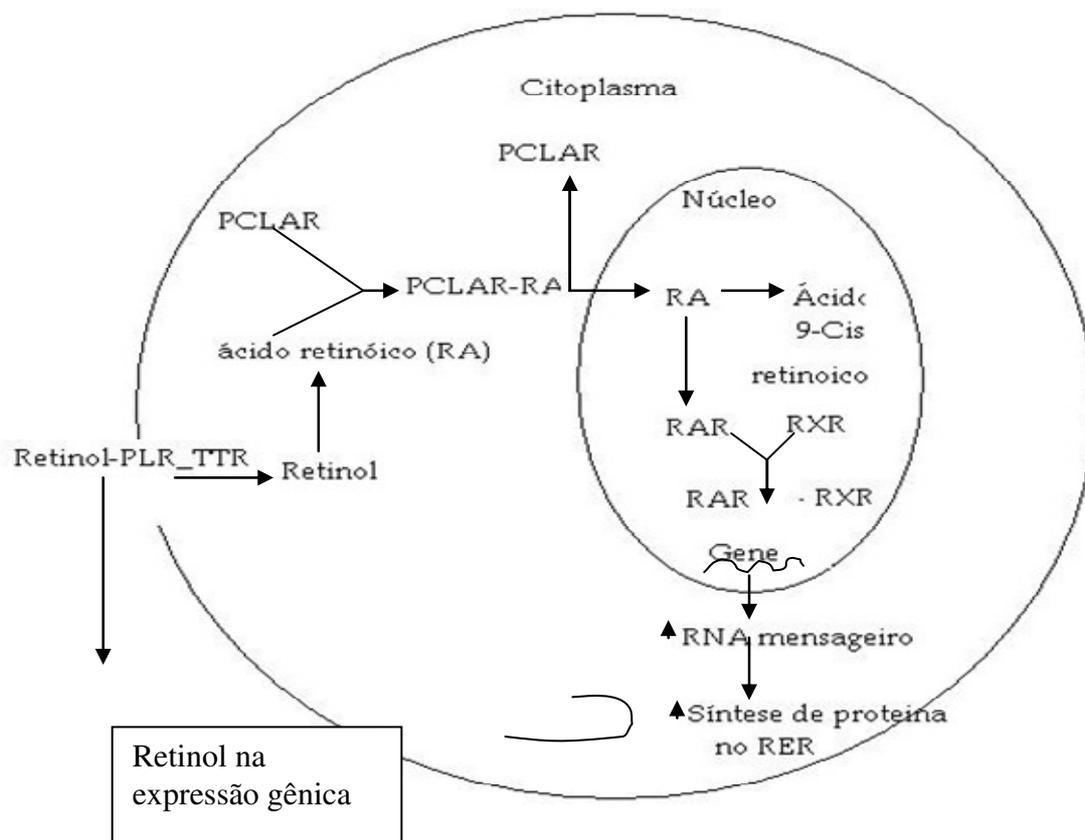
### 1.15.3. FUNÇÕES

A vitamina A possui papéis essenciais porém distintos na visão e várias funções sistêmicas, incluindo a diferenciação celular normal e a função na superfície celular, crescimento e desenvolvimento, nas funções imunológicas e reprodução.

A função da vitamina A na visão está bem estabelecido e é baseada na ligação do 11 cis\_retinaldeído com a proteína opsina para formar a púrpura visual (rodopsina) na retina (BALL,1998, DRI,2001).

O retinol é um componente estrutural dos pigmentos visuais dos cones de bastonetes da retina e como tal é essencial para a fotorrecepção.

Apesar das funções sistêmicas da vitamina A estarem longe de ser completamente compreendidas, podem ser separadas em duas categorias principais. Primeiro, a vitamina A (especialmente o ácido retinóico) atua como um hormônio para afetar a expressão genética.



**Figura 14** – PLR = proteína ligante de retinol TTR=transtiretina – CRABP= proteína ligante de ácido retinóico celular – RAR= receptor de ácido retinóico RXR =receptor retinoide X – RER retículo endoplasmático rugoso. Baseado em Krause-Alimentos,Nutrição & Dietoterapia , 2005.

Dentro da célula a PCLR (Proteína Celular Ligante de Retinol) transporta o ácido retinóico para o núcleo. No núcleo, o ácido retinóico liga-se aos receptores de ácido retinóico (RAR) ou receptores de retinóides X (RXR) no gene.(Figura 14 ). As interações subseqüentes permitem a estimulação ou inibição de transcrição de genes específicos, afetando assim a síntese de proteínas e muitos processos corporais. Apenas alguns desses processos são conhecidos, entre eles estão morfogênese no desenvolvimento embrionário e a função celular epitelial.

O segundo papel principal da vitamina A nas funções sistêmicas envolve a síntese de glicoproteínas. As glicoproteínas são importantes para as funções normais da superfície celular, tais como agregação e reconhecimento celular.

#### 1.15.4 NOMENCLATURA

As recomendações para a nomenclatura das vitaminas, incluindo retinol, retinal e ácido retinóico, foram publicadas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) em 1960, posteriormente revisadas em 1995 (IUPAC – IUB, 1996; IUPAC - IUB,1983).

Sporn et.al., 1976 introduziram o termo retinóide para abranger todos os análogos estruturais naturais, bem como os sintéticos da vitamina A. De acordo com a definição da IUPAC e da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB), retinóides é o termo empregado para designar uma classe de compostos cuja estrutura química consiste de quatro grupos isoprenóides unidos de modo cabeça – cauda. O esqueleto dos retinoides naturais é constituído por um anel não aromático de seis átomos de carbono com uma cauda lateral poliprenóide que é, com poucas exceções, terminada com um grupo funcional constituído de carbono e oxigênio. (DINIZ et. al., 2002).

#### 1.15.5 - QUÍMICA

As fórmulas estruturais de Beta-caroteno e vitamina A foram estabelecidos por Karrer et.al., na Universidade de Zurich entre 1928 e 1931. Karrer recebeu o premio Nobel de química em 1937.

#### 1.15.6 - MÉTODOS DE ANÁLISE

Atualmente a vitamina A e os caratenóides se medem mais a miúdo por Cromatografia Líquida de Alta Resolução, conhecida como HPLC.

#### 1.15.7 - METABOLISMO

A taxa normal de retinol no plasma é de 30 a 70µg/dl (1, 04 µmol/L a 2,43 µmol/L). Porem, em indivíduos saudáveis, o retinol plasmático é mantido dentro de uma variação estreita de 1,39 a 1,73 µmol/L (40,1 a 4970µg/dl.(VANNUCCH 1991 ). Os retinoides são importantes reguladores da reprodução, proliferação e diferenciação celular. Os retinoides são mediadores com a diferenciação, proliferação e reprodução e apoptose das células. Segundo suas necessidades as células regulam a formação de um isômero retinoide específico. Os retinoides exercem seus efeitos fisiológicos unindo-se a

um receptor intracelular específico que se divide em receptores retinoides X (RxRs) e receptor do ácido retinóico (RARs). Ambos os tipos de receptores se dividem em três subtipos denominados alfa, beta e gama. Os RAR beta se encontram no rim, próstata, córtex cerebral e estão associados a câncer de pele (MANGELSDORF et al.,1990 ;MANGELSDORF et al.,1991).

O uso destas substâncias em áreas anatômicas diferentes do mesmo tecido, (zonas central e periférica) que são sede de diferentes patologias como hiperplasia e carcinoma da próstata nos faz vislumbrar o potencial da aplicação desta técnica, criando novos focos para futuras investigações.

O retinol não é eliminado na urina e sob forma inalterada é excretado somente em casos de nefrite crônica. Quando altas doses de vitamina A são administradas é que certa proporção sofre excreção sob forma inalterada nas fezes .

O ácido retinóico, absorvido após passagem na circulação pela veia porta é transportado no plasma como um complexo ligado à albumina. De modo diferente do retinol, o ácido retinóico não é armazenado no fígado, sendo rapidamente excretado.

#### 1. 16 - ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O envelhecimento da população é uma realidade. A faixa etária a partir de 60 anos de idade é a que mais cresce. Estima-se que em 2025, haverá cerca de 32 milhões de idosos no Brasil. Um dos fatores importantes para esse aumento populacional, além da queda nas taxas de natalidade, é a transição epidemiológica e suas alterações relevantes no quadro de morbimortalidade.

De acordo com dados da PNAD divulgados pelo IBGE (2006), a faixa etária de pessoas com mais de 80 anos de idade, na composição da sociedade (Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 18-36, jan./jun. 2007. Disponível em: [www.metrocamp.com.br/pesquisa](http://www.metrocamp.com.br/pesquisa)).

brasileira, foi a que mais cresceu entre os grupos etários de idosos. Em uma população total de cerca de 182 milhões de pessoas, a PNAD indica que a faixa etária de pessoas de 60 anos ou mais é de 18,2 milhões, ou seja, 10% da

população brasileira. Trata-se de um grupo que cresce a cada ano e que aumentou em mais de cinco milhões de pessoas entre 1995 e 2005. Dados da OMS (1998) indicam que o Brasil ocupará o sexto lugar entre os países com maior contingente de idosos, alcançando, em 2025, cerca de 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade.

No Brasil, no período de 1960 a 1980, a expectativa de vida ao nascer era de 63,4 anos, ou seja, foram acrescentados cerca de 20 anos em três décadas (IBGE, 1981). As projeções para o período de 2000 a 2025 permitem supor que a expectativa média de vida do brasileiro estará próxima de 80 anos, para ambos os sexos (KALACHE; VERAS; RAMOS, 1987).

#### 1.16.1 DADOS EPIDEMIOLOGICOS DO BRASIL

No Brasil as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão 472.050 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção de pele não melanoma serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo de útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil de magnitude observado no mundo.

No Brasil teremos 47 mil novos casos de câncer de próstata.

#### Estado da BAHIA

Estimativa para o ano de 2006 das taxas brutas de incidência por 100.000 e do número de casos novos por câncer, em homens segundo a localização primária para o Estado da Bahia:

Próstata	2.380 casos	Taxa Bruta 34,46
Na capital	750 casos	Taxa Bruta 61,40

#### REGIÃO

NORTE	NORDESTE	CENTRO OESTE	SUL	SUDESTE
1.680	8.730	3.050	9.200	24.620

Dados do Ministério da Saúde

Instituto Nacional do Câncer INCA – Estimativa 2006

#### 1.16.2 FATORES PREDISPOONENTES

### 1.16.3 ASPECTOS ÉTNICOS

Há diferenças consideráveis entre as incidências relatadas de câncer clínico de próstata nos diferentes grupos étnicos. As taxas de incidência são baixas entre os homens asiáticos, são mais elevadas nos homens escandinavos e atingem seus níveis máximos entre os afro-americanos.

Homens de origem étnica chinesa ou japonesa que moram nos Estados Unidos apresentam taxas que, embora inferiores às de negros e brancos americanos, são superiores às de seus pares que moram na Ásia. Utilizando-se dados coletados entre 1988 e 1992, foi relatado que a taxa de incidência entre afro-americanos é 35% mais elevada do que a observada em brancos.(PARKER, 1998). Em comparação com homens brancos, os homens de cor negra apresentam a doença com menos idade, em grau mais elevado e estágio mais avançado e com maior atraso no diagnóstico.

Asiáticos têm a mais baixa taxa de incidência de câncer de próstata com aproximadamente 107.2 por 100.000, os hispânicos têm uma taxa ligeiramente mais alta às 127.6 por 100.000. Brancos têm uma taxa de 172.9 por 100.000, e os afro-americanos têm as taxas mais altas de 275.3 por 100.000 - aproximadamente 60% mais alto que os brancos. Os índices de mortalidade também variam entre diferentes raças, com dados de 1992-1999 mostram que os afro-americanos têm um índice cinco vezes mais alto que os asiáticos, três vezes mais alto que hispânicos e duas vezes mais alto que o de brancos. Maior incidência em negros, menor incidência em asiáticos quando permanecem no seu país de origem, porém têm aumentado a taxa de incidência de câncer de próstata quando migram para países que tem altas taxas de incidência, na segunda geração.

### 1. 16.4 IDADE

Envelhecer aumenta o risco de câncer de próstata. Indivíduos com menos de 40, é raro ter câncer de próstata mais, com 65 anos de idade ou mais é muito comum, enquanto respondem por 70% de casos no EUA. O risco de morte por câncer de próstata é 1:6. A possibilidade de ter câncer de próstata varia com idade, sendo 13.7% para o grupo com idade entre 60-79 anos, 2.2% para aqueles com 40-59, e 0.005% para o jovem com menos de 39 anos. A probabilidade de se encontrar câncer de próstata quando se executa autópsias

em pessoas falecidas é muito mais alto, é aproximadamente 20% em homens entre as idades de 50 e 60 anos e aumentando a 50% em homens entre 70 e 80. O risco de ter evidência patológica de câncer de próstata em um indivíduo com mais de 50 anos é 42%, o risco disto se manifestar clinicamente é 9.5%, e o risco de mortalidade é 2.9% , o que indica um alto grau de prevalência de doença subclínica.

#### 1.16.5 HISTÓRIA FAMILIAR

A presença de familiares de primeiro grau (pai ou irmão) com Câncer de Próstata dá chances 2,2 vezes maiores de um parente vir a ter a neoplasia. A probabilidade aumenta para 4,9 a 10,9 vezes se dois ou três parentes de 1º grau tiverem a doença, respectivamente.

