

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIEGO AUGUSTO LOPES DA SILVA

**“ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA
FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL:
efeitos da ovariectomia e posterior exposição prolongada ao
estradiol e estradio + testosterona”**

Este exemplar corresponde à ~~re~~reção final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Diego Augusto Lopes da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara Santos

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si38a	<p>Silva, Diego Augusto Lopes da, 1987- Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral: efeitos da ovariectomia e posterior exposição prolongada ao estradiol e estradiol + testosterona / Diego Augusto Lopes da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Sebastião Roberto Taboga. Coorientador: Fernanda Cristina Alcântara dos Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata feminina. 2. Ovariectomia. 3. Estradiol. 4. Testosterona. 5. Gerbilo. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Santos, Fernanda Cristina Alcântara dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Morphofunctional aspects of gerbil female prostate during the estrous cycle: effects of ovariectomy and subsequent long-term exposure to estradiol and estradiol plus testosterone

Palavras-chave em Inglês:

Female prostate

Ovariectomy

Estradiol

Testosterone

Gerbil

Área de concentração: Histologia

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Luis Antonio Justulin Junior

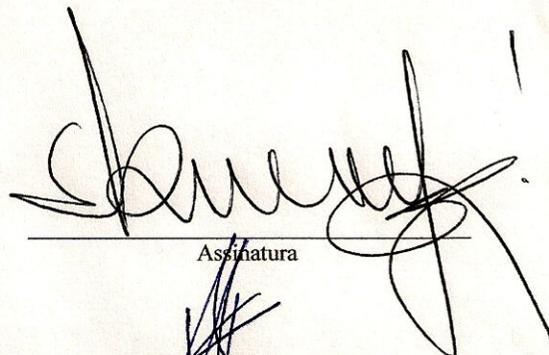
Data da defesa: 17-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 17 de fevereiro de 2012.

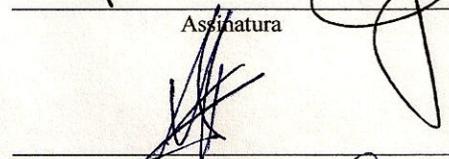
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



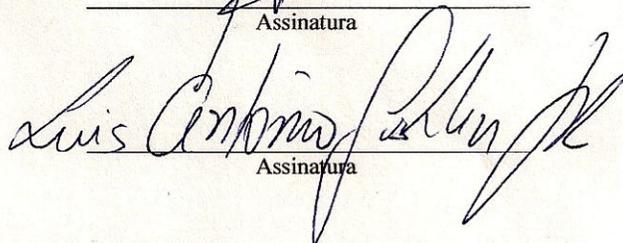
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior



Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Assinatura

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

Assinatura

Agradecimentos

A Deus, que permitiu a minha existência presenteando-me com a vida e amou-me incondicionalmente. Minha Origem.

Ao Supertécnico Luiz Roberto Falleiros Júnior pela dedicação em “desperdiçar” seu tempo comigo, por toda a sua ajuda e por fazer os dias na bancada muito mais agradáveis. Gratidão.

À minha Coorientadora, Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara Santos, pelos momentos abdicados do seu trabalho para atender aos meus apelos e por todo o suporte oferecido nos momentos oportunos. Auxílio.

A todos os colegas de bancada do Laboratório de Microscopia e Microanálises que de alguma forma também tornaram meu trabalho possível. Cooperação.

To my English teacher, Clécia, who was always available, even when I asked her something at the last moment, or during Holidays, or during vacation... Always there.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Chance.

À secretária do PPG em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, a querida Líliam Panagio, que sempre esteve disponível para ajudar em absolutamente tudo que estivesse ao seu alcance, desde simples dúvidas corriqueiras até endereços de locais para dormir durante nossas viagens a Campinas. Sempre com um sorriso no rosto, uma palavra de incentivo, muita paciência, dedicação e competência. Mãezona!

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro concedido para a realização das minhas atividades. Possibilidade.

Aos professores que se puseram prontamente à disposição para análise prévia e para a banca deste trabalho e que contribuíram para a correção e enriquecimento do mesmo: Prof. Dr. Luis Antônio Justulin Jr., Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi e Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano. Atenção.

E, sem dúvidas, ao Professor Dr. Sebastião Roberto Taboga pela confiança, pela oportunidade dada e por todo o aprendizado. Ele que é um grande responsável pelo ser humano e profissional que me tornarei. Exemplo.

Agradecimentos em especial

Aos meus Pais, Edison e Denisi, que me auxiliaram em todas as dificuldades e nunca me negaram apoio e paciência. Eles foram meus grandes professores e educadores, a eles serei eternamente grato. São eles o meu maior motivo de orgulho e de inspiração. Deles recebi o amor que não se cansa de amar e os “nãos” necessários para uma vida plena e digna. Ao meu irmão Matheus pelas conversas e risadas, e pelos ensinamentos de como levar a vida mais “de boa”, pois assim também dá certo! Aos meus avós, Georgina, Djanira e meu querido avô Benedito que hoje mora junto do Pai. E a toda a minha família que sempre torceu por mim. Meu porto.

Aos meus amigos, pela convivência sadia e companheirismo em (quase) todos os momentos da minha vida. Ao meu *brother* Mateus Augusto por me ensinar tanto desde que éramos crianças. Aos amigos do PET (Programa de Educação Tutorial) e ao Tutor Prof. Dr. Clássius de Oliveira, do Laboratório de Microscopia e Microanálises (em especial Ana Paula pela ajuda constante e Eloísa pelo companheirismo), do laboratório de Biologia Celular, especialmente à Profa Dra. Maria Tercília e Profa. Dra. Ester Tartarotti, aos amados amigos do Phila (Lê, isso também é pra você!) e do IBILCE, principalmente aos amigos da Turma 51. Todos vocês foram importantíssimos para minha formação acadêmica e pessoal. Essenciais.

Um obrigado muito especial à Turminha da Luz: Radu, Nego, Nina, Bá, Lílian e Dri. Para vocês, não há o que dizer além de muito obrigado, pois o resto sempre foi dito e demonstrado, com todo o coração. Impossível deixar de lado meu querido amigo Mon, por todo o aprendizado, pela culinária, pela partilha e pela convivência. Eternos.

Ao companheiro de projetos, Tião (vulgo Filipe). À grande parceira de todas as dificuldades e glórias do Mestrado, Marianna Zanatelli, pelas experiências compartilhadas, pelas viagens divididas, pela amizade, pelo ombro paciente (e como!), pelas caronas, pelos empurrões e pelos infinitos motivos que fizeram de você uma pessoa indispensável nessa conquista. Dedico esse trabalho a você! Agradeço imensamente, também, à minha amada Bibi, que me ensinou muito sobre a responsabilidade, a confiança no trabalho bem feito, a paciência e amar um pouco mais aquilo que a gente vive para fazer. Quando eu crescer, quero ser como você! Amigos.

Por fim, a todos aqueles cujos nomes não aparecem aqui, mas sabem que são especiais demais para serem esquecidos. Muito Obrigado!

