

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**AÇÕES DA TESTOSTERONA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS EM CULTURA**

Ilma Simoni Brum da Silva

Orientador: Dra. Poli Mara Spritzer

**Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas
- Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.**

Porto Alegre-1993

**À minha mãe,
pelo carinho, dedicação e
incentivo à minha formação profissional,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Poli Mara Spritzer, orientadora desta dissertação, pela amizade, compreensão, pelo exemplo de conduta acadêmica e principalmente pelo constante estímulo a minha formação profissional.

À Isabel Oliveira de Oliveira e Débora dos Santos Martinho pela valiosa amizade e inestimável auxílio em muitas etapas dos experimentos.

À Iracema Vera Soares pelo carinho, dedicação e incansável colaboração na manutenção do laboratório de cultura.

À Maria Flavia, Maria Amália, Victor, Neusa e Rodrigo pela colaboração e pelo amável convívio durante a realização deste trabalho.

À Cibele, minha irmã, pelo carinho, paciência, compreensão e incentivo sempre demonstrados.

À minha família e aos meus amigos, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão, principalmente nos momentos de ausência nos quais o tempo foi dedicado a este trabalho.

À Maria Helena Tedeschi pela disponibilidade e atenção na revisão do texto.

À Profa. Rosa Helena Crestana pelo incentivo ao ingresso neste curso.

A Profa. Ligia Maria Barbosa Coutinho pela elaboração das fotos.

Ao Francisco Lhullier pela dosagem dos hormônios esteróides.

Aos professores e funcionários do departamento de Fisiologia pelo agradável convívio e colaboração.

À Miriam e Uira, secretárias do curso de Pós Graduação pelo auxílio e disponibilidade sempre demonstrados.

Aos serviços de Urologia dos Hospitais São Lucas, HCPA, Ernesto Dorneles e Petrópolis pelo precioso auxílio no fornecimento de tecido prostático para o desenvolvimento deste trabalho.

Apoio Financeiro: CAPES, FINEP, FAPERGS e CNPq.

SUMÁRIO

Abreviaturas	VIII
Índice de figuras	IX
Resumo	XI
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Fisiologia dos andrógenos	02
1.2 A glândula prostática	07
1.2.1 Morfologia	08
1.2.2 Morfogênese	09
1.3 Interação epitélio-estroma	10
1.4 Modelo experimental	11
1.5 Estudos de proliferação celular	13
1.6 Cultura de células	15
1.7 Objetivos	16
1.7.1 Objetivo geral	16
1.7.2 Objetivos específicos	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Produtos químicos	17
2.1.1 Meios	17

2.1.2	Soro	17
2.1.3	Antibiótico	18
2.1.4	Enzimas	18
2.1.5	Hormônios	18
2.2	Procedimentos em cultura de células prostáticas humanas	18
2.2.1	Obtenção do tecido	18
2.2.2	Dissociação enzimática	19
2.2.3	Separação dos componentes celulares	19
2.2.4	Semeadura	20
2.2.5	Tripsinização	21
2.2.6	Manutenção das células em cultura	21
2.3	Avaliação da proliferação celular	22
2.3.1	Determinação do DNA total	22
2.3.2	Contagem do número de células	25
2.4	Equipamentos	25
2.4.1	Capela de fluxo laminar	25
2.4.2	Estufa para incubação	25
2.4.3	Microscópio	26
2.4.4	Banho maria	26
2.4.5	Agitador magnético	26
2.4.6	Estufa para secagem e esterilização	26
2.4.7	Autoclave	27
2.4.8	Esterilização de soluções	27
2.5	Análise dos dados	27
2.6	Análise estatística	28
3.	RESULTADOS	29

3.1	Morfologia das células prostáticas humanas em cultura	29
3.2	Crescimento de células prostáticas humanas não transformadas em diferentes condições de adição de soro normal ou desteroideado no meio de cultura	32
3.3	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células prostáticas humanas não transformadas em cultura	41
3.4	Ações do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células prostáticas humanas não transformadas em cultura	48
4.	DISCUSSÃO	55
5.	CONCLUSÕES	68
6.	Referências bibliográficas	70

ABREVIATURAS

Δ^4 Diona	- Androstenediona
μg	- micrograma
μl	- microlitro
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DHT	- Dihidrotestosterona
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
EGF	- Fator de crescimento epitelial
FLU	- Flutamida
hCG	- Gonadotrofina coriônica
HPB	- Hiperplasia prostática benigna
LH	- Hormonio luteinizante
M	- Molar
N	- Normal
OH-FLU	- Hidroxiflutamida
PBS	- Salina tampão fosfato
PCA	- Ácido percloroacético
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- RNA mensageiro
rpm	- rotações por minuto
SHBG	- Globulina de ligação de hormônios esteróides
T	- Testosterona
TeBG	- Globulina ligadora de testosterona-estradiol

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Síntese de hormônios esteróides gonadais	04
Figura 2 Mecanismo molecular de ação dos andrógenos	06
Figura 3 Aspecto morfológico de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária, ao microscópio óptico (100x)	30
Figura 4 Aspecto morfológico das células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária, ao microscópio óptico	31
Figura 5 Curva de proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas, em cultura primária, com meio 199 + 10% SBF	33
Figura 6 Curva de proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em meio 199 com 5% de SBF	34
Figura 7 Cultura secundária de células estromais de próstata humana não transformadas incubadas em meio com 5% e 1% de SBF	36
Figura 8 Cultura de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em meio 199 com 5% e 2,5% de SBF	37
Figura 9 Cultura primária de células epiteliais de próstata humana não transformadas em meio 199 com 5%, 2,5% e 1% de SBF	38
Figura 10 Cultura de células epiteliais de próstata humana não transformadas em meio 199 com 5% SBF e 5% SBF desteroídado	40

Figura 11	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária	42
Figura 12	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária	43
Figura 13	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária	45
Figura 14	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em cultura primária	46
Figura 15	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária	47
Figura 16	Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária	49
Figura 17	Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas em cultura primária	51
Figura 18	Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em cultura primária	52
Figura 19	Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células estromais prostáticas humanas não transformadas em cultura secundária	53

Resumo

A glândula prostática é um órgão acessório do aparelho reprodutor masculino, conhecido como típico alvo de andrógenos. Estes hormônios, secretados pelos testículos, têm um papel importante no crescimento e diferenciação da próstata no decorrer da vida. Sua ação é bem caracterizada no período embrionário, pós-natal e durante a puberdade. Mas a próstata apresenta um terceiro estágio de multiplicação durante a senescência que é alvo de muitas investigações.

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação de andrógenos, mais especificamente a testosterona, sobre a proliferação de células epiteliais e estromais de próstata humana não transformadas.

Para este estudo foi escolhido um modelo de cultura de células, obtidas de tecido prostático, proveniente de pacientes submetidos a prostatectomia por hiperplasia prostática benigna (HPB). O tecido prostático foi dissociado, as células epiteliais analisadas em cultura primária e as células estromais em cultura secundária (uma passagem). A proliferação celular foi avaliada pela determinação do DNA total e contagem de células. As células prostáticas foram incubadas em meio 199 com diferentes concentrações de soro bovino fetal (SBF) e SBF desteroideado, a fim de determinar um meio básico para os estudos de proliferação celular. Estas células epiteliais foram também incubadas com diferentes concentrações de testosterona (2×10^{-5} a 2×10^{-11} M) isolada ou associada a flutamida (10^{-6} M).

Os resultados obtidos indicaram o meio 199 contendo 5% de SBF como adequado para o estudo de proliferação das células prostáticas humanas não transformadas, epiteliais ou estromais.

Observou-se que a incubação das células prostáticas com testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} a 2×10^{-8} M não apresentaram alteração no ritmo de proliferação celular. Por outro lado, as concentrações de 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M de testosterona estimularam significativamente a proliferação celular.

Buscando avaliar o envolvimento do receptor de andrógenos no mecanismo de proliferação celular, a testosterona foi adicionada ao meio de cultura associada ao antiandrógeno flutamida. A flutamida inibiu significativamente o efeito proliferativo induzido pelas menores doses de testosterona. Um resultado interessante foi observado com a associação de flutamida à testosterona 2×10^{-5} e 2×10^{-6} M, a qual aumentou significativamente a proliferação celular.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1 - As células de próstata humana não transformadas crescem de modo adequado para estudos de proliferação celular, em meio 199 contendo 5% de SBF. O uso de soro desteroideado não alterou o padrão proliferativo destas células, embora tenha ocorrido uma tendência ao descolamento.

2 - A testosterona adicionada ao meio básico nas concentrações de 2×10^{-5} a 2×10^{-9} M não apresentou efeito proliferativo sobre as células epiteliais ou estromais, quando comparadas às células incubadas apenas com meio básico. Nas concentrações de 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M a testosterona estimulou significativamente a proliferação de células epiteliais e estromais, o que sugere um mecanismo bifásico de ação da testosterona sobre a regulação hormonal das células prostáticas humanas, onde doses mais elevadas de testosterona mantém o controle da proliferação em células diferenciadas e concentrações menores permitiriam o escape destes mecanismos regulatórios.

3 - O antiandrógeno flutamida (10^{-6} M) associado às menores doses de testosterona inibiu significativamente o efeito proliferativo induzido por este

andrógeno tanto em células epiteliais como estromais. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação da testosterona, nestas células, ocorre via receptor de andrógenos. Por outro lado, a associação de flutamida (10^{-6} M) com a testosterona em concentrações maiores (2×10^{-5} e 2×10^{-6} M) estimulou a proliferação das células epiteliais e estromais, quando comparada com a proliferação de células incubadas apenas com testosterona nas mesmas doses. Estes resultados indicam que a flutamida, nestas condições hormonais, agiu bloqueando parcialmente os receptores de andrógenos, mimetizando os dados obtidos com pequenas doses de testosterona e reforçando as evidências que os efeitos deste esteróide sobre a proliferação das células prostáticas, apresentados neste trabalho, ocorrem via receptor de andrógeno.

O controle da proliferação de células prostáticas é um processo complexo, envolvendo numerosas interações entre hormônios, fatores de crescimento e protooncogenes, que podem ser modificados de acordo com as condições experimentais utilizadas.

Progressos no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos com a regulação hormonal da próstata exigem estudos mais aprofundados, incluindo tanto o estudo de receptores de esteróides sexuais quanto a expressão do RNA_m de diversos fatores de crescimento e protooncogenes relacionados com proliferação celular.

1.INTRODUÇÃO

A próstata é um dos órgãos sexuais acessórios masculinos, alvo da ação de hormônios esteróides e de uma série de hormônios peptídicos e fatores de crescimento. O interesse pelo estudo da regulação hormonal desta glândula vem aumentando principalmente pela alta incidência no desenvolvimento de patologias neoplásicas que ela pode apresentar, sendo a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata as principais. É estimado que aproximadamente 50% da população masculina com 65 anos de idade apresente algum grau de aumento do volume prostático (Gormley et al, 1992; Carter, Carter e Isaacs, 1990; Carter e Coffey, 1990; Griffiths et al, 1991). A incidência de HPB e câncer de próstata estão claramente relacionados com a idade (Berry et al, 1984). A HPB é caracterizada por um aumento nodular não maligno do tecido prostático, resultando na obstrução da uretra. O carcinoma de próstata é um dos cinco mais incidentes nos Estados Unidos (Matuo et al, 1987).

A importância dos esteróides testiculares no desenvolvimento da próstata tem sido evidenciada em animais de experimentação e no homem (Baulieu, 1975; English, 1985; Habenicht, 1986; Kozak, 1982; Kyprianou, 1987; Guess, 1992; Labrie, 1991). Os andrógenos são essenciais para o desenvolvimento, crescimento, diferenciação e manutenção da morfologia e função secretora da próstata.

1.1.Fisiologia dos andrógenos

Os esteróides androgênicos apresentam papéis complexos na diferenciação sexual masculina e no desenvolvimento da fase inicial da vida. A cronologia cuidadosamente orquestrada da secreção de andrógenos pelos testículos fetais durante a vida embrionária e neonatal é responsável pelo crescimento e pelo desenvolvimento inicial de muitos órgãos do sistema reprodutor masculino, como os ductos de Wolff, o seio urogenital e os primórdios da genitália externa. Os andrógenos também atuam sobre áreas do sistema nervoso central que controlam o padrão masculino de secreção de gonadotrofinas (Fischman et al, 1980; Wilson, 1972).

Na puberdade, os andrógenos são responsáveis pelo aparecimento das características sexuais secundárias masculinas, incluindo o crescimento da genitália externa, o crescimento da próstata e das vesículas seminais, a distribuição masculina de pelos e o aumento da massa muscular total (Fischman et al, 1980).

Estes hormônios são essenciais para a manutenção da espermatogênese e exercem um controle de "feedback" sobre a liberação de gonadotrofinas pelo eixo-hipotálamo-hipófise. Os esteróides androgênicos podem causar virilização no sexo feminino e possuem efeitos específicos sobre a eritropoiese em ambos os sexos (Jepson et al 1973).

A testosterona é o principal andrógeno produzido no homem e é secretado pelas células de Leydig do interstício do testículo (Heller e Clermont, 1964). Este hormônio é sintetizado a partir do colesterol. Quando as células de Leydig são estimuladas pela gonadotrofina coriônica (hCG) ou pelo hormônio luteinizante (LH), a cadeia lateral de ácido graxo é removida da

molécula de colesterol, a qual fica então disponível para a biossíntese de testosterona. O sistema 20-hidroxiase/22-hidroxiase/20,22-desmolase transforma o colesterol em pregnenolona, o precursor de todos os hormônios esteróides. Dois outros sistemas enzimáticos, o da 3β -hidroxiesteróide desidrogenase e o da 17α -hidroxiase/17-20 desmolase, são necessários para a conversão de pregnenolona em androstenediona. Este último esteróide tem 19 carbonos e é considerado um andrógeno. No entanto, para que adquira maior atividade biológica, a androstenediona deve ser metabolizada em testosterona pela enzima 17-cetoesteróide redutase, presente no testículo, mas não na supra-renal (Miller, 1988) (figura 1)

As células estimuladas por andrógenos para exercer funções que não exerceriam de outra maneira são chamadas de células alvo de andrógenos (Fischman, 1980). Muitos tipos de células que respondem a andrógenos já foram identificadas. Algumas destas células, como aquelas que formam a genitália externa e os ductos internos, exercem funções diretamente associadas com a diferenciação sexual masculina, enquanto que outras, como as da medula óssea, fígado e rins, não apresentam estas funções (Mainwaring, 1973). As células-alvo existem em ambos os sexos, sendo que a resposta potencial aos andrógenos depende apenas do nível de secreção de testosterona (Chan e O'Malley, 1976).

O primeiro passo no mecanismo de ação da testosterona é a sua difusão do espaço extracelular para o interior da célula. A maior parte da testosterona circulante está ligada à globulina ligadora de testosterona-estradiol (TeBG) (Pearlman, 1967) e à albumina. A testosterona ligada às proteínas está em equilíbrio dinâmico com a livre ou não-ligada que representa apenas 1 a 5% da testosterona circulante total (Anderson, 1974) e está disponível para a transferência de dentro dos vasos para os líquidos intersticiais. Admite-se que

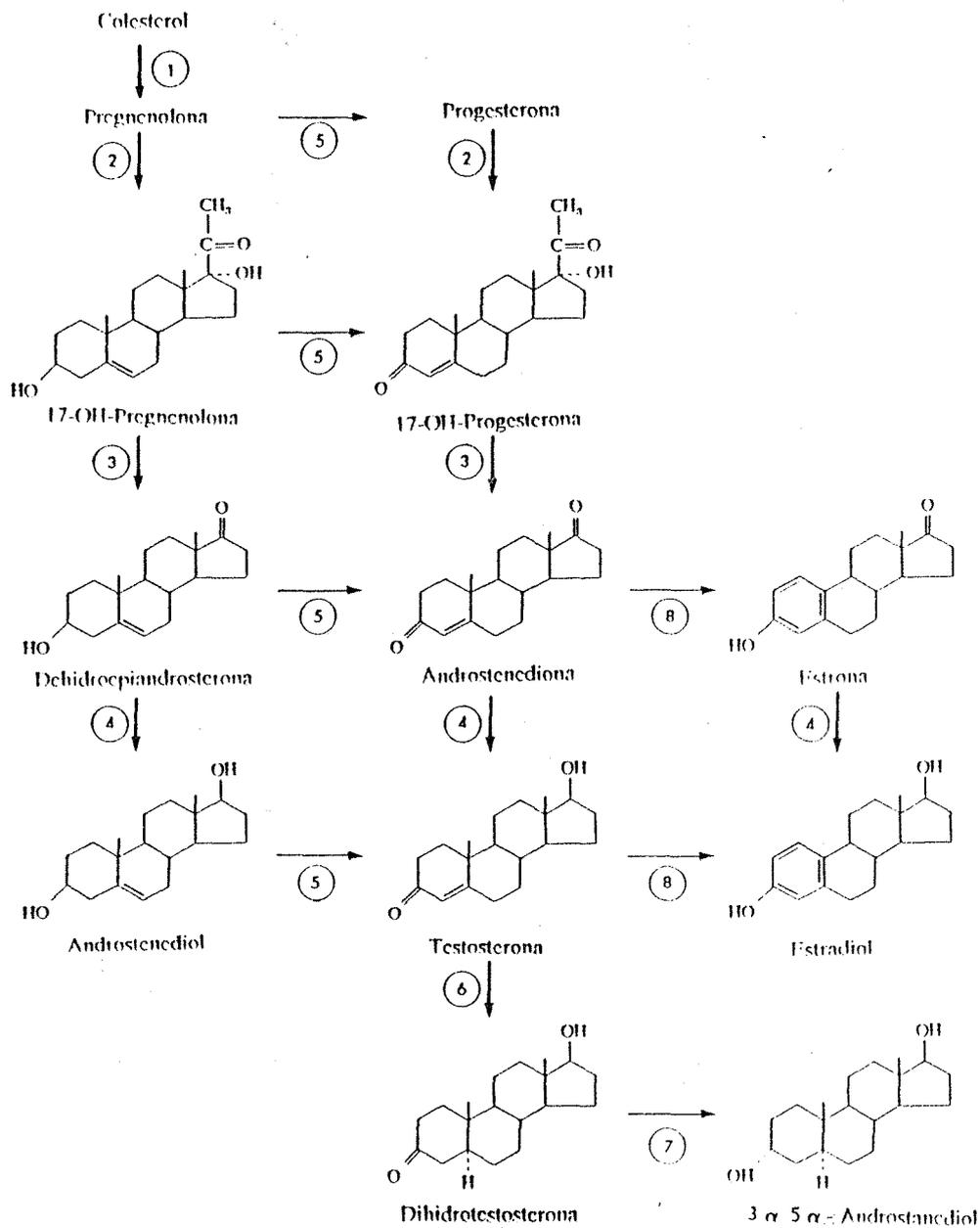


Figura 1: Síntese de hormônios esteróides gonadais. As enzimas envolvidas nesta síntese são: (1) 20,22 desmolase, (2) 17-hidroxilase, (3) 17-20-desmolase, (4) 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase, (5) 3 β -ol-desidrogenase e Δ 4-5-isomerase, (6) 5 α -redutase, (7) 3 α -redutase e (8) aromatase.

a passagem da testosterona para o interior das células seja passiva. No interior da célula, a testosterona pode ser convertida a 5α -dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase de maneira irreversível (Bruchowisky e Wilson, 1968) ou pode ser aromatizada até 17β -estradiol, um estrógeno potente. O 17β -estradiol pode agir sinergicamente com os andrógenos, influenciando processos fisiológicos, ou pode ter efeitos independentes ou opostos (Marcus e Korenman, 1976). A DHT não pode ser aromatizada, portanto a conversão da testosterona em DHT exclui a sua conversão em estrógenos. Estes metabólitos podem agir nos tecidos de origem, por exemplo, a próstata, ou entrar na circulação e atuar em outros locais. Em qualquer destas situações, as conseqüências fisiológicas da ação da testosterona são o resultado dos efeitos combinados da própria testosterona e aqueles de seus derivados, a DHT e o 17β -estradiol.