O fator hereditário para a relação de risco de vir a adquirir o Câncer de Próstata por fatores genéticos está altamente relacionado à idade de início em que o parente veio a adquirir o câncer. Idades relativamente jovens para o início de desenvolvimento de um câncer pelo parente é um grande fator de risco para o paciente, enquanto que idades avançadas para o desenvolvimento da doença têm um fator de risco muito pequeno.

Alteração dos genes no cromossomo 1 e no cromossomo X tem sido achada em alguns pacientes com histórico familiar de Câncer de Próstata. Em adição, estudos genéticos sugerem que uma predisposição familiar pode ser responsável por cerca de 10% dos casos de Câncer de Próstata. Recentemente, vários estudos têm sugerido um risco familiar partilhado (herdado ou ambiental) para o câncer de próstata e de mama. Irmãos e filhos de mulheres que têm câncer de mama ou que são portadores de uma forma mutante do gene BRCA 1 (o qual tem sido associado ao câncer de mama) correm risco de câncer de próstata, em certa medida, elevado. Além disso, a herança de uma forma anormal do gene HPC 1 (câncer de próstata humana 1) parece contribuir para o desenvolvimento de alguns tipos de Câncer de Próstata.

#### 1.16.6 DIETA

Dieta com alto teor de gordura conduz a um aumento de risco, enquanto que uma dieta rica em soja pode ser defensiva. Esta observação tem sido proposta como razão para a baixa incidência de Câncer de Próstata na Ásia.

Além disso, a gordura alimentar pode elevar os níveis de hormônios sexuais os quais, acredita-se, estão relacionados ao risco de Câncer de Próstata — uma hipótese que envolve não apenas o consumo de gordura alimentar, mas também o das vitaminas lipossolúveis A, D e E, e de oligoelementos, como o zinco. A alimentação dos homens japoneses, por exemplo, é menos rica em gordura do que dos homens nos Estados Unidos, e é interessante notar que, à medida que o teor de gordura da alimentação japonesa tem aumentado para níveis ocidentais, a incidência de câncer de próstata no Japão tem começado a aumentar. Esses achados de estudos recentes de grande porte sobre o consumo de gordura e o câncer de próstata fornecem sustentação à tese de que o risco de câncer avançado de próstata eleva-se quando o consumo de gordura animal (principalmente de gordura de carne vermelha) é alto.

Têm-se verificado que a ingestão de alimentos com muita gordura animal está relacionada ao surgimento do câncer de próstata. . Por sua vez, dietas ricas em fibras e tomate podem diminuir o risco dessa neoplasia.

Entre os fatores de proteção alimentar estão o betacaroteno e fitoestrogênios. A soja contém os isoflavanóides genesteína, daidzeína, que possuem fraca atividade estrogênica e estrutura química que lembra o 17-beta-estradiol.

## 2.0 – OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral estabelecer modelo tridimensional de cultura de organóides prostáticos para avaliar efeito de fármacos na proliferação e indução de apoptose, em células neoplásicas de próstata humana.

## 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O estabelecimento de modelo de estudo da próstata humana através de cultura de organóide.

Avaliar a arquitetura tecidual dos organóides prostáticos em modelos tridimensionais de cultivo.

Avaliar o efeito do ácido retinóico na proliferação de culturas primárias aderentes de tecido prostático humano.

Avaliar o efeito do ácido retinóico na indução de apoptose em células de organóides prostático de neoplasia e hiperplasia prostática.

## 3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à análise e sua realização foi aprovada e autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana em 17 de outubro de 2006, sendo registrado sob o protocolo 064/2006 (CAAE- 0060.0.059-06).

### 3.1 CASUÍSTICA

Foram obtidas amostras de tecido prostático de 6 pacientes atendidos no Hospital D.Pedro de Alcântara da Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana-Ba, no período de maio de 2006 a dezembro de 2007.

Os pacientes incluídos possuíam prospectivamente comprovação histológica de Hiperplasia Prostática Benigna ou Adenocarcinoma. Apesar disto uma parte do tecido coletado foi re-encaminhado para exame anatomopatológico confirmatório no laboratório Anatomia Patológica e Citopatologia - CEDAP.

Foram excluídos de nosso estudo, pacientes em uso de cateter vesical ou focos inflamatórios. Idade avançada não foi considerada fator de exclusão, desde que o paciente apresentasse condições clínicas para a realização do procedimento cirúrgico.

Todos os pacientes concordaram com a coleta e doação do material biológico descartado, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados dos pacientes estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 2 - Dados dos pacientes.

Paciente	Diagnóstico	Idade	Raça	Score de Gleason	Tecido
01	HPB	68	Afro	-	Próstata
02	Cap	72	Pardo	T1c	Próstata
03	HPB	63	Branco	-	Próstata
04	Cap	65	Afro	T1c	Próstata
05	HPB	70	Pardo	-	Próstata
06	HPB	66	Branco	-	Próstata

Há diferenças consideráveis entre as incidências relatadas de câncer clínico de próstata nos diferentes grupos étnicos. As diferenças de incidência e mortalidade entre afro-americanos e brancos têm sido atribuídas a fatores de triagem, ambientais e biológicos. Em comparação com controles brancos, os homens negros apresentam a doença com menos idade, em grau mais elevado e estágio mais avançado e com maior atraso no diagnóstico. Esse quadro tem sido atribuído a importantes diferenças de acesso à triagem, assim como a diferenças na percepção da doença e na consciência do seu tratamento, o que representa barreiras significativas à detecção precoce entre afro-descendentes.

### 3.2 – COLETA DO TECIDO

Os pacientes com comprovação histológica de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) ou Adenocarcinoma, foram submetidos à adenomectomia pela técnica de Freyer, conforme indicação técnica da equipe médica assistente. Após o procedimento, o paciente permaneceu internado, sob cuidados médico-hospitalares de rotina, até sua completa recuperação. A peça cirúrgica foi dissecada para retirada da cápsula prostática, e as amostras foram então clivadas e dela foram retirados fragmentos com tamanhos e espessuras variados (Figura 15). Deste material parte foi encaminhado para a realização de exame anatomopatológico de rotina. Os demais fragmentos foram

colocados em frasco de vidro estéril, contendo meio de transporte constituído pelo meio RPMI suplementado com 5% FCS e 200 µl de Ciprofloxacino, acondicionado numa caixa de isopor com gelo, para ser transportado ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais.



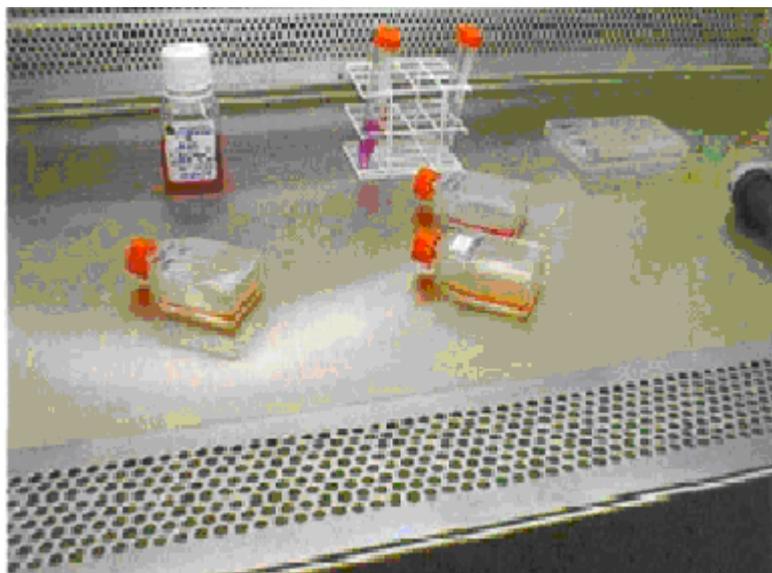
**Figura 15 – Fragmentos em diversos tamanhos e de diversas regiões da próstata.**

### 3.3 – PROCESSAMENTO E DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO TECIDO PROSTÁTICO HUMANO

O processamento foi realizado em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar. O meio de transporte foi removido e descartado. Os fragmentos de tecido foram lavados por 3 vezes com solução de PBS estéril. O tecido lavado foi colocado numa placa de Petri estéril, e usando-se tesouras, pinças e bisturis, foram removidos, resíduos de sangue ou coágulos (Figura 16). Os fragmentos de tecido foram então clivados e transferidos para uma garrafa de 25 cm<sup>3</sup> contendo 1,5 mL de solução de colagenase tipo 1 A (Sigma lote nº026K8617) por grama de tecido (Figura 17) e o processo de digestão enzimática do tecido foi mantido por agitação suave, com o auxílio de uma barra magnética no agitador, a 37°C por 5 ou 6 horas na estufa com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>.



**Figura 16 - Processamento dos fragmentos prostáticos no fluxo laminar**



**Figura 17 - Cultura primária aderente de células prostáticas humana, após digestão enzimática do tecido. Garrafas contendo solução de células e meio de cultura.**

### 3.4 - CULTURA PRIMÁRIA ADERENTE DE CÉLULAS PROSTÁTICA HUMANA.

Após 6 horas de digestão enzimática, fragmentos do tecido não dissociados foram removidos por filtração e o homogenato foi centrifugado a 1400 RPM, 4<sup>o</sup>C por 5 minutos. A seguir, o sedimento celular foi ressuspensão em solução tampão salina sem cálcio e magnésio CMF (Cálcio e magnésio livre) (1x), suplementado com 5% de FCS (soro fetal bovino, Cultilab.número da partida 012/06), e 2 µg/ml de ciprofloxacino (Bayer). Tanto o banho como a centrifugação, nas mesmas condições, foi repetido, por mais duas vezes. Em seguida, o sedimento celular foi resuspensão em 5 ml de DMEM,(Dulbecco's Modificado Invitrogen Corporation,lote1341390) suplementado a 5% com FCS e 2 µg/ml de ciprofloxacino e plaqueado em uma garrafa de 25 cm<sup>3</sup> para propagação da cultura celular.

A renovação do meio da cultura foi realizada a cada dois dias, até que as células aderentes, que formaram uma monocamada, estivessem próximas a tornarem-se confluentes. Na manutenção, o meio de cultura era desprezado, a camada celular era lavada com 3 banhos de BSS 1x, cada um deles com 5 ml, após os quais era colocado na garrafa de cultura 5 ml de DMEM suplementado a 5% com FCS e 2 de µg/ml de ciprofloxacino.

Após confluência das células a dissociação e propagação da monocamada foi realizada por ação enzimática e sub-cultivo das células. Brevemente, adicionou-se 1 ml de solução de 0.25% tripsina (Invitrogen Corporation, 1:250, lote No 1318331), e manteve-se a garrafa na incubadora a 37<sup>o</sup>C durante 2 minutos.

Após dissociação controlada em microscópio de contraste de fase (marca Leica, modelo DM IL), adicionou-se DMEM suplementado com 5% SFB à suspensão celular para inativação da atividade tripsinolítica. O homogenato celular foi centrifugado (1500 rpm/10 minutos), o sedimento celular ressuspensão em DMEM suplementado a 5% com FCS, e a concentração da suspensão celular foi então avaliada em câmara de Neubauer.

### 3.5 - CULTURA PRIMÁRIA DE ORGANÓIDES PROSTATICOS HUMANOS

Após 3 horas de digestão enzimática do tecido prostático, os organóides foram separados do homogenato tecidual total por filtração e decantação em tubos Falcon de 50 ml. Objetivando a aquisição de organóides de cerca de 300 µm de diâmetro, o homogenato total foi filtrado em malha de nylon e centrifugado a 4°C, 170g, durante 1 minuto. Descartado o sobrenadante o sedimento foi lavado três vezes com 30 ml de CMF, enriquecido com 5% de SFB e 2 µg/ml de ciprofloxacino. Em seguida à última lavagem, o sedimento contendo os organóides foi re-suspenso em 10 ml de DMEM, suplementado a 5% com SFB e 2 µg/ml de ciprofloxacino. Para cultivo não-aderente, a maioria da suspensão celular contendo os organóides foi adicionada a uma placa de 24 poços revestidos com camada de ágar. Cerca de 20 poços foram preparados previamente com 0,5 ml de ágar a 1,2 % (Invitrogen. Lote 1300 104), DMEM 2x suplementado com 5% de SFB e 4 µg/ml ciprofloxacino.

Após 48 horas a solução contendo organóides foi lavada e centrifugada por três vezes e fixado com paraformaldeído (Sigma Lot.P-6418) para processamento histológico.

### 3.6 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento histológico para microscopia óptica dos organóides: após ser colocado no paraformaldeído, foi desidratado passando por uma bateria de álcool etílico em ordem crescente: álcool 70°, 90° e 100°. Após desidratação o material seguiu para diafanização: xilol I, II e III.

A infiltração consistiu em banhos de parafina histológica I e II no material, numa estufa a 60°C.

Após a inclusão em parafina o material seguiu para a microtomia, para se obter cortes finos de 4µm. Feitos os cortes, o material cortado foi colocado em lâminas histológicas e levados para estufa a 45°C para secagem. Depois da secagem seguiu para a coloração. Para que o material pudesse ser corado, foi preciso ser desparafinizado, passando por uma bateria de desparafinização e hidratação: xilol I e II e uma bateria de álcool etílico em ordem decrescente: álcool 100°, 90° e 70°. Após a desparafinização e hidratação as lâminas foram divididas em dois grupos. Grupo 1 seguiu para a coloração pelos métodos de

hematoxilina e eosina com o intuito de se observar as características gerais do tecido.