*“Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência.
Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão”*
(Lao-Tsé)

“Uma vela nada perde quando, com sua chama, acende uma outra que está apagada”
(Orison S. Marden)

“Ninguém comete erro maior do que não fazer nada porque só pode fazer pouco”
(Edmundo Burke)

*“Nenhuma luta haverá jamais de me embrutecer.
Nenhum cotidiano será tão pesado a ponto de me esmagar.
Nenhuma carga me fará baixar a cabeça.
Quero ser diferente. Eu sou. E se não for, me farei”*
(Caio Fernando Abreu)

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO.....	6
1. Histórico.....	6
2. Morfologia da próstata feminina.....	7
3. Aspectos funcionais da próstata feminina	8
4. Controle endócrino da próstata feminina.....	9
5. Importância do presente estudo	13
OBJETIVO.....	15
ARTIGO	16
Effects of exposure to Estradiol and Estradiol plus Testosterone on the Mongolian gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>) female prostate.	16
CONCLUSÕES GERAIS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CERTIFICADO E DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	48

RESUMO

A próstata feminina é uma glândula funcionalmente ativa encontrada em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos e roedores. Em fêmeas adultas de gerbilos, a próstata apresenta localização parauretral, exibindo íntimo contato com a parede da uretra média e distal. Esta glândula é homóloga a próstata ventral de roedores machos, sendo formada por um conjunto de glândulas e ductos inseridos em um estroma fibromuscular. O estudo da morfofisiologia prostática nas fases do ciclo estral tem demonstrado que a próstata feminina é influenciada pelas oscilações nos níveis séricos de estradiol e progesterona. Assim, tornam-se necessários estudos que avaliem o efeito da exposição ao estradiol em longo prazo, com o objetivo de observar como este esteróide atua no desenvolvimento de lesões prostáticas. Além disso, de igual importância é avaliar a interação dos estrógenos com outros esteróides circulantes, a fim de se avaliar quais associações hormonais são necessárias para manter o equilíbrio homeostático da próstata feminina do gerbilo. A partir do proposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração prolongada de estradiol, e de estradiol + testosterona, sobre a próstata de fêmeas ovariectomizadas. Para isso, as fêmeas adultas foram submetidas à intervenção cirúrgica para remoção dos ovários e, após 10 dias de recuperação, foram submetidas à administração de estradiol, e de estradiol + testosterona. Após trinta dias de tratamento, os animais foram sacrificados e as glândulas prostáticas submetidas a análises morfológicas, morfométrico-estereológicas e sorológicas. Alterações morfológicas e fisiológicas foram observadas em todos os grupos experimentais. A restrição hormonal resultante da ovariectomia causou grande regressão glandular e diminuição da atividade secretora, aspectos revertidos pela exposição dos animais ao estrógeno isolado e conjugado à testosterona. Entretanto, esses hormônios não foram capazes de reestabelecer a histoarquitetura normal do tecido. Foram observadas, inclusive, algumas lesões presentes principalmente nos grupos tratados, tais como inflamações e neoplasias intraepiteliais. A imunorreação para o ER- α foi reduzida nos núcleos do estroma prostático após castração e foi recuperado com os tratamentos. Já a localização de ER- β no núcleo das células epiteliais mostrou-se muito semelhante em todos os grupos. Sugere-se, ainda, uma atuação do estradiol na regulação dos níveis séricos de

progesterona e testosterona. Sendo assim, conclui-se que a histoarquitetura normal da glândula nas fêmeas está relacionada ao equilíbrio entre os hormônios ovarianos e que, dentre eles, o estradiol e a testosterona desempenham papel importante na homeostasia prostática desses animais.

ABSTRACT

The female prostate is a functional gland found in several mammal species, including humans and rodents. In adult female gerbils, the prostate shows paraurethral localization, exhibiting intimate contact with medial and distal urethra wall. This gland is homologous to ventral prostate in male rodents, composed by a group of acini and ducts inserted into a fibromuscular stroma. Prostate morphophysiology studies during estrous cycle have shown that female prostate is influenced by estradiol and progesterone serum levels oscillations. Thus, studies which evaluate the effect of long-term exposure to estradiol become necessary, in order to observe the way this steroid acts by on prostate lesions development. Furthermore, it is also important to evaluate hormonal interaction among estradiol and other serum steroids with the aim of evaluating which hormonal associations are necessary to maintain the homeostatic balance of gerbil female prostate. Hence, this study role was to evaluate the effect of estradiol and estradiol plus testosterone long-term exposure on the prostate of ovariectomized females. To make it possible, adult females underwent to surgical intervention to remove both ovaries and, after 10 days recovering, they received estradiol or estradiol plus testosterone doses. After 30 days of treatment, the animals were euthanized and de prostate glands were submitted to morphological, morphometric-estereological and serological analysis. Morphological and physiological alterations were observed in all experimental groups. Hormonal deprivation caused by castration brought glandular atrophy and decreased secretory activity. These aspects were reverted by animals exposure to isolated estrogen and estrogen plus testosterone conjugation. However, these hormones were not able to reestablish the tissue normal histoarchitecture. Some lesions were even observed mainly in tratment groups, like inflammations and intraepithelial neoplasias. The imunoreaction for ER- α decreased in prostate stroma nuclei after castration and was reestablished with treatmens. On the other hand, the epithelium ER- β expression was similar in all groups. It also seems that there is a role played by estradiol in testosterone and progesterone serum levels regulation. In conclusion, normal histoarchitecture of gerbil female prostate is related to ovarian

hormones balance and estradiol and testosterone play an important role in prostatic homeostasis in these animals.

1. Histórico

A descoberta da existência de uma glândula prostática feminina não é recente. Datam do século XVII as primeiras evidências de que a mulher apresentava glândulas parauretrais de grande similaridade com a próstata do homem (de Graaf, 1672). Dois séculos mais tarde, a glândula prostática da fêmea passa a ser chamada de “glândula parauretral de Skene”, desde que este pesquisador descreveu a estrutura como ductos parauretrais que se abriam em orifícios em ambos os lados da uretra e que apresentavam função secretora pouco relevante (Skene, 1880). A partir disto, a próstata feminina passou a ser considerada um órgão vestigial sem importância biológica para o organismo feminino (Zaviacic and Ablin, 2000).

Entretanto, há cerca de sessenta anos, as ideias de que essa glândula fosse vestigial dão lugar a estudos que indicam uma importante função da próstata feminina, especialmente na biologia reprodutiva das fêmeas (Huffman, 1948 e 1951; McCrea, 1952; Tepper *et al.*, 1984; Wernet *et al.*, 1992; Zaviacic, 1993; Zaviacic *et al.*, 1993, 1997a, 1997b, 1999, 2000a e 2000b). Além disso, é crescente o número de diagnósticos que apontam para importantes doenças prostáticas, tais como prostatites, neoplasias e carcinomas, as quais, segundo encontrado na literatura, acometem tanto indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino (Zaviačić, 1993; Dodson *et al.*, 1994 e 1995; Ali *et al.*, 1995; Ebisuno *et al.*, 1995; Sloboda *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2001; Sharifi-Aghdas and Ghaderian, 2004; Kato *et al.*, 2005; McCluggage *et al.*, 2006; Konecki *et al.* 2009).

Segundo uma revisão publicada por Santos e Taboga em 2006, é grande o entendimento da morfologia e dos aspectos estruturais da próstata feminina, tanto em mulheres quanto em roedores. Entretanto, apenas recentemente tem sido lançada atenção para seus aspectos funcionais e fisiológicos. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo contribuir para o entendimento da morfofisiologia da próstata feminina, sobretudo no que diz respeito ao papel dos hormônios sexuais.

2. Morfologia da próstata feminina

Muito do que se sabe sobre a próstata feminina é oriundo de estudos feitos com modelos experimentais, devido ao fato do material humano ser muito escasso, uma vez que a próstata de mulheres só pode ser obtida através de necrópsia frente à morte cerebral (Zaviačič, 2000a). Sendo assim, o nosso grupo de pesquisa optou por adotar o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*, Gerbilinae, Muridae) como modelo, posto que a próstata das fêmeas dessa espécie apresenta grande homologia com a próstata da mulher e com a próstata ventral de machos da mesma espécie (Taboga *et al.*, 2001). Além disso, a ocorrência de próstata em fêmeas desses animais é muito elevada, sendo que cerca de 80% das fêmeas apresentam uma glândula prostática bem desenvolvida e ativa nos processos de secreção (Santos *et al.*, 2003).

A próstata da mulher (Figura 1A) é composta por numerosos ácinos secretores e ductos parauretrais inseridos em um estroma fibromuscular. Os ácinos são delimitados por um epitélio diferenciado composto por dois tipos principais de células: as células basais, com formato frequentemente piramidal e que atuam como células-tronco responsáveis pela manutenção da população de células prostáticas; e as células secretoras ou luminais, as quais são as mais numerosas, apresentam formato cúbico a prismático, expressam o antígeno específico prostático e a fosfatase ácida, importantes marcadores prostáticos, e que produzem, continuamente, o fluido prostático lançado no lumen. São encontradas, ainda, células intermediárias que representam a transição na diferenciação de células basais em células secretoras (Zaviačič, 1993, 2000a e 2000b). Anatomicamente, a próstata feminina do gerbilo (Figura 1B), muito semelhante à próstata da mulher, é composta por um conjunto de glândulas e ductos que se concentram em ambos os lados da uretra média. Os ductos estão inseridos na musculatura envolvente da uretra, e se abrem em vários pontos da luz uretral. As células secretoras da próstata feminina do gerbilo apresentam um citoplasma rico em organelas envolvidas nos processos de síntese e secreção de glicoproteínas (Santos *et al.*, 2003). As glândulas e os ductos prostáticos estão associados a um estroma fibromuscular composto por células musculares lisas e fibroblastos, fibras de colágeno e elásticas, e muitos vasos sanguíneos (Santos *et al.*, 2001).

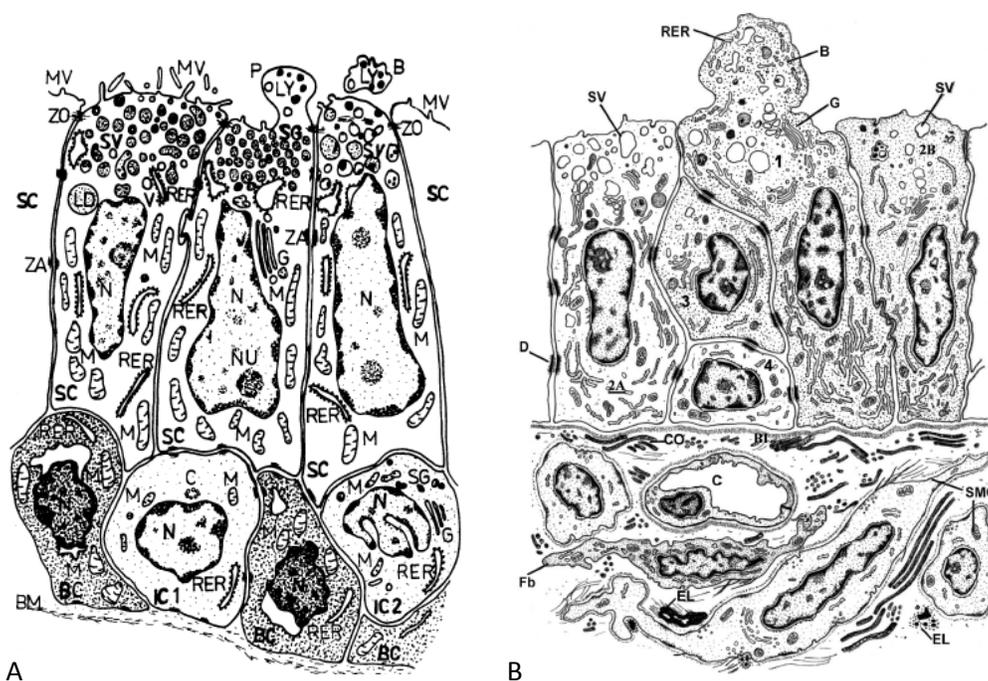


Figura 1. Aspectos ultra-estruturais da próstata feminina humana (A – Zaviacič *et al.*, 2000a) e do gerbilo (B - Santos *et al.*, 2003). A próstata feminina adulta do gerbilo apresenta grande semelhança com a humana. Os mesmos tipos epiteliais são observados em ambas as espécies. O compartimento estromal da próstata feminina do gerbilo é denso, sendo composto por células musculares lisas (SMC) e fibroblastos (Fb), além de muitas fibras de colágeno (CO) e elásticas (El). A – SC: célula secretora; BC: célula basal; IC1 e IC2 células intermediárias. B – 1: célula secretora apócrina; 2A: célula secretora merócrina clara; 2B célula secretora merócrina típica; 3: célula intermediária; 4: célula basal. B: “blebs” apicais; BM: membrana basal; C: capilar; G: complexo de Golgi; M: mitocôndrias; RER: retículo endoplasmático rugoso; SV: vesículas de secreção.

3. Aspectos funcionais da próstata feminina

Embora não se achem completamente esclarecidos, atribuem-se à prostata feminina papeis biologicamente importantes na reprodução e no comportamento sexual. Bioquimicamente, o ejaculado feminino em humanos possui grande semelhança com o líquido prostático masculino, sendo o PSA, PSAP, zinco e a frutose os componentes mais abundantes (Zaviacic, 1993 e 1999). A frutose presente no esperma constitui a principal fonte de energia para os espermatozoides. A próstata feminina contribuiria, portanto, com o sucesso na fertilização dos ovócitos uma vez que a frutose produzida por esta glândula escoar em pequenas quantidades da uretra para a vagina (Santos e Taboga, 2006). Além

disso, a próstata constituiria a principal fonte de produção de PSA nas fêmeas (Zaviacic and Ablin, 2000; Schmidt *et al.*, 2001).

Outra função atribuída à próstata das fêmeas, relacionada ao comportamento sexual, é que esta estrutura estaria envolvida com a sensibilização que culmina na ejaculação feminina (Schubach, 2002). Neste sentido, a próstata feminina tem sido associada ao ponto de Gräfenberg (ponto-G), tido como uma zona muito inervada da parede ântero-superior da vagina através da qual a próstata feminina pode ser acessada (Gräfenberg, 1950).

4. Controle endócrino da próstata feminina

Os fatores que regulam o desenvolvimento e atividade da glândula prostática nas fêmeas são pouco conhecidos. Entretanto, sabe-se que desde o desenvolvimento embrionário, a formação da glândula é dependente de andrógenos (Thomson, 2001; Thomson *et al.*, 2002). Da mesma forma, sua funcionalidade tem sido relacionada com hormônios esteróides (Zaviačič *et al.*, 2000a e 2000b; Fochi *et al.*, 2008).

A próstata desenvolve-se a partir do seio urogenital (UGS), que é um tubo endodérmico derivado do intestino primitivo e que termina na cloaca (Staack *et al.*, 2003). O UGS é composto por uma camada epitelial (UGE) derivada da endoderme, que é circundada por uma camada mesenquimal (UGM) originada da mesoderme. A partir da 17^o-18^o dia em camundongos, ou da 10^a-12^a semana em humanos, inicia-se a morfogênese prostática, um processo que é iniciado por andrógenos (Marker *et al.*, 2003) e dependente de andrógenos para continuar seu crescimento embrionário e neonatal e, posteriormente, para iniciar a atividade secretória na puberdade (Isaacs *et al.*, 1994).

Em machos, o evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos do UGE em direção ao UGM circundante (Marker *et al.*, 2003). Interações epitélio-mesenquimais desempenham um papel chave no direcionamento do crescimento e do desenvolvimento da próstata, sendo que a sinalização parácrina do mesênquima para o epitélio é essencial para a embriogênese prostática. Desse modo, a ação de andrógenos sobre as células mesenquimais resulta em fatores parácrinos específicos que atuam sobre as células epiteliais induzindo a sua proliferação (Thomson *et al.*, 2001). Por outro lado, também existe uma sinalização parácrina do epitélio para o mesênquima. Esta

sinalização regula a diferenciação do mesênquima que circunda os brotos em formação em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward *et al.*, 1996).

Em embriões de fêmeas de ratos e humanos, a ausência de testosterona induz o UGS a originar a porção inferior da vagina e a uretra (Shapiro *et al.*, 2004). O UGM passa a circundar o epitélio uretral, sendo subdividido em três zonas: o mesênquima periuretral, a zona mesenquimal que sofre diferenciação em músculo liso e a zona que contém o mesênquima condensado ventral (VMP). Esta última estrutura apresenta localização análoga à próstata ventral masculina e representa o mesênquima do UGS sem a invasão do UGE (Thomson *et al.*, 2002).

A diferenciação de parte do mesênquima do UGS em músculo liso é crucial para a morfogênese prostática em machos e fêmeas, pois é este evento que regula a sinalização parácrina entre o epitélio e o mesênquima. Durante a diferenciação do mesênquima, os andrógenos regulam a espessura e a continuidade da camada de músculo liso formada, de modo que a ausência de andrógenos em embriões femininos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua. Esta camada separa o VMP do epitélio uretral, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP. Desse modo, a espessa camada de músculo liso impede a interação do VMP com os brotos prostáticos em formação, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima. Em machos, na presença de andrógenos, a formação do músculo liso é inibida ou atrasada e os brotos prostáticos emergem da uretra e podem penetrar no VMP. Assim, a interação parácrina epitélio-mesênquima é estabelecida, ocasionando a ramificação e expansão da próstata ventral. (Thomson *et al.*, 2002). Desse modo, o reduzido tecido prostático observado em fêmeas de várias espécies é originário do UGS que não sofreu estímulo androgênico.

No entanto, embora a próstata feminina adulta seja menor que a masculina (cerca de 15% a 25% do tamanho da próstata ventral masculina), ela apresenta um epitélio secretor diferenciado e funcional (Zaviačič *et al.*, 2000a; Santos *et al.*, 2003; Custódio *et al.*, 2004). Trata-se de um órgão ativo nos processos de secreção e merece os cuidados que qualquer outro órgão do organismo feminino, uma vez que alterações em sua fisiologia podem comprometer a saúde da mulher. Como a próstata de fêmeas cresce e desenvolve-se em um

ambiente com baixos níveis de andrógenos (apenas 5% do total de precursores androgênicos produzidos no organismo masculino), acredita-se que outros fatores além desses hormônios possam atuar no desenvolvimento e manutenção da função dessa glândula em adultos (Timms *et al.*, 1999).

Poucos dados na literatura tratam da regulação endócrina da próstata feminina. No organismo feminino existe uma baixa concentração de testosterona circulante, a qual é produzida pelos ovários e pela glândula adrenal. Esta produz precursores androgênicos (sulfato de diidroepiandrosterona – DHEA-S, diidroepiandrosterona – DHEA, e androstenediona) que são convertidos em suas formas ativas nos tecidos periféricos. Os ovários secretam androstenediona, DHEA e testosterona. Além disso, receptores para testosterona têm sido identificados nos ovários, ovidutos e útero, indicando a importância desse hormônio para o desenvolvimento e regulação do sistema reprodutor feminino (Staub e Beer, 1997).

Em machos adultos, os testículos são responsáveis por 95% da produção de testosterona contra 5% da produção pela adrenal. Os principais andrógenos produzidos por essas glândulas são a androstenediona, diidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol e a própria testosterona, a qual representa a forma mais abundante de andrógenos (Coffey, 1992). Entretanto, a maior parte desses andrógenos é inativa, através de sulfatação ou ligação a proteínas, tais como a albumina, a globulina ligadora de corticosteroide ou a globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBP), sendo esta última a que apresenta maior afinidade pela testosterona circulante (revisão em Taplin e Ho, 2001). Nos tecidos periféricos, esses andrógenos são convertidos em testosterona (Cheng *et al.*, 1993). No caso da próstata, através da ação da 5 α -redutase, a testosterona é, ainda, convertida na diidrotestosterona (DHT), que representa o andrógeno intracelular mais potente (Taplin e Ho, 2001). A DHT é rapidamente metabolizada a 3 α ,17 β -androstenediol (3 α -diol), que pode ser novamente convertido a DHT ou em 3 β ,17 β -androstenediol (3 β -diol). Este é tornado inativo e hidrossolúvel pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (Labrie, 1992). Além disso, 75 - 90% dos estrógenos extragonadais, também relacionados ao controle endócrino da glândula prostática, são derivados dos andrógenos circulantes e sua síntese ocorre nos tecidos periféricos através da enzima aromatase (Simpson *et al.*, 1999). Na

próstata, é a presença dessa enzima que garante a presença de estrógenos dentro da glândula (Tsugaya, 1996).

Em fêmeas adultas de roedores ocorrem alterações hormonais cíclicas, que são influenciadas pelo ciclo estral do animal. Em gerbilos, o ciclo estral tem duração de 4 a 6 dias, sendo dividido em proestro, estro, diestro I (metaestro) e diestro II (Nishino e Totsukawa, 1996). Tais oscilações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral de fêmeas do gerbilo influenciam profundamente a fisiologia prostática. Segundo Fochi e colaboradores (2008), a avaliação da dosagem hormonal sérica de fêmeas adultas, com coletas de amostras sanguíneas sempre pela manhã, demonstrou que os níveis de testosterona se mantêm constantes em todas as fases do ciclo estral. No entanto, foi observada uma grande variação com relação aos níveis séricos de estradiol e progesterona. Um estudo realizado por Santos e Rochel-Maia (2011) mostra que os níveis de estradiol mantiveram-se constantes nas fases de proestro, diestro I e diestro II e tornaram-se mais elevados no estro. Por outro lado, os níveis de progesterona se mantiveram constantes nas fases de proestro, estro e diestro I, sendo mais elevados na fase de diestro II. Dessa forma, a relação entre o ciclo estral e a histofisiologia prostática nas fêmeas de gerbilo mostrou que essa glândula apresentou-se mais desenvolvida e com maior atividade secretória na fase de estro, período que coincide com o pico hormonal de estradiol. Inversamente, o menor desenvolvimento e atividade glandular foram observados na fase de diestro II, período em que ocorre um pico de progesterona. Assim, a oscilação cíclica de estradiol e progesterona seria a responsável pelas alterações morfológicas ocorridas na próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral, visto que os níveis séricos de testosterona se mantêm constantes em todas as fases (Fochi *et al.*, 2008; Santos e Rochel-Maia *et al.*, 2011).

Sendo assim, fica evidente que tanto a testosterona, quanto o estradiol e a progesterona, são importantes agentes na manutenção da morfologia e função da glândula prostática feminina.

5. Importância do presente estudo

Pelo fato da próstata feminina ser um órgão ainda negligenciado clinicamente, há uma carência científica referindo-se às interações hormonais atuantes neste órgão. Estudos em andamento em nosso laboratório observaram que os desníveis hormonais provocados com o envelhecimento (Custódio *et al.*, 2006), com a suplementação hormonal pela testosterona (Santos *et al.*, 2006; 2007) e com tratamentos por drogas anti-estrogênicas (Santos e Taboga, 2006) comprometem a próstata feminina com as mesmas lesões descritas para a glândula masculina, tais como: prostatites, hiperplasias, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas (Santos *et al.*, 2006).

Sabe-se que o equilíbrio entre os níveis de estrógeno e progesterona influencia grandemente a função reprodutiva da fêmea e que o balanço cíclico destes hormônios promove adaptações histofisiológicas de todo o sistema genital feminino. Entretanto pouco existe até o momento, na literatura, a respeito da próstata feminina. O monitoramento dos níveis hormonais séricos das fêmeas adultas do gerbilo durante o ciclo estral associado à análise morfológica das glândulas demonstra que o estrógeno e a progesterona desempenham um papel chave na manutenção da próstata feminina (Fochi *et al.*, 2008; Santos e Rochel-Maia, 2001). Este achado é inédito, principalmente no que se refere ao papel da progesterona, ou da interação estrógeno/progesterona, que é muito pouco explorada nos estudos sobre a próstata.

Os estudos morfológicos iniciais desenvolvidos por D.A.L. Silva durante sua iniciação científica (dados não publicados) demonstraram que o estradiol, sem a interação dos outros esteróides presentes no organismo feminino, desempenha importante papel na recuperação do desenvolvimento prostático e no restabelecimento da atividade secretora após a castração cirúrgica das fêmeas de gerbilo. No entanto, estes resultados também demonstraram que o curto período de administração de estradiol não foi suficiente para recuperar a arquitetura normal da próstata feminina do gerbilo, sendo que 100% das glândulas analisadas apresentaram focos de lesões neoplásicas. Assim, tornou-se necessário avaliar o efeito isolado do estradiol, com o objetivo de observar como este esteróide atua no desenvolvimento de lesões prostáticas. Além disso, de igual importância foi avaliar a interação dos estrógenos com os andrógenos circulantes, a fim de se verificar quais

associações hormonais são necessárias para manter o equilíbrio homeostático da próstata feminina do gerbilo.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivos avaliar o efeito isolado da longa exposição estrogênica sobre a próstata feminina de gerbilos ovariectomizados, bem como avaliar o efeito combinado dos estrógenos e andrógenos sobre a manutenção da histofisiologia prostática. Com isso pretende-se levantar dados para responder às seguintes questões:

1. Qual é a participação específica dos estrógenos na regulação da próstata feminina?
2. Seria o estrógeno suficiente para desencadear alterações em longo prazo na próstata de fêmeas privadas dos hormônios ovarianos? Quais seriam essas alterações?
3. Qual a contribuição dos andrógenos (em baixos níveis na fêmea normal) em associação com o estrógeno no surgimento de alterações teciduais da glândula prostática de fêmeas ovariectomizadas?
4. Que alterações na expressão de receptores de estrógeno da próstata podem ser observadas sob influência dos estrógenos e andrógenos?

Effects of exposure to Estradiol and Estradiol plus Testosterone on the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate.

Efeitos da exposição ao Estradiol e Estradiol associado à Testosterona sobre a próstata feminina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

Trabalho a ser submetido à revista *Microscopy Research and Technique*

Efeitos da exposição ao Estradiol e Estradiol associado à Testosterona sobre a morfologia e fisiologia da próstata feminina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

*Diego A. L. da Silva*¹; *Marianna Zanatelli*¹; *Filipe Z. Shinohara*¹; *Fernanda C. A. Santos*²;
Sebastião R. Taboga^{3*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. ² Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO, Brasil. ³ Departamento de Biologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Título Resumido: Efeitos da exposição ao Estradiol e Estradiol + Testosterona sobre a Próstata feminina do gerbilo.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

***Endereço para correspondência:**

Sebastião R. Taboga, Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel +55-17-32212386; Fax +55-17-32212390

Resumo

A próstata feminina é um órgão diferenciado e ativo nos processos de secreção encontrado em muitas espécies de mamíferos, inclusive humanos e roedores. Uma importante função da próstata feminina tem sido relacionada, especialmente, na biologia reprodutiva das fêmeas. Embora o entendimento da morfologia da próstata feminina, tanto em mulheres quanto em roedores, seja amplo, apenas recentemente tem sido lançada atenção para seus aspectos funcionais e fisiológicos. Os fatores que regulam o desenvolvimento e atividade da glândula prostática nas fêmeas são pouco conhecidos. Entretanto, sua funcionalidade tem sido relacionada com hormônios esteróides. Sabe-se que o equilíbrio entre os níveis de estrógeno e progesterona influencia grandemente a função reprodutiva da fêmea e que o balanço cíclico destes hormônios promove adaptações histofisiológicas de todo o sistema genital feminino. Entretanto pouco existe até o momento, na literatura, a respeito da próstata feminina. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado do estradiol em longo prazo e a interação dos estrógenos com andrógenos, a fim de se verificar quais associações hormonais são necessárias para manter o equilíbrio homeostático da próstata feminina do gerbilo. Para isso, as fêmeas adultas foram submetidas à intervenção cirúrgica para remoção dos ovários e, após 10 dias de recuperação, foram submetidas à administração de estradiol, e de estradiol + testosterona durante 30 dias. As glândulas prostáticas foram submetidas a análises morfológicas, morfométrico-estereológicas e sorológicas. A restrição hormonal resultante da ovariectomia causou grande regressão glandular e diminuição da atividade secretora, aspectos revertidos pela exposição dos animais ao estrógeno isolado e conjugado à testosterona. Entretanto, esses hormônios não foram capazes de reestabelecer a histoarquitetura normal do tecido. Foram observadas, inclusive, algumas lesões presentes principalmente nos grupos tratados, tais como inflamações e neoplasias intraepiteliais. A imunorreação para o ER- α foi reduzida nos núcleos do estroma prostático após castração e foi recuperado com os tratamentos. Já a localização de ER- β no núcleo das células epiteliais mostrou-se muito semelhante em todos os grupos. Portanto, conclui-se que o tanto o estradiol quanto a testosterona são capazes de influenciar a morfologia e fisiologia

prostática. No entanto, a manutenção da homeostasia da glândula depende de um fino balanço entre esses hormônios e, certamente, de outros hormônios ovarianos.

Palavras-chave: próstata feminina, ovariectomia, estradiol, testosterona, morfologia.

Abstract

The female prostate is a differentiated organ active in secretion processes, found in several mammal species, including humans and rodents. This gland has been related to important functions on females' reproductive biology. Although much knowledge has been produced on female prostate morphology, as well in women as in rodents, only recently it has been explored its functional and physiological aspects. The factors which regulate prostate's development and activity are not well known. However, its functionality has been related to steroid hormones. It is well established that the balance between estrogen and progesterone influences hardly the female reproductive function and that the cyclic changes of these hormones promotes histophysiological adaptations of the whole female genital system. In contrast, only a few is found until now, in literature, about those adaptations in female prostate. Thus, this study aimed to evaluate the long-term effect of isolated estradiol and of estradiol associated to testosterone on the gerbil female prostate in order to verify which hormonal associations are necessary to maintain its homeostasis. To make it possible, adult females underwent surgical intervention to remove both ovaries and, after 10 days of recovering, they received estradiol and estradiol + testosterone doses through 30 days, each 48 hours. The prostatic tissue underwent morphological, morphological-estereological and sorological analysis. Hormonal restriction caused great gland involution and decreased secretory activity, aspects that were reverted by exposure to estradiol and estradiol + testosterone. However, these hormones were not able to reestablish the normal histoarchitecture. Some lesions were even observed mainly in treatment groups, like inflammations and intraepithelial neoplasias. The immunoreaction for ER- α decreased in prostate stroma nuclei after castration and was reestablished with treatments. On the other hand, the epithelium ER- β localization was similar in all groups. Therefore, we conclude

that estradiol and testosterone are able to influence prostate's morphology and physiology. Although, the maintenance of gland's homeostasis depends on a balance among these and, certainly, other hormones.

Keywords: female prostate, ovariectomy, estradiol, testosterone, morphology.

Introdução

A próstata feminina é um órgão diferenciado e ativo nos processos de secreção. Há cerca de sessenta anos, as ideias de que essa glândula fosse vestigial começaram a dar lugar a estudos que indicam uma importante função da próstata feminina, especialmente na biologia reprodutiva das fêmeas (Huffman, 1948 e 1951; McCrea, 1952; Tepper *et al.*, 1984; Wernet *et al.*, 1992; Zaviacic, 1993; Zaviacic *et al.*, 1993 e 1999). Este órgão tem sido relacionado com o sucesso na fertilização dos ovócitos através do provimento de energia atribuída à frutose (Santos e Taboga, 2006) e com o comportamento sexual feminino, sendo associada ao ponto de Gräfenberg (ponto-G), importante para o orgasmo nas mulheres (Gräfenberg, 1950). Embora o entendimento da morfologia da próstata feminina, tanto em mulheres quanto em roedores, seja amplo, apenas recentemente tem sido lançada atenção para seus aspectos funcionais e fisiológicos (Santos e Taboga, 2006).

Sendo assim, esta glândula merece os cuidados dispensados a qualquer outro órgão do organismo feminino, uma vez que alterações em sua fisiologia podem comprometer a saúde da mulher. De fato, é crescente o número de diagnósticos que apontam para importantes doenças prostáticas, tais como prostatites, neoplasias e carcinomas, as quais, segundo encontrado na literatura, acometem tanto indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino (Dodson *et al.*, 1995; Sloboda *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2001; Sharifi-Aghdas and Ghaderian, 2004; Kato *et al.*, 2005; McCluggage *et al.*, 2006; Konecki *et al.*, 2009).

Os fatores que regulam o desenvolvimento e atividade da glândula prostática nas fêmeas são pouco conhecidos. Entretanto, sabe-se que desde o desenvolvimento embrionário, a formação da glândula é dependente de andrógenos (Thomson, 2001;

Thomson *et al.*, 2002). Da mesma forma, sua funcionalidade tem sido relacionada com hormônios esteróides (Zaviačič *et al.*, 2000a e 2000b; Fochi *et al.*, 2008). Como a próstata de fêmeas cresce e desenvolve-se em um ambiente com baixos níveis de andrógenos de principal origem atribuída às adrenais e aos ovários, acredita-se que outros fatores além desses hormônios possam atuar no desenvolvimento e manutenção da função dessa glândula em fêmeas adultas (Timms *et al.*, 1999).

Segundo Fochi e colaboradores (2008), com dados revisados por Santos e Rochel-Maia e colegas (2011), a avaliação da dosagem hormonal sérica de fêmeas adultas demonstrou que os níveis de testosterona se mantêm constantes em todas as fases do ciclo estral. No entanto, foi observada uma grande variação com relação aos níveis séricos de estradiol e progesterona. Mudanças morfofuncionais da próstata acompanharam essas alterações: a glândula apresentou-se mais desenvolvida e com maior atividade secretória na fase de estro, período que coincide com o pico hormonal de estradiol e menos desenvolvida e ativa na fase de diestro II, período em que ocorre um pico de progesterona.

Pelo fato da próstata feminina ser um órgão ainda negligenciado clinicamente, há uma carência científica referindo-se às interações hormonais atuantes neste órgão. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que as glândulas de fêmeas superexpostas à testosterona e expostas ao estradiol em curto-prazo exibem grande atividade proliferativa e secretória, mas de forma aberrante (Silva *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2006). Sabe-se que o equilíbrio entre os níveis de estrógeno e progesterona influencia grandemente a função reprodutiva da fêmea e que o balanço cíclico destes hormônios promove adaptações histofisiológicas de todo o sistema genital feminino. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado do estradiol em longo prazo sobre a morfofisiologia prostática de fêmeas ovariectomizadas. Além disso, de igual importância foi avaliar a interação dos estrógenos com andrógenos, a fim de se verificar quais associações hormonais são necessárias para manter o equilíbrio homeostático da próstata feminina do gerbilo.

Material e Métodos

Delineamento experimental

Foram utilizadas 40 fêmeas jovens adultas, com 90 dias de idade para a realização do presente estudo. Todas as fêmeas foram mantidas em Biotério de manutenção do Departamento de Biologia (IBILCE/UNESP), sob condições de luminosidade e temperatura adequadas, e alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Unesp e do COBEA. Depois de anestesiadas pela ketamina/xilasina (1ml/Kg), 32 fêmeas foram submetidas à intervenção cirúrgica, através da qual foram removidos os ovários (ovariectomia bilateral). Após a cirurgia, as fêmeas permaneceram em recuperação por dez dias em gaiolas de polietileno mantidas em condições de luminosidade e temperatura controladas no biotério. Decorridos os dez dias, oito fêmeas do grupo Castrado + Estradiol (Ca + E) receberam doses subcutâneas de estradiol (β -estradiol 3-benzoato – Sigma – 1mg/kg em 0,1ml de óleo mineral Nujol®), oito fêmeas do grupo Castrado + Estradiol + Testosterona (Ca + E + T) receberam doses subcutâneas de estradiol + cipionato de testosterona (β -estradiol 3-benzoato – Sigma – 1mg/kg + Deposteron-Novartis/Sigma – 1mg/kg, ambos diluídos em 0,1ml de óleo mineral Nujol®), oito fêmeas do grupo Castrado + Óleo (Ca + O) receberam doses subcutâneas (0,1ml) apenas do veículo de diluição e as outras oito restantes, pertencentes ao grupo Castrado (Ca) não receberam qualquer aplicação. A administração dos hormônios e do veículo ocorreram a cada 48 horas a partir do décimo dia até o 40º dia após a intervenção cirúrgica, sempre pela manhã entre 8h e 10h (adaptado de Santos *et al.*, 2006 e Scarano *et al.*, 2008). As outras oito fêmeas utilizadas no estudo foram mantidas como controle (Co) do experimento sem que passassem pela intervenção cirúrgica nem pelas reposições hormonais até o dia da eutanásia. Os animais de cada grupo foram eutanasiados no 131º dia após o nascimento, com exceção das fêmeas do grupo controle que foram sacrificadas na fase de proestro subsequente, por ser a etapa do ciclo reprodutivo do gerbil que apresenta maior regularidade hormonal sérica. Todos foram submetidos à inalação de CO₂ e, depois de pesados, foram decapitados para a coleta do sangue, o qual foi submetido à dosagem

hormonal. As próstatas (removidas juntamente com a uretra) foram devidamente pesadas e fixadas de acordo com a metodologia adequada para cada uma das análises.

Dosagem hormonal sérica

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado durante 20 minutos, a 3.000 rpm, e o soro separado e congelado para posterior análise. A análise sérica foi realizada em aparelho automatizado (VITROS ECi-Johnson & Johnson de Análise Quimioluminescente Ultra-sensível), com nível de sensibilidade de 0,1–3814 pg/ml para estradiol, 0,1–150 ng/ml para testosterona e 0,15–60 ng/ml para progesterona, em um laboratório de análises clínicas de referência. Foram feitas as seguintes dosagens: testosterona, progesterona, estrógeno. A análise exploratória e estatística dos resultados foi realizada em gráficos e planilhas dos softwares Microsoft Excel e Statistic. O teste de significância utilizado foi o Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância $p \leq 0,05$.

Obtenção de cortes histológicos

Os complexos prostáticos coletados de cinco animais por grupo experimental foram fixados por 24 horas em imersão no fixador Karnovski a 4%, diluído em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de etanol e incluído em historesina (Historesin embedding Kik – Leica). Cortes de 3 μm foram produzidos em micrótomo rotativo e foram coletados em lâminas de vidro para as devidas colorações com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico e Schiff (PAS). Três complexos em cada grupo experimental foram imersos em paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato 0,2M, pH 7,2, durante 24 horas. Em seguida, esse material foi desidratado em uma série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluídos em parafina (Histosec - MERK). Cortes de 5 μm foram produzidos em micrótomo rotativo e foram coletados em lâminas de vidro silanizadas para aplicação dos protocolos imuno-histoquímicos para detecção da expressão dos receptores de estrógenos ER- α e ER- β .

Análise morfológica

Para avaliar as diferenças morfológicas na próstata das fêmeas, os cortes histológicos de cinco animais por grupo foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina. As avaliações foram feitas em microscopia de luz e as imagens histológicas digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics.

Análise da atividade secretora

Para avaliar o padrão da atividade secretora segundo a presença de carboidratos no fluido prostático, os cortes histológicos de cinco animais por grupo experimental foram submetidos à coloração por Ácido Periódico e Schiff. As avaliações foram feitas em microscopia de luz e as imagens histológicas digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics.

Análise Morfométrico-estereológica e estatística

A análise estereológica foi realizada para a obtenção da frequência relativa dos diferentes compartimentos prostáticos (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) dos grupos em estudo. Para isso, foram capturados 40 campos aleatórios divididos entre os cinco animais de cada grupo a partir de lâminas coradas pela HE, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics). As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, obteve-se a frequência relativa (%) dos compartimentos prostáticos. Para o cálculo de frequência relativa dos compartimentos utilizaram-se os pontos do Sistema-teste que coincidiam com cada compartimento e esses números de pontos foram transformados em porcentagem.

Para as análises morfométricas, os cortes histológicos corados pela HE foram submetidos às análises de altura (μm) das células epiteliais secretoras e da espessura (μm) da camada de células musculares lisas. Além disso, foram aferidas as medidas de área

(μm^2) e perímetro (μm) nucleares. Nas análises de altura, espessura, área e perímetro, foram coletadas 200 medidas aleatórias divididas entre os cinco animais de cada grupo experimental. Dessa forma, foram utilizados 25 campos em cada grupo. A análise do material foi realizada em fotomicroscópio Olympus BX60, e a captura das imagens para as medidas morfométricas pelo software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics. Todas as medidas realizadas foram feitas de maneira automatizada pelo programa devidamente calibrado por régua micrométrica.

A análise exploratória e tratamento estatístico dos dados biométricos estereológicos e morfométricos foram realizados em planilhas e gráficos dos softwares Statistic e Microsoft Excel. Para a comprovação da significância dos resultados, foram utilizados os testes ANOVA e de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Análises Imuno-histoquímicas

Para avaliar o efeito dos hormônios sobre o desenvolvimento da próstata das fêmeas, foram verificadas as possíveis alterações na expressão de receptores hormonais de estrógenos ER α (Anti-ER α , rabbit polyclonal IgG, MC-20, Santa Cruz Biotechnology) e ER β (Anti-Er β , rabbit polyclonal IgG, H-150, Santa Cruz Biotechnology) em células epiteliais e estromais nas diferentes situações hormonais estabelecidas. Procedimentos gerais adotados para imunocitoquímica: os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 100°C por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em TBS por três vezes de cinco minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi realizado com H₂O₂ em etanol por 30 minutos e depois os cortes foram lavados em TBS por três vezes de cinco minutos. Os anticorpos primários para ER α e Er β foram utilizados em diluições de 1:50 a 4°C overnight. Após serem lavados em TBS por três vezes de cinco minutos, e incubados com polímero marcado com peroxidase (Dako Envision Polimer Dual Link System HRP), os cortes foram revelados com a diaminobenzina (DAB). A contra-coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em etanol, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional.

Resultados

Biometria

A análise da Tabela I demonstra que não ocorreram alterações significativas na massa corpórea das fêmeas de gerbilo dos diferentes grupos experimentais. Contudo, houve uma redução significativa da massa do complexo prostático (uretra + ductos e alvéolos prostáticos) nos grupos Ca e Ca+O e um aumento após o tratamento com estradiol e testosterona (Ca+E+T). Os dados referentes ao peso relativo confirmam a diminuição da próstata feminina nos grupos Ca e Ca+O e do seu aumento no grupo Ca+E+T.

Sorologia

Os níveis séricos de estradiol nas fêmeas controle em proestro foram $23,0 \pm 4,2$ pg/ml (Tabela I). Estes níveis se mantiveram constantes nos grupos Ca e Ca+O, mas tornaram-se muito elevados nos grupos Ca+E ($132,3 \pm 7,9$ pg/ml) e Ca+E+T ($80,0 \pm 15,0$ pg/ml). Os níveis de progesterona (controle = $7,2 \pm 2,0$ ng/ml) sofreram grande redução nos grupos Ca e Ca+O ($0,5 \pm 0,2$ e $0,4 \pm 0,3$ ng/ml, respectivamente), mas se recuperaram a um padrão similar ao grupo controle nos tratamentos com estradiol e estradiol+testosterona. As oscilações nos níveis de testosterona não foram significativas para os grupos estudados.

Estereologia

A frequência relativa dos compartimentos prostáticos nos diferentes grupos experimentais pode ser observada na Tabela I. Os resultados demonstram que o compartimento epitelial alterou-se significativamente apenas no grupo Ca+E+T ($33,7 \pm 7,5\%$), onde observou-se um aumento com relação aos demais grupos ($27,3 - 30,2\%$). O compartimento estromal sofreu uma redução significativa nos grupos Ca+O, Ca+E e Ca+E+T. Inversamente, a proporção de estroma muscular tornou-se mais elevada nestes mesmos grupos. O compartimento luminal manteve-se constante em todos os grupos experimentais.

Morfometria e Cariometria

Os dados morfométricos (Tabela I) indicam que as células epiteliais secretoras tornaram-se significativamente mais baixas nos grupos Ca e Ca+O. Contudo, nos grupos tratados com estradiol e estradiol+testosterona estes valores foram sucessivamente mais elevados (controle = $19,3 \pm 5,5 \mu\text{m}$; Ca+E = $27,4 \pm 8,4 \mu\text{m}$; Ca+E+T = $32,9 \pm 8,5 \mu\text{m}$). A espessura da camada de células musculares lisas tornou-se reduzida no grupo Ca+O, porém mostrou-se significativamente mais desenvolvida nos grupos Ca+E e Ca+E+T.

Os dados cariométricos (Tabela I) demonstram que a área e o perímetro do núcleo das células secretoras diminuem com a castração (grupos Ca e Ca+O), mas que tendem a se recuperar a valores semelhantes ao do grupo controle após o tratamento hormonal (grupos Ca+E e Ca+E+T).

Análise morfológica e do perfil secretor

A próstata de fêmeas na fase de proestro é encontrada na região parauretral como um conjunto de ductos e alvéolos inseridos em um estroma fibromuscular e exibe íntimo contato com a parede da uretra média e distal (figura 1A). Os ácinos são revestidos por um epitélio simples que varia de cúbico a prismático e com dois tipos celulares principais: as células basais e as células secretoras (figura 1B). Os lumens se apresentam volumosos, repletos dos produtos de secreção glicoproteica, e podem ser observados numerosos *blebs* de secreção no ápice das células epiteliais secretoras (figura 1C). Os ácinos e ductos prostáticos estão associados a um estroma rico em fibras reticulares e colágenas que circundam a membrana basal, células musculares lisas e estriadas esqueléticas, além de vasos sanguíneos (figura 1A-C).

Nos animais do grupo Castrado, a glândula prostática apresentou grande regressão acinar, evidenciada pela diminuição do volume dos ácinos (figura 1D). A morfologia geral da glândula apresentou grande perda da arquitetura quando comparada com a glândula do grupo controle. O epitélio, que antes exibia um formato regular acompanhando a circunferência dos ácinos, apresentou-se bastante pregueado. As células epiteliais tornaram-se cúbicas muito mais frequentemente em relação ao observado no grupo controle (figura 1E). Fica evidente pela coloração PAS uma importante redução da atividade secretora

(figura 1F). Notou-se, ainda, a presença de “debris” celulares ocupando o interior dos lúmens acinares. Resultados muito semelhantes foram notados no grupo castrado+óleo (figura 1G-I).

A reposição do estradiol causou importantes mudanças no arranjo tecidual da próstata feminina do gerbilo (figura 1J-L). As glândulas dos animais do grupo castrado+Estradiol mostraram uma reversão no processo de regressão acinar com lumens apresentando-se mais volumosos e com grande densidade celular (figura 1J). A altura e o volume das células epiteliais sofreram um aumento considerável em relação ao observado nos animais castrados e, inclusive, em relação aos animais controles, passando de cúbicas a prismáticas em grande parte da superfície epitelial (figura 1K). A atividade secretora parece ter aumentado uma vez que além das células apresentarem-se maiores e repletas de *blebs*, os lumens apresentaram numerosos grânulos de secreção (figura 1L). Resultados semelhantes foram encontrados para as próstatas de fêmeas do grupo Castrado+Estradiol+Testosterona, que receberam doses conjugadas dos hormônios estradiol e testosterona após a ovariectomia (figura 1M-O). Entretanto, nesses animais a resposta mostrou-se mais exacerbada, com células secretoras muito altas e uma frequência muito maior de arcos intraepiteliais e figuras cribiformes neoplásicas (figura 2J).

Em todos os grupos experimentais foi observado pelo menos um tipo de lesão, desde pequenas desordens inflamatórias até altos graus de desordens proliferativas (figura 2). Em alguns casos, pôde-se observar certo distanciamento entre a lâmina basal e as camadas musculares lisas, que em condição normais, são estruturas adjacentes.

Análise Imuno-histoquímica

A imunorreação para o ER- α foi mais evidente nos núcleos das células estromais e, apesar de ter sido observada em todos os grupos, sua frequência e intensidade diminuíram nos grupos Ca e Ca + O. No entanto, os dois tratamentos hormonais aplicados foram capazes de tornar a marcação muito mais evidente, sobretudo frente à maior celularidade observada no estroma (Figura 3A-E). Eventualmente, foram observadas marcações em células epiteliais. Em contrapartida, o padrão de imunolocalização de ER- β nas células epiteliais foi muito semelhante em todos os grupos experimentais (Figura 3F-O).

Discussão

Estudos prévios têm demonstrado que a próstata feminina é um órgão funcional e que o desempenho regular do seu papel na reprodução é dependente da ação de hormônios esteróides (Santos *et al.*, 2006 e 2008). Oscilações naturais desses hormônios durante o ciclo estral da fêmea do gerbilo são acompanhadas por importantes alterações na estrutura e funcionamento da glândula prostática, tanto da porção secretora quanto da porção estromal, o que comprova o envolvimento dos esteróides na histofisiologia prostática feminina (Fochi *et al.*, 2008; Santos e Rochel-Maia *et al.*, 2011). De fato, a privação dos hormônios ovarianos causou atrofia na glândula, evidenciada pela redução de sua massa absoluta e relativa e pela redução da altura do epitélio, da área e perímetro nucleares e da atividade secretora externada pela coloração PAS. Além disso, dados de ultra-estrutura comprovam a redução da atividade secretora nestas células devido à redução das organelas responsáveis por tal função após a castração, como o Golgi, o retículo endoplasmático rugoso e vesículas de secreção (Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, dados não publicados).

A reversão de todas essas características citadas no processo de regressão acinar foi observada nos grupos tratados pelo estradiol e pelo estradiol+testosterona. Respostas muito semelhantes às encontradas no grupo tratado com estradiol isolado foram observadas em próstatas de gerbilos machos que passaram por reposição hormonal por estradiol após orquiectomia (Scarano *et al.* 2008). Entretanto, há alguma diferença entre os grupos experimentais tratados no que diz respeito ao padrão de reestruturação do tecido. Embora a maioria das respostas tenham tido aspecto semelhante (aumento da altura do epitélio, da área e perímetro nucleares, da produção de secreção etc.), a intensidade dessas respostas foi diferente entre esses grupos. Nos dois casos, apesar da recuperação da atividade secretora, a histoarquitetura normal da glândula não foi recuperada e ambos os tratamentos tiveram efeito proliferativo sobre o órgão. Com isso, podemos afirmar que há semelhança entre o papel dos hormônios esteróides na próstata feminina e na masculina (Scarano *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2006) e que o balanço entre esses hormônios, e não somente sua circulação, é fundamental para a manutenção da sua homeostasia.

De acordo, numerosos tipos de lesões foram observados, desde pequenos focos de desordens inflamatórias até prostatites generalizadas e desordens proliferativas, tanto nos animais castrados quanto, e principalmente, nos animais tratados. Apesar de 100% dos animais tratados terem apresentado lesões teciduais, no grupo estradiol+testosterona elas se mostraram muito mais conspícuas e intensas. Dados de literatura corroboram que a proliferação celular induzida por estradiol é aberrante (Prins & Korach 2008) e a superexposição de fêmeas à testosterona, que é um hormônio envolvido na regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência das células prostáticas, também geraram lesões de ordem inflamatória e proliferativa (Santos *et al.* 2006). Assim, a combinação de doses supra-fisiológicas desses hormônios foi igualmente inadequada para o bom funcionamento prostático nas fêmeas estudadas, apesar de reverter a atrofia glandular.

Observaram-se, ainda, alguns eventos de metaplasia escamosa, as quais se apresentam como lesões comuns em glândulas expostas a altas concentrações de estradiol, caso do presente estudo. Este tipo de lesão é resultante da proliferação e da multiestratificação das células epiteliais basais (Ellem & Risbridger 2009). A metaplasia escamosa ocorre normalmente durante a vida intra-uterina de homens, enquanto o feto está sob grande influência dos níveis de estrógeno presentes no sangue da mãe, mas a ocorrência diminui após o nascimento, quando a concentração de estrógeno diminui e a de testosterona aumenta relativamente (Prins & Korach 2008).

A incidência de lesões frente ao desequilíbrio hormonal reitera a importância de se entender a ação dos estrógenos e andrógenos sobre a próstata feminina, posto que as alterações hormonais que acompanham o envelhecimento, o uso de substâncias disruptoras endócrinas, de métodos contraceptivos ou terapias hormonais podem interferir na saúde da mulher. Na literatura já são encontradas importantes doenças do sistema urogenital feminino com origem na próstata, tais como cistos parauretrais, carcinomas e adenocarcinomas (Zaviačič , 1993; Dodson *et al.*, 1994, 1995; Ali *et al.*, 1995; Ebisuