

STROMAL MODIFICATIONS IN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AS EVIDENCED BY GLYCOSAMINOGLYCAN COMPOSITION

LUIZ E.M. CARDOSO, WALDEMAR S. COSTA, FRANCISCO J.B. SAMPAIO

Urogenital Research Unit and Division of Urology, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Objective: Benign prostatic hyperplasia (BPH) is accompanied by extensive albeit not well known modifications of the extracellular matrix. Herein the matricial composition in BPH was evaluated by analyzing the glycosaminoglycans (GAG) in the prostatic tissue.

Material and Methods: BPH samples were obtained from 6 patients aged 63 to 79 years who had been submitted to open prostatectomy. Controls consisted of the transitional zone of prostates from 6 young adults. GAGs were extracted by papain digestion and cetylpyridinium chloride/ethanol precipitation, assayed by a hexuronic acid method, and the concentrations were expressed as micrograms of hexuronic acid per milligram of dry, defatted tissue. Sulfated GAGs were identified and quantitated by agarose gel electrophoresis.

Results: The concentration of GAG in BPH (1.34 ± 0.20) was increased by 62% ($p < 0.005$) with regard to that in the transitional zone (0.83 ± 0.21). The prevailing sulfated GAG both in the normal and hyperplastic prostates is dermatan sulfate. The proportions of heparan sulfate is unchanged in both cases, whereas the content of dermatan sulfate is decreased (49.2 ± 6.5 vs. $59.9 \pm 4.1\%$, $p < 0.01$) and that of chondroitin sulfate is increased (24.9 ± 4.5 vs. $14.5 \pm 2.8\%$, $p < 0.005$) in BPH samples.

Conclusion: GAG composition in BPH differs markedly from that of the normal transitional zone. These findings are at variance with previous reports in which less appropriate controls were used. Our results also imply that interstitial proteoglycans are more affected in BPH, which may result from cytokine-mediated stimulation of stromal cells.

Key words: prostate; prostatic hyperplasia; glycosaminoglycans; extracellular matrix
Braz J Urol, 26: 630-634, 2000

INTRODUÇÃO

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é acompanhada de proliferação de células epiteliais e de extensas modificações na organização do estroma. Embora diversos estudos tenham relatado dados quantitativos para esses componentes, os resultados eram de início controversos, de modo que não havia um consenso com relação a qual deles estaria aumentado (1-4). Mais recentemente, no entanto, tem se mostrado por análise morfométrica que o estroma é o componente majoritário na HPB (5). Confirmando esses achados, Walden et al. (6) mostraram que células do estroma prostático, quando comparadas com células epiteliais, expressam níveis mais bai-

xos de mRNA que codifica um inibidor da progressão do ciclo celular.

Outros estudos revelaram que alterações também ocorrem na composição do estroma. Existem evidências, por exemplo, de que a densidade de células de músculo liso está alterada no estroma hiperplásico, e que esse parâmetro pode ser usado para o acompanhamento da resposta farmacológica a medicamentos (7,8). As células de músculo liso podem também estar substituídas por fibroblastos, o que provavelmente ocorre como reação a zonas de isquemia (9).

O estroma da próstata inclui diversos componentes da matriz extracelular, como colágenos, fibras elásticas, e proteoglicanos. A identificação des-

ses últimos no tecido prostático foi feita por meio de imunohistoquímica em microscopia óptica (10,11) ou pela detecção de seqüências gênicas (6,12), e estudos recentes têm mostrado que os proteoglicanos e suas cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG) desempenham um papel importante na patologia da próstata, principalmente no câncer (11,13-15).

A composição de GAG na HPB foi investigada por De Klerk (16) & Iida et al. (15), que utilizaram como controle ou a zona central ou amostras sem localização anatômica definida de próstatas normais, respectivamente. Como a grande maioria dos casos de HPB se origina na zona de transição (1), e pelo fato de que se dispõe de métodos mais seletivos para a purificação e quantificação de GAG, os resultados nos referidos trabalhos podem não refletir as alterações que ocorrem nessa doença. Essa questão foi abordada no presente trabalho, cujo objetivo foi determinar a composição de GAG em amostras de HPB, utilizando como controle a zona de transição de próstatas de adultos jovens.