O grupo 2 do material, foi também desparafinado para marcação e identificação de núcleos em apoptose pelo método TUNEL ( TdT mediated dUTP nick end labeling) que significa : desoxinucleotídio terminal transferase, mediado pela 5' desoxiuridina trifosfato.

Este método se baseia nas ligações específicas de nucleotídeos marcados, catalizados pela deoxinucleotidil transferase (TdT) aos terminais 3'-OH do DNA nas áreas de fragmentação, possibilitando a identificação de células em apoptose, cujas etapas são as seguintes:

### 3.7 – IMUNOMARCAÇÃO -TUNEL

As lâminas destinadas à marcação imunofluorescente, tiveram o seguinte tratamento;

Secções de 4µm foram desparafinizadas com xilol e re-hidratadas com soluções decrescentes de álcool. Permeabilização com solução de triton a 0,1%. Foi adicionado 1ml de solução de triton 0,1% em cada espécime sendo coberto com parafilme.

As lâminas recobertas com parafilme foram então colocadas em câmara úmida e levados à estufa de CO<sup>2</sup> por 8 minutos. Decorrido este tempo, foram lavadasduas vezes com BSS. As lâminas, lavadas e secas, cuidadosamente, sofrerá ação da tripsina diluída com HCL. Adicionamos1 gota de tripsina sobre cada corte,e depois cobrimos com parafilme e mantidas em estufa de CO<sup>2</sup> por 30 minutos a temperatura de 37°C.

Após esse tempo, foram lavadas 2 vezes com BSS e secas.

### 3.8 – MARCAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TOTAIS E EM APOPTOSE

Cada corte, individualmente foi recoberto com parafilme.O verso das lâminas com cortes foram marcadas com caneta tipo piloto, para facilitar a visualização do espécime. Em seguida prepara-se a mistura reacional para apoptose (TUNEL) com o kit In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein ( Roche Diagnostics Corporation Indianápolis, Ind ) Lote 11 684 795 919 na

seguinte proporção: 90 µL de solução de coloração e 10 µL da solução com enzimas.

Coloca-se 5 µL da mistura reacional sobre cada corte e veda-se com parafilme. Incubar por 60 minutos a 37° C em câmara úmida. Após esse tempo, lavar duas vezes com BSS (1x). Secar cuidadosamente com papel absorvente ou cotonetes, conforme instrução do fabricante.

### 3.9 – CONTRACOLORAÇÃO

A contra coloração foi feita com iodeto de propídio 0,2mg/ml na diluição 1/1000. (Iodeto de propídio Invitrogen, lote nº1300104)

Protegido da luminosidade, adicionamos 10µL/por corte, à temperatura ambiente por 1 minuto. Após, lavar em água destilada. Secar com cotonete, com cuidado para não ferir o corte. A lâmina foi protegido da luminosidade.

### 3.10 – MEIO DE MONTAGEM

Preparado o meio de montagem “anti desbotamento” (Pro Long Antifade Kit Invitrogen Molecular Probes lote nº 26452w). Adicionados 5 µL em cada lâmina para recobrir todos os cortes. Protegidos com lamínulas. Selado com esmalte. Avaliado no microscópio de contraste de fase invertido com fluorescência. Utilizando filtro verde, a imagem, fluorescente vermelho, que mostrou o total de núcleos. Usando o filtro azul a fluorescência verde que mostrou o número de células em apoptose.

### 3.11 –CONTAGEM DAS CÉLULAS CÉLULAS TOTAIS E EM APOPTOSE

A contagem das células totais e em apoptose foi realizada em 10 campos de maior aumento do microscópio de fluorescência (Leica modelo DM IL objetiva de 40x) em áreas aleatórias e adequadas a interpretação, isto é aquelas onde a morfologia dos ácinos estivessem bem caracterizadas, com paredes de forma contínua, tanto para a contagem das células totais, como para células em apoptose. Células em apoptose que se encontravam na luz do ácino não foram consideradas para efeito de contagem.

### 3.12 - CAPTURA DE IMAGEM

As imagens apresentadas no presente trabalho foram capturadas em uma câmara digital Sony modelo DSC/W5, 5.1 Mega Pixels, através das objetivas de 20x10 e 40x10 do microscópio de contraste de fase (Leica DM IL) do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. As imagens da imunofluorescência foram realizadas usando objetiva de 40x10 e câmara analógica Olympus PMC 350 acoplada ao microscópio de fluorescência (Olympus Bx41), do Laboratório de Taxonomia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Para identificação das células totais e em apoptose as imagens foram escaneadas e trabalhadas no programa Adobe Photoshop versão C S. 2.

#### 4.0 – RESULTADOS

Os experimentos realizados permitiram estudar a constituição e a arquitetura dos tecidos prostáticos, cultivar células e organóides da glândula, realizar testes de sobrevivência/viabilidade com ácido retinóico, estabelecer curva de proliferação e aferir, qualitativamente e quantitativamente, a proliferação e apoptose de células de hiperplasia e câncer de próstata.

Com o objetivo de avaliar o efeito do ácido retinoico na sobrevivência e proliferação de células prostáticas humana, foram realizadas curvas de crescimento na presença e na ausência da referida droga.

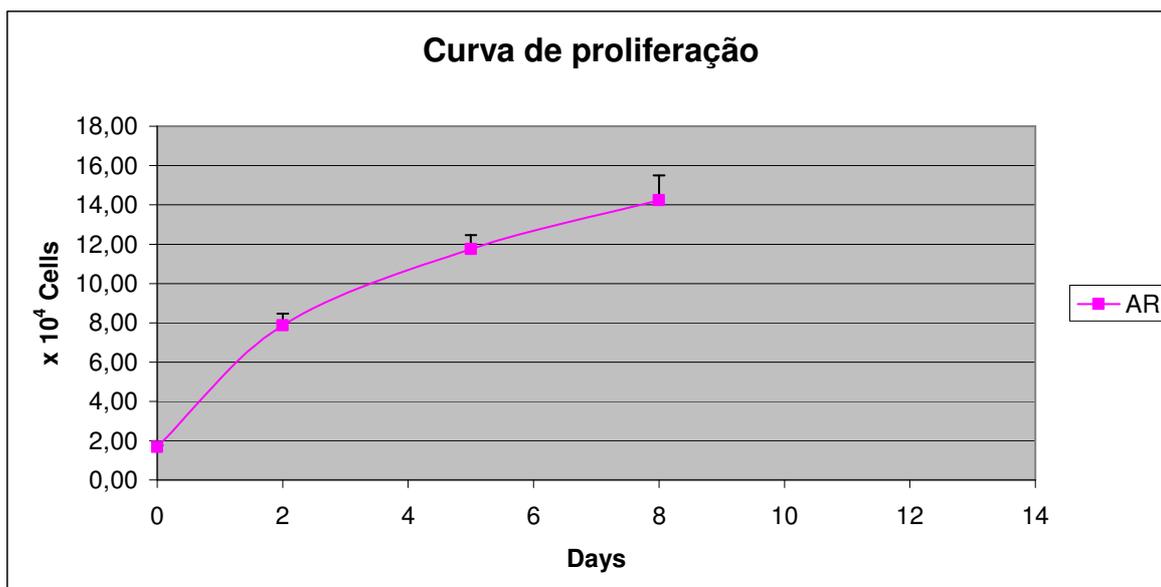
Foi utilizado neste experimento culturas primária aderente entre a segunda e quarta passagem. No dia do plaqueamento do experimento as monocamadas de células prostáticas aderente foram tripsinizadas e aproximadamente  $2.0 \times 10^4$ , células foram plaqueadas em poços com área de  $1\text{cm}^2$ . No dia seguinte se procedeu a troca do meio de cultura, DEMEM 1 x (DEMEM + FCS5% +  $2 \mu\text{g}$  de CIPRO), acrescido da droga em teste ( $10 \mu\text{M}$  de ácido retinoico).

O número total de células viáveis foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer, com azul de tripam, ao longo de 8 dias de incubação com as drogas nos seguintes intervalos:

Dia 0 (T0) dia 2 (T2) dia 5 (T5) dia 8 (T8).

Os meios de cultura contendo a droga  $10\mu\text{M}$  de ácido retinoico e o meio de cultura sem adição de droga foram substituídos a cada dois dias com lavagem da monocamada, por três vezes com 5ml de BSS (1x) entre as trocas. Em cada experimento foi reservado no mínimo quatro poços para contagem do número de células e verificação do efeito da droga em cada um dos tempos pré estabelecido para o estudo e posterior graficação da curva de sobrevivência.

A curva de sobrevivência é utilizada para determinar o potencial de um determinado agente em promover a morte ou proliferação celular. (Sogayar 2004).



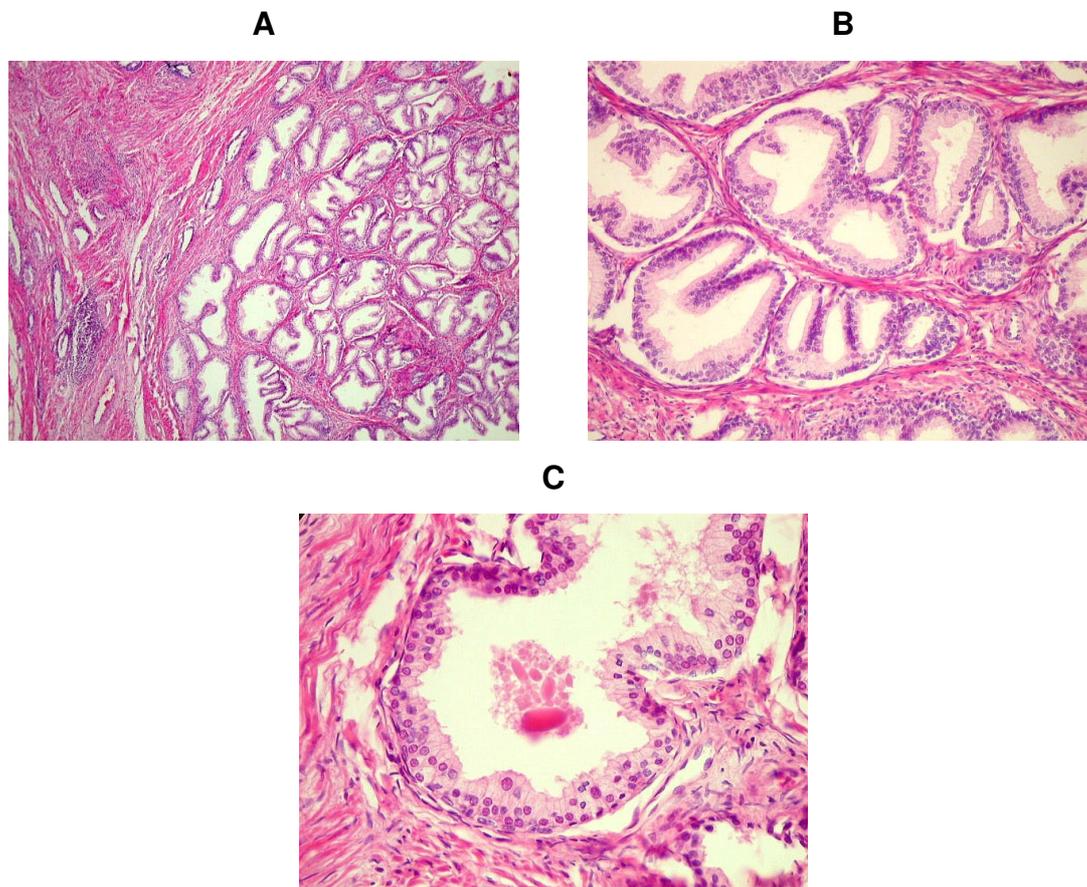
**Gráfico 1 – Curva de proliferação e sobrevivência de cultura em células aderente de próstata humana na presença de ácido retinóico.**

#### 4.1 MORFOLOGIA DO TECIDO PROSTÁTICO

O estudo do tecido prostático, tanto aquele de tecido hiperplasiado como o de adenocarcinoma, foram feitos a partir do processamento histológico, de acordo com o Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002, corados pela hematoxilina/eosina e montados em lâminas histológicas.

Nos casos de HPB (Hiperplasia Prostática Benigna) observou-se um conjunto de estruturas túbulo - alveolares, nas quais as células epiteliais encontram-se envolvidas por um estroma abundante (tecido fibromuscular e tecido conjuntivo) e um volumoso lúmen, com depósito de produtos secretórios. Observam-se nódulos, com hiperplasia bem delimitados, em sua maior parte constituídos, por estroma e glândulas (nódulos estrômato – glandulares). Em alguns cortes, apresentam hiperplasia puramente estromal e em outros glandulares. As células epiteliais são colunares com citoplasma claro de aspecto mucoso, e são mais altas que as de próstata normal. Em muitos lugares é possível observar que as glândulas são formadas por uma dupla camada de células epiteliais. A camada mais interna de células colunares

proeminentes e na camada periférica de células basais achatadas. O encontro da dupla camada tem importância para definir a benignidade do processo - que se trata de hiperplasia e não neoplasia.