Assim, a atividade hormonal dos andrógenos é mediada em células-alvo por dois tipos de proteínas: o receptor de andrógeno e a enzima 5α -redutase. Em células-alvo, a testosterona liga-se ao receptor de andrógenos diretamente ou após a conversão efetuada pela 5α -redutase em DHT, um andrógeno mais ativo que a testosterona e com maior afinidade pelo receptor (Mainwaring, 1973; Wilson et al, 1981). Esta ligação andrógeno-receptor é do tipo reversível não covalente com alta afinidade (Liao et al, 1975). O complexo hormônio-receptor formado liga-se a um sítio aceptor na cromatina nuclear facilitando a transcrição de vários genes, os quais controlam a resposta biológica provocada pelo hormônio através da síntese de RNA mensageiro e proteínas (figura 2)

Os receptores de andrógenos estão presentes em altas concentrações nos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino. O número de receptores

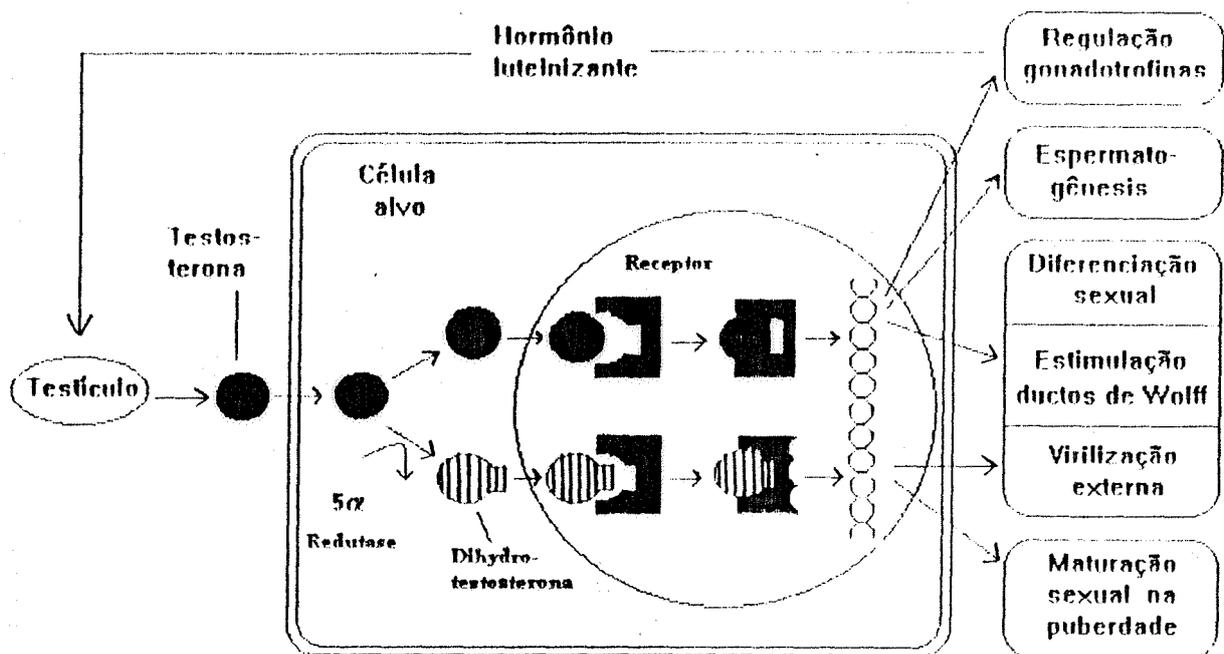


Figura 2: Mecanismos de ação dos andrógenos a nível molecular (modificado de GRIFFIN, 1992).

presente em um tecido pode ser afetado por vários fatores, entre eles o nível de andrógenos ou estrógenos, a idade ou mutações gênicas. A testosterona e a DHT agem através de um mesmo receptor, mas, como já foi citado, a afinidade do receptor de andrógeno pela testosterona é menor que pela DHT. O complexo T-receptor é menos estável que o complexo DHT-receptor. Esta diferença na interação dos dois esteróides com o receptor de andrógenos serve como um mecanismo amplificador da ação de andrógenos em tecidos-alvo que possuem a capacidade de converter T em DHT. Este é o caso da próstata, que possui uma 5α redutase de grande atividade.

1.2. A Glândula Prostática

A glândula prostática pesa aproximadamente 1g ao nascimento, aumenta para 4g na puberdade e cresce até mais ou menos 20 g na idade de 20 anos (McNeal, 1984; Wilson, 1980).

A próstata, no homem, está localizada imediatamente abaixo da bexiga, anterior à sínfise púbica, acima do diafragma urogenital e em frente a ampola retal. O espaço entre a sínfise, a superfície anterior da próstata e a bexiga é preenchido com tecido conjuntivo, adiposo e um rico plexo venoso. Os ligamentos puboprostáticos prendem a região lateral anterior da glândula à sínfise.

1.2.1.Morfologia

Lowsley (1912), baseado em estudos da histologia fetal, dividiu a próstata humana em cinco lobos laterais. No entanto, a divisão lobar da glândula prostática em adultos é indistinta no homem e no cão (McNeal, 1983).

Baseado na reconstituição histológica tridimensional da próstata adulta, McNeal (1984) identificou quatro regiões morfológicamente distintas: o estroma fibromuscular anterior, a zona periférica, a zona central e a zona de transição.

Estudos histológicos indicam que a próstata é composta por uma disposição complexa de estruturas ducto-acinares. A próstata humana é constituída por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ou tubossaculares (McNeal, 1983 e 1984). O epitélio dos ácinos diferencia-se de pseudoestratificado colunar para cuboidal (McNeal, 1983). Os ductos distais são revestidos por epitélio cuboidal simples ou colunar, o epitélio de transição é visto nos ductos proximais quando eles emergem da uretra.

O componente estromal da próstata circunda todos os elementos celulares e extracelulares externos da lâmina basal epitelial e inclui: células de músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos, células de tecido conjuntivo, terminações nervosas e linfáticos; estas estruturas estão embebidas em uma matriz extracelular de colágeno frouxo (Aumuller, 1983).

O número relativo de células epiteliais e estromais na próstata difere entre as espécies. A próstata ventral de ratos e de cães é primariamente um órgão parenquimatoso (DeKlerk e Coffey, 1978; Bartsch e Rohr, 1980); a proporção entre epitélio e estroma no rato adulto é aproximadamente 5:1 (DeKlerk e Coffey, 1978). Em homens e outros primatas, células epiteliais e

estromais estão presentes em aproximadamente igual número (Bartsch, Rohr, 1980; DeKlerk e Lombard, 1986).

1.2.2. Morfogênese

A rede ductal da próstata é derivada de regiões epiteliais densas, os botões prostáticos, que emergem do "sinus" urogenital endodermal imediatamente abaixo do desenvolvimento da bexiga e crescem para o mesênquima (considerando tecido fetal não diferenciado). No feto humano, o primeiro crescimento epitelial origina-se da uretra prostática em torno da décima semana de gestação (Lowsley, 1912; Johnson, 1920, Kellokumpu-Lehtinen et al, 1980 e 1985). Os ductos crescem rapidamente em comprimento e ramificam-se. Com 13 semanas, são aproximadamente 70 ductos primários, alguns dos quais exibem diferenciação secretória (Lowsley, 1912; Kellokumpu-Lehtinen et al 1980). Em humanos, os botões prostáticos originam-se de diferentes partes da uretra em cinco grupos separados. Esta observação levou Lowsley (1912) a propor originalmente o conceito de lobos prostáticos. A morfogenese ductal prostática normal e o crescimento ocorrem em dois períodos separados, pré-natal e puberal, além do crescimento patológico na HPB que é iniciado próximo à quarta década. Durante o período de crescimento da rede prostática, o índice de proliferação celular excede o índice de morte celular, enquanto no adulto normal estes índices são equivalentes (Isaacs, 1984; Berry e Isaacs, 1984).

1.3. Interação Epitélio-Estroma

Cunha e colaboradores (1987), a partir de uma série de experimentos realizados com recombinações entre o epitélio do sinus urogenital, mesênquima de camundongo com feminização testicular e embrião de camundongo tipo selvagem, concluíram que fatores tróficos produzidos no mesênquima responsivo a andrógeno resultam na morfogenese epitelial prostática, crescimento e cito diferenciação secretória. Nas recombinações, o epitélio desprovido de receptores de andrógenos se diferencia, desde que o estroma da próstata com receptor de andrógeno seja usado na recombinação. Em outros trabalhos, já havia sido demonstrado que o desenvolvimento do epitélio prostático do seio urogenital é dependente da ação de andrógenos no mesênquima (Cunha, 1973). Presume-se que o crescimento da próstata adulta em homens é fortemente influenciado por fatores de crescimento estromais estimulado por andrógenos.

Os efeitos dos andrógenos na proliferação são reprimidos por outros fatores controladores (Bruchovsky et al , 1975; Cunha, 1987; Griffiths, 1991). A próstata adulta mantém um correto equilíbrio entre a morte e a renovação celular em um ambiente de alta concentração de andrógenos no qual os receptores de andrógenos são funcionais na regulação da transcrição. A secreção prostática não é alterada quando os níveis de andrógenos são aumentados suprafisiologicamente. Portanto, a replicação é coordenada por um mecanismo mais complexo envolvendo fatores adicionais, mas dependente da presença de andrógenos. O equilíbrio mesênquima-epitélio é um modulador essencial do crescimento e desenvolvimento da próstata, mas a regulação desta glândula não é restrita a interações epitélio-estroma, podendo envolver ações

autócrinas moduladoras no epitélio. O efeito androgênico iniciado no estroma pode influenciar rapidamente a subpopulação de células epiteliais.

Bolton et al (1981), estudando a distribuição e a concentração de andrógenos nos compartimentos epitelial e estromal da próstata humana hiperplásica, concluíram que no tecido hiperplásico existe uma complexa inter-relação entre os andrógenos séricos e seus metabólitos no estroma e epitélio. O estroma prostático parece ser um importante sítio do metabolismo de andrógenos, particularmente a testosterona e a DHT, as quais podem ser transferidas do estroma para o epitélio, possivelmente pela ação da globulina ligadora de esteróides sexuais (SHBG). Krieg e colaboradores (1983), estudando a interação de andrógenos e estrógenos com o estroma e o epitélio da próstata normal e hiperplásica, concluíram que o estroma é o componente mais ativo na HPB e constataram a formação acumulada de DHT nuclear. Postularam também que a DHT é altamente capaz de induzir hiperplasia celular e que o desenvolvimento da HPB é principalmente promovido pelo estroma. Outros estudos mostram o aumento da atividade da enzima que converte DHT em androstanediol na HPB, como aqueles desenvolvidos em cultura de células epiteliais e estromais de próstata ventral de ratos (Orlowiski et al, 1983 e 1986) e em cultura de tecido hiperplásico humano (Lombardo et al, 1992).

1.4. Modelo Experimental

Diversos modelos experimentais podem ser utilizados pelo investigador para desenvolver estudos relacionados com o desenvolvimento anormal de determinado órgão. Estudos relacionados aos tipos celulares individuais, proliferação celular, metabolismo e análise cromossomal, podem ser

desenvolvidos em cultura de células. Estudos envolvendo o mecanismo de indução de tumores requerem o uso de modelos animais. Por estas razões, a utilização de diferentes modelos experimentais pode trazer dados complementares na investigação biológica.

Vários estudos têm sido desenvolvidos buscando um melhor conhecimento das ações hormonais na próstata e suas implicações nas disfunções que afetam esta glândula. Entre eles podem ser citados aqueles que envolvem a utilização de animais de laboratório "in vivo" (Gloyna et al, 1970; Sikes et al 1990; Matuo et al, 1987) ou estudos "in vitro" com tecidos animais ou humanos (Chevalier et al 1981; Orlowiski et al, 1983; Rubenstein e Anderson, 1980). Uma importante contribuição para o conhecimento do desenvolvimento da glândula prostática e suas características histológicas tem sido fornecida por procedimentos experimentais utilizando ratos ou camundongos (Cunha 1987, e McNeal 1983, 1984).

A incubação de tecido prostático, por curto tempo, é utilizada para estudos da cinética do crescimento tumoral e metabolismo de hormônios esteróides, como a testosterona (Siiteri e Wilson, 1970). A principal desvantagem desta técnica é que ela é funcional por períodos de tempo muito curtos. A cultura de órgão tem sido amplamente utilizada para estudos do tecido prostático de roedores, cães e homem (Shao, 1986; Launoit et al, 1988).

A separação das células e a cultura de tipos celulares individuais presentes em tecido hiperplásico teoricamente possibilitaria o estudo de propriedades individuais destas células incluindo sua dependência endócrina, marcadores e enzimas que podem ser de importância para o metabolismo de esteróides. Com isto também seria possível estudar a interação das células estromais e epiteliais em experimentos com cocultivo. A separação celular requer o fracionamento do tecido como um primeiro passo. O fracionamento

do tecido prostático HPB pode ser feito por métodos mecânicos, conforme sugerido por Franks et al(1970) ou por digestão enzimática, como sugerido por diversos autores (Pretlow et al, 1975, Helms et al, 1975, 1976; Thomas, 1971; Wilson et al 1975, Peehl, 1992).

1.5. Estudos de Proliferação Celular

Os hormônios esteróides têm uma função importante na regulação do crescimento e diferenciação celular em vários tecidos, incluindo a próstata. Além disso, parecem estar implicados no crescimento anormal desta glândula, como na HPB e no carcinoma de próstata (Wilson, 1980; Ghanadian, 1981; Hammond, 1978; Vermeulen, 1991; Schulze e Siegfried, 1990).

O efeito hormonal em um determinado órgão-alvo é difícil de ser definido quando utilizadas análises em modelos animais "in vivo", tanto pelas ações metabólicas que estes hormônios sofrem antes de atingir o tecido alvo, como pela composição celular heterogênea do órgão. Culturas de órgão nas quais pequenas porções da próstata são mantidas por 10 dias ou mais em meio quimicamente definido, têm sido utilizadas por muitos autores (Shao et al 1986; Launoit et al, 1988) e têm fornecido valiosas informações, principalmente sobre a ação de andrógenos nesse tecido. Já em 1958, Franks demonstrou que próstatas ventrais de camundongos jovens (4-6 semanas), quando eram incubadas em "meio normal", mostravam atrofia epitelial, que era prevenida pela adição de propionato de testosterona; posteriormente, estudando a próstata ventral de camundongos normais e animais tratados com propionato de testosterona, os mesmos autores observaram que estas próstatas apresentavam morfologia normal, enquanto que os controles (castrados) apresentavam atrofia epitelial (Franks, 1960). Outro estudo, utilizando cultura

de próstata ventral de ratos incubadas com estradiol numa concentração de 2 μ g/ml, demonstrou atrofia epitelial mais severa em comparação com o meio controle, postulando um efeito direto do estrógeno (Habib et al, 1980). Nestes estudos, nenhum parâmetro adequado para avaliação do crescimento celular foi utilizado. A informação obtida neste sistema é limitada à determinação da concentração de RNA, síntese de proteínas e mudanças morfológicas associadas. Embora ocorra uma certa síntese de DNA em tais culturas de órgãos (Mukherjee et al, 1973) esta técnica não é ideal para estudar a proliferação celular já que somente uma pequena fração de células se reproduz durante o tempo de cultura. Além disso, a população de células neste tipo de cultura consiste tanto de células epiteliais quanto não epiteliais. Uma técnica mais aceitável seria a cultura celular na qual células de uma população definida podem ser estudadas sob condições controladas (Macintyre, 1974). Como os eventos de transformação tecidual envolvem alterações intrínsecas nas células, as culturas celulares, que são isentas de influências teciduais e sistêmicas, são ideais para investigar se uma alteração na resposta celular realmente acontece.

Entretanto, pode haver dificuldade em correlacionar resultados de cultura celular com os de órgãos intactos devido à possíveis alterações causadas por uma ruptura das relações célula-célula, eventual remoção de receptores de superfície e condições de crescimento não fisiológico. Porém, tecido prostático parece adequado em termos de cultura celular para estudar o controle hormonal do epitélio, já que corresponde a um tecido extensamente estudado tanto no animal "in vivo" quanto em cultura de órgão (Damber, 1991; Bouton, 1981; Walsh e Wilson, 1976)

Estudos da fisiologia celular do epitélio prostático humano normal e patológico têm sido prejudicados pelas dificuldades em manter culturas de camadas de células epiteliais únicas livres de outros elementos celulares.

Alguns relatos têm descrito culturas de curto tempo de células prostáticas derivadas de tecido hiperplásico humano (Siiteri e Wilson, 1970; Stone et al, 1986; Davies e Eaton, 1989; Guess, 1992; Grayhack, 1992). De outra parte, o interesse pelo estudo do controle hormonal do carcinoma de próstata (Labrie et al, 1983; Mobbs et al, 1983 e 1990; Bostwick et al, 1992) permitiu o desenvolvimento de linhagens contínuas de células prostáticas carcinomatosas, que representam um bom modelo para estudar os mecanismos de ação hormonal no carcinoma de próstata (Horoszewics et al, 1983; Kaighn et al, 1979; Stone et al, 1978).

1.6.Cultura de Células

O desenvolvimento de técnicas de cultura de células trouxe um considerável progresso no campo da endocrinologia experimental, possibilitando o estudo de componentes celulares de tecidos heterogêneos, bem como interações bioquímicas complexas dos processos celulares.

Existem algumas variações na realização de estudos "in vitro" utilizando-se as técnicas de cultura (Evans et al, 1975). Define-se cultura celular como a incubação de células "in vitro" incluindo a cultura de células isoladas. Na cultura de células, estas não são mais organizadas em tecidos. Cultura de tecidos é a manutenção ou crescimento de tecidos "in vitro" de modo que possa permitir sua diferenciação e função. Finalmente, cultura de órgão é a manutenção ou crescimento de um órgão ou parte do mesmo "in vitro" permitindo não só sua diferenciação como ainda, a preservação de sua arquitetura e função.

O método de cultura de células apresenta algumas vantagens sobre os demais como possibilitar o estudo de tipos celulares individualmente, controle

do ambiente, facilitar o estudo da proliferação celular, avaliar as interações epitélio-estroma através de cocultura, adequação do tempo de duração do estudo, além de ser um modelo aplicável em estudos imunológicos, virológicos, bioquímicos e genéticos. Este sistema apresenta também algumas limitações, como tempo de sobrevivência das células em cultura, riscos de infecção da cultura e rompimento da relação epitélio-estroma, as quais são superáveis pelas vantagens que o método oferece.

1.7.Objetivos

1.7.1.Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal analisar as ações de andrógenos em diferentes condições experimentais sobre a proliferação de células epiteliais e estromais prostáticas humanas não transformadas.

1.7.2.Objetivos Específicos

1. Estabelecer um meio de cultura com suprimento de soro bovino fetal (normal ou desteroídado) adequado para manter a proliferação destas células em níveis basais, possibilitando assim o estudo da ação de esteróides sobre a multiplicação celular.

2. Determinar os efeitos de diferentes concentrações de testosterona isolada ou associada ao antiandrógeno flutamida sobre a proliferação celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUTOS QUÍMICOS

2.1.1. Meios

Com base em dados da literatura e em experimentos anteriores realizados para o estabelecimento desta cultura, selecionou-se como meio base para a cultura de células o meio 199 com solução de Hank's, glutamina e bicarbonato, fornecidos pela Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.

A solução de Hank's, também fornecida pela Laborclin Produtos para Laboratório Ltda. foi utilizada para procedimentos de lavagem do material.

2.1.2. Soro

O soro utilizado como suplemento ao meio de cultura foi o Soro Bovino Fetal (SBF) estéril, também fornecido pela Laborclin, em concentrações que variaram de 10 a 1%. Em alguns experimentos, foi utilizado SBF desteroideado, preparado em 60 min de incubação a 4°C com um "pellet" de carvão-dextran (2,5% Norit A, 0,25% dextran em 0,01 M Tris-HCl, PH 8.0, 1 ml/2 ml de soro) (Nagai et al, 1988).

2.1.3. Antibiótico

Ao meio de cultura ou solução de Hank's foi sempre adicionada Kanamicina (Sigma/USA) na concentração de 0,062 g/100 ml.

2.1.4. Enzimas

Para dissociação do tecido, foi utilizada colagenase Tipo IA (Sigma/USA), 7,5 mg por grama de tecido ou 3,0 mg/ml de solução de Hank's.