MATERIAL E MÉTODOS

As próstatas com hiperplasia benigna foram obtidas de 6 pacientes com idade variando entre 63 e 79 anos. Esses pacientes apresentavam sintomas clínicos de HPB e foram submetidos a prostatectomia aberta. O diagnóstico histopatológico posteriormente confirmou a presença de HPB em todas as amostras. Os controles consistiram da zona de transição (17,18) de próstatas obtidas durante a necropsia de 6 adultos com idade de 18 a 30 anos e que haviam morrido de acidentes. As amostras de tecido foram fixadas em acetona logo em seguida à remoção em cirurgia ou necropsia, e, após clivagem, foram delipidadas em clorofórmio/metanol (2:1, v/v) por 24 horas e secas a 60°C.

A extração e determinação da concentração tissular de GAG foi feita segundo métodos previamente descritos (19). Resumidamente, 100 a 500 mg de tecido delipidado e seco foram rehidratadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.0, contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, por 24 horas a 4°C, e posteriormente incubadas com papaína (Sigma,

bicristalizada) nesse mesmo tampão por 24 horas a 60°C. Após centrifugação (3000xg, 20 minutos) e lavagem dos resíduos insolúveis com água, os dois sobrenadantes foram agrupados, e a esta solução adicionou-se cloreto de cetilpiridínio (Sigma) para uma concentração final de 0.5%. Essa mistura foi deixada à temperatura ambiente por 24 horas, centrifugada (3000xg, 30 minutos), e ao pellet adicionou-se NaCl 2M:etanol (100:15, v/v). Após dissolução completa do pellet, a solução foi misturada com 2 volumes de etanol absoluto e deixada a 4°C por 24 horas. Os GAGs foram então recuperados por meio de uma série de centrifugações (3000xg, 30 minutos cada) em que se lavou o pellet com etanol 80% e absoluto. O pellet final, que constitui a preparação purificada de GAG total, foi seco a 60°C, dissolvido em água, e a solução foi guardada a -20°C.

A concentração tissular de GAG total foi determinada por meio da dosagem de ácido hexurônico segundo o método do carbazol (20), utilizando-se glicuronolactona (Sigma) como padrão.

A eletroforese em gel de agarose (Dietrich and Dietrich, 1976) foi utilizada para se determinar a proporção dos diferentes tipos de GAG sulfatados. Aproximadamente 5 µg da preparação GAG total, como ácido hexurônico, foram aplicados em uma placa de gel de agarose 0.5% (Sigma) em tampão 1,3-diaminopropano 50 mM, pH 9.0. A corrida foi realizada a 80 V, e o gel foi em seguida tratado com brometo de N-Cetil-N,N,N-trimetilamônio a 0.1% por 2 horas, e corado com azul de toluidina 0.1% em etanol absoluto:ácido acético 1% (1:1, v/v). A placa de agarose foi então digitalizada em scanner (Hewlett-Packard) e o perfil densitométrico das bandas, assim como a área dos picos, foram obtidos usando-se o programa Scion Image (Scion Corporation, USA). A identificação das bandas na placa de agarose foi feita com base na comparação com a migração de padrões de GAG comerciais (Sigma) e na susceptibilidade à degradação por GAG-liases (Cardoso et al., 1992).