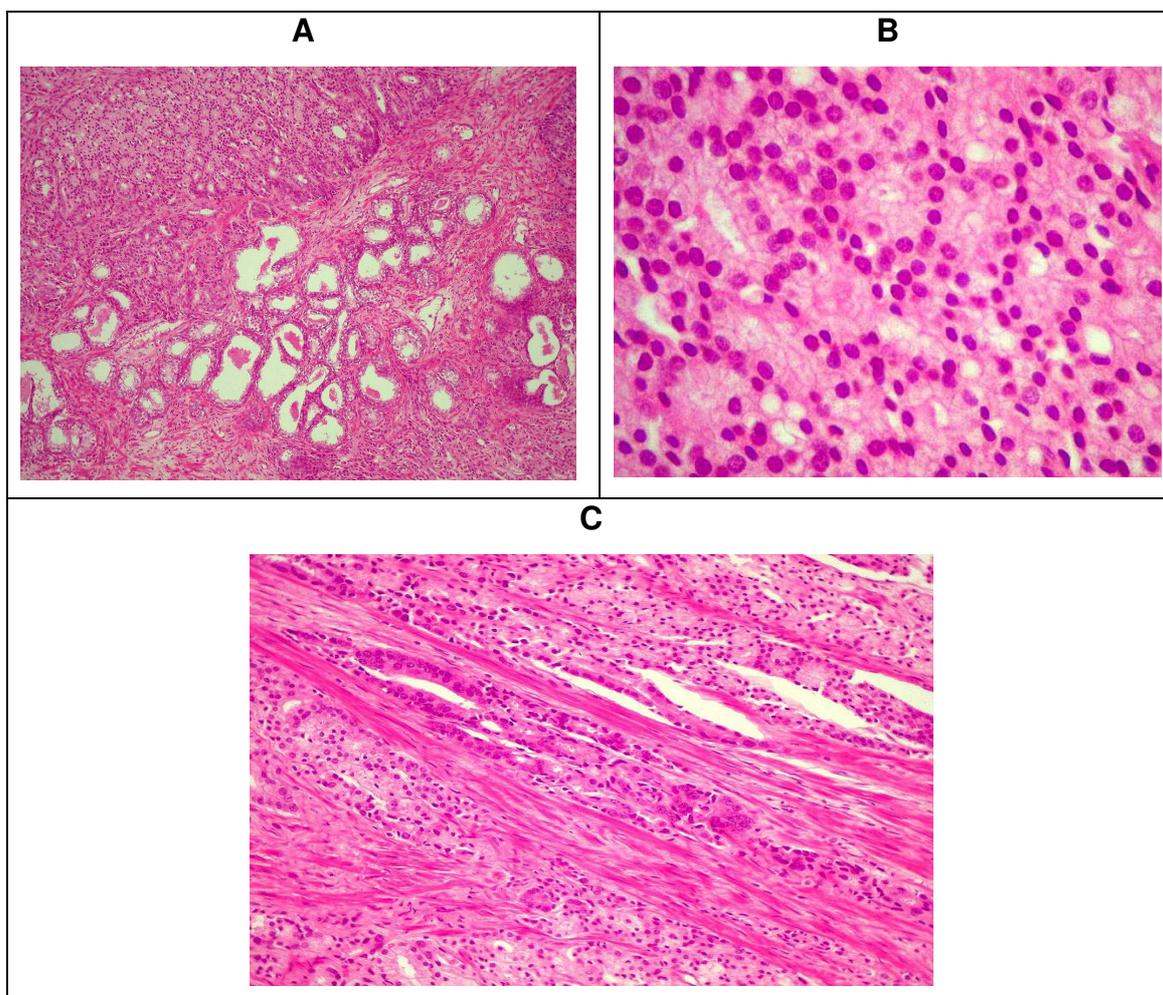


**Figura 18 -Morfologia do tecido prostático: A estrutura túbulo – alveolar envolvida em estroma abundante. B – Estruturas túbulo - alveolar dilatadas de aspecto cístico. C –Estrutura túbulo – alveolar apresentando lúmen volumoso com depósito de produtos secretórios. Corte histológico corado com hematoxilina/eosina.Registro em objetiva 200x,respectivamente**

Nos casos de estudo de adenocarcinomas observou-se que estavam constituído por células pequenas e claras com discreto pleomorfismo nuclear. Podendo estar em arranjo sólido (sem formar glândulas) ou formar microácinos glandulares dispostos muito proximamente entre si (caráter medular). O carcinoma infiltra a próstata, da qual ainda se observa algumas glândulas

remanescentes e feixe de músculo liso. Os achados histológicos incluíram desaranjo acinar, infiltrações estroma.

Os achados citológicos incluíram ausência de células basais, núcleos volumosos e vesiculados.



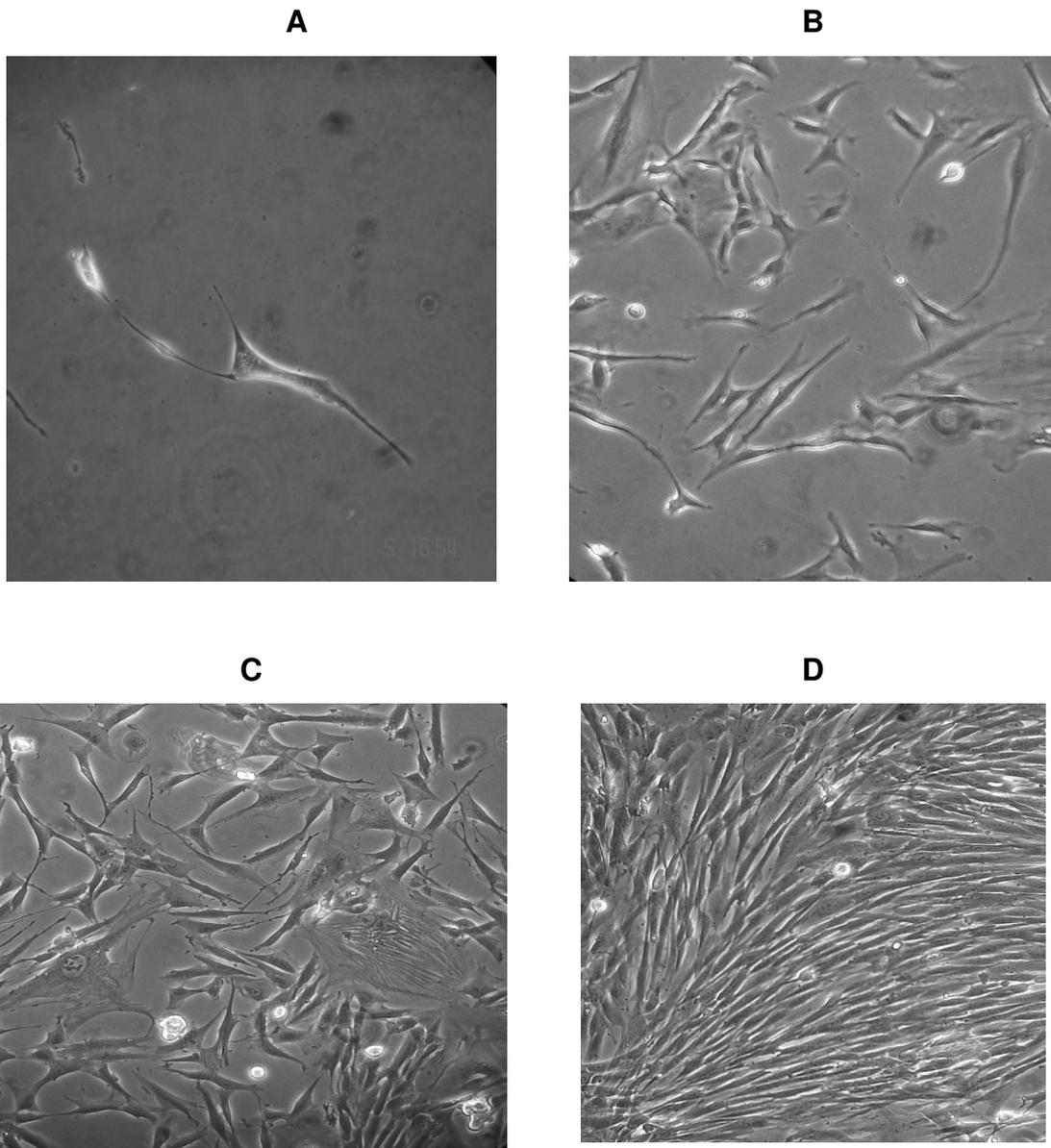
**Figura 19 – Microscopia de corte histológico de Adenocarcinoma da próstata. A – Ácinos glandulares próximos, infiltração do estroma. B – Área menos diferenciada, aspecto sólido. C – Adenocarcinoma de próstata, infiltrando a musculatura lisa. Coloração por HE, 200x respectivamente.**

## 4.2 – CULTIVO ADERENTE E MORFOLOGIA DE CÉLULAS PROSTÁTICAS

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência e proliferação das células epiteliais da próstata humana, foi realizada cultura primária aderente de células prostáticas.

Tais células apresentam frequentemente muitas propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem. Elas são acessíveis para estudar eventos que não são possíveis de serem estudados em tecidos intactos.

Após digestão do tecido prostático, o homogenato tecidual foi purificado e tanto as células isoladas como os organóides foram mantidos em meio de cultivo sobre suporte plástico aderente. Foi possível identificar células do estroma e do parênquima prostáticos e confirmar a capacidade de aderência e proliferação das mesmas, além da possibilidade de sub-cultivo. As células cultivadas em plástico exibiram um crescimento em monocamada, com morfologia epitelióide ou fusiforme, comprovando a presença predominante de células acinares/ductais e uma pequena contaminação com células estromais(Figura 20). Os organóides cultivados aderiram sobre plástico após dois dias e a partir do “cluster”, observou-se a migração de células epitelióides que formaram monocamadas sub-confluentes. Com o sub-cultivo e expansão dos organóides aderidos obteve-se uma monocamada de células epitelióides 48 horas após o isolamento dos organóides.



**Figura 20 - Cultura aderente de células da próstata humana.**

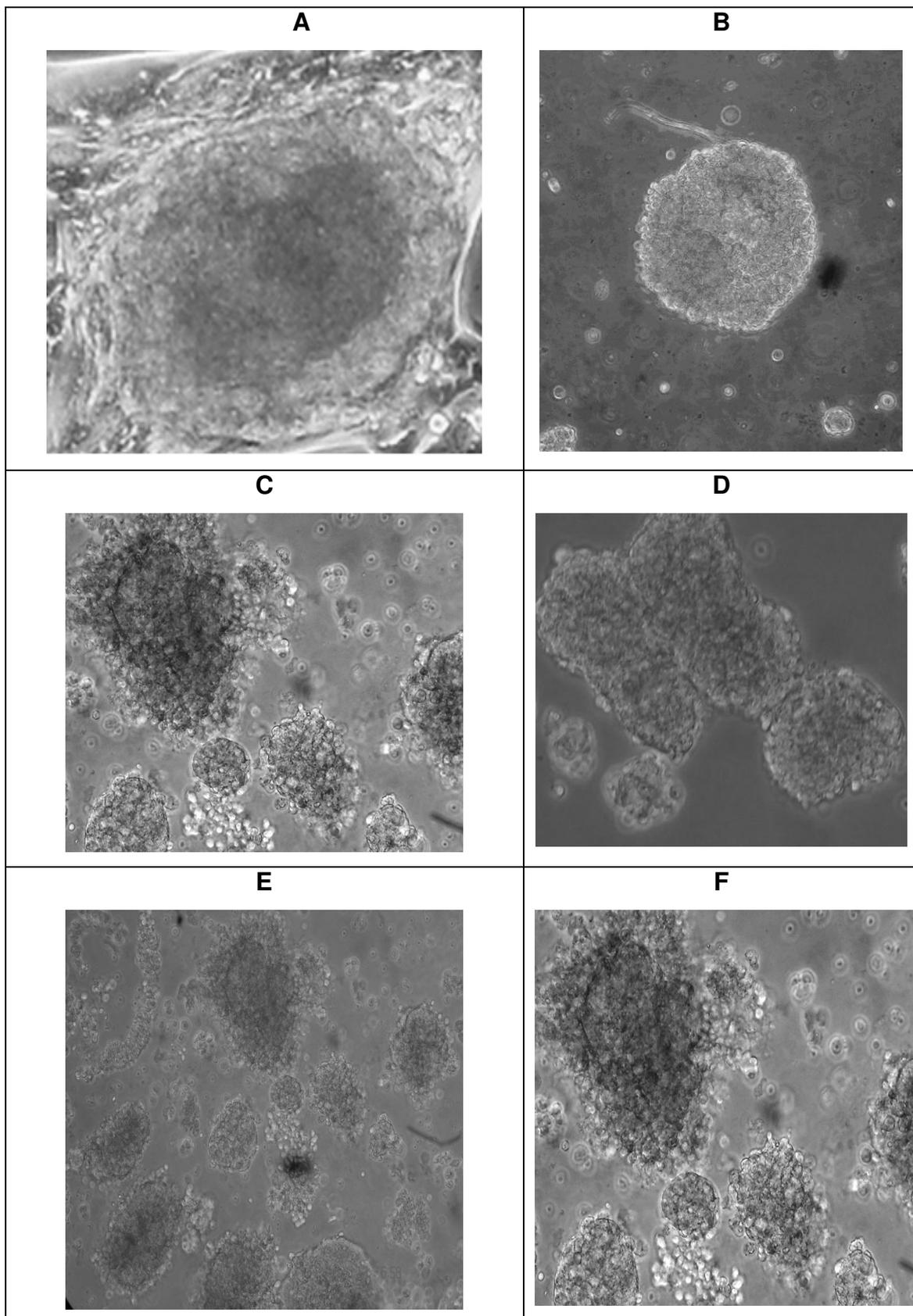
**A - Células de aspecto alongado e projeções citoplasmática, semelhantes a fibroblastos B e C - Cultura aderente de células da próstata humana. Proliferação de células com aspecto fibroblastóide. D Cultura aderente de células da próstata humana. Proliferação de células com aspecto fibroblastóide, confluyente. Registro de células cultivadas, após digestão enzimática e mecânica. Microscopia de contraste de fase invertido- 200x, respectivamente.**

### 4.3 – CULTIVO E MORFOLOGIA DE ORGANÓIDES DE TECIDO PROSTÁTICO

Os sistemas tridimensionais de cultura de células são um bom modelo para estudo dos muitos fatores que influenciam o crescimento e o comportamento celular bem como aumentar a nossa compreensão da homeostase, diferenciação celular e organização dos tecidos. Esses sistemas foram desenvolvidos por fornecer um bom modelo para analisar as interações entre células. Líquidos podem fluir através das culturas celulares permitindo que drogas e outros produtos químicos possam ser utilizados e seus efeitos medidos.

Com o objetivo de caracterizar a arquitetura dos fragmentos epiteliais (ductos e ácinos) obtidos de próstata humana, os organoides isolados foram cultivados em suspensão em meio DMEM sobre uma camada de solução de gel de ágar e todo o sistema pode ser acompanhado e avaliado por de microscopia de contraste de fase (Leyca), após serem fixados e processado por técnicas histológicas, e corados pelo método de hematoxilina/eosina e avaliados em microscópio ótico (Leyca).

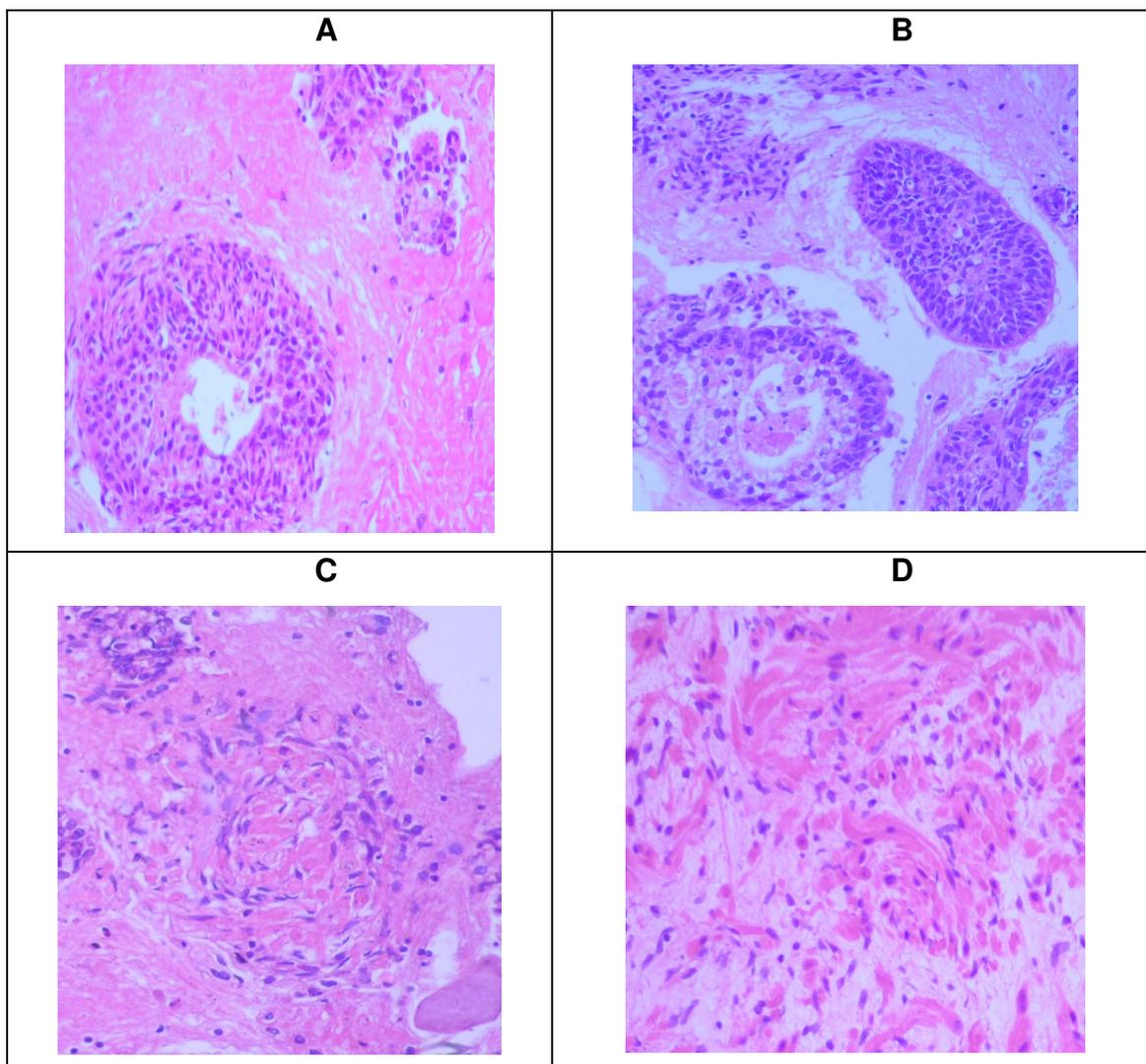
Os organóides de células da próstata humana apresentaram formato esferóide, formado pela agregação de células, sem nenhuma protusão aparente na sua superfície, com tamanhos variáveis, entre 100 e 300 micrometros ( Figura 21).



**Figura 21 - Organóides de células prostáticas.**

**Figura A – Organóide de digestão parcial de tecido prostático; B – Organóide de célula prostática isolado, apresentando agregado de células de forma esférica. C – Diversos organóides de células prostática com forma esférica e alongada. D – Organóides isolados, evidenciando a forma alongada e forma esférica. E, F – Grande organóide de forma dismórfica, e organoides pequeno na forma esférica. Organóides oriundos da digestão enzimática e mecânica de tecido prostático. Microscopia de contraste de fase invertido, 200x.**

Os achados histológicos básicos que foram observados nos organóides de HPB são análogos aos observados em análises histológicas de tecidos. Apresentam nódulos hiperplásicos bem delimitados em sua maior parte constituídos por estroma e glândulas. Em muitos lugares é possível observar que as glândulas são formadas por uma dupla camada de células epiteliais (Figura 22).



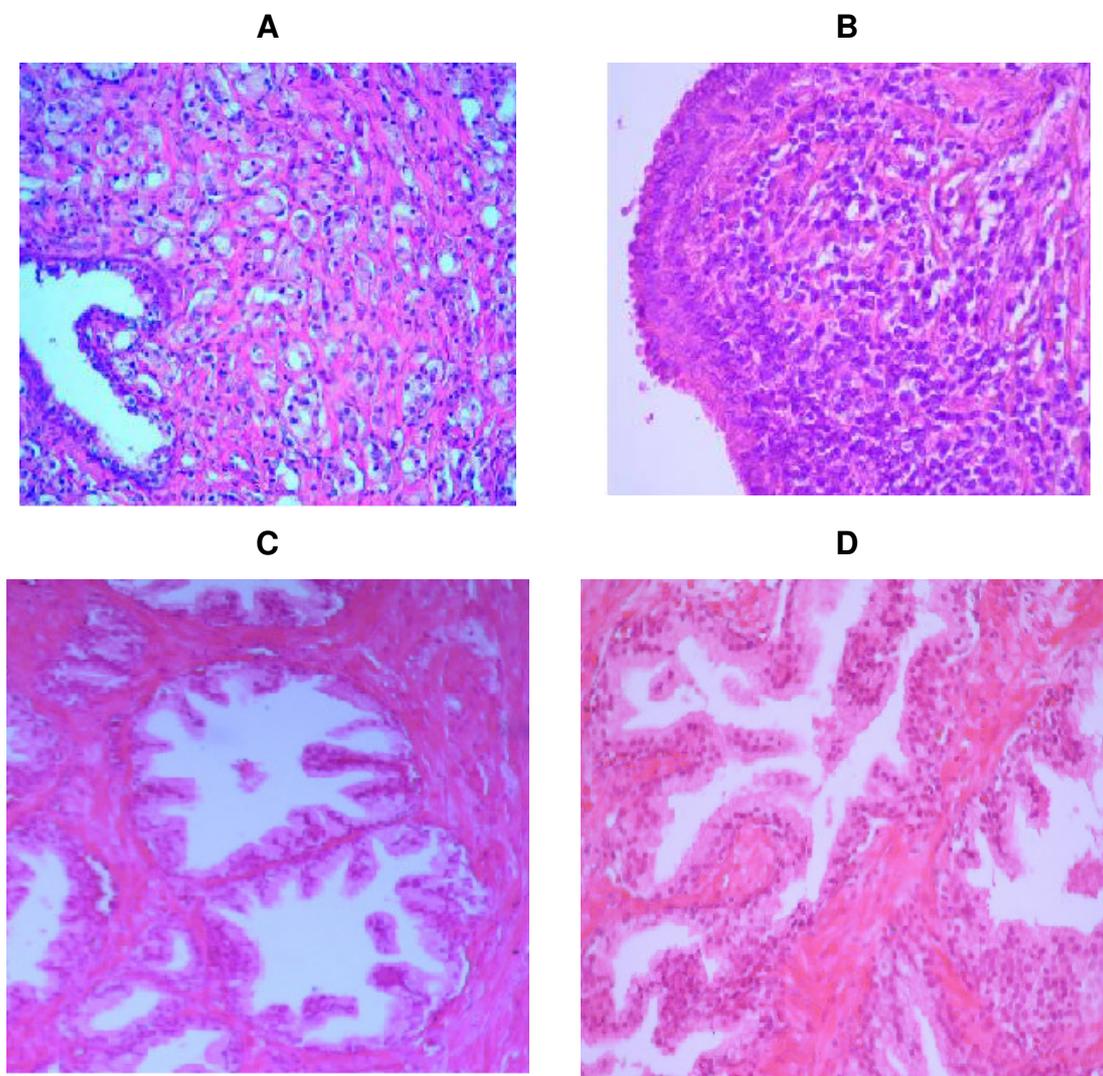
**Figura 22 – Achados básicos em organóides de Hiperplasia de Próstata Humana.**

**A – Ácino glandular de forma arredondada com hiperplasia de células basais. B - Ácino glandular, de forma alongada, com hiperplasia de células basais, preenchendo o lume glandular. Ácino de forma arredondada com lume apresentando depósito de produtos secretórios. C**

**-Estroma com aspecto nodular , apresentando infiltração de células basais . D – Estroma apresentando aspecto nodular e infiltração de células basais. Coloração por HE, e registro em objetiva 200x, respectivamente.**

A análise histológica dos organóides obtidos de HPB revelou o predomínio de estruturas tubulares, circundadas por tecido estromal escasso. A estrutura acinar ou ductal com epitélio colunar/cubóide secretório sobreposto a camada de epitélio cubóide pavimentoso, e lúmen foi mantida, indicando que não houve colapso da arquitetura durante o isolamento ou cultivo em suspensão. A maioria dos organóides apresentou aparência de esferas ocas. Nos esferóides constituídos apenas de tecido epitelial, sem a presença de tecido estromal, observou-se uma membrana delgada delimitando os limites externos do organóide.

Os achados histológicos básicos que foram observados nos organóides de adenocarcinoma(Figura 23) têm a mesma organização arquitetônica e citológica encontrados naqueles que tiveram processamento histológico de tecidos.

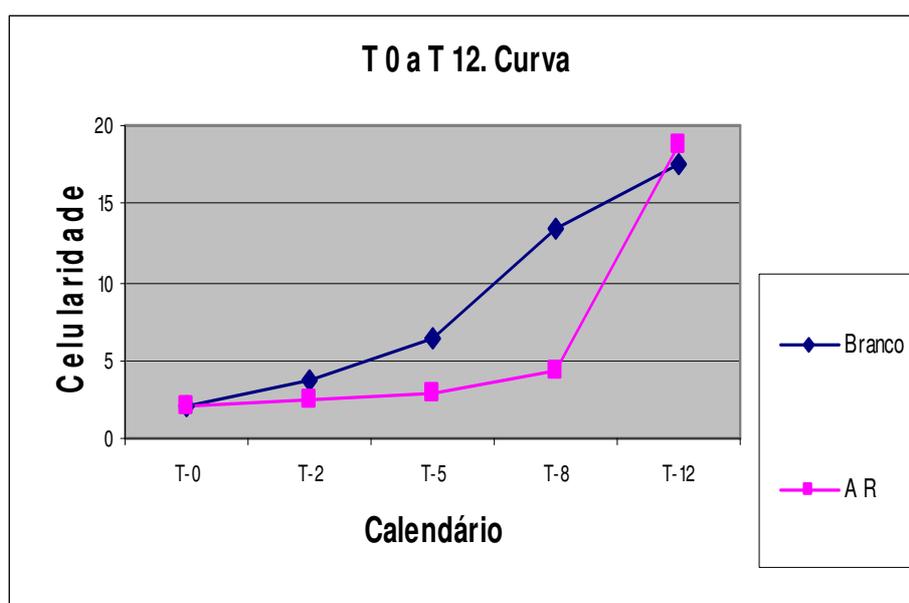


**Figura 23 -A – Adenocarcinoma de próstata com células em anel de sinete  
B - Carcinoma de próstata Grau 5 (pouco diferenciado) com diferenciação glandular mínima ou ausente, e com as células formando massas e cordões. A neoplasia infiltra o estroma adjacente. C e D – Neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (Pin de alto grau), forma micropapilar. Projeções papiliformes, com eixo constituído por estroma prostático, revestido de epitélio atípico. Coloração por HE , registro em objetiva 200x respectivamente.**

#### 4.4 EFEITO DO ÁCIDO RETINÓICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CULTURA ADERENTE DE CÉLULAS PROSTÁTICAS.