No procedimento de repicagem de células estromais, para a utilização em cultura secundária, foi utilizada Tripsina Tipo I (Sigma/USA) 0,25%.

2.1.5. Hormônios

O hormônio esteróide utilizado nestes experimentos foi a testosterona (Sigma/USA) em concentrações de $2 \times 10^{-5} \text{M}$ a $2 \times 10^{-11} \text{M}$.

Como antiandrógeno foi utilizada Flutamida 10^{-6}M (Schering A.G., Berlin).

2.2. PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS

2.2.1. Obtenção do Tecido

O tecido prostático utilizado foi obtido de pacientes masculinos com idade média de 72 ± 6 anos, submetidos a prostatectomia supra-púbica por hiperplasia benigna de próstata (HBP). Na sala de cirurgia, a peça era separada, parte para o exame anatomopatológico e o restante dividido em fragmentos de $\pm 1,5 \text{ cm}^3$, os

quais eram acondicionados em frasco estéril, contendo solução de Hank's com kanamicina (0,062 g/ml) e imediatamente transportados ao laboratório.

No laboratório, sob capela de fluxo laminar, realizava-se uma dissecação cuidadosa no tecido para retirar coágulos e tecido fibroso (cápsula). O material era reduzido a fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank's e transferido para um frasco de vidro previamente pesado, para determinação do peso do tecido. Após a pesagem, adicionava-se a este frasco solução de Hank's e o tecido era estocado a 4°C por 12 a 24 horas.

2.2.2. Dissociação Enzimática

Após a fragmentação do tecido em aproximadamente 0,5 cm³ procedia-se à dissociação enzimática durante 3 h a 37°C.

O meio de dissociação foi preparado com solução de Hank's e colagenase tipo IA (3 mg/ml). O volume total de meio de dissociação foi calculado em função do peso do tecido a ser digerido, mantendo-se uma relação de 50 ml de meio para cada 20 g de tecido. O processo de dissociação foi realizado em Erlenmeyer especial para digestão enzimática (Osy/França) com barra magnética, sob agitação constante.

2.2.3. Separação dos Componentes Celulares

A separação de células epiteliais das células estromais era feita através de sucessivas filtrações, utilizando-se filtros de nylon (Polilabo/França). Após a dissociação enzimática, a ação da colagenase era inibida pela adição de igual volume de solução de Hank's. Esta suspensão era vertida em filtros de 300 e 150 micra, para reter porções de tecido não digeridas. O filtrado era centrifugado durante 10 min a

1500 rpm, o sobrenadante desprezado, o precipitado ressuspendido em solução de Hank's e separado em filtro de 60 micra, o qual retinha as células epiteliais. Para o filtrado passavam os fibroblastos. O filtro contendo as células epiteliais era então lavado em solução de Hank's duas vezes e esta solução centrifugada novamente durante 10 min a 1500 rpm. Na etapa final, após o sobrenadante ter sido desprezado, o precipitado era ressuspendido em meio 199 com 10% de soro bovino fetal para ser semeado nas placas de cultura..

Com o filtrado contendo as células estromais era realizado o mesmo procedimento descrito para as células epiteliais.

2.2.4. Semeadura

a) Células Epiteliais

As células em suspensão eram submetidas a um teste de viabilidade pelo azul de Tripán e contadas em hemocitômetro. Em seguida, eram distribuídas em placas de plástico estéreis (Corning 35 mm) numa concentração de 1×10^5 céls./ ml de meio e incubadas em estufa a 37° com atmosfera úmida e adição automática de 3% de CO₂. Inicialmente as células eram incubadas em 1 ml de meio de cultura (meio 199 + 10% de SBF), para facilitar a adesão à placa; 24 horas após a semeadura, o volume do meio era completado para 2 ml.

b) Células Estromais

A suspensão celular contendo aproximadamente 80% de células estromais e 20% de células epiteliais era distribuída em frascos estéreis para cultura de células,

T-25 (25 cm²). Eram semeadas 2x10⁵ cels./ml em cada frasco com 2,5 ml de meio de cultura; 24 h após o volume do meio era completado para 5ml. Estas células também eram incubadas a 37° em estufa com atmosfera úmida e 3% de CO₂ de 07 a 09 dias em cultura primária. Após este período, passavam pelo processo de tripsinização a fim de serem semeadas em cultura secundária.

2.2.5. Tripsinização

As células estromais cultivadas por um período médio de 07 dias, eram tripsinizadas, utilizando-se 0,25% de Tripsina Tipo I (Sigma/USA) em solução salina. A viabilidade celular era avaliada pelo teste com o azul de Tripan e o número de células estimado por contagem em hemocitômetro. O processo de semeadura era análogo ao descrito para células epiteliais, com 1x10⁵ cels./ml em cada placa e a proliferação celular avaliada em dias determinados no protocolo experimental.

2.2.6. Manutenção das Células em Cultura

As células em cultura eram observadas a cada 48 horas em microscópio invertido, antes de ser efetuada a troca do meio de incubação. Células epiteliais eram analisadas em cultura primária e células estromais em cultura secundária (uma passagem).

A primeira troca do meio de cultura das células epiteliais era realizada 48h após a semeadura. Após este período de aderência e equilíbrio, as células eram nutridas em meio de cultura 199 com SBF, suplementado ou não com esteróides em

diferentes condições e por tempos variáveis, de acordo com o protocolo experimental. A troca dos meios com os distintos tratamentos era realizada sempre a cada 48 h durante 06 ou 07 dias, tempo no qual era avaliada a proliferação destas células.

As células estromais eram mantidas em cultura primária de 7 a 10 dias, sendo a troca do meio de incubação realizada a cada 48 h, sempre utilizando-se meio 199 com 10% de SBF. Após este período, estas células eram tripsinizadas, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de cultura de 35mm e recebiam, em cultura secundária, o tratamento nos mesmos moldes descritos para células epiteliais.

2.3. Avaliação da Proliferação Celular

A proliferação celular era avaliada pela determinação do conteúdo total de DNA através da técnica de Burton (1956) e pela contagem direta do número de células em hemocitômetro ou câmara de Neubauer (Murrell 1974), com a utilização de um microscópio óptico.

2.3.1. Determinação do DNA Total

Nos dias determinados no protocolo experimental, as células eram descoladas para a análise de proliferação celular como descrito a seguir: o meio de cultura era desprezado e a placa contendo a monocamada era lavada com 1 ml de solução salina (PBS); em seguida, as células eram descoladas em 2 ml de solução salina com o auxílio de um estilete plástico. A suspensão celular era recolhida em tubos de vidro (pirex) previamente identificados, centrifugada 10 min a 1500 rpm, sendo o sobrenadante desprezado. Ao precipitado (células epiteliais ou estromais)

adicionavam-se 500 μ l de água destilada por 30 min; ao final dos 30 min, eram adicionados a estes tubos 500 μ l de PCA (1M), os tubos eram selados com parafilme e estocados a -20°C para posterior dosagem.

A dosagem do DNA total era feita através de uma reação colorimétrica obtida com um reativo formado por:

100 ml de ácido acético
1,50 ml de ácido sulfúrico
1,50 g de difenilamina
0,50 ml de acetaldeído 1,6%

No momento da dosagem, as amostras eram descongeladas e hidrolizadas 30 min em banho maria a 70°C e mais 15min a 90°C . Após a hidrólise, as amostras eram centrifugadas e o sobrenadante, contendo o DNA, transferido para tubos de dosagem, previamente identificados, aos quais eram adicionados 2ml de reativo de cor a cada um. Estes tubos eram incubados em banho maria a 30°C por um período de 16 a 18 horas e, então, realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro (Micronal) em comprimento de onda de 595nm.

a) Preparação do DNA padrão tipo bovino

Eram pesados 15 mg de DNA (SIGMA) e diluídos em 100 ml de PCA 0,5N (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A dissolução era feita com auxílio de um agitador magnético e a solução final dividida em alíquotas de 1ml, em tubos de vidro pirex e congelados a -20°C .

b) Preparo da curva padrão

Um tubo de DNA padrão era descongelado, diluído 2x com PCA 0,5N, ou seja, era adicionado mais 1ml de PCA 0,5N e agitado. A curva padrão era feita de acordo com o protocolo abaixo.

Tubo	μl DNA (padrão)	μl PCA	μg DNA	D.O.
01	0	1000	0	
02	10	990	0,75	
03	20	980	1,50	
04	40	960	3,00	
05	50	950	3,75	
06	80	920	6,00	
07	100	900	7,50	
08	200	800	15,00	
09	400	600	30,00	

A quantidade de DNA em cada amostra era calculada a partir de uma relação estabelecida entre a densidade óptica e o conteúdo em DNA, do padrão, de concentração conhecida, a partir da curva padrão mostrada acima.

μg DNA padrão D.O. padrão

X D.O. amostra

X = μg de DNA da amostra

2.3.2. Contagem do Número de Células

O hemocitômetro ou Câmara de Neubauer é um dispositivo que permite determinar o número de células por ml de solução, a partir de uma alíquota desta solução.

No momento em que as células eram descoladas para a análise do conteúdo de DNA e a suspensão celular transferida para tubos de vidro, esta suspensão era homogeneizada com pipeta "Pasteur" e retirada uma alíquota de 20 μ l para contagem do número de células. O hemocitômetro contém duas câmaras, cada uma delas subdividida em quatro quadrantes com capacidade para 0,1mm³ ou \cong 1,0 x 10⁻⁴ml de suspensão celular. Contando-se o número total de células nas duas câmaras e dividindo-se pelo número de quadrantes (8), obtém-se o número médio de células por ml (x10⁴cels./ml). Na contagem realizada para avaliar proliferação celular não era utilizado corante.

2.4.EQUIPAMENTOS

2.4.1 Capela de Fluxo Laminar

Todos os procedimentos que exigiam condições estéreis eram realizados em capela de fluxo laminar vertical (Veco).

2.4.2. Estufa para Incubação

As células em cultura eram incubadas em estufa (Nuair, modelo NU 2500) equipada com controle de temperatura e entrada de CO₂. A incubadora era mantida com atmosfera úmida a 37°C e 3% CO₂.

2.4.3. Microscópio

A observação das células em cultura era realizada utilizando-se um microscópio invertido (Zeiss Winke).

A contagem do número de células era realizada em microscópio óptico (ausJena) em objetiva e ocular de 10x.

2.4.4. Banho Maria

Para o aquecimento dos meios de cultura era utilizado um banho (Biomatic) a 37°C e para hidrólise das células, um banho (DeLeo) a 70° e 90°C.

2.4.5. Agitador Magnético

No processo de dissociação do tecido, era utilizado um agitador magnético (Fisaton) com controle de temperatura.

2.4.6. Estufa para Secagem e Esterilização

A vidraria era esterilizada envolvida em papel alumínio em estufas para secagem e esterilização (Biomatic) durante 3h a 170°C; pipetas de vidro graduadas, pipetas "pasteur" e material cirúrgico eram esterilizados em recipientes de metal, durante o mesmo período de tempo.

2.4.7. Autoclave

Materiais com componentes plásticos (tampas, filtros, etc...) eram esterilizados em autoclave (Phoenix) a 120°C a 1Kgf/cm² durante 25 min.

2.4.8. Esterilização de Soluções

Grandes volumes eram esterilizados em filtro a vácuo (Nalgene) com membrana (Whatman) 47mm e poro de 0,2 μ m.

Pequenos volumes eram esterilizados em filtros descartáveis Millex (Millipore) com poros de 0,2 μ m.

2.5. ANÁLISE DOS DADOS

A influência das diferentes condições de cultura e adição de hormônios esteróides sobre os parâmetros de multiplicação celular (DNA e contagem do número de células) foi comparada em séries de culturas celulares para cada grupo de experimentos, originárias de um mesmo doador. Cada determinação era realizada em 3 ou 4 placas de cultura e os resultados expressos como a média mais ou menos o erro padrão. A variação intra-ensaio foi inferior a 10%. Os mesmos estudos foram realizados em células prostáticas de pelo menos 3 doadores diferentes e os resultados eram comparados a fim de se avaliar sua reprodutibilidade. Os resultados obtidos com células de origens diferentes estudadas sob as mesmas condições hormonais tiveram variações, ocasionalmente, superiores a 20%. Contudo, o efeito

hormonal obtido foi sempre observado nas mesmas proporções com uma variação inter-ensaio inferior a 15%.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foram selecionados procedimentos paramétricos. Conforme as condições experimentais estudadas, foram utilizados: teste t de Student para amostras não emparelhadas, análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de comparações múltiplas de Duncan. Os níveis de significância (α) adotados foram de 5% e 1%. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EP). O número mínimo de amostras utilizado foi de 3 placas de cultura para cada grupo de tratamento.

3. RESULTADOS

3.1 - Morfologia das Células Prostáticas Humanas em cultura

Células epiteliais e células estromais, quando semeadas em cultura crescem aderidas à placa, formando uma monocamada e têm aspecto morfológico distinto.

Com o objetivo de caracterizar morfológicamente as células epiteliais e estromais prostáticas humanas cultivadas, de acordo com a metodologia descrita em material e métodos, após 4 dias de cultura as células foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa e fotografadas ao microscópio óptico.

Na figura 3, observa-se o aspecto das células epiteliais, pequenas, arredondadas ou ovais, apresentam núcleo refringente e tendem a proliferar concentricamente, atingindo confluência. Pode-se observar também algumas áreas sem células na placa de cultura.

Na figura 4, observam-se as células estromais (fibroblastos), que apresentam uma forma bem característica, alongada e com núcleos pequenos, proliferando em várias direções. Algumas áreas desta cultura também atingem confluência.

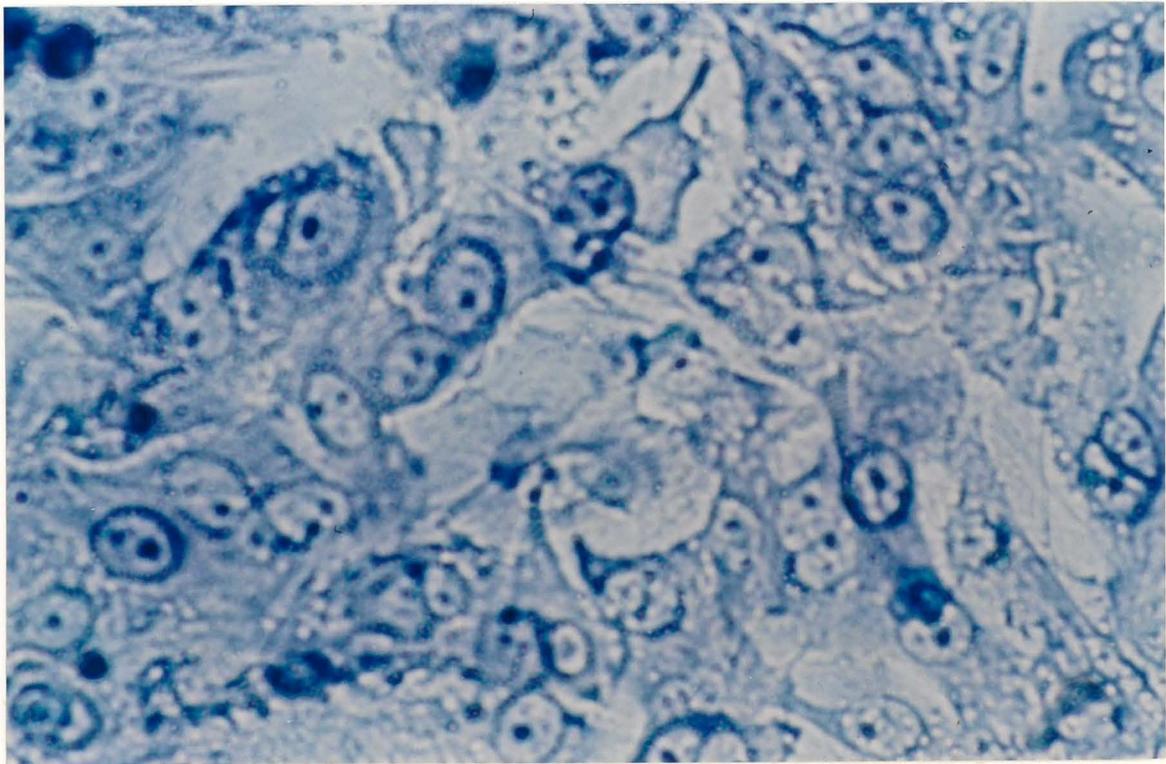


Figura 3: Aspecto morfológico de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária, ao microscópio óptico (100x).



Figura 4: Aspecto morfológico das células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária, ao microscópio óptico (40x).

3.2 Proliferação de Células Prostáticas Humanas Não Transformadas em Diferentes Condições de Adição de Soro Normal ou Desteroidado no Meio de Cultura.

Com o objetivo de testar a viabilidade destas células em cultura durante um período de tempo necessário para estudos de ação hormonal sobre a proliferação celular, inicialmente células epiteliais não transformadas, oriundas de próstata humana, foram incubadas em cultura primária, em meio 199 com 10% de SBF. A população celular foi avaliada pelo conteúdo total de DNA (μ g/placa) nos dias 0, 3, 4, 5, e 7 de cultura. Foi considerado dia "0" (zero) o primeiro dia após a semeadura em que era efetuada a troca de meio de cultura, ou seja, 48 h após a semeadura, tempo necessário para as células aderirem à placa e estabelecerem um equilíbrio com o meio de incubação.

A figura 5 ilustra os resultados obtidos nas condições experimentais descritas acima, mostrando um aumento significativo da proliferação celular, no sétimo dia em relação ao dia "0" (zero) ($p < 0,01$) e em relação ao terceiro dia de cultura ($p < 0,05$), possibilitando a manutenção destas células em cultura, nestas condições experimentais, pelo tempo previsto como necessário para estudos de proliferação.

A partir dos resultados iniciais, avaliou-se o comportamento proliferativo das células epiteliais de próstata humana não transformadas em meio de cultura contendo 5% de soro bovino fetal. A proliferação celular foi avaliada pelo conteúdo total de DNA (μ g/placa) nos dias 0, 3, 5 e 7 de cultura. Observou-se um aumento significativo no conteúdo total de DNA a partir do 5º dia de cultura, em relação ao tempo zero ($p < 0,01$) e no 7º dia em relação ao ao 3º dia ($p < 0,05$). Estes resultados estão representados na figura 6 e

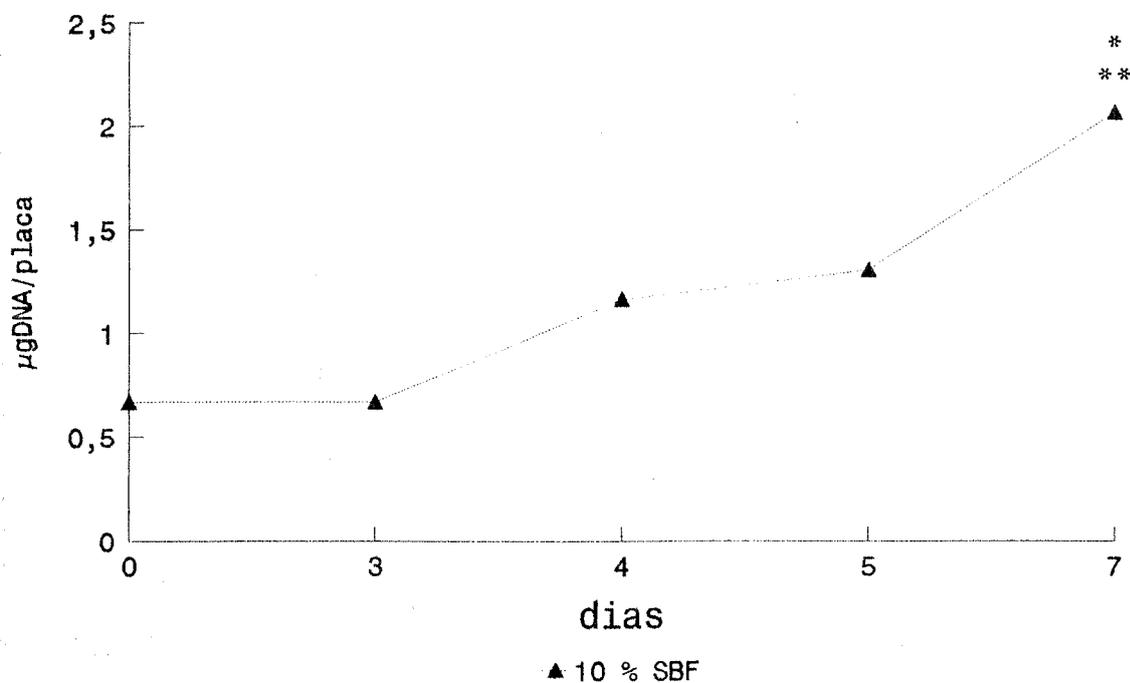


Figura 5: Curva de proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas, em cultura primária, com meio 199 + 10% SBF. A proliferação celular foi avaliada pelo conteúdo de DNA em cada placa. Cada ponto representa a média de 3 placas de cultura.