Diferenças de concentração e proporção de GAG entre os grupos controle e de HPB foram analisadas pelo teste para duas amostras de Wilcoxon (21). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

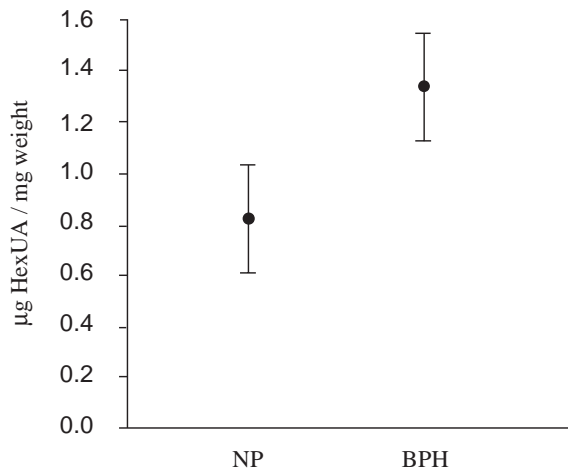


Figure - Total glycosaminoglycans concentration in normal prostates (NP) and in benign prostatic hyperplasia (BPH). The values are expressed as the mean concentrations and the bars represent the standard deviation.

Concentração de glicosaminoglicanos totais na próstata normal (NP) e na hiperplasia prostática benigna (BPH). Os valores são a média das concentrações para cada grupo, e as barras de erro representam o desvio padrão. A diferença entre os dois grupos é significativa ($p < 0.005$).

RESULTADOS

A concentração de GAG nas amostras de próstata foi expressa em termos de microgramas de ácido hexurônico por miligrama de tecido delipidado e seco, e está mostrada na Figura. Na zona de transição de próstatas de adulto jovem essa concentração é, em média, de 0.83 ± 0.21 µg/mg. A mesma dosagem mostrou que, em amostras de HPB obtidas de

Table - Proportions of the different sulfated glycosaminoglycans in normal prostates (NP) and in benign prostatic hyperplasia (BPH). The proportions are expressed as the percentages of the total sulfated glycosaminoglycans.

Proporção dos diferentes glicosaminoglicanos sulfatados em próstatas normais e com hiperplasia benigna (HPB). As proporções estão expressas como porcentagens de glicosaminoglicanos sulfatados totais.

Prostate	N	HS	DS	CS
Normal	6	25.6 ± 3.58	59.9 ± 4.102	14.5 ± 2.77
BPH	6	25.8 ± 4.09	49.2 ± 6.58*	25.0 ± 4.52**

HS = heparan sulfate, DS = dermatan sulfate, CS = chondroitin sulfate. The asterisks indicate the statistical significant differences. * = $p < 0.01$, ** = $p < 0.005$. N = number of prostates.

HS = heparan sulfato, DS = dermatan sulfato, CS = condroitim sulfato. As diferenças significativas em relação aos glicosaminoglicanos correspondentes das próstatas normais estão indicadas com um asterisco ($p < 0.01$) ou dois ($p < 0.005$) asteriscos. N, número de próstatas.

pacientes com idade variando entre 63 e 79 anos, a concentração de GAG é de 1.34 ± 0.20 µg/mg. Na HPB, portanto, a concentração de GAG está aumentada em 62% quando comparada às próstatas de adulto jovem, e essa diferença é significativa ($p < 0.005$).

Os GAG sulfatados presentes nas próstatas normais e hiperplásicas, como determinado pela eletroforese em gel de agarose, são o heparan sulfato, o dermatan sulfato, e o condroitim sulfato. Tanto na zona de transição das próstatas normais quanto nas amostras de HPB, o dermatan sulfato é o GAG predominante, enquanto que o heparan sulfato está presente em proporções similares nos dois casos. Existem, no entanto, modificações significativas na HPB, com uma diminuição no conteúdo relativo do dermatan sulfato ($p < 0.01$) e um aumento do condroitim sulfato ($p < 0.005$) (Tabela).