Comprovada a viabilidade das células prostáticas e organóides em cultura primária aderente, a próxima etapa consistiu na avaliação do efeito do ácido retinóico sobre a proliferação das células aderentes totais do tecido prostático.

O efeito das drogas na proliferação das células de tecido prostático em cultura foi avaliado através da adição da droga diretamente no meio de cultura (sempre na concentração de  $10\mu\text{M}$ ), contagem da células viáveis em cada grupo experimental e análise estatística. O grupo branco não recebeu droga nenhuma, enquanto o grupo controle DMSO, recebeu sempre a mesma quantidade de DMSO, que foi o solvente do ácido retinóico. Os resultados obtidos estão descritos no gráfico 2 e serviram de base para a elaboração dos gráficos de celularidade de T0 a T-2, de T0 a T-12 e na curva de proliferação.



**Gráfico 2 - Curva de proliferação de cultura aderente de tecido prostático na presença ou não de  $10\mu\text{M}$  de ácido retinoico. Resultados**

**expressos em celularidade x 10.000. Representativo de dois experimentos distintos.**

De uma forma geral o gráfico 2 demonstra que em condições controle houve aumento na taxa de proliferação após 48hs, que continuou até T12. Os resultados também demonstram uma clara inibição da proliferação celular pelo ácido retinóico até o oitavo dia de incubação.

Aos 5 dias, a condição de tratamento com ácido retinóico apresentou efeito inibitório considerável, comparado ao controle.

Aos 12 dias, a celularidade apresentou aumento, no entanto, sem apresentar diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

O efeito observado para o ácido retinóico teve relação direta com o tempo de exposição à droga, mostrando relação inversamente proporcional entre o grupo tratado, e o grupo controle, que demonstrou progressivo aumento na densidade celular.

#### **4.4.1 – AVALIAÇÃO DE APOPTOSE EM CULTURA TRIDIMENSIONAL DE ORGANÓIDES PROSTÁTICOS.**

O efeito das drogas sobre a taxa de renovação celular poderia envolver o equilíbrio entre a geração de novas células por proliferação contrabalançada pela morte de células por apoptose. Após comprovar que a droga causava diminuição no número de células, tornou-se importante investigar se esta redução deu-se por meio de indução de apoptose ou se a droga estava primariamente causando necrose celular. A próxima etapa consistiu na avaliação da indução de apoptose de células epiteliais de organóides prostáticos em cultivo tridimensional, antes e após 48 horas de incubação com os DMSO e droga em estudo,.

Os resultados obtidos refletem a análise qualitativa e quantitativa das células epiteliais em apoptose após marcação pelo método TUNEL e contra-coloração com iodeto de propídio.

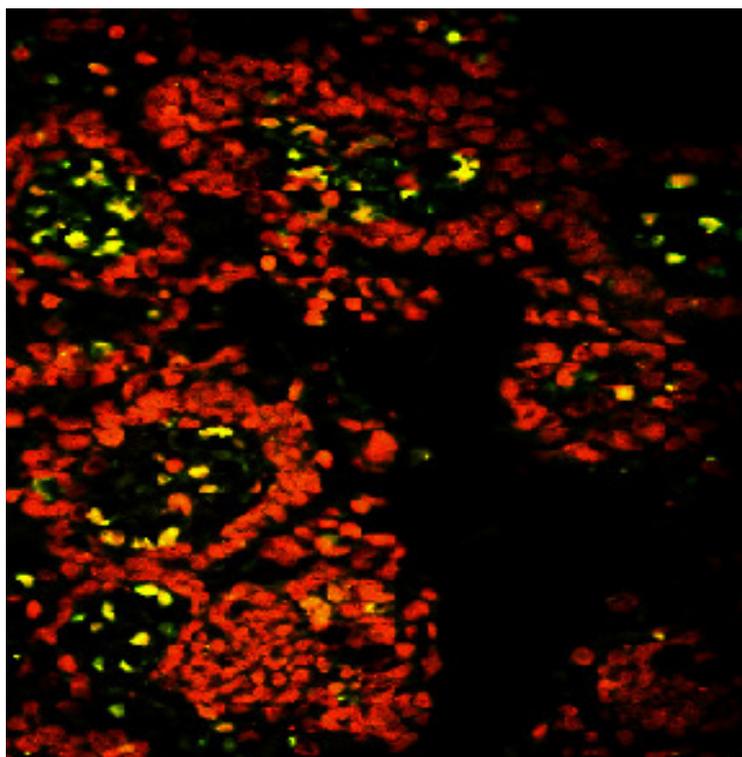
Qualitativamente observou-se a presença de células epiteliais em apoptose tanto na dupla camada epitelial de revestimento quanto no luz do ácino prostático, principalmente após incubação com ácido retinóico (Figura24).

Os resultados da análise quantitativa foram obtidos com a contagem das células totais e em apoptose de 20 ácinos de organóides antes da incubação e após 48 horas de cultivo com ácido retinóico e condições controle.

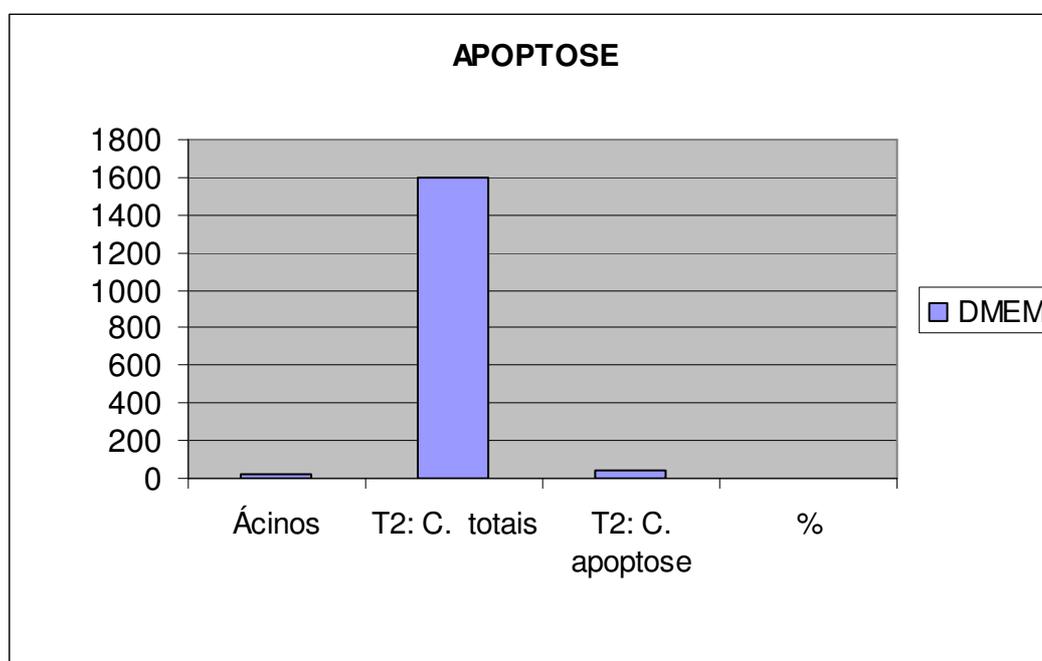
Na tabela 3 estão consolidados os resultados da contagem antes da incubação com ácido retinóico. Esses resultados estão também demonstrados no gráfico 2 e as imagens das células totais e em apoptose podem ser visualizadas nas figuras 24 e 25.

**Tabela 3 - Exibe o percentual de células em apoptose 48 hs após a dissociação enzimática do tecido prostático**

<b>Drogas/células</b>	<b>Ácinos</b>	<b>Células totais</b>	<b>Células em apoptose</b>	<b>%</b>
<b>DEMEM</b>	<b>20</b>	<b>1600</b>	<b>41</b>	<b>2,56</b>



**Figura 24 - Experimento Inicial: Células que se encontravam em apoptose no momento da dissociação por digestão enzimática. Marcação pelo método de TUNEL e contracoloração por Iodeto de Propídio. Em vermelho células totais. Em verde, células em apoptose. Microscopia de contraste de fase invertido com fluorescência - 400x.**

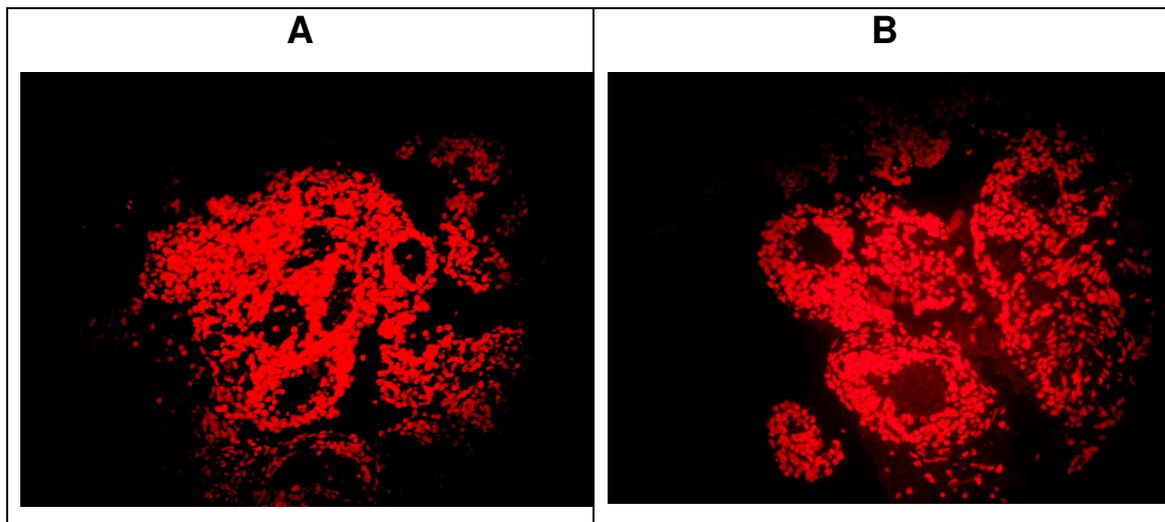


**Gráfico 3 - Comparativo entre o número de ácinos, número de células totais e número de células que se encontravam em apoptose no momento em que o tecido foi dissociado por digestão enzimática para cultura tridimensional de organóides prostáticos.**

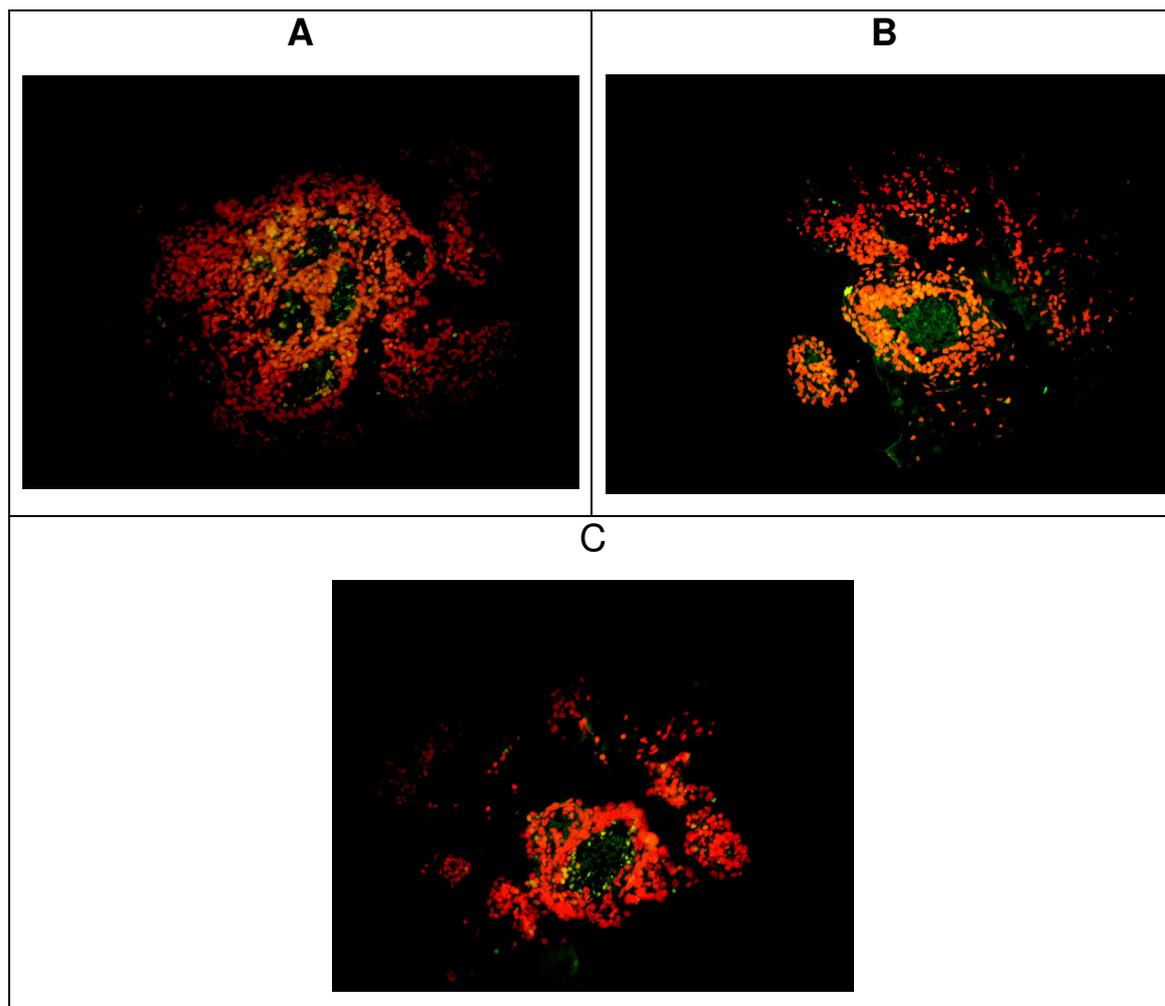
A tabela 4 demonstra o índice de apoptose em cultura tridimensional de organóides prostáticos quando incubados por 48hs com 10 $\mu$ M ácido retinóico e em condições controle. A análise qualitativa foi feita com base na comparação da marcação das lâminas estudadas com controles sabidamente positivos e negativos para os marcadores determinados. A análise foi realizada em campos definidos, observando-se, ácinos glandulares, bem formados, e escolhidos de forma aleatória. Para a contagem das células em apoptose, foram observados 20 ácinos glandular. As imagens, de cada campo, foram vista com microscopia de contraste de fase invertido, com aumento de 400 x e contadas com hemocitometro. Os corpos apoptóticos encontravam-se corados em verde. Foram quantificadas células totais do tecido glandular e células apoptóticas.

**Tabela 4 - Comparativo entre percentual, número de células totais, células em apoptose incubadas com meio de cultura e na presença de 10 $\mu$ M do ácido retinóico incubadas por 48 horas.**

	<b>ÁCINOS</b>	<b>CÉLULAS TOTAIS</b>	<b>CÉLULAS EM APOPTOSE</b>	<b>%</b>
<b>DMEM</b>	<b>20</b>	<b>1639</b>	<b>46</b>	<b>2,81</b>
<b>AR</b>	<b>20</b>	<b>1573</b>	<b>35</b>	<b>2,2</b>



**Figura 25 - A e B - Organoides de tecidos prostáticos marcados pela técnica de TUNEL com fluorescência A – Organoides obtidos por digestão enzimática e mecânica. Observa-se vários ácinos prostáticos bem definidos, e luz glandular. Em vermelho vêm-se as células totais. Condição controle. B - Organoides obtidos por digestão enzimática e mecânica. Observa-se vários ácinos prostáticos bem definidos, e luz glandular. Em vermelho vêm-se as células totais. Condição controle. Registro em microscopia de contraste de fase com fluorescência, objetiva de 400x.**



**Figura 26 — Organoides prostáticos obtidos por digestão enzimática e mecânica de fragmentos prostáticos, marcadas células pela técnica de TUNEL e contracoras por Iodeto de Propídio. Microscopia de contraste de fase com fluorescência. Objetiva de 400x, respectivamente.**

**A- Em vermelho, células com a formação de vários ácinos glandulares. Em verde, núcleos apoptóticos.**

**B- Em vermelho temos ácino glandular bem formado, vendo-se na luz grande quantidade de núcleos apoptóticos.**

**C- Em vermelho vê-se um ácino glandular bem formado. Em verde vemos células em apoptose contornando a luz glandular.**

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As doenças da próstata tem sido motivo de grande interesse por parte de pesquisadores em face aos elementos envolvidos ,e dos transtornos causados, quer seja de ordem psicológica quer seja de ordem de saúde pública.

Uma das grandes dificuldades dos pesquisadores é encontrar um modelo de estudo, que preserve as condições do tecido original tanto anatômico ,como funcional.

O sistema de cultura tridimensional de células da próstata humana pode ser usado em uma variedade de aplicações, e sem dúvidas pode ser a solução para este problema.

O desenvolvimento deste modelo de estudo, a partir da cultura de organóides prostáticos humanos, não encontra similar na literatura.

Elucidando o mecanismo de certas doenças, estudando o mecanismo por qual a droga ou fatores de crescimento atua, diagnosticando e monitorando o tratamento de câncer em um paciente, terapia gênica e a produção de produtos biologicamente ativos.

A capacidade de diferenciação do ácido retinóico tem despertado grande interesse pelo potencial terapêutico do mesmo, para tratamento de uma variedade de tipos de câncer (SHELTON et al., 2006)

Estudos têm demonstrado que o ácido retinóico é capaz de produzir uma maior diferenciação fenotípica em vários tipos de

células, sendo também efetivo em reduzir, atrasar ou prevenir as transformações neoplásicas e promover a regressão de alguns tumores “in vivo “ (NILES,2000).

Concluimos que os resultados encontrados neste trabalho atendem aos nossos objetivos:

No que diz respeito ao estabelecimento de modelo de cultura de organóides;

Na validação do modelo para estudo dos tecidos da próstata, validação do modelo de cultura para estudos farmacológicos.

## PERSPECTIVAS

Este modelo parece ser muito promissor para cultura de tecidos humanos onde os padrões histológicos da cultura tri-dimensional são semelhantes aos observados nos padrões histológicos em tecidos, quanto a morfologia e disposição das células que compõe o epitélio glandular e estromal do tecido prostático diferentemente dos observados em cultura convencionais, como em monocamada.

Este fato vem demonstrar que este modelo é factível para o estudo da próstata humana.

Este modelo pode ser muito importante nos ensaios terapêuticos de quimio-prevenção.

Aplicação do modelo para avaliar o efeito de ácido retinóico em epitélio da próstata humana.

Também pode ser usado para teste com drogas na busca de novos agentes terapêuticos para tratamento das desordens proliferativas da próstata.

**APÊNDICE****TÉRMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nós, Jorge Roberto Tavares Almeida (pesquisador responsável, e Radovan Borojevic (pesquisador colaborador e orientador), aluno do Mestrado do Programa Minter em Ciências Morfológicas, estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar O EFEITO DE RECEPTORES NUCLEARES DO GRUPO RETINOIDES NA INDUÇÃO DE APOPTOSE EM TECIDO PROSTÁTICO.

Os resultados desta pesquisa poderão oportunizar esta substância do grupo retinóides como químio - preventivo em adeno - carcinoma de próstata.

Se você consentir, o descarte resultante de sua prostatectomia será utilizado no experimento deste projeto. Os pesquisadores asseguram seu anonimato, isto é, ninguém saberá que foi você que forneceu material, buscando respeitar a sua integridade moral, social e cultural.

Você pode desistir ou anular este consentimento em qualquer fase da pesquisa.

As despesas do projeto são de responsabilidade do Programa Mestrado Fora de Sede e do pesquisador colaborador.

No momento em que houver necessidade de esclarecimento de qualquer dúvida sobre sua participação na pesquisa, você pode entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones ( 75 ) 3221-7378 , (75 ) 8109 9977, ( 71 ) 3245 8602. Após ter sido informado sobre os objetivos da pesquisa , caso concorde em participar ,você pode autorizar ou não que o material coletado sejam utilizados para fins científicos. Sendo assim, se você concordar, por sua livre vontade, em participar da pesquisa, assine este termo de consentimento ficando com uma cópia do mesmo.

Feira de Santana-----de -----de 2007

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGHA, A, H, SCHECHTER E, ROY J, B, CULKIN D, J: Prostate specific antigen is metabolized in the liver .**J Urol**;155 -1332-5 . 1996
2. ABRAHANSEN, PA., Neuroendocrine differentiation in prostate carcinoma. **Urologic Oncology** 5. 168 - 172
3. ALBERTS, B et al; **Biologia Molecular da Célula** -4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médica 2004.
4. ANURADHA, C. D.; KANNO, S.; HIRANO, S. Oxidative damage to mitochondrial is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL60 cells. **Free Rad. Biol. & Med.**, n. 31, p. 367-373, 2001.
5. ARANDA, A. PASCUAL, A. **Physical Review**, 81: 1269:1304. 2001
6. ARMBRUSTER, D.A. Prostate-Specific Antigen: Biochemistry, Analytical Methods and Clinical Application Clin. **Chem.** V. 39, n. 2, p. 181-195, 1993.
7. BALL, G.F.M. **Bioavailability and analysis of vitamins in Foods**. Chapman & Hall, London, p.115-161. 1998.
8. BANKHOFF H.: Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. **Prostate** 8: 18-22. 1998.
9. BANKHOFF H, REMBERG, K: Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostate growth; a stem cell model; **Prostate** 28:98-106c. 1996
10. BEGLIOMINI, H. **Geriatrics: Fundamentos, clinica e terapeutica**; Hiperplasia Prostática Benigna, Cap. 43 pag 475 2<sup>a</sup>Ed São Paulo: Editora Atheneu, 2005

11. BIERHOFF, E.; WALLJASPER, U.; HOFMANN, D.; VOGELI, J.; WERNET, N. & PFEIFER, U. Morphological analogies of fetal prostate stroma and stromal nodules in BPH **Prostate**31:234-40,1997.

12. BRENTANI RR. CARRARO DM. VERJOVSKI-ALMEIDA S. REIS EM NEVES EJ. DE SOUZA SJ, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit RevOncol Hematol** ; 54(2):95-105. 2005.

---

13. BOCCON-GIBOD, L. Aumento do PSA com biópsias negativas. Simpósio Satélite da Astra Zeneca, Genebra, v. 1, p.4-5, 2001.

14. BOGLIOLO, LUIGI. Patologia, cap. 18 p. 514 – 537, 6 ed. 2000.

15. BRITON. G. **Fseb** J. 9:1551-8

16. BLOMHOFF, R. Introduction: overview of vitamin A metabolism and function. In: Vitamin A in Health and Disease (ed Blomhoff R) pp. 1-35. **Marcel Dekker**, New York. 1994.

17. BROWN T.R.;SCHERER P.A.;CHANG V.T.;MIGEON C.J.;GHIRRI P.;MURANOK.Molecular genetics of human androgen insensitivity. **Eur J Pediatr**. 152:62-9. 1993

18. CADEDDU, J. A.; PEARSON, J. D.; LEE, B. R.; LANDIS, P.; PARTIN, A. W.; EPSTEIN, J. I. & CARTER, R. H. B. Relationship between changes in prostate-specific antigen and the percent of prostatic epithelium in men with benign prostatic hyperplasia. **Urology**, 45:5, 1995.

1. CARDOSO, I.C.R. et al. Utilização do antígeno prostático específico (PSA Livre e Total com o marcador tumoral no diagnóstico de câncer de próstata e hiperplasia benigna prostática). **News Lab**. V. 36, p. 114-122, 1999.

20. CATALONA, W.J.,SMITH D.S.,WOLFERT R.L, WANG T.J,RITTENHOUSE H.G,RATLIFF T.L,et al.,Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening.**JAMA**;274:1214-20 1995.
21. CARDOSO, L. E. M.; COSTA, W. S. & SAMPAIO, F. J. B. Stromal Modifications in Benign -Prostatic Hyperplasia as Evidenced by Glicosaminoglycan Composition. **Braz. J. Urol.**, 26:630-4, 2000.
22. CHAGAS, M. A.; BABINSKI, M. A.; COSTA, W. S. & SAMPAIO, F. J. B. Stromal and acinar components of the transition zone in normal and hyperplastic human prostates. *Brit. J. Urol.*, 89:699-702, 2002.
23. CHAMBRON, P. **FASEB J.**10:940-54 (1996)
24. CHAU P. TRAN, CONNIE LIN, JOYCE YAMASHIRO, ROBERT E. REITER. Prostete stem cell antigen is a marker of lote intermediate prostate epithelial cells **Molecular Cancer Research** .V 1, 113-121,December 2002.
25. CHEN J Y, CLIFFORD J,ZUZI C, STARRET J, TOETOLANDI D, OSTROWSKI J, RECEZEK P R, CHAMBON P, GRONEMEYER H. Two distinct actions of retinoid – receptor ligands.**Nature**, v,382,n 6594,p.819 -22,1996.
26. COTRAN R.S; KUMAR,V.;COLLINS,T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª Ed.Rio de Janeiro:Guanabara Koogan 2000-1400p.
27. COWARD KH. Influence of light and heat on formation ofvitamin A in plant tissues. **J Biol Chem** 72: 781-799, 1927.
28. CROWFORD, E.D. Epidemiology of prostate câncer.**Urology**, 22:62 (6) suppl 1 347:312 .2003.
29. COOPER, GEOFREY M. **A célula: uma abordagem molecular**/Geofrey M.Cooper. Trad.Itabajara da Silva Vaz Junior et.al,;2ªEd.Porto Alegre;Art Med Editora, 2001.
30. CRITZ, F. et al .The Facts About Prostate Cancer. Radiotherapy Clinics of Georgia,Atlanta,USA, **Journal of Clinical Oncology** , 2000.

31. CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, n. 265, p. 49-72, 2002.
32. DEIGNER, H. P.; HABERKOM, V.; KINSCHERF, R. Apoptosis modulation in the therapy of neurodegenerative diseases. **Expert. Opin. Investing. Drugs**, n. 9, p. 747-764, 2000
33. DINIZ, D. G. A. et al.; Isotretinoína: Perfis farmacológico, farmacocinético e analítico-RBCF Brazilian Journal of Pharmaceutical **Sciences**. V, 38 nº4 out/dez 2002.
34. FOSSLIEN, E. Review: Mitochondrial medicine - Molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, n. 31, p. 25-67, 2001
35. FRANCO, S. Avanços Metodológicos em Diagnóstico de Câncer de Próstata: PSA Livre e Total Disponível em: <http://www.sergio-franco.com>
36. FURR HC, BARUA AB, OLSON JA. Retinoids and carotenoids. In: Nelis HJ, Lambert WE, DeLeenheer AP, eds. Modern chromatographic analysis of the vitamins. 2nd ed. New York: **Marcel Dekker**,;1-71. 1992
37. GIGUERE, V.; ONG, E.S.; SEGUI. P.; EVANS, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. **Nature**, v. 330, p. 624-629, 1987.
38. GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. **Crit. Rev. Eukaryot Gen Expr.**, n. 10, p. 231-239, 2000.
39. GRAY, H. **Anatomia**, tomo II, 35ª ed. Editora Guanabara Koogan ,1979
40. GLEAVE, M .et al. PSA como preditor de prognóstico para câncer de próstata. <http://www.uronews.org.br> [citado em 23 /05/2000].

41. GRONEMEYER, H and LAUDET, V. **Protein Profile** 2: 1173-08 .1995.
42. GUILLAN, J. C. & LEQUEU, B. **As vitaminas: do nutriente ao medicamento**.1 ed. São Paulo : Livraria Santos Editora, p.357, 1995.
43. HARA, M. INORRE, T. FUKUIAMA, T. Some physico-chemical characteristics of gamma-serinoprotein, na antigen component specific for human seminal plasma.**J.J.Legal Méd**.5: 322-324. 1971.
44. HARRISON E.H, Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A **Annu Rev Nutur.**,v.25,p. 87 -103,2005.
45. HEALLHCOTE, J.G.; GRANT,M.E.The molecular organization of basement membranes, **Int Rev Connect Tissue Res**,9:191,1981
46. HYNES, RO. Integrin:Versatility,moderation and signaling in cell adhesion. **Cell**. V.69 p 11, 1992
47. HUDSON -D.L - **Prostate Cancer and Prostatic Disease** 7,188-194 doi:10.1038/sj.pean 4500745. (2004).
48. HUDSON, D. L., - **Methods in Molecular Biology** v 188. Epithelial Cell Culture Protocols. Introduction to cell and tissue culture. Cap 5: Standard cell techniques- Edited by Clare Wise 2004.
49. HUMPHEY, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate- **Modern Pathology**, 17:292-306. 2004
50. IOACHIM,E.,CHARCHANTIA.,BRIASOULIS, E.;KARAVASILIS,V.;TSANON,H.;ARVANTIS,D.L.;AGNANTIS,N.J.;PAVLIDIS,N .Imunohistochemical expression of extra cellular matriz components tenascim,

fibronectin, collagen tipo 1V and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumor invasion and progression. **European Journal of Cancer**, v.38, p 2362-2370. 2002

51. ISAACS JT. Molecular markers for prostate cancer metastasis. **Am J Pathol**; 150:1511-21. 1997

52. ISAACS, JT., COFFEY D.S. Etiology and disease process of benign prostate hyperplasia. **Prostate** 2 (spp) 33-50. 1989

53. IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Tentative rules, section on trivial names of miscellaneous compounds of importance in Biochemistry. **J. Biol. Chem, Berlin** v241 n°11 p 2987-2988 .1966.

54. IUPAC –IUB. Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of retinoids. **J. Biol. Chem; Berlin**, v.258, n°9, p5329-5333, 1983

55. KALACHE A.; VERAS, R. P.; RAMOS L. R. Envelhecimento da população mundial: Um desafio novo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 200-210, 1987.

56. KESSEL, R.G. **Histologia Médica Básica**. A histologia das Células, Tecidos e Órgãos. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. cap 23 p 481-2.2001

57. KARRER, P. Chemical relation of carotenoid and vitamin A. **Arch Dis Biol** 18:30-39 .1933

58. KLIEVER, S.A.; UMESOMO, K.; MANGELSDORF, D.J.; EVANS, R.M.; Retinoid x receptor interacts with nuclear receptor in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signaling. **Nature**, v355 p.446-449.1992

59. KLIEVER, S.A.; LEBMANN J.M. AND WILSON T.M. **Science** 284:757-60

60. KUPFER S.R. **Male pseudohermaphroditism Semin Perinatol**; 16:319-31.1992.

61. KUSIAK, J.W., IZZO, J.A., ZHAO, B. Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? **Mol. Chem. Neuropathol.**, n. 28, p. 153-162, 1996.
62. LABRIE, F. SUGINATO Y, LUU-THE V, SINARD J, LACHANCE Y, BACHVAROV D, LEBLANC O, DUROCHER F, PAQUET N, **Structure of human type II 5 alpha – reductase gene.** *Endocrinology* sep;131 (3):1571 – 3.1992.
63. LEE, C.; KOZLOWSKI KI J.M.; Etiology of Benign prostatic hyperplasia. **Urol Clin Am** 22 (2) :237-46. 1995
64. LOWSLEY, O. S. The development of human prostate gland with reference of the development of other structures and the neck of the urinary bladder. **Am. J. Anat.**, 13:299-349, 1912.
65. LOCHTER, A.; BISSEL, M. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Cancer Biology**, v.6, p 165-173, 1995.
66. LUBAHN D.B.; JOSEPH, D. R.; SULLIVAN PM.; WILIARD H.F.; FRENCH PS.; WILSON, E.M. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization X chromosome. **Science**. 240 :327-30. 1998
67. MACHLIN, L, J (ed) **Handbook of vitamins.** Marcel Dekku, Inc, p . 1 -57, 1990.
68. MANGELSDORF, D. J, ONG, E.S., DYCK, J.A., EVANS, R.M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. **Nature.**, London., v.345 n. 6272, p.224 – 229, 1990.
- 69...ANGELSDORF, D.J, UMESONO, K., KLIEVER, S.A., BORGMEYER, U., ONG, E.S., EVANS, R.M. A direct repeat in the cellular retinol- binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. **Cell** , Massachusetts, v.66 .n.3, p.555 – 561, 1991.

70. MC COLLUM & DAVIS, M. The necessity of certain lipins in the diet during growth. **J Biol Chem** 15: 107 -175. 1913
71. McNEAL, J. E. Regional morphology and pathology of the prostate. **Am. J. Clin. Pathol.**, 49:347,1968.
72. McNEAL, J. E. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 145:27, 1984.
73. McNEALI, J. E. Prostate. In: SS Sterenberg (Ed), **Histology for Pathologists**. 2nd, Chap 42, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. pp 997-1017
74. MOHSIN, S.K.; WEISS, H.L.; GUTIERREZ, M.C.; CHAMMESS, G.C.; SCHIFF, R, DIGIOVANNA, M.P., et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. **J Clin Oncol**; 23 (11):2460-8 Epub 2003 Feb 14. 2005
75. MOORE, K. L. - **Embriologia Clínica**. 6 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 13: 20 Capítulo 13-p 249-283 2000.
76. MINOR, R.R. Collagen metabolism **An J Pathol**, 98:255,1998
77. NILES , R. M. Recent advances in the use of vitamin A ( retinoids ) in the prevention treatment of cancer **Nutrition** , v. 16, n.11 – 12p. 1084 -9, 2000.
78. OUDEN, V.D. et al Radical prostatectomy as a monotherapy locally advanced (stage T3) prostate cancer. **J.Urol.**v. 151, n. 3, p. 646-51, 1994.
79. OLSON, J.A.; Caratenoids and human health. **Arch Latinoam Nutr** 49:7S-11s, 1999
80. OLSEN, J.A.; KRINSKY, N.I. **FASEB** 9 1547-50. 1995
81. OLSEN, D.R.; PELTONEN, I.; JAAKKOLA, S. Colagen gene expression by cultured human skin fibroblasts. Abundant steady-state levels of type V1 procollagen messenger RNAs, **Clin Invest**, 83: 791-795, 1989
82. OSBORNE, T.B & MENDEL J.B. relation on growth to diet. **J Biol Chem**. 16: 423-424. 1913 PARKER S. L., DAVIS K. J., WINGO P.A., RIES L.A., HEATH.

C.W.Jr. **Cancer statistic by race and ethnicity.** C A Cancer J Clijan.-Feb;48 (1) : 31- 48.1998.

83. OTTAWAY , P.B. **The technology of vitamins in food.** 1 ed Cornwall, Blacie Academic, p.91 – 92, 1993.

84. PEEHL D.M Primary cell culture as models of prostate câncer development-**Endocrine Related Câncer**-12.19-47 - (2005)

85. PETKOVICH,M., BRAND,N.J.;KRUST,A.;CHAMBORD,P.A. Humam retinoic acid receptor wich belongs to the family of nuclear receptors.**Nature**,v.330,p 444-450,1987.

86. PRADHAN, B. K. & CHANDRA, K. Morphogenesis of Nodular Hyperplasia-**Prostate.** J. Urol., 113:210-3, 1975.

87. PRICE, H.; McNEAL, J. E. & STAMEY, T. A. Evolving patterns of tissue composition in benign prostate hyperplasia as a function of specimen size. **Hum. Pathol.**, 21:578-85, 1990.

88. RO, J. Y.; GRIGNON, D. J. & AMIN, M. B. **Atlas of Surgical Pathology of the Male Reproductive Tract.** Philadelphia, Saunders, 1997.

89. SAGNIER PP, MAC FARBANE G, RICHARD F, BOTTO H,TEILLAC P, BOYLE P. Results of an epidemiological Suurvey using a modified American Urological Association Synpton index for benign prostatic hyperplasia in France. **J. Urol** 151 (%) 1266-70 May 1994.

90. SALDANHA, L. B.; CAVALCANTI, F. D. B. C. & ARAP, S. **Atlas de patologia da próstata.** São Paulo, Sarvier, 2000.

91. SALVAJOLI, J.V., **Radioterapia em Oncologia**, São Paulo: MEDSI, 1999, 1243P.

92. SAMPAIO, F. J. B. Neoplasia prostática: conceitos anatômicos fundamentais para a compreensão da patologia benigna e maligna. **J. Bras. Urol.**, 18:121-5, 1992.

93. SCALETSCKY, R. E. M: Classificação, patologia e estradiamento do câncer de próstata In: Wroclaswski, E. et. al. **Guia prático de urologia**. Editora Segmento; Rio de Janeiro. SBU – Sociedade Brasileira de Urologia, 134 : 451-455, 2003.
94. SHAPIRO, E.; BECICH, M. J.; HARTANTO, V. & LEPOR, H. The relative proportion of stromal and epithelial hyper-plasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. **J. Urol.** 147:1293-7, 1992.
95. SHAPIRO, E.; HARTANTO, V.; PERLMAN, E. J.; TANG, R.; WANG, B. & LEPOR, H. Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that bph is not a unique stromal process. **Prostate**, 33:177-2, 1997.
96. SHELTON, S. B.; KRISHNAMURTHY, P.; JOHNSON, G. V. W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 76, n. 1, p. 110-120, 20. 2004.
97. SOGAYAR, M.C. **Biologia da transformação maligna**. Manual do curso pratico.2004.
98. STANLEY L ROBINS - **Patologia Estrutural e Funcional**-Cap 23 p919-920 Ed.Guanabara Koogan 2000.
99. STEENBOCK H. Review of certain researches relating to occurrence and chemical nature. **Yale J Biol & Med**; 4: 563-78. 1932
100. STEVES, A.; LOWE, J. **Histologia Humana**. 2 ed. Editora Manole, São Paulo 4:49-64. 1997.
101. SPRING, T.A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v.346 p. 425-434.1990.

102. SROUGI, M. **Hiperplasia prostática**. Editora Record. 1995
103. STITES, D.P. TERR, A. **I. Imunologia Básica**. Rio de Janeiro. Editora Prentice - Hall do Brasil Ltda. 1992.
104. TANEJA, R. **Nuclear receptor**. SCI STKE 286; 1 -2. 2005.
105. TEMPL, R PAULSSON, M. DZIADE, K.M.FUJIWARA, S. Basement membranes. **Meth Enzymol**, v.145 p363-369. 1987.
106. TSUJIMURA, A., KOIKAWA, Y., SALM, S., TAKAO, T., COETZEE, S., MOSCATELLI, D., SHAPIRO, E., LEPOR, H., SUN, T.T. and WILSON, E.L. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. **J. Cell Biol.**, 157, 1257–1265. (2002).
107. VANNUCHI H. Interaction of vitamins and minerals. **Arch Latinoam Nutr**; 41:9-18. 1991.
108. VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, n. 36, p. 165-175, 2003.
109. WALDEN, P.D. LEFKOWITZ G.K.; FICAZZOLA M.; GITLIN, J.; LEPOR, H. Identification of genes associated with stromal hyperplasia and glandular atrophy of the prostate by mRNA differential display. **Exp Cell Res**. Nov 25; 245 (1):19-26. 1998.
110. WANG Y, HAYWARD S, CAO M, THAYER K, CUNHA G. **Cell differentiation lineage in the prostate** 68 (4-5): 270 -9. oct. 2001.







# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)