* $p < 0,05$ em relação ao 3° dia de cultura

** $p < 0,01$ em relação ao dia zero (antes do tratamento)

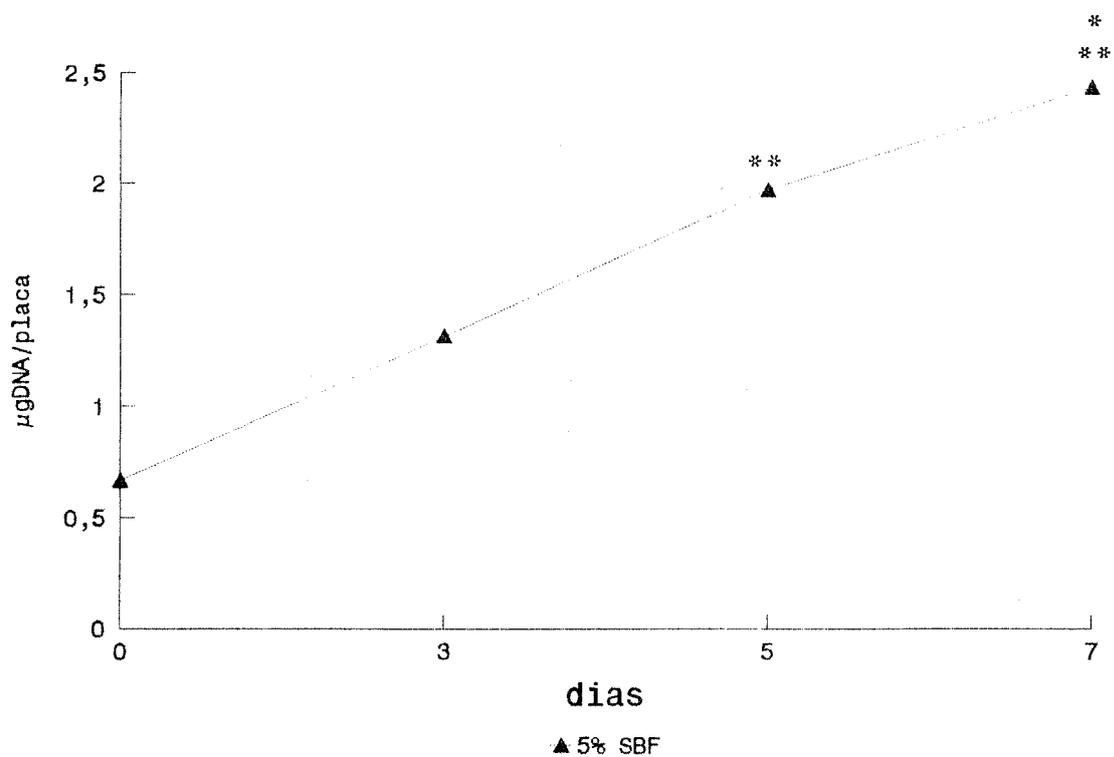


Figura 6: Curva de proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em meio 199 com 5% de soro bovino fetal. A análise da proliferação celular foi feita através do conteúdo de DNA total; cada ponto da curva representa a média de 3 placas de cultura.

* $p < 0,05$ em relação ao 3° dia
 ** $p < 0,01$ em relação ao dia zero

mostram que também é possível manter estas células em cultura utilizando-se meio 199 com 5% SBF.

Procurando utilizar um meio de incubação com as condições mínimas necessárias para a manutenção das células de próstata humana não transformadas em cultura, testou-se em cultura secundária de células estromais o meio normalmente utilizado (meio 199) com 5% de SBF como controle em comparação com o meio contendo 1% de SBF. A proliferação celular foi avaliada através da contagem do número de células em hemocitômetro ($\times 10^4$ cels./ml), nos dias 3, 5 e 7 de cultura. Estes resultados estão representados na figura 7. A avaliação feita no 3º dia de tratamento não mostra diferença significativa entre o número de células do meio com 5% ou 1% de SBF. No 5º dia de cultura, as células incubadas com 1% de SBF apresentaram uma diminuição significativa no ritmo de proliferação celular (* $p < 0,05$) em relação a 5% de SBF. Igualmente, no 7º dia de cultura, a população celular incubada em meio com 1% SBF foi significativamente menor que aquela incubada com 5% de SBF ($p < 0,01$).

Na figura 8, estão ilustrados os resultados obtidos quando células epiteliais foram incubadas em cultura primária em meio 199 com 5% e 2,5% de SBF. A proliferação celular foi avaliada no 3º dia de cultura através do conteúdo de DNA total ($\mu\text{g/placa}$). As células cultivadas em meio com apenas 2,5% de SBF apresentaram uma tendência à redução no ritmo de crescimento, embora esta diferença (28% menor) não tenha sido significativa.

Para confirmar estes resultados, células epiteliais de próstata humana não transformadas foram incubadas em meio 199 com 5%, 2,5% e 1% de SBF e a proliferação celular avaliada no 6º dia de cultura através do conteúdo de DNA. Conforme os resultados mostrados na figura 9, observa-se novamente, uma tendência à redução no ritmo de proliferação das células incubadas com

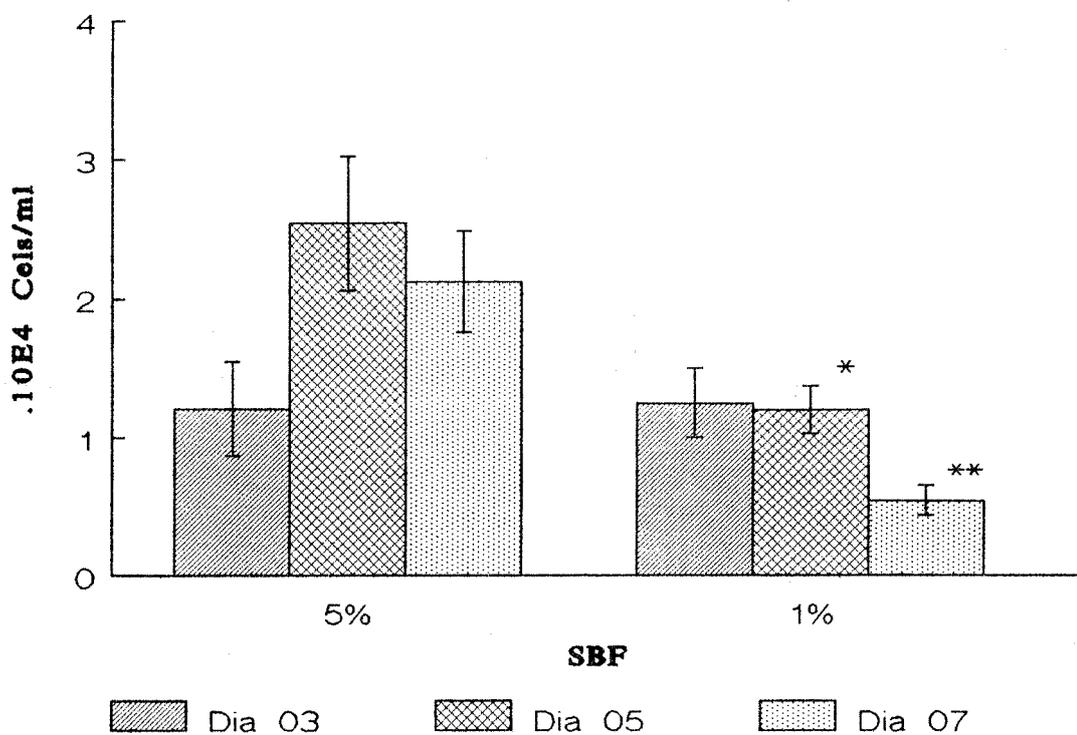


Figura 7: Cultura secundária de células estromais de próstata humana não transformadas incubadas em meio com 5% e 1% de SBF. A população celular foi avaliada pela contagem do número de células no 3º, 5º e 7º dia, sendo os resultados expressos em número de células por mililitro ($\times 10^4$ cels./ml). Cada coluna representa a média de 3 placas de cultura e as barras verticais representam o erro padrão (EP).

* $p < 0,05$ em relação ao SBF 5% no 5º dia

** $p < 0,01$ em relação ao SBF 5% no 7º dia

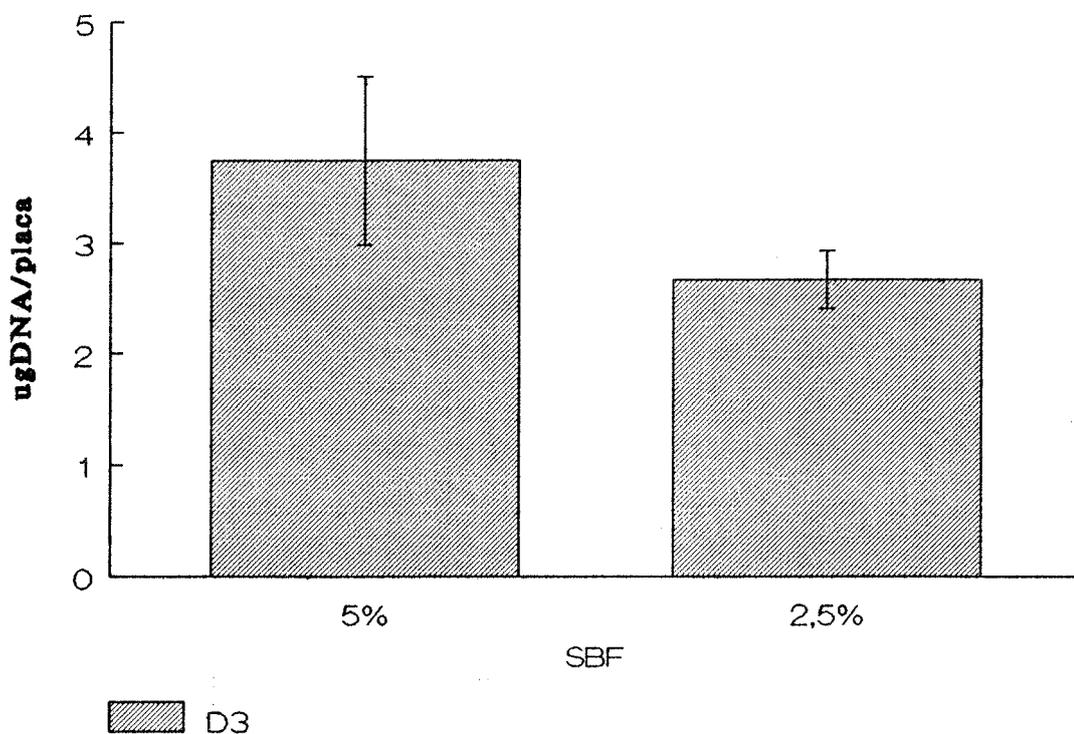


Figura 8: Cultura de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em meio 199 com 5% e 2,5% de SBF. A população celular foi avaliada no 3° dia de cultura, pelo conteúdo de DNA ($\mu\text{gDNA/placa}$). Cada coluna representa a média \pm EP (n=3).

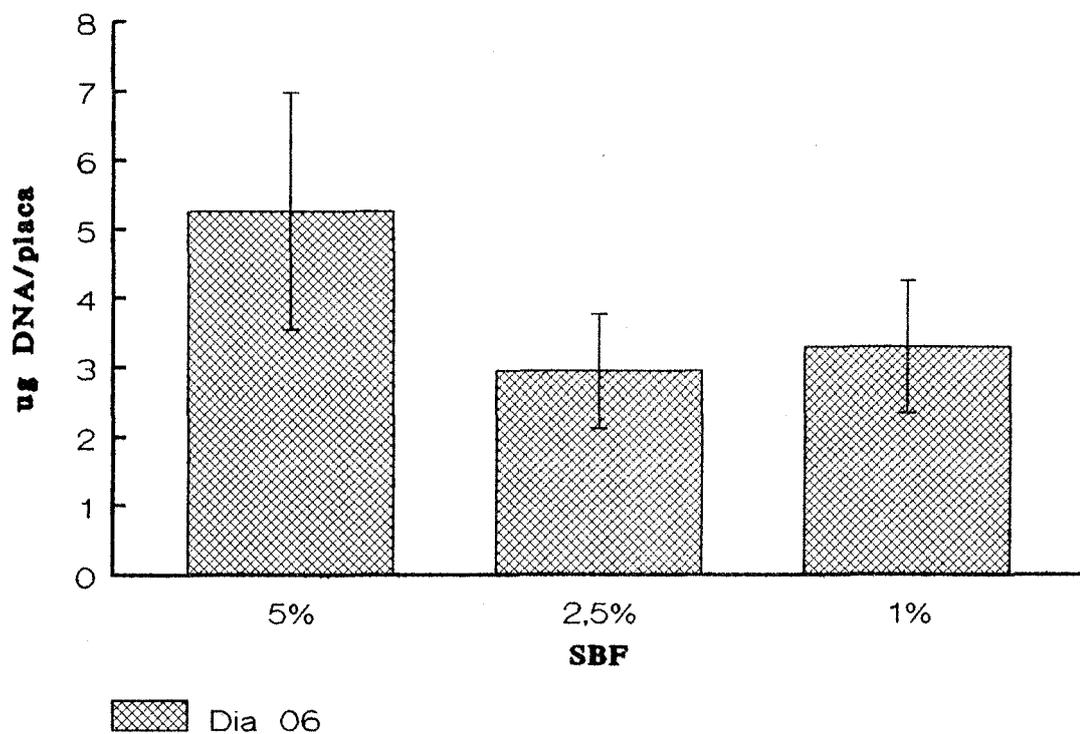


Figura 9: Cultura primária de células epiteliais de próstata humana não transformadas em meio 199 com 5%, 2,5% e 1% de SBF. A proliferação celular foi avaliada no 6° dia de cultura pelo conteúdo de DNA (μ gDNA/placa). Cada coluna representa a média \pm EP (n=3).

meio de cultura suplementado com 2,5% e 1% de SBF em comparação com meio contendo 5% de SBF, indicando que as condições nutritivas oferecidas por este meio não são adequadas à manutenção da população celular para estudos de proliferação.

Com base nestes resultados optamos por utilizar o meio 199 + 5% de soro bovino fetal como meio base para a cultura celular.

Antes de iniciar o estudo da ação de hormônios esteróides sobre a proliferação de células prostáticas humanas não transformadas, em cultura, foi investigado se a concentração de esteróides presente no soro bovino fetal alteraria ou não o padrão proliferativo destas células. Para isto, as células epiteliais foram incubadas em meio de cultura contendo 5% de SBF e 5% de SBF desteroídado. A proliferação celular foi avaliada através da contagem do número de células em hemocitômetro nos dias 2, 4 e 7 de cultura. A figura 10 mostra a curva de proliferação celular com os meios contendo SBF total e SBF desteroídado. Observa-se no 2º dia de cultura uma diferença significativa entre o número de células em ambos os meios ($p < 0,05$). Entretanto, ao longo do período de incubação, as células tratadas com meio contendo SBF desteroídado apresentaram o mesmo padrão de crescimento celular, conforme pode ser verificado nos dias 4 e 7 de cultura. Por outro lado, observou-se que o aspecto das células incubadas em meio com soro desteroídado diferia daquele das células incubadas com soro normal, com uma tendência ao descolamento das células tratadas com SBF desteroídado.

Para complementar este estudo, a concentração de testosterona (esteróide que seria utilizado nos próximos experimentos) no soro bovino fetal utilizado, foi medida pela técnica de radioimunoensaio, através da qual foi constatada a presença de 0,046 ng/ml de testosterona neste soro. Como era utilizado somente 5% de soro no meio de cultura, calculou-se a quantidade de

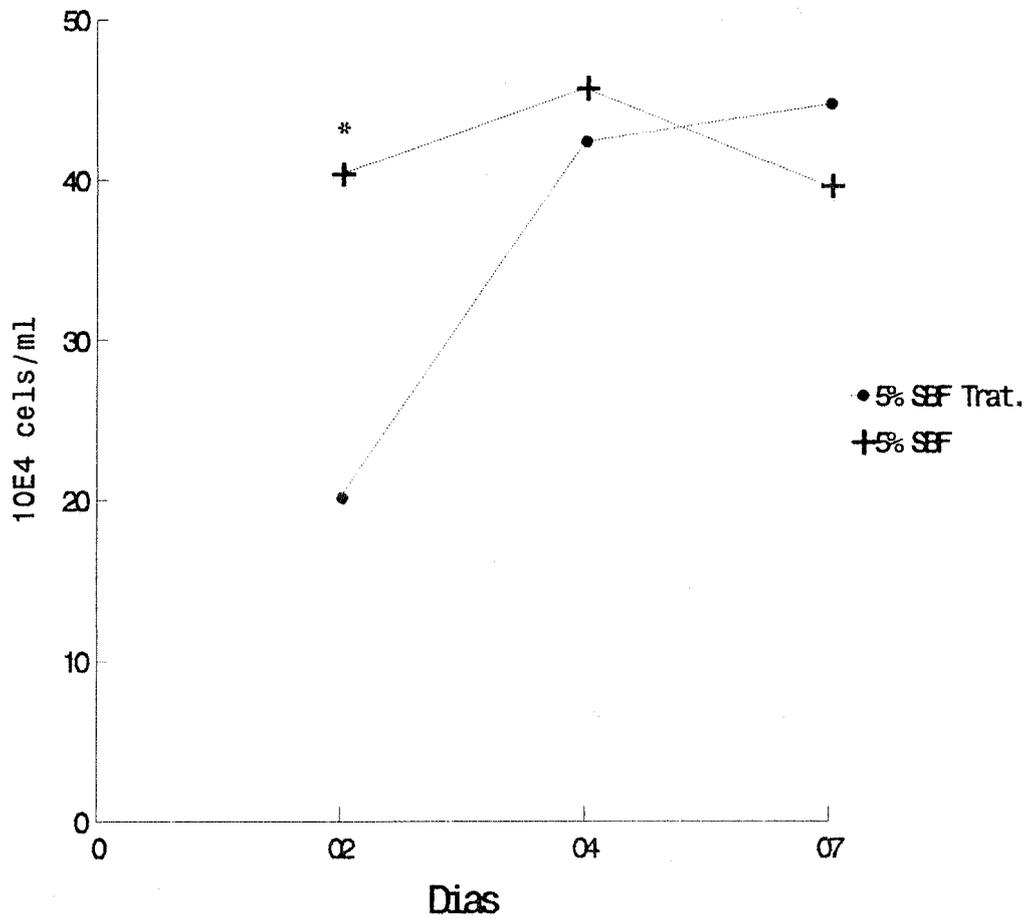


Figura 10: Cultura de células epiteliais de próstata humana não transformadas em meio 199 contendo 5% de SBF normal e 5% de SBF desteroidado. A população celular foi avaliada nos dias 2, 4 e 7 de cultura através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml). Cada ponto representa a média de 3 placas.

* $p < 0,05$ em relação a 5% SBF desteroidado

esteróide (testosterona, PM=288,4g) que estaria se adicionando ao meio de cultura através do soro.

Constatou-se que apenas $0,8 \times 10^{-14}$ M de testosterona é adicionada ao meio de cultura através do soro, o que é uma quantidade aproximadamente 1000 vezes menor que a menor dose de testosterona a ser utilizada, o que não deveria interferir nos índices de proliferação a serem avaliados.

3.3 - Efeitos da Testosterona Sobre a Proliferação de Células Prostáticas Humanas não Transformadas em Cultura

Uma vez definido o meio base de incubação para estas células (meio 199 + 5% de SBF), iniciou-se o estudo dos efeitos da testosterona (T) sobre a proliferação de células epiteliais e estromais não transformadas derivadas de próstata humana, em cultura. Inicialmente, células epiteliais foram incubadas em meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} M, 2×10^{-7} M e 2×10^{-8} M, comparadas com células incubadas em meio controle (5% SBF). A proliferação celular foi avaliada através do conteúdo de DNA total ($\mu\text{g/placa}$) e pela contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml) em hemocitômetro nos dias 3 e 6 de tratamento. Os resultados mostrados na figura 11 representam a avaliação feita através do conteúdo de DNA e na figura 12 através da contagem do número de células, ambos seguindo o protocolo experimental descrito acima. Como se pode observar, a testosterona nestas concentrações não exerceu efeito estimulatório sobre a proliferação celular em nenhum dos parâmetros avaliados. Resultados semelhantes também foram obtidos quando células estromais foram incubadas em cultura secundária com as mesmas concentrações de testosterona (2×10^{-6} M, 2×10^{-7} M e 2×10^{-8} M). A avaliação

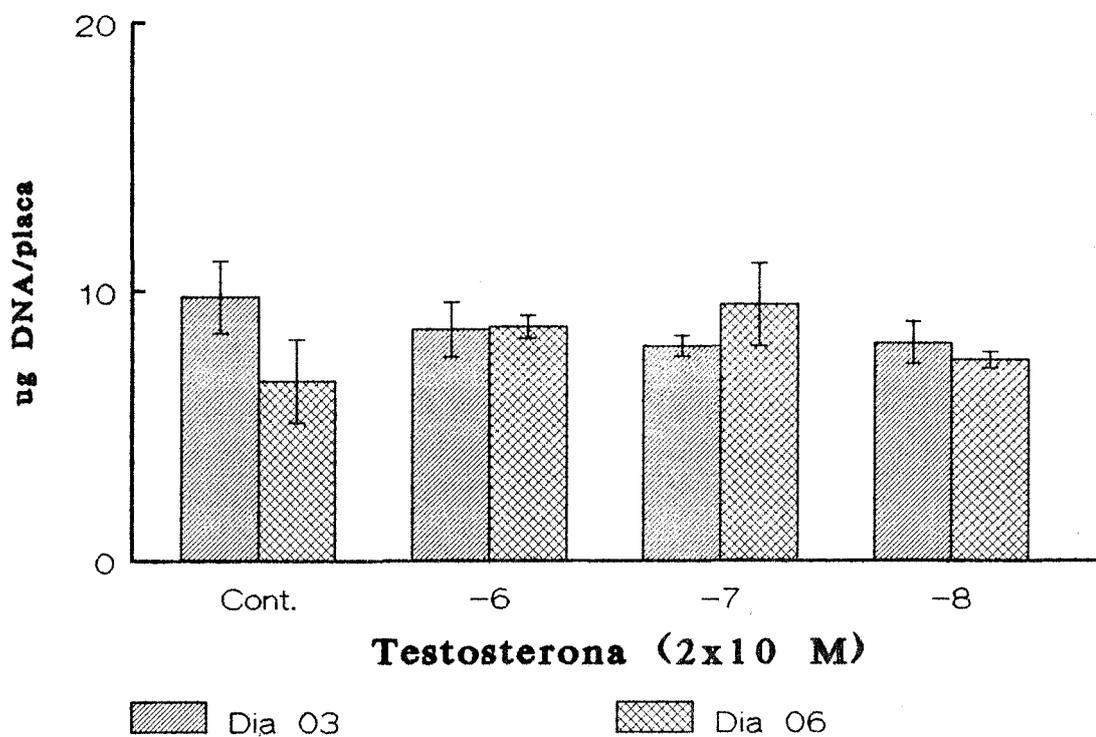


Figura 11: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle (5% SBF) e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} , 2×10^{-7} e 2×10^{-8} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de cultura através do conteúdo de DNA total (μg DNA/placa). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

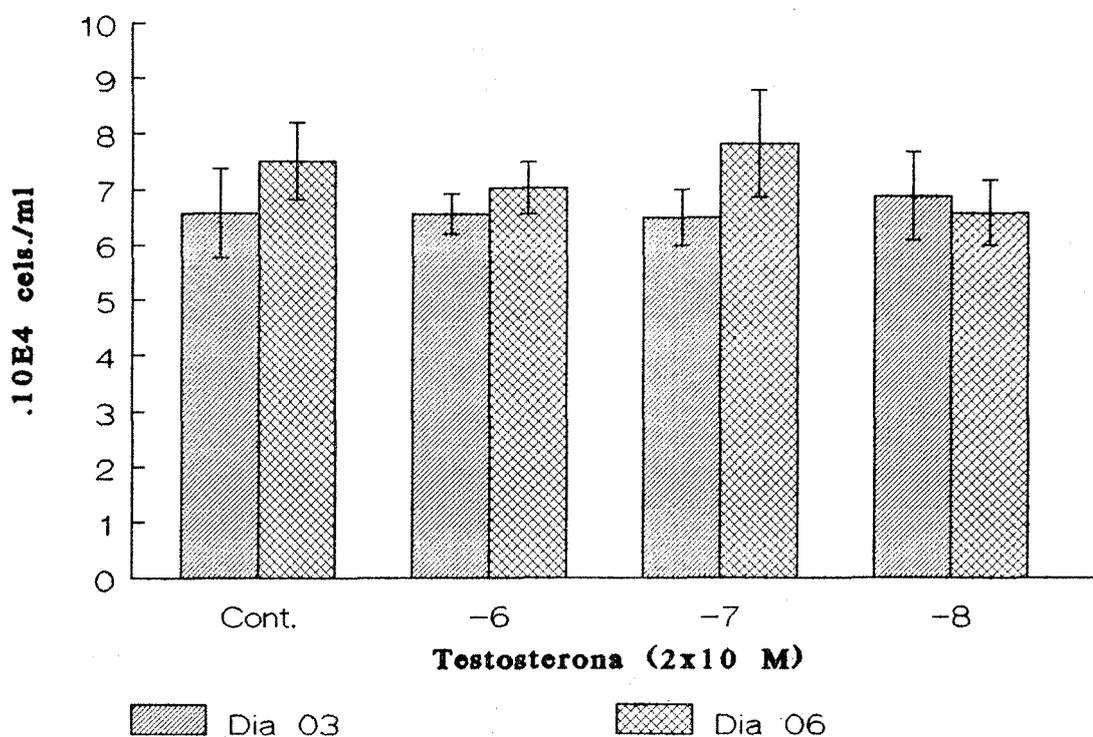


Figura 12: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle (5% SBF) e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} , 2×10^{-7} e 2×10^{-8} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de cultura através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

da proliferação celular foi feita através da contagem do número de células. Os resultados referentes a cultura secundária de células estromais estão ilustrados na figura 13.

Considerando-se estes resultados, foi avaliada a ação de concentrações de testosterona maiores e menores que as descritas anteriormente sobre a proliferação de células prostáticas humanas não transformadas, em cultura. A figura 14 ilustra os resultados obtidos quando células epiteliais foram incubadas em meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M. A proliferação celular foi avaliada pelo conteúdo total de DNA ($\mu\text{g/placa}$) nos dias 3 e 6 de tratamento. No 3º dia de cultura, a dose de 2×10^{-10} M de testosterona, quando comparada ao grupo controle, mostrou um efeito estimulatório significativo sobre a proliferação destas células ($p < 0,05$). No 6º dia de cultura, as células tratadas com testosterona nas doses de 2×10^{-9} e 2×10^{-10} M apresentaram uma proliferação significativamente maior em relação a dose de testosterona 2×10^{-5} M ($p < 0,05$). Também no 6º dia de cultura, as células incubadas com testosterona 2×10^{-11} M apresentaram um índice de proliferação significativamente maior, quando comparadas com qualquer dos outros grupos experimentais: grupos controle, testosterona 2×10^{-9} e 2×10^{-10} M ($p < 0,05$) e testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-8} M ($p < 0,01$).

Utilizando-se o mesmo protocolo experimental descrito acima, a análise da proliferação celular foi feita através da contagem do número de células, conforme mostrado na figura 15. No 3º dia de tratamento hormonal, as células incubadas com testosterona 2×10^{-10} M apresentaram um índice de proliferação significativamente maior em relação a testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M ($p < 0,05$). As células incubadas com testosterona 2×10^{-11} M

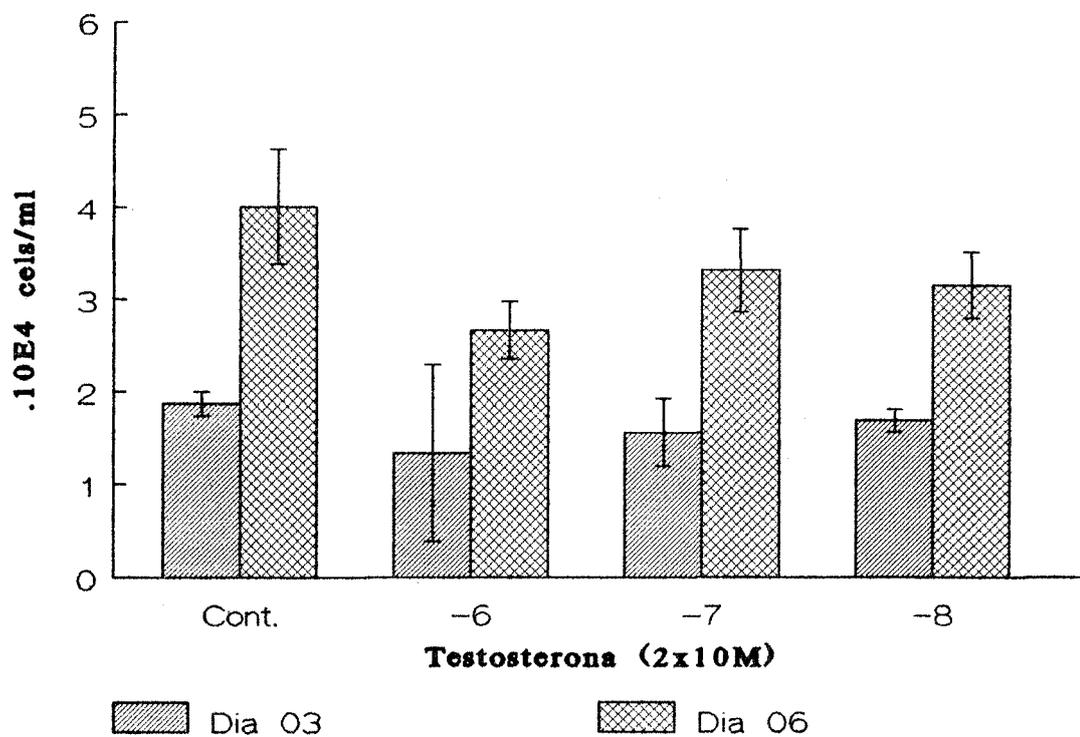


Figura 13: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária. As células estromais foram cultivadas em meio controle (5%SBF) e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} , 2×10^{-7} e 2×10^{-8} M. A análise de proliferação foi feita por contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml) no 3° e 6° dia de cultura. Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

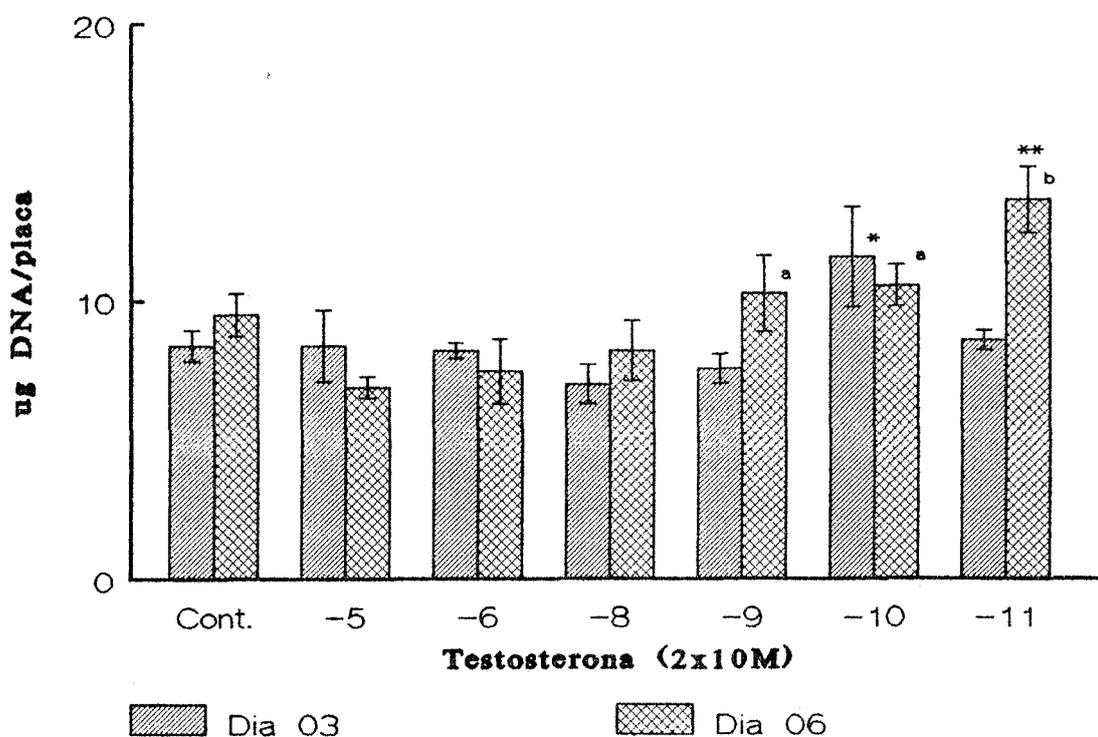


Figura14: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de cultura pelo conteúdo de DNA total (μg DNA/placa). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

* $p < 0,05$ em relação ao controle, 3° dia

a $p < 0,05$ em relação à testosterona 2×10^{-5} M, 6° dia

b $p < 0,05$ em relação ao controle, testosterona 2×10^{-9} e 2×10^{-10} M, 6° dia

** $p < 0,01$ em relação à testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-8} M

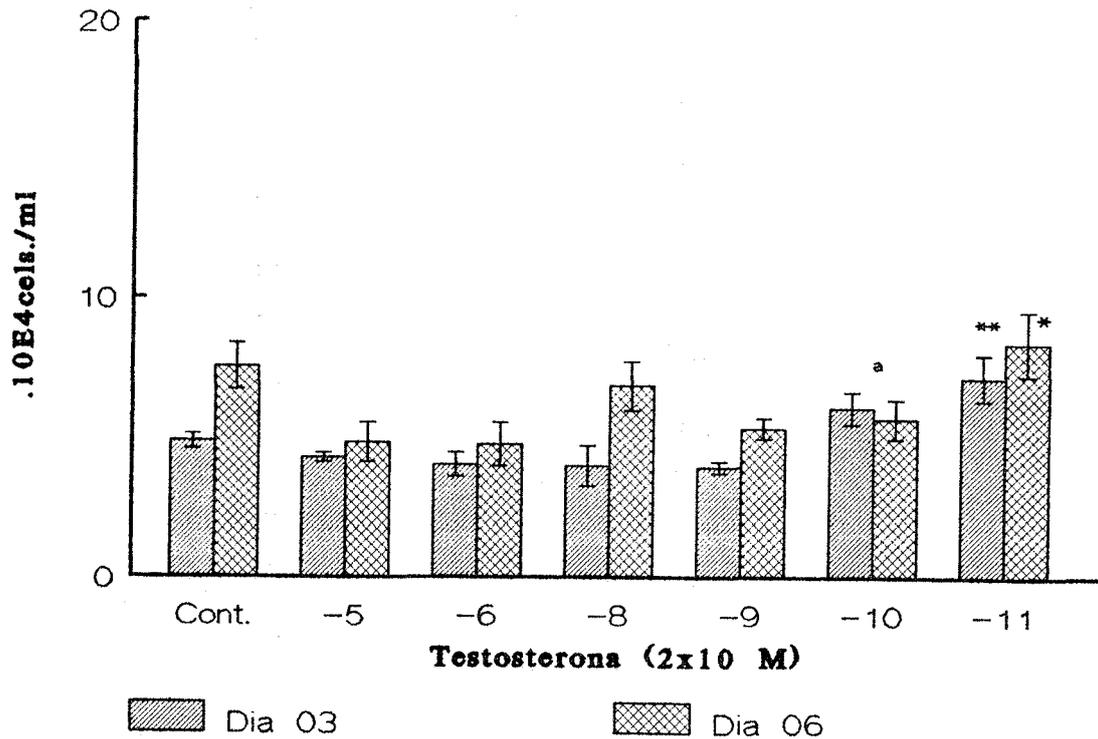


Figura 15: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas, em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} , 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de tratamento através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cells./ml). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

a $p < 0,05$ em relação à testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M, 3° dia

** $p < 0,01$ em relação ao controle, testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M, 3° dia.

* $p < 0,05$ em relação à testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-9} e 2×10^{-10} M, 6° dia

também apresentaram proliferação significativamente maior que o grupo controle e testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M ($p < 0,01$). No 6º dia de tratamento, o efeito proliferativo da testosterona na dose de 2×10^{-11} M foi significativamente maior em relação a testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-9} e 2×10^{-10} M ($p < 0,05$), o que confirma os resultados da análise de proliferação obtidos através da avaliação do conteúdo de DNA.

Células estromais foram incubadas, em cultura secundária, com meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} a 2×10^{-10} M para a análise da ação deste andrógeno sobre a proliferação deste outro tipo celular. A proliferação foi avaliada pela contagem do número de células, no 3º e 6º dia de cultura. Conforme pode-se observar na figura 16, no 6º dia de cultura, as células tratadas com testosterona na dose de 2×10^{-10} M apresentaram proliferação significativamente maior em relação a testosterona 2×10^{-5} M ($p < 0,01$) e em relação ao grupo controle e aos grupos tratados com testosterona 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M ($p < 0,05$). Estes resultados obtidos com a avaliação da proliferação de células estromais não transformadas em cultura secundária confirmam os resultados obtidos com células epiteliais em cultura primária.

3.4 Ações do Antiandrógeno Flutamida sobre a Proliferação de Células Prostáticas Humanas Não Transformadas em Cultura

Após a análise desses resultados, procuramos avaliar o envolvimento do receptor de andrógeno no mecanismo de proliferação das células estudadas, utilizando-se o antiandrógeno flutamida (FLU), isolado ou associado a

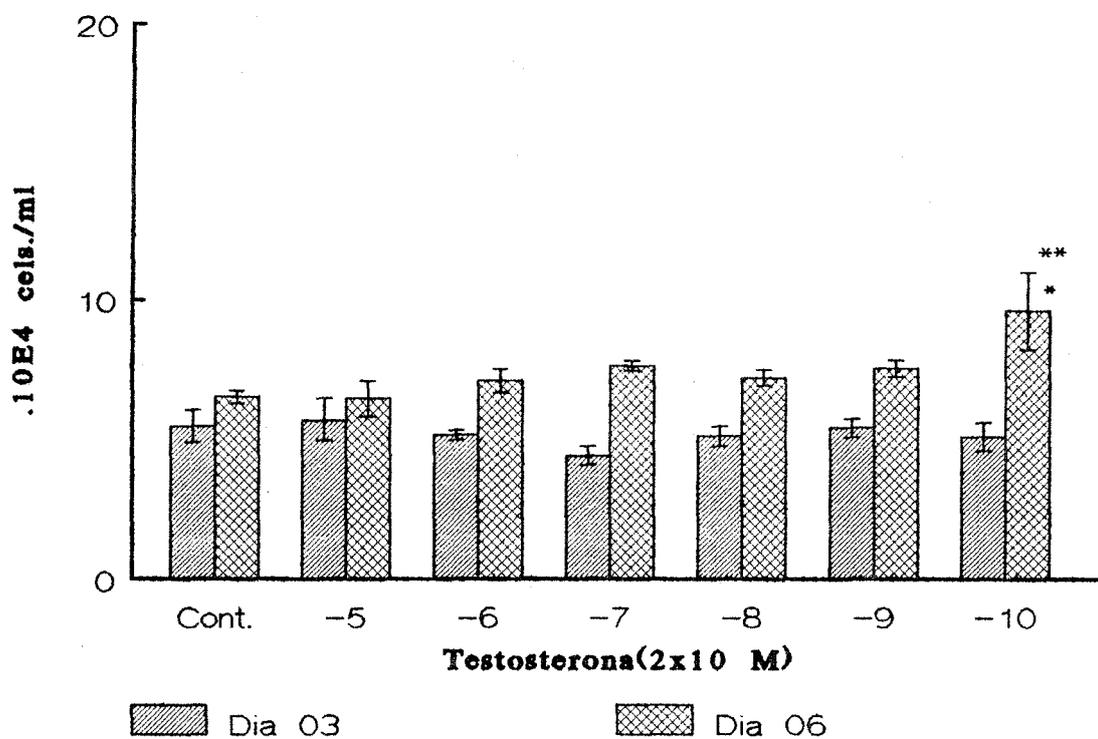


Figura 16: Efeitos da testosterona sobre a proliferação de células estromais de próstata humana não transformadas, em cultura secundária. As células estromais foram incubadas em meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^5 a 2×10^{-10} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de tratamento através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

* $p < 0,05$ em relação ao controle, testosterona 2×10^{-6} , 2×10^{-8} e 2×10^{-9} M, 6° dia

** $p < 0,01$ em relação a testosterona 2×10^{-5} M, 6° dia

testosterona.

Na figura 17, estão ilustrados os resultados obtidos quando células epiteliais de próstata humana não transformadas foram cultivadas com meio controle, meio contendo flutamida 10^{-6} M, ou testosterona nas doses de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-11} M isoladas ou associadas a flutamida 10^{-6} M. A proliferação celular foi avaliada pelo conteúdo de DNA ($\mu\text{g/placa}$) no 3° e 6° dia de cultura. No 3° dia, as células incubadas com testosterona 2×10^{-11} M apresentaram um índice de proliferação significativamente maior que o grupo controle e o grupo tratado com testosterona 2×10^{-6} M ($p < 0,05$). Além disso, a adição de flutamida 10^{-6} M ao meio contendo testosterona 2×10^{-11} M exerceu uma redução significativa da proliferação celular ($p < 0,05$) em comparação com as células tratadas apenas com testosterona 2×10^{-11} M. No 6° dia de cultura, as células incubadas com testosterona 2×10^{-6} M associada a flutamida 10^{-6} M apresentaram um índice de proliferação significativamente maior que aquelas incubadas com testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-11} M + Flutamida 10^{-6} M ($p < 0,05$).

O mesmo protocolo experimental descrito acima foi utilizado para avaliar a proliferação das células epiteliais prostáticas através da contagem do número de células, conforme mostrado na figura 18, onde as células incubadas com testosterona 2×10^{-11} M apresentaram um índice de proliferação significativamente maior ($p < 0,01$) que o grupo controle, o grupo com flutamida isolada e os grupos tratados com testosterona 2×10^{-5} e 2×10^{-6} M ($p < 0,01$), no terceiro dia de tratamento. No 6° dia de tratamento, esta dose de testosterona (2×10^{-11} M) também apresentou um índice de proliferação significativamente maior em relação a flutamida isolada e testosterona 2×10^{-6} M ($p < 0,05$) e, em relação a testosterona 2×10^{-5} M ($p < 0,01$). Novamente, a associação de flutamida 10^{-6} M com testosterona 2×10^{-11} M provocou uma

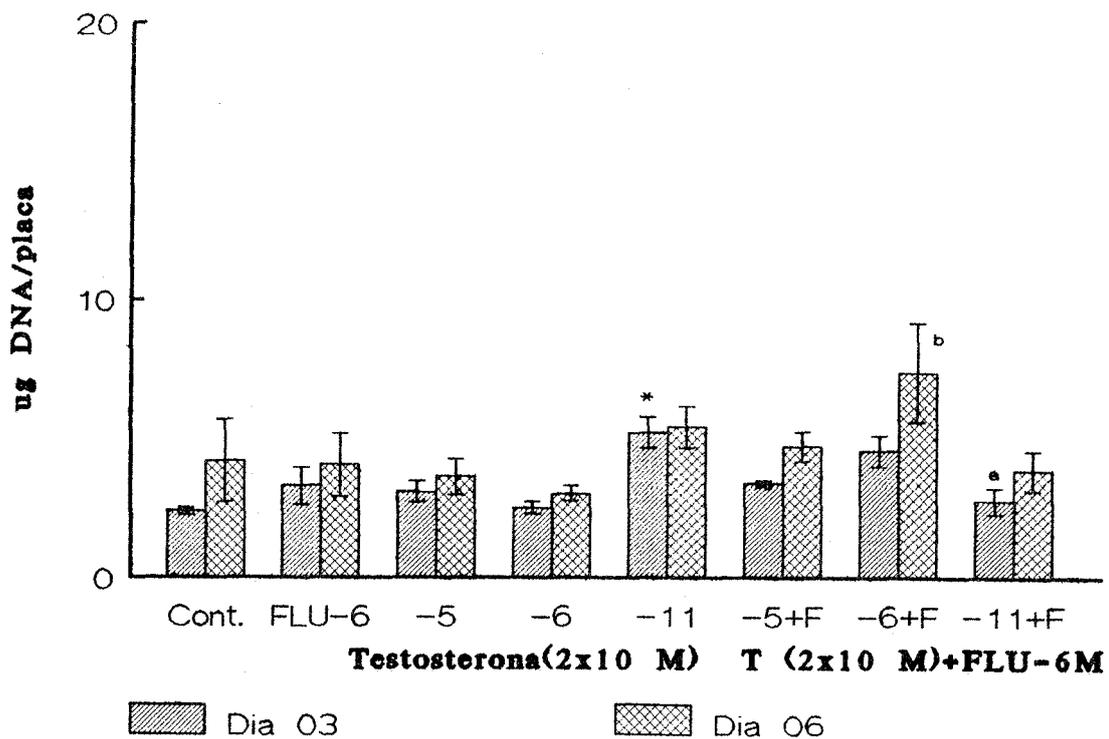


Figura17: Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células epiteliais de próstata humana não transformadas em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle, meio com flutamida (FLU), com testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-11} M e meio com testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-11} associada a Flutamida 10^{-6} M. A proliferação celular foi avaliada no 3º e 6º dia de cultura pelo conteúdo de DNA total (μg DNA/placa). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

* $p < 0,05$ em relação ao controle e testosterona 2×10^{-6} M, 3º dia

a $p < 0,05$ em relação a testosterona 2×10^{-11} M, 3º dia

b $p < 0,05$ em relação a testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} M e testosterona 2×10^{-11} M + flutamida 10^{-6} M, 6º dia

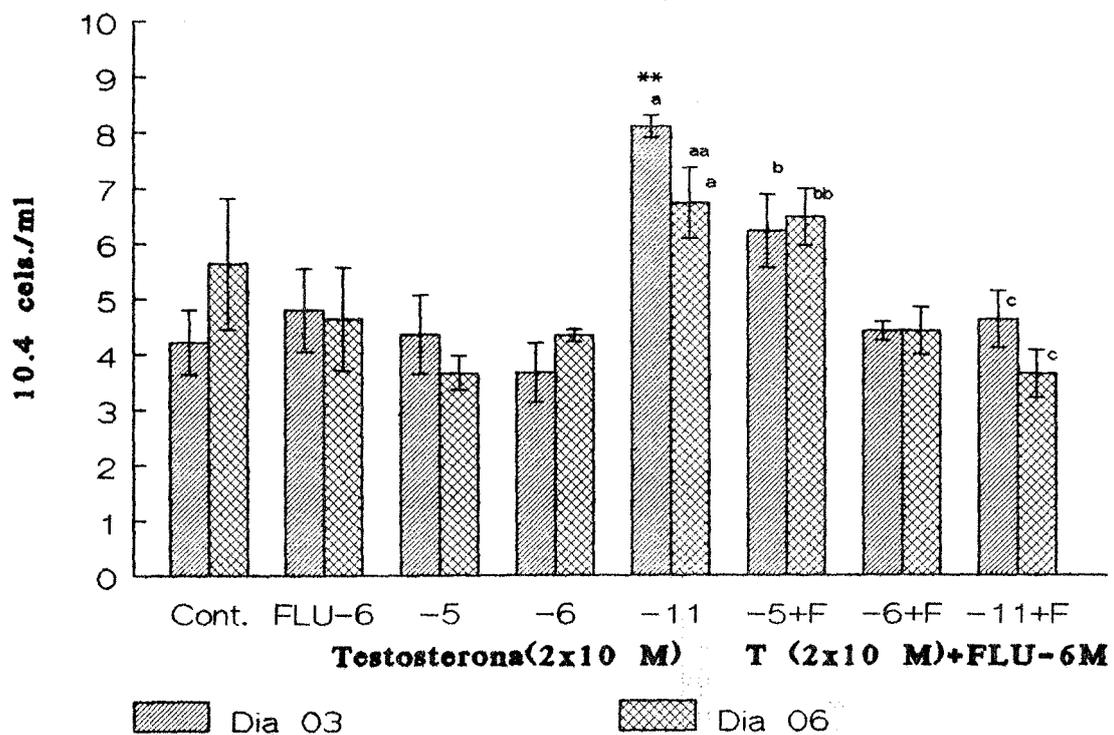


Figura18: Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células epiteliais prostáticas humanas não transformadas em cultura primária. As células foram incubadas em meio controle, meio com Flutamida $10^{-6}M$, meio com Testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , $2 \times 10^{-11}M$ isolada ou associada a flutamida $10^{-6}M$. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de cultura, através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

** $p < 0,01$ em relação ao controle, flutamida, testosterona 2×10^{-5} e 2×10^{-6} , 3° dia

b $p < 0,05$ em relação à testosterona $2 \times 10^{-5}M$, 3° dia

a $p < 0,05$ em relação à flutamida $10^{-6}M$ e testosterona $2 \times 10^{-6}M$, 6° dia

aa $p < 0,01$ em relação à testosterona 2×10^{-5} , 6° dia

bb $p < 0,01$ em relação à testosterona $2 \times 10^{-5}M$, 6° dia

c $p < 0,01$ em relação à testosterona $2 \times 10^{-11}M$, 3° e 6° dia

redução significativa no número de células, nos dias 3 e 6 de cultura, quando comparado com as células tratadas com testosterona 2×10^{-11} M isolada ($p < 0,01$). O grupo tratado com testosterona 2×10^{-5} M associado a flutamida apresentou um índice de proliferação celular significativamente maior que o grupo tratado apenas com testosterona 2×10^{-5} M, no 3° dia de tratamento ($p < 0,05$) e no 6° dia de tratamento ($p < 0,01$).

A figura 19 ilustra os resultados obtidos quando células estromais foram incubadas em cultura secundária, em meio controle e meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M isolada ou associada a flutamida 10^{-6} M. A proliferação celular foi avaliada pela contagem do número de células no 3° e 6° dia de cultura. As células incubadas com testosterona na concentração de 2×10^{-11} M apresentaram um índice de proliferação celular significativamente maior ($p < 0,05$) que aquelas incubadas com testosterona na concentração de 2×10^{-5} M, no 3° dia. No 6° dia de cultura, este mesmo grupo (testosterona 2×10^{-11} M) apresentou um índice de proliferação significativamente maior ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle e aos grupos tratados com testosterona nas concentrações de 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-10} M. O grupo tratado com a associação testosterona 2×10^{-11} M e flutamida 10^{-6} M apresentou uma redução significativa ($p < 0,01$) no número de células em comparação ao grupo tratado apenas com testosterona 2×10^{-11} M. As células tratadas com testosterona 2×10^{-5} e 2×10^{-6} M associada a flutamida 10^{-6} M, apresentaram um índice de proliferação significativamente maior ($p < 0,05$) que as células incubadas com as respectivas concentrações de testosterona isolada.

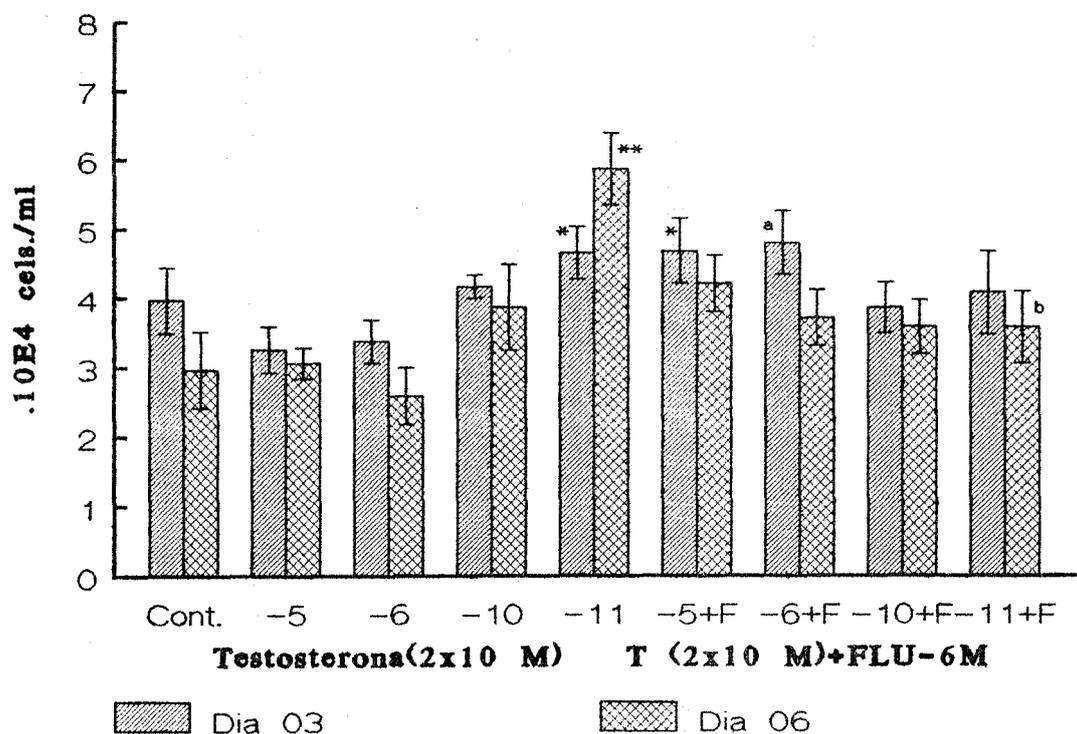


Figura 19: Efeitos da testosterona e do antiandrógeno flutamida sobre a proliferação de células estromais prostáticas humanas não transformadas em cultura secundária. As células foram incubadas em meio controle e meio com testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M isolada ou associada a flutamida 10^{-6} M. A proliferação celular foi avaliada no 3° e 6° dia de cultura, através da contagem do número de células ($\times 10^4$ cels./ml). Cada coluna representa a média \pm EP (n=4).

* $p < 0,05$ em relação à testosterona 2×10^{-5} M, 3° dia

a $p < 0,05$ em relação à testosterona 2×10^{-6} M, 3° dia

** $p < 0,01$ em relação ao controle, testosterona 2×10^{-5} , 2×10^{-6} e 2×10^{-10} M, 6° dia

b $p < 0,01$ em relação à testosterona 2×10^{-11} M, 6° dia

DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a regulação hormonal da próstata, entre eles os estudos "in vitro" como cultura de órgãos, de explantes, cultura de curto tempo, cultura de células normais ou neoplásicas, humanas ou animais e, estudos "in vivo", com a utilização de próstata de ratos e de cães.

O modelo de cultura de células utilizado neste trabalho, a partir de próstata humana proveniente de pacientes submetidos à prostatectomia por HPB (Spritzer e Poy, 1990), foi estabelecido a partir de modificações das técnicas utilizadas por Cowan et al (1976) e Habib et al (1981), para obtenção de células prostáticas humanas em cultura, e por Malet e colaboradores (1988), para o cultivo de células de mama normal; este sistema de cultura de células representa um modelo relativamente simples e adaptável às condições do nosso laboratório. Na escolha deste modelo foi considerado também que as células epiteliais cultivadas em monocamada, em cultura primária, e células estromais em cultura secundária (uma passagem), estão mais próximas de seu padrão de origem, além de possibilitar o estudo da ação dos andrógenos nos tipos celulares isolados. Outras técnicas de cultura também foram descritas para esse tipo de células (Peehl e Stamey, 1984 e 1986; Peehl, 1992).

A próstata humana difere consideravelmente da próstata de roedores em seu desenvolvimento embriológico, anatomia adulta e etiologia de doenças. No

entanto, a próstata de rato tem sido amplamente utilizada para análises "in vivo" do potencial biológico de agonistas e antagonistas androgênicos e para estudos do seu mecanismo de ação. Este modelo tem algumas limitações. Para estudos de ações biológicas, é necessário grande número de animais e relativamente grandes quantidades do composto a ser estudado. Além disso, a administração "in vivo" de um esteróide torna-o sujeito a alterações metabólicas pelo fígado ou outros órgãos, o que pode potenciar ou minimizar o seu efeito, tornando difícil discernir os efeitos das modificações estruturais específicas pela ação de andrógenos (Shao, T.C. et al, 1986).

Além do homem, o cão é a única espécie que desenvolve uma forma espontânea de hiperplasia próstática benigna ao longo dos anos. A hiperplasia espontânea em cães difere em diversos aspectos da HPB humana. Enquanto a HPB humana envolve aumento do estroma e epitélio, no cão é observado apenas um aumento nos elementos epiteliais. Cães com hiperplasia de próstata desenvolvem sintomas de obstrução fecal em lugar da obstrução da uretra observada em homens. Entretanto, apesar das diferenças, a próstata desses animais tem sido usada como modelo para estudos da hiperplasia prostática benigna humana (Siiteri e Wilson, 1970; Geller et al, 1976; Meikle et al, 1980; Walsh et al, 1983; Gloyna et al, 1970; Peehl, 1992)

A utilização de linhagens celulares provenientes de carcinoma de próstata é um modelo bastante utilizado atualmente para estudos dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na patogênese deste tipo de carcinoma (Launoit et al, 1991; Narayan e Dahiya, 1992). Até o momento, apenas 3 linhagens de carcinoma prostático humano são consideradas bem caracterizadas pela avaliação da Coleção Americana de Tipos Celulares para Cultura (Rockville, MD) (Horoszewics et al, 1983; Kaighn et al, 1979 e Stone et al, 1978). Outras linhagens têm sido citadas na literatura, mas a maioria

delas não é capaz de se propagar em cultura e crescem somente quando implantadas em camundongos (Okada et al, 1976; Iizumi et al, 1989; Brothman et al, 1989).

A dependência natural do tecido prostático a andrógenos é bem aceita, mas o papel destes esteróides na HPB não está bem estabelecido. Fatores que afetam o crescimento do epitélio prostático humano são difíceis de serem estudados "in vivo", principalmente pela composição celular heterogênea da próstata. Até o presente, a forma mais adequada para o estudo destes tecidos é a técnica de cultura. Procedimentos de cultura de órgãos têm sido extensamente usados para análises do metabolismo de esteróides e seus efeitos na síntese de RNA e DNA e para avaliar número de receptores de andrógenos ou proliferação celular. Estudos de proliferação são mais factíveis em cultura de células não transformadas, em monocamada (Syms, et al 1982), também podendo ser realizados com a utilização de linhagens estabelecidas.

Também é importante para os estudos de proliferação celular, além de um sistema biológico apropriado, o emprego de um método acurado para a quantificação do crescimento da cultura. Uma série de métodos de medida de proliferação celular têm sido descritos em sistemas biológicos como contagem de células, de núcleos, índice mitótico, síntese de DNA, área de crescimento celular e outros. No presente trabalho, foi utilizado um método de contagem do número de células em câmara de Neubauer, paralelamente à análise de síntese de DNA, para comparar, "in vitro", os ritmos de multiplicação destas células, sob os diferentes tratamentos hormonais. Os dois métodos utilizados fornecem resultados comparáveis e têm sido comumente utilizados neste tipo de estudo (Burton, 1956; Bolton et al 1981; Wilding et al 1989; Sikes et al 1990; Levine et al 1992).

Ao iniciar o trabalho, um primeiro aspecto foi o de estabelecer se as células de próstata humana não transformadas, mantidas em cultura, utilizadas neste trabalho, poderiam representar um modelo apropriado para avaliar modificações de respostas biológicas induzidas pela adição de hormônios exógenos. Conforme demonstrado pelas curvas de crescimento obtidas, estas células permanecem viáveis para estudos de proliferação durante o tempo previsto como necessário, validando assim a utilização do modelo experimental descrito para o desenvolvimento destes estudos.

Segundo relatos descritos na literatura, células normais mantidas em cultura requerem alguma quantidade de proteína e fatores de crescimento do soro para sustentar a multiplicação e em células, onde tais necessidades não estão completamente caracterizadas, requerem grandes quantidades de soro total (Jacoby, 1979).

Como foi demonstrado neste trabalho, diversas tentativas foram feitas para a manutenção de células prostáticas humanas em cultura com a menor concentração possível de soro no meio de cultura, considerando que era necessário um modelo onde as células se mantivessem vivas e multiplicando-se em condições basais. As células prostáticas humanas não transformadas, estromais e epiteliais não mantiveram um nível de crescimento adequado para estudos de proliferação, quando incubadas em meio de cultura com concentrações de soro bovino fetal (SBF) inferiores a 5%. O soro adicionado ao meio de cultura possui, além de pequena quantidade de esteróides, fatores de crescimento não esteróides e nutrientes de baixo peso molecular necessários para a manutenção da proliferação celular. Provavelmente, com 1% e 2,5%, a quantidade desses fatores não esteróides tenha sido insuficiente para manter esta população celular em cultura. Cabe também lembrar que nenhum outro fator de crescimento foi adicionado ao meio de cultura além daqueles presentes

no soro. Alguns trabalhos têm sido publicados mostrando que é possível o crescimento de células humanas normais, em meio livre de soro, uma vez que sejam definidas as necessidades nutritivas destas células e supridas pelo desenvolvimento de um meio definido, o qual contém todos os componentes necessários para manter o crescimento do tipo celular a ser estudado (Tsao, Walthall, e Ham, 1982; Syms, 1982). Levine (1992) demonstrou que fibroblastos derivados de próstata humana, quando incubados em condições livres de soro, não apresentaram um bom índice de adesão à placa de cultura, sendo que apenas 10% das células aderiram, enquanto que em meio suplementado com 10% SBF foi obtida uma adesão de 60% das células. Neste trabalho, as células incubadas com 5% e 10% de SBF não apresentaram diferença significativa na proliferação celular, o que indica que as células epiteliais ou estromais de próstata humana, não transformadas, podem ser mantidas nessas condições experimentais com 5% de SBF.

A presença de hormônios no soro adicionado ao meio de cultura dificulta a demonstração dos efeitos hormonais específicos na proliferação das células cultivadas. Tentativas para resolver este problema têm incluído o uso de soro tratado com carvão-dextrana ou meio sem soro. O soro tratado com carvão-dextrana tem sido usado em muitos estudos sobre a ação de hormônios esteróides, já que estes esteróides são adsorvidos pelo carvão-dextrana e facilmente removidos do soro por centrifugação (Horwitz e McGuire, 1978). No nosso modelo experimental, quando as células epiteliais de próstata humana foram incubadas com meio contendo 5% de SBF total ou 5% de SBF tratado com carvão-dextrana, apenas no 2º dia de cultura o número de células foi menor no meio contendo SBF tratado com carvão-dextrana. É possível que tenha ocorrido uma lentificação inicial na proliferação das células tratadas com adição de 5% de SBF desteroidado. A partir do 4º dia de incubação, o número

de células foi muito semelhante nos dois meios de cultura, permanecendo até o final do período de incubação, quando não foi evidenciada nenhuma diferença significativa no número de células nestas condições entre os dois grupos. Isto sugere que não são os esteróides os fatores contidos no soro, responsáveis pela boa aderência e multiplicação destas células, mas sim fatores de crescimento ou outros fatores não esteróides. A partir destes resultados, optamos por utilizar a adição de 5% SBF total ao meio de cultura como condição controle.

Cabe salientar que a concentração de testosterona medida por radioimunoensaio no soro total foi de 0,046 ng/ml (correspondendo a $1,6 \times 10^{-13}$ M). Como utilizou-se somente 5% de soro, a concentração final de testosterona adicionada ao meio de cultura através do soro foi de $0,8 \times 10^{-14}$ M, um valor 1000 vezes menor que a menor dose de testosterona usada para os estudos de proliferação, o que indica que a pequena quantidade de esteróides presentes no SBF total não exerceu influência significativa sobre os dados de proliferação celular apresentados neste trabalho. A concentração de T no soro tratado com carvão-dextrana foi indetectável. Observações semelhantes foram verificadas em linhagens celulares de carcinoma de mama humano em cultura, crescidas em meio contendo soro bovino fetal tratado com carvão-dextrana (Brian e Lykkesfeldt, 1984).

É conhecido que os andrógenos acionam o processo de crescimento em seus tecidos alvo, mas o mecanismo de controle deste crescimento não está esclarecido. Os andrógenos podem influenciar diretamente a síntese de DNA, bloquear a ação de um inibidor constitutivo (Sonnenschein, Olea, Pasanem & Soto, 1989), induzir a síntese de substâncias mitogênicas e/ou regular a produção de um inibidor induzível. Os andrógenos podem também exercer seus efeitos através da "up regulation" do número de receptores de EGF (Schuurmans et al 1988; Wilding et al 1989) e RNA_m de receptores de EGF, ou

por inibição de um fator isolado (Sonnenschein et al 1989). No tecido prostático, os andrógenos exercem um efeito proliferativo bem estabelecido em condições de multiplicação acelerada, como por exemplo durante a vida fetal e puberdade, ou em situações patológicas como câncer de próstata. No entanto, durante a vida adulta tem sido postulado (Davies e Eaton 1991) que os andrógenos exerceriam um controle inibitório sobre os mecanismos moleculares de proliferação celular. Assim, uma discreta redução dos níveis intraprostáticos de andrógenos e/ou um desequilíbrio na relação andrógeno/estrógeno, poderia levar a um "escape" deste controle e aumento da multiplicação celular.

Vários estudos têm abordado o crescimento anormal da próstata e os mecanismos envolvidos. Os andrógenos parecem manter um rigoroso controle da homeostase desta glândula, modulando a funcionalidade do receptor, a produção de fatores de crescimento e/ou induzindo substratos celulares em resposta aos agentes regulatórios (Davies e Eaton 1991; Katz et al 1989). Mas além disso, o tecido prostático responde a uma variedade de fatores esteróides e não esteróides e produz uma grande quantidade de fatores de crescimento que se combinam para criar um ótimo ambiente glandular regulatório e manter o equilíbrio funcional da glândula. Um desequilíbrio de fatores opostos resultaria em HPB (Davies e Eaton, 1991).

No presente trabalho, quando células epiteliais e estromais não transformadas de próstata humana foram cultivadas em meio contendo testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} a 2×10^{-8} M, não foi observado qualquer efeito deste hormônio sobre a proliferação celular. A ausência de efeito proliferativo da testosterona sobre estas células, nas condições experimentais descritas, pode estar relacionada ao tempo de tratamento que pode ter sido insuficiente para a observação de respostas proliferativas "in

vitro". Entretanto a manutenção de células prostáticas não transformadas em cultura primária só é possível a curto prazo, pois estas células não sobrevivem em cultura por longo tempo (Spritzer e Poy, 1990). Por outro lado, outros autores também observaram a ausência de efeito de andrógenos sobre células prostáticas em diferentes condições experimentais. McKeehan et al (1984) não conseguiram demonstrar o efeito de andrógenos sobre a proliferação celular, quando células epiteliais de próstata de rato foram incubadas em cultura primária, em meio livre de soro, com $1\mu\text{M}$ de DHT ou testosterona. Neste mesmo estudo, os autores observaram que concentrações de andrógenos acima de $1\mu\text{M}$ foram inibitórias sobre a proliferação celular (McKeehan, Adams e Rosser, 1984). Outros estudos igualmente não evidenciaram efeito da testosterona e DHT sobre o crescimento de células epiteliais prostáticas em culturas primárias e linhagens estabelecidas (Boileau et al, 1978; Orlowiski et al, 1983 e 1986; Schroder, 1971; Kaigh, 1979). Outros autores, utilizando cultura de órgão, observaram ausência de efeito de hormônios sobre o crescimento de tecido hiperplásico prostático (Schrodt e Foreman, 1971; McRae et al, 1973). Segundo McKeehan (1984), as dificuldades encontradas em obter alguma resposta "in vitro" podem ser atribuídas à natureza não dependente de andrógenos das células, ou a altas concentrações ($>1\mu\text{g/ml}$) de esteróides usados nos experimentos. Um outro fator que pode estar relacionado a esta ausência de efeito proliferativo é a utilização de um andrógeno menos potente que a DHT, um metabólito 5α -reduzido da T, considerado o andrógeno ativo no tecido prostático. Existe controvérsia a respeito de possíveis alterações no metabolismo intra-prostático dos andrógenos e eventual acúmulo de um destes metabólitos. Siiteri e Wilson (1970), em seus estudos sobre a concentração de dihidrotestosterona (DHT) prostática na HPB, utilizando uma técnica de duplo isótopo para medir o conteúdo de andrógenos teciduais,

encontraram níveis de DHT significativamente maiores em HPB que em próstata normal. Geller et al em 1976, comparando o metabolismo de andrógenos em HPB e próstata normal, através de cromatografia de camada fina, observaram que nos tecidos hiperplásicos os níveis de DHT foram significativamente maiores que em tecido normal. Meikle et al (1980), analisando o conteúdo de DHT nuclear em tecido prostático hiperplásico humano, observaram igualmente que o conteúdo de andrógenos endógenos quantificado por radioimunoensaio foi significativamente maior em tecido hiperplásico que em tecido normal. No entanto, Walsh et al, em 1983, mostraram que o conteúdo de DHT do tecido prostático hiperplásico humano não é supranormal, não havendo diferença entre o tecido normal e o hiperplásico, de acordo com análises feitas por radioimunoensaio dos esteróides purificados por cromatografia líquida. Gloina et al, em 1970, analisaram o conteúdo de DHT em próstatas imaturas, maduras e hiperplásicas de cães, pela técnica de duplo isótopo e observaram que o conteúdo de DHT é cinco vezes maior em próstatas hiperplásicas que nas demais próstatas estudadas. Quando o estroma e epitélio de próstata ventral de ratos foram separados e incubados com H^3 -testosterona, foi observado que 80 a 90 % da radioatividade retida, analisada por cromatografia de camada fina, estava associada a células epiteliais. Orłowski et al (1983), bem como Rubenstein et al (1980) também estudaram a atividade das enzimas 5α redutase e 3α -hidroxisteróide desidrogenase em células epiteliais e estromais de ratos maduros e imaturos, em cultura de curto tempo, observando que ocorreu uma maior formação de metabólitos 5α reduzidos nas células epiteliais, tanto de ratos imaturos como de ratos adultos.

Shannon e Cunha (1983), em experimentos utilizando a localização autoradiográfica da ligação de andrógenos durante o desenvolvimento da

próstata de camundongo, mostraram que a H³-testosterona, na fase pré-natal, era encontrada apenas no estroma, enquanto que no período pós-natal, era encontrada tanto em células estromais como epiteliais. Na fase adulta, a localização de H³-testosterona era principalmente no epitélio.

Entretanto, outros trabalhos mostram efeitos da T ou DHT sobre o tecido prostático. Lasnitzki (1970) realizou estudos em cultura de explantes de próstata, onde análises autoradiográficas confirmaram o efeito de andrógenos na captação de H³-timidina, mas não identificaram claramente o tipo de células que são primariamente responsáveis aos andrógenos. Syms et al (1982) estudaram a proliferação de células prostáticas humanas, crescidas em monocamada a partir de explantes de tecido hiperplásico, incubados em meio 199 suplementado com glutamina (100 µg/ml) e 8% SBF. Observaram que tanto a testosterona na concentração de 10⁻⁷M como a DHT, nas concentrações de 10⁻⁷ e 10⁻⁸ M, estimularam a proliferação do epitélio prostático humano. A análise de proliferação foi realizada no 7º dia de cultura e baseou-se no número de células em metáfase e na área de crescimento da monocamada, contadas com uma grade com quadrantes de 2mm.

Também poderia ser considerado que o efeito dos andrógenos pode ocorrer via algum fator circulante, entretanto, como será descrito a seguir, pequenas doses de testosterona exercem efeito estimulatório sobre a proliferação celular, o que invalida esta hipótese.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que utilizando pequenas doses de andrógenos ocorre uma resposta proliferativa positiva a esse hormônio, sugerindo, como foi referido anteriormente, que concentrações moderadas de andrógenos, neste caso a testosterona, poderiam manter um controle inibitório da proliferação celular no tecido não transformado. A adição de doses moderadas de testosterona ao meio de incubação poderiam ter

permitido um escape destes mecanismos regulatórios, desencadeando um aumento da proliferação celular, o que caracteriza um mecanismo de ação bifásica da T sobre as células de próstata. Esta parece ser a primeira vez que este tipo de efeito é descrito em células prostáticas não transformadas. Launoit et al (1991) demonstraram uma ação bifásica da DHT, trabalhando com a linhagem celular LNCaP, oriunda de carcinoma de próstata metastático.

Um outro aspecto considerado foi a possibilidade que este efeito bifásico pudesse estar sendo mediado pela ligação de T a um outro receptor que não o receptor de andrógeno clássico.

Buscando avaliar o envolvimento do receptor de andrógenos no mecanismo de proliferação destas células, analisamos o comportamento das células epiteliais e estromais de próstata na presença de testosterona isolada ou associada a flutamida. A flutamida é um antiandrógeno puro, não esteroide, que tem sido usado "in vitro" e "in vivo" para investigar o envolvimento do receptor de andrógenos nos mecanismos que desencadeiam as diferentes ações biológicas. Este composto inibe a ligação de DHT, o andrógeno ativo no crescimento prostático, ao seu receptor intracelular. Quando a flutamida (10^{-6} M) foi associada à testosterona e adicionada ao meio de cultura, o efeito proliferativo provocado pela menor dose de testosterona utilizada foi significativamente inibido. A flutamida isolada não exerceu nenhum efeito proliferativo sobre estas células. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Labrie, onde ele demonstrou que utilizando flutamida isolada nenhum efeito é produzido sobre a próstata ventral de ratos, mas quando associada a outros andrógenos (DHEA, Δ^4 -diona, Δ^4 -diona mais DHEA, testosterona ou testosterona mais Δ^4 -diona mais DHEA) reverteu o efeito estimulatório sobre o crescimento da próstata causado por estes esteróides (Labrie et al 1989). Chang, também em 1989, estudando o papel dos

andrógenos em cultura de células epiteliais e fibroblastos de linhagens estabelecidas destas células, demonstrou que a 4-hidroxi-flutamida pode eficientemente antagonizar o efeito da dihidrotestosterona nestas células.

Em experimentos "in vivo", Fleshner et al (1992) utilizaram flutamida 10mg/kg e finasteride, um outro anti-andrógênio 0,15mg/kg por 7 dias em ratos adultos, observando uma redução significativa no crescimento da próstata ventral destes ratos.

Estes resultados sugerem que o efeito proliferativo desencadeado por pequenas doses de testosterona sobre as células epiteliais e estromais de próstata não transformadas deve estar ocorrendo via receptor de andrógenos.

Um dado interessante do presente trabalho foi a resposta observada com a adição de flutamida a doses maiores de T. Nestas condições experimentais, houve uma resposta semelhante àquela observada com pequenas doses de T isolada. A flutamida, nesta situação, por competição com o receptor de andrógênio, funcionou bloqueando parcialmente estes receptores, mimetizando o que ocorre com pequenas doses de andrógenos. Estes dados reforçam as evidências de que os efeitos da T sobre a proliferação das células prostáticas, neste trabalho, ocorram via receptor de andrógenos. Dados semelhantes a estes foram observados em cultura de células LNCaP, as quais possuem um receptor de andrógênio modificado (Wilding et al 1989) e, em cultura de fibroblastos fetais humanos em meio livre de soro, após seis dias de cultura, quando a utilização de OH-FLU 10^{-7} M associada a DHT 10^{-7} M, aumentou em 3 vezes o número de células em relação ao controle (Levine et al 1992).

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, propõe-se que em células não transformadas os andrógenos exerçam um controle inibitório sobre a proliferação celular da próstata de indivíduos adultos normais e que um desequilíbrio, nas concentrações fisiológicas destes esteróides e suas interações

com os estrógenos, levaria a um escape dos mecanismos regulatórios com aumento de proliferação celular. Esta hipótese já foi sugerida por Launoit em 1971, utilizando linhagem de células carcinomatosas humanas. Por outro lado, embora sejam bem conhecidos os efeitos "in vivo" dos andrógenos sobre a multiplicação celular prostática, as conclusões de estudos "in vitro" são ainda controversas.

O controle da proliferação de células prostáticas é um processo complexo, envolvendo numerosas interações entre hormônios, fatores de crescimento e protooncogenes, que podem ser modificados de acordo com as condições experimentais utilizadas.

Assim, a partir dos dados obtidos no presente trabalho, impõe-se o estudo mais aprofundado dos mecanismos moleculares envolvidos com a regulação hormonal da próstata, incluindo tanto o estudo de receptores de esteróides sexuais quanto a expressão do RNA_m de diversos fatores de crescimento e protooncogenes relacionados com a proliferação celular, induzidos ou não por hormônios esteróides.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1 - As células epiteliais prostáticas humanas não transformadas puderam ser mantidas em cultura por 10 dias, utilizando-se como meio básico o meio 199 com adição de 5% de SBF. As células estromais permaneceram viáveis após um processo de repicagem, tendo sido capazes de crescer em cultura secundária com o mesmo meio de cultura das células epiteliais. Nas condições experimentais utilizadas, os dois tipos celulares apresentaram-se com aspecto morfológico característico e com uma curva de proliferação celular evidenciando crescimento durante o período de incubação. O padrão proliferativo das células estudadas não foi alterado com o uso de SBF desteroideado, quando comparado com o meio contendo SBF não tratado, embora tenha sido observada uma tendência ao descolamento das células.

2 - A testosterona adicionada ao meio básico nas concentrações de 2×10^{-5} a 2×10^{-9} M não apresentou efeito proliferativo sobre as células epiteliais ou estromais, quando comparada com o padrão proliferativo de células incubadas apenas com meio básico. Nas concentrações de 2×10^{-10} e 2×10^{-11} M a testosterona estimulou significativamente a proliferação das

células epiteliais e estromais. Estes resultados sugerem um mecanismo bifásico para a regulação hormonal das células prostáticas humanas, onde doses mais elevadas de testosterona mantém o controle da proliferação em células diferenciadas e concentrações menores permitiriam o escape destes mecanismos regulatórios.

3 - O antiandrógeno flutamida (10^{-6} M) associado às menores doses de testosterona inibiu significativamente o efeito proliferativo induzido por este andrógeno tanto em células epiteliais como estromais, sugerindo que o mecanismo de ação da testosterona nestas células ocorre via receptor de andrógenos. Por outro lado, a associação de flutamida (10^{-6} M) com a testosterona em concentrações maiores (2×10^{-5} e 2×10^{-6} M) estimulou a proliferação das células epiteliais e estromais, quando comparada com a proliferação de células incubadas apenas com testosterona nas mesmas doses. Estes dados indicam que a flutamida, nestas condições hormonais, agiu bloqueando parcialmente os receptores de andrógenos, mimetizando os dados obtidos com pequenas doses deste esteróide e reforçando as evidências que os efeitos da testosterona sobre a proliferação das células prostáticas, apresentados neste trabalho, estão relacionados com o receptor de andrógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol* 3: 69-96, 1974.
- AUMULLER, G. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *The Prostate* 4: 195-201, 1983.
- BARTSCH G, ROHR HP. Comparative light and electron microscopic study of the human, dog and rat prostate. *Urol Int* 35: 91-97, 1980.
- BAULIEU EE, GOASCOGNE C, GROYER A, FEYEL-CABANES T, ROBEL P. Morphological e bioquematical parameters of androgen effects on rat ventral prostate in organ culture. *Vitamins and hormones*, 33: 1-38, 1975.
- BERRY S, ISAACS CJ. Comparative aspects of prostatic growth and androgen metabolism with aging in the rat versus the dog. *Endocrinology* 114: 511-516, 1984.
- BERRY SJ, COFFEY DS, WALSH PC, EWING LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urology* 132: 474-479, 1984.
- BOILEAU M, KEENAN E, KEMP E, LAWSON R, HODGES CV. The effect of human serum on 3H - thymidine incorporation in human prostate tumours in tissue culture. *J Urol* 119: 777-786, 1978.
- BOLTON, NJ, LAHTONEN, R, HAMMOND GL, VIHKO R. Distribution and concentrations of androgens in epithelial and stromal compartments of the human benign hypertrophic prostate. *J. Endocrinology* 90: 125-131, 1981.
- BOSTWICK DG, COONER, WH, DENIS L, JONES GW, SCARDINO PT, MURPHY, GP. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer* 70 (Suplement): 291-301, 1992.
- BOUTON MM, PORNIN C, GRANDADAN JA. Estrogen regulation of rat prostate androgen receptor. *J Steroid Biochem* 15: 403-408, 1981.

- BRIAND P, LYKKESFELDT AE. Effect of estrogen and antiestrogen on the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to growth at low serum concentration. *Cancer Res* 44: 1114-1119, 1984.
- BROTHMAN AR, LESLO LJ, SOMERS KD, WRIGHT GL, MERCHANT DL. Phenotypic and cytogenic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 44: 898-902, 1989.
- BRUCHOWSKY N, LESSER B, VAN DOORN E, CRAVEN S. Hormonal effects on cell proliferation in the rat prostate. *Vitamins Hormones* 33: 61-100, 1975.
- BRUCHOWSKY N, WILSON JD. The conversion of testosterone to 5α -androstan- 17β -ol-3one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 243: 2012-2021, 1968.
- BURTON K. A study of the mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem J* 62: 315-323, 1956.
- CARTER BS, CARTER HB, ISAACS JT. Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostatic cancer. *The Prostate* 16: 187-197, 1990.
- CARTER HB, COFFEY DS. The prostate: an increasing medical problem. *The Prostate* 16: 39-48, 1990.
- CHAN L, O'MALLEY BW. Mechanism of action of the sex steroid hormones (first of two parts). *N Engl J Med* 294: 1322-1328, 1976.
- CHANG SM, CHUNG LWK. Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture: role of androgen. *Endocrinology* 125: 2719-2727, 1989.
- CHEVALIER S, BLEAU G, ROBERTS KD, CHAPDELAIN, A. Proliferation and differentiation of canine prostatic epithelial cells in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 24: 195-208, 1981.
- COWAN RA, COWAN SK, GILES CA, GRANT JK. Prostatic distribution of sex hormone-binding globulin and cortisol-binding globulin benign hyperplasia. *J Endocr* 71: 121-131, 1976.
- CUNHA GR, DONJACOUR AA, COOKE PS, MEE S, BIGSBY RM, HIGGINS SJ, SUGIMURA Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews* 8: 338-362, 1987.
- CUNHA GR. Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat Rec* 172: 179-183, 1972.

- CUNHA GR. The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175: 87-93, 1973.
- DAMBER JE, BERGH A, LANDSTROM M, TOMIC R. Treatment of rat prostatic adenocarcinoma with medroxyprogesterone acetate (MPA): effects on growth and morphology. *J Urology* 145: 1283-1287, 1991.
- DAVIES P, EATON CL. Binding of epidermal growth factor by human normal, hypertrophic, and carcinomatous prostate. *The Prostate* 14:123-132, 1989.
- DAVIES P, EATON CL. Regulation of prostate growth. *J. Endocrinology* 131: 5-17, 1991.
- DeKLERK DP, COFFEY DS. Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique: biomorphometrics. *Invest Urol* 16: 240-245, 1978.
- DeKLERK DP, LOMBARD CJ. Stromal and epithelial growth of the prostate during puberty. *The Prostate* 9: 191-196, 1986.
- ENGLISH HF, DRAGO JR, SANTEN RJ. Cellular response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate: autoradiography and morphometric analysis. *The Prostate* 7: 41-51, 1985.
- EVANS V, PERRY V, VICENT M. Tissue culture association manual. *Biomed Res Institute* vol I, 1975.
- FICHMAN KR, MIGEON BR, MIGEON CJ. Genetic disorders of male sexual differentiation. In *Advances in Human Genetics* v.10, New York, Plenum Press 1980 p.333-377.
- FLESHNER NE, TRACHTENBERG J. Sequential androgen blockade: a biological study in the inhibition of prostatic growth. *J. Urology* 148: 1928-1931, 1992.
- FRANKS LM, BARTON AA. The effects of testosterone on the ultra-structure of the mouse prostate in vivo and in organ cultures. *Exp Cell Res* 19: 35-40, 1960.
- FRANKS LM, RIDDLE PN, CARBONELL AW, GEY GO. A comparative study of the ultrastructure and lack of growth capacity of adult human prostate epithelium mechanically separated from its stroma. *J Pathol* 100: 113-119, 1970.
- FRANKS LM. The effect of age on the structure and response to oestrogens and testosterone of the mouse prostate in organ cultures. *Br J Cancer* 13: 59-68, 1958.

- GELLER J, ALBERT J, LOPEZ D, GELLER S, NIWAYAMA G. Comparison of androgen metabolites in benign prostatic hypertrophy (BPH) and normal prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 686-688, 1976.
- GHANADIAN R, PUAH CM. Relationships between oestradiol -17 β , testosterone, dihydrotestosterone and 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol in human benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Endocr* 88: 255-262, 1981.
- GLOYNA RE, SIITERI PK, WILSON JD. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog. *J. Clin. Investigation* 49: 1746-1753, 1970.
- GORMLEY GJ, STONER E, BRUSKEWITZ RC, MCGINLEY JI, WALSH PC, McCONNEL JD, ANDRIOLE GL, GELLER J, BRACKEN BR, TENOVER JS, VAUGHAN ED, PAPPAS F, TAYLOR A, BINKOWITZ B, JENNIFER NG. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *New england J. Medicine* 327: 1185-1191, 1992.
- GRAYHACK JT. Benign prostatic hyperplasia. *Cancer* 70 (Supplement 1): 275-279, 1992.
- GRIFFIN JE. Androgen resistance - the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 326: 611-618, 1992.
- GRIFFITS K, EATON CL, DAVIES P. Prostatic cancer: aetiology and endocrinology. *Horm Metab Res* 32: (supplement 1) 38-43, 1989.
- GUESS HA. Benign prostatic hyperplasia: antecedents and natural history. *Epidemiologic Reviews* 14: 131-153, 1992.
- HABENICHT UF, SCHWARZ K, SCHWEIKERT HU, NEUMANN F, ETREBY MFE. Development of a model for the induction of estrogen-related prostatic hyperplasia in the dog and its response to the aromatase inhibitor 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione: preliminary results. *The Prostate* 8: 181-194, 1986.
- HABIB FK, TESDALE AL, CHISHOLM GD, BUSUTILL A. Prostatic retropubic and transurethral specimens: a comparison of androgen metabolism in the respective stromal and epithelial components (abstract). *The Prostate* 1: 117-121, 1980.
- HAM RG, McKEEHAN WL. Media and growth requirements. In: JACOBY WB, PASTAW IH (eds): *Methods in Enzymology* vol LVIII, Academic Press, 1979, p 44.

- HAMMOND GL. Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. *J Endocrinol* 78: 7-19, 1978.
- HELLER CG, CLERMONT Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 20: 545-575, 1964.
- HELMS SR, PRETLOW TG, BUESCHEN AJ, LLOYD KL, MURAD TM. Separation of cells with histochemically demonstrable acid phosphatase activity from suspension of cells from human prostatic carcinomas in an isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium. *Cancer Res* 36:481-486, 1976.
- HOROSZEWICS JS, LEONG SS, KAWINSKI E, KARR JP, ROSENTHAL H, CHU TM, MIRAND FA MURPHY GP. LACaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 43: 1809-1818, 1983.
- HORWITZ KB, McGUIRE WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinol* 103: 1742-1751, 1978.
- IIZUMI T, YAZAKI T, KANO S, KONDO I, KOISO K. Establishment of a new prostatic carcinoma cell line derived from primary prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 44: 758-763, 1989.
- ISAACS JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *The Prostate* 5: 545-557, 1984.
- JEPSON JH, GARDNER FH, GORSHEIN D, HAIT WM. Current concepts of the action of androgenic steroids on erythropoiesis. *J Pediatr* 83: 703-708, 1984.
- JOHNSON FP. The later development of the urethra in the male. *J Urol* 4: 447-451, 1920.
- KAIGHN ME, NARAYAN KS, OHNUKI Y, LECHNER JF, JONES LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23, 1979.
- KATZ AE, BENSON MC, WISE GJ, OLSSON CA, BANDYK MG, SAWCZUK IS, TOMASHEFSKY P, BUTTYAN R. Gene activity during the early phase of androgen-stimulated rat prostate regrowth. *Cancer research* 49:5889-5894, 1989.
- KELLOKUMPU LP, SANTTI R, PELLINIEMI LJ. Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and Leydig cells. *Anat Rec* 196: 263-267, 1980.

- KELLOKUMPU LP. Development of sexual dimorphism in human urogenital sinus complex. *Biol Neonate* 48: 157-161, 1985.
- KOZAK I, BARTSCH W, KRIEG M, VOIGT KD. Nuclei of stroma: site of highest estrogen concentration in human benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 3: 433-438, 1982.
- KRIEG M, BARTSCH W, THOMSEN M, VOIGT KD. Androgens and estrogens: their interaction with stroma and epithelium of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. *J. Steroid Biochem.* 19: 155-161, 1983.
- KYPRIANOU N, ISAACS JT. Quantal relationship between prostatic dihydrotestosterone and prostatic cell content: critical threshold concept. *The Prostate* 11: 41-50, 1987.
- LABRIE C, SIMARD J, ZHAO HF, BELANGER A, PELLETIER G, LABRIE F. Stimulation of androgen-dependent gene expression by the adrenal precursors dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 124: 2745-2753, 1989.
- LABRIE C, TRUDEL C, LI S, MARTEL C, COUËT J, LABRIE F. Combination of an antiandrogen and 5 α -reductase inhibitor: a further step towards total androgen blockade?. *Endocrinology* 129: 566-568, 1991.
- LABRIE F, DUPONT A, BELANGER A, LACOURSIERE Y, RAYNAUD JP, HUSSON JM, GAREAU J, FAZEKAS ATA, SANDOW J, MONFETTE G, GIRARD JG, EMOND J, HOULE JG. New aproach in the treatment of prostate cancer: complete instead of partial withdrawal of androgens. *The Prostate* 4: 579-594, 1983.
- LASNITZKI I. Metabolism and action of steroid hormones on human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma grown in organ culture. *J Steroid Biochem* 11: 625-632, 1979.
- LASNITZKI I. The rat prostate gland in organ culture. In GRIFFITHS K, PIERREPOINT CG (eds): "Some aspects of the retiology and biochemistry of prostate cancer." Cardiff: *Fenovus workshop publications*, 1970. pp 68-73.
- LAUNOIT Y, KISS R, JOSSA V, COIBION M, PARIDAENS RJ, BACKER ED, DANGUY AJ, PASTEELS JL. Influences of dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, progesterone, or prolactin on the cell kinetics of human hyperplastic prostatic tissue in organ culture. *The Prostate* 13:143-153, 1988.
- LAUNOIT Y, VEILLEUX R, DUFOUR M, SIMARD J, LABRIE F. Characteristics of the biphasic action of androgens and of the potent antiproliferative effects of

- the new pure antiestrogen EM-139 on cell cycle kinetic parameters in LNCaP human prostatic cancer cells. *Cancer Research* 51: 5163-5170, 1991.
- LEVINE AC, REN M, HUBER GK, KIRSCHENBAUM A. The effect of androgen, estrogen and growth factors on the proliferation on cultured fibroblasts derived from human fetal and adult prostates. *Endocrinology* 130: 2413-2419, 1992.
- LIAO S, TYMOCZKO JL, CASTANEDA E, LIANG T. Androgen receptors and androgen dependent initiation of protein synthesis in the prostate. *Vitam Horm* 33: 297-316, 1975.
- LOMBARDO ME, HAKKY SI, HALL MK, HUDSON PB. In vitro studies on the effect of cofactors on the 5 α -reductase and 3 α and 3 β -hydroxysteroid reductase activities in the hyperplastic human prostate. *J. Urology* 148: 1605-1610, 1992.
- LOWSLEY OS. The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. *Am J Anat* 13: 299- 304, 1912.
- MACINTYRE EH. Cell culture in the study of the mechanism of hormone action. In: RICKENBERG HV (ed). *Biochemistry*, series 1, vol 8, Butterworth and Co, London, 1974, p.305-329.
- MAINWARING WIP, MANGAN ER. A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive tissues. *J Endocrinol* 59: 121-139, 1973.
- MALET C, GOMPEL A, SPRITZER PM, BRICOUT N, YANEVA H, MOWSZOWICZ I, KUTTENN F, MAUVAIS-JARVIS P. Tamoxifen and hydroxitamoxifen isomers versus estradiol effects on normal human breast cells in culture. *Cancer Research* 48: 7193-7199, 1988.
- MARCUS R, KORENMAN SG. Estrogen and the human male. *Annu Rev Med* 27: 357-370, 1976.
- MATUO Y, NISHI N, WADA F. Growth factors in the prostate. *Archives of Andrology* 19: 193-210, 1987.
- McKEEHAN WL, ADAMS PS, ROSSER MP. Direct mitogenic effects on insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Research* 44: 1998-2010, 1984.
- McNEAL JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res* 145: 27-39, 1984.

- McNEAL JE. The prostate gland-morphology and pathobiology. *Monogr Urol* 4: 3-15, 1983.
- McRAE CV, GHANADIAN K, FOTHERBY K, CHISHOLM GD. The effect of testosterone on the human prostate in organ culture. *Br J Urol* 45: 156-161, 1973.
- MEIKLE AW, COLLIER ES, MODDLETON RG, FANG SM. Supranormal nuclear content of 5α -dihydrotestosterone in benign hyperplastic prostate of humans. *J. Clinical Endocrinol. and Metabolism* 51: 945-947, 1980.
- MEIKLE AW, STRINGHAM JD, OLSEN DC. Subnormal tissue 3α -androstanediol and androsterone in prostatic hyperplasia. *J. Clinical Endocrinol. and Metabolism* 47: 909-913, 1978.
- MILLER WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 9: 295-318, 1988.
- MOBBS BG, JOHNSON IE, CONNOLLY JG, THOMPSON J. Concentration and cellular distribution of androgen receptor in human prostatic neoplasia: can estrogen treatment increase androgen receptor content?. *J. Steroid Biochem.* 19: 1279-1290, 1983.
- MOBBS BG, LIU Y. Immunohistochemical localization of progesterone receptor in benign and malignant human prostate. *The Prostate* 16:245-251, 1990.
- MUKHERJEE AS, WASHBURN LL, BANERJEE MR. The role of insulin as a permissive hormone in mammary gland development. *Nature* 246: 159-160, 1973.
- NAGAY MA, SONOHARA S, BRENTANI MM. Estrogen control of lactate dehydrogenase isoenzyme-5 in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 41: 10-16, 1988.
- NARAYAN P, DAHIYA R. Establishment and characterization of a human primary prostatic adenocarcinoma cell line (ND1). *J. Urology* 148: 1600-1604, 1992.
- OKADA K, LAUDENBACH I, SCHROEDER FH. Human prostatic epithelial cells in culture; clonal selection and androgen dependence of cell line EB-33. *J Urol* 115: 164-169, 1976.
- ORLOWSKI J, BIRD CE, CLARK AF. Androgen 5α -reductase and 3α -hydroxysteroid dehydrogenase activities in ventral prostate epithelial and stromal cells from immature and mature rats. *J Endocrinol.* 99: 131-139, 1983.

- ORLOWSKI J, CLARK AF. Androgen metabolism and actions in rat ventral prostate epithelial and stromal cell cultures. *Biochem Cell Biol* 64: 583-593, 1986.
- PEARLMAN WH, CREPY O, MURPHY M. Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy and post-partum period. *J Clin Endocrinol Metab* 27: 1012-1018, 1967.
- PEEHL DM, STAMEY TA. Growth responses of normal, benign hyperplastic, and malignant human prostatic epithelial cells in vitro to cholera toxin, pituitary extract, and hydrocortisone. *The Prostate* 8: 51-61, 1986.
- PEEHL DM, STAMEY TA. Serial propagation of adult human prostatic epithelial cells with cholera toxin. *In Vitro* 20: 981-986, 1984.
- PEEHL DM. Culture of human prostatic epithelial cells. *Culture of Epithelial Cells* 7:159-180, 1992.
- PRETLOW TG. Disaggregation of prostates and purification of epithelial cells from normal and cancerous prostates using sedimentation in an isokinetic density gradient of ficoll in tissue culture medium. *Cancer Chemother.* 59:143-145, 1975
- RUBENSTEIN M, ANDERSON KM. Isolation of viable rat ventral prostate epithelial and nonepithelial cells. *Endocrinology* 106: 530-540, 1980.
- SCHRODT GR, FOREMAN CD. In vitro maintenance of human hyperplastic prostatic tissue. *Invest Urol* 9: 85-88, 1971.
- SCHULZE H, SIEGFRIED C. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. *The Prostate* 16: 331-343, 1990.
- SCHUURMANS ALG, BOLT J, MULDER E. Androgens stimulate both growth rate and epidermal growth factor receptor activity of the human prostate tumor cell LNCaP. *The Prostate* 12: 55-63, 1988.
- SHANNON JM, CUNHA GR. Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *The Prostate* 4: 367-373, 1983.
- SHAO TC, TINDALL DJ, CUNNINGHAM GR. Age dependency of androgen and estrogen effects on incorporation of (3H)-Thymidine by rat prostates in organ culture. *The Prostate* 8: 349-362, 1986.
- SIITERI PK, WILSON JD. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J Clin Invest* 49: 1737-1745, 1970.

- SIKES RA, THOMSEN S, PETROW V, NEUBAUER BL, CHUNG LWK. Inhibition of experimentally induced mouse prostatic hyperplasia by castration or steroid antagonist administration. *Biol Reproduction* 43: 353-362, 1990.
- SONNENSCHN C, OLEA A, PASANEN ME, SOTO AM. Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res* 49: 3474-3481, 1989.
- SPRITZER PM, POY M. Obtenção de células prostáticas humanas em cultura. In: *Reunião anual da FESBE*, 5, 1990, Caxambú. Resumos Caxambú, FESBE, 1990. 619 p. p.241.
- STONE KR, MICKEY DD, WUNDERLI H, MICKEY GH, PAULSON DF. Isolation of a human prostatic carcinoma cell line (DU-145). *Int J Cancer* 21: 274-281, 1978.
- STONE NN, FAIR WR, FISHMAN J. Estrogen formation in human prostatic tissue from patients with and without benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 9: 311-318, 1986.
- SWYER GIM. Post-natal growth changes in the human prostate. *J Anat* 78: 130-144, 1944.
- SYMS AJ, HARPER ME, BATTERSBY S, GRIFFITHS K. Proliferation of human prostatic epithelial cells in culture: aspects of identification. *J Urology* 127: 561-567, 1982.
- THOMAS TG. Estimation of experimental conditions that permit cell separations by velocity sedimentation on isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium. *Anal Biochem* 41:248- 255, 1971.
- TSAO MC, WALTHALL BJ, HAM RG. Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110:219-229, 1982.
- VERMEULEN A. Androgens in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 221-224, 1991.
- WALSH PC, HUTCHINS GM, EWING LL. Tissue content of dihydrotestosterone in human prostatic hyperplasia is not supranormal. *J Clin Invest* 72: 1772-1777, 1983.
- WALSH PC, WILSON JD. The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J Clin Invest* 57: 1093-1097, 1976.

- WILDING G, CHEN M, GELMANN EP. Aberrant response in vitro of hormone-responsive prostate cancer cells to antiandrogens. *The Prostate* 14: 103-115, 1989.
- WILSON JD, GRIFFIN JE, GEORGE FW, LESHIN M. The role of gonadal steroids in sexual differentiation. *Rec Prog Horm Res* 37: 1-39, 1981.
- WILSON JD. Recent studies in the mechanism of action of testosterone. *N Engl J Med* 287: 1284-1291, 1972
- WILSON JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am J Med* 68: 745-752, 1980.
- WILSON JKV, PRETLOW TG, ZAREMBA JL, BRATTAIN MG. Heterogeneity among preparations of crude trypsin used to disaggregate the human tonsil. *Immunology* 30:1-4, 1975.