DISCUSSÃO

A purificação em “batch” de GAG por meio de resinas ou detergentes catiônicos permite a eliminação de diversos contaminantes que podem interferir na dosagem de ácido hexurônico. Os valores de concentração relatados por De Klerk (16) se baseiam em métodos menos seletivos para o isolamento de GAG, e podem portanto estar superestimados. Os nossos resultados para concentração de GAG na próstata são de fato três vezes menores, e tal diferença se manteve consistentemente em todas as amostras analisadas. Nota-se também que, pelos resultados apresentados no referido artigo, não está claro se existe modificação na concen-

tração de GAG na HPB, pois além de não se comparar a mesma região da glândula, a zona de transição não foi utilizada como controle. Sabe-se que nessa área origina-se a maior parte dos casos de HPB (1). Iida et al. (15) isolaram os GAG com método semelhante ao de De Klerk (16), e os controles consistiram de amostras de tecido prostático sem localização anatômica definida. Os resultados desse primeiro trabalho, obtidos a partir de um número pequeno de amostras e expressos em relação a peso úmido, não indicaram diferenças significativas entre HPB e os controles.

Os nossos resultados mostraram que, apesar da grande quantidade de estroma presente na zona de transição da próstata normal (18), a concentração de GAG nessa região é comparativamente baixa. Em artérias, por exemplo, essa concentração é em torno de cinco vezes maior (19). Nossos resultados também revelaram que há um aumento considerável e significativo na concentração de GAG na HPB quando comparado com as amostras de zona de transição. Além disso, os GAG de distribuição eminentemente intersticial, como o dermatam sulfato e o condroitim sulfato, apresentaram modificações de concentração relativa na HPB. Já o heparan sulfato, que está associado principalmente à membrana basal e à superfície celular (Iozzo, 1998), permaneceu inalterado. Esses dados indicam que as alterações de síntese de proteoglicanas ocorrem basicamente no estroma, onde haveria um remodelamento marcante na matriz extracelular, com conseqüências importantes para o metabolismo das células epiteliais e mesenquimais. É preciso notar, entretanto, que esse remodelamento é qualitativa e quantitativamente diferente do que se observa no câncer de próstata e mesmo em processos de reparo e cicatrização. Nesses casos, por exemplo, estão elevados tanto a expressão do variante "splicing" oncofetal (ED-B) da fibronectina (Albrecht et al., 1999) quanto a atividade da hialuronidase (Lokeshwar et al., 1996), uma das principais enzimas associadas ao "turnover" da matriz extracelular. Na HPB, por outro lado, esses marcadores estão presentes em níveis normais.

Com base em dados prévios (12) e em nossos resultados sobre dermatam sulfato e condroitim sulfato, as proteoglicanas majoritárias do estroma da próstata são decorin/biglican e versican. Este último, um proteoglicano de alto peso molecular e contendo

em torno de 20 cadeias de condroitim sulfato (Iozzo, 1998), estaria aumentado, como indicam nossos resultados, na hiperplasia benigna. Essas conclusões são consistentes com os achados de Walden et al. (6), que, usando como controle a zona de transição, encontraram níveis aumentados de mRNA que codificam proteoglicanos de condroitim/dermatam sulfato no estroma de amostras de HPB.

Parte dessas modificações na composição da matriz pode ser explicada por alterações na população de células do estroma, com a substituição, em certas áreas, de células de músculo liso por fibroblastos (9). Adicionalmente, mostrou-se recentemente, na HPB, a presença de grandes quantidades de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) básico em células de músculo liso (22), além de um aumento na concentração tissular de isoformas do FGF (Ropiquet et al., 1999). Esta citocina tem potentes efeitos estimulatórios sobre a migração de células mesenquimais (23) e sobre a síntese de proteoglicanos intersticiais (24), o que sugere um mecanismo parácrino nas vias regulatórias que levam ao crescimento e reorganização do estroma na HPB.

REFERÊNCIAS

1. McNeal JE: Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol*, 15: 340-345, 1978.
2. Bartsch G, Muller HR, Oberholzer M, Rohr HP: Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 122: 487-491, 1979.
3. Bartsch G, Keen F, Daxenbichler G, Marth C, Margreiter R, Brungger A, Sutter T, Rohr HP: Correlation of biochemical (receptors, endogenous tissue hormones) and quantitative morphologic (stereologic) findings in normal and hyperplastic human prostates. *J Urol*, 137: 559-564, 1987.
4. Price H, McNeal JE, Stamey TA: Evolving patterns of tissue composition in benign prostatic hyperplasia as a function of specimen size. *Hum Pathol*, 21: 578-585, 1990.
5. Deering RE, Bigler SA, King J, Choongkittaworn M, Aramburu E, Brawer MK: Morphometric quantitation of stroma in human benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 44: 64-70, 1994.

6. Walden PD, Lefkowitz GK, Ficazzola M, Gitlin J, Lepor H: Identification of genes associated with stromal hyperplasia and glandular atrophy of the prostate by mRNA differential display. *Exp Cell Res*, 245: 19-26, 1998.
7. Shapiro E, Hartanto V, Lepor H: The response to alpha blockade in benign prostatic hyperplasia is related to the percent area density of prostate smooth muscle. *Prostate*, 21: 297-307, 1992.
8. Shapiro E, Hartanto V, Lepor H: Anti-desmin vs. anti-actin for quantifying the area density of prostate smooth muscle. *Prostate*, 20: 259-267, 1992.
9. Cleary KR, Choi HY, Ayala AG: Basal cell hyperplasia of the prostate. *Am J Clin Pathol*, 80: 850-854, 1983.
10. Murdoch AD, Liu B, Schwarting R, Tuan RS, Iozzo RV: Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem*, 42: 239-249, 1994.
11. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Horsfall DJ: Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 4: 963-971, 1998.
12. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR: A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem*, 269: 32992-32998, 1994.
13. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Tilley WD, Skinner JM, Horsfall DJ: Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 3: 983-992, 1997.
14. Schamhart DH, Kurth KH: Role of proteoglycans in cell adhesion of prostate cancer cells: from review to experiment. *Urol Res*, 25: S89-S96, 1997.
15. Iida S, Suzuki K, Matsuoka K, Takazono I, Shimada A, Inoue M, Yahara J, Noda S: Analysis of glycosaminoglycans in human prostate by high-performance liquid chromatography. *Br J Urol*, 79: 763-769, 1997.
16. De Klerk DP: The glycosaminoglycans of normal and hyperplastic prostate. *Prostate*, 4: 73-81, 1983.
17. Sampaio FJB: Neoplasia prostática: conceitos anatômicos fundamentais para a compreensão da patologia benigna e maligna. *J Bras Urol*, 18: 121-125, 1992.
18. Ro JY, Grignon DJ, Amin MB, Ayala A: Atlas of surgical pathology of the male reproductive tract. W B Saunders, Philadelphia, 233 pp, 1997.
19. Cardoso LEM, Erlich RB, Rudge MC, Peraçoli JC, Mourão PAS: A comparative analysis of the glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affecting pregnancy. *Lab Invest*, 67: 588-595, 1992.
20. Taylor KA, Buchanan-Smith JG: A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem*, 201: 190-196, 1992.
21. Sokal RR, Rohlf FJ: *Biometry*. New York, WH Freeman, 3rd ed., pp. 887, 1995.
22. Deshmukh N, Scotson J, Dodson AR, Smith PH, Foster CS: Differential expression of acidic and basic fibroblast growth factors in benign prostatic hyperplasia identified by immunohistochemistry. *Br J Urol*, 80: 869-874, 1997.
23. Bennett NT, Schultz GS: Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*, 165: 728-737, 1993.
24. Bodo M, Baroni T, Carinci F, Becchetti E, Bellucci C, Conte C, Pezzetti F, Evangelisti R, Tognon M, Carinci P: A regulatory role of fibroblast growth factor in the expression of decorin, biglycan, betaglycan and syndecan in osteoblasts from patients with Crouzon's syndrome. *Eur J Cell Biol*, 78: 323-330, 1999.

Received: August 10, 2000

Accepted: September 14, 2000

Correspondence address:

Dr. Luiz E.M. Cardoso
 Unidade de Pesquisa Urogenital
 Av. 28 de Setembro, 87, fundos, FCM, térreo
 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
 Fax: ++ (55) (21) 587-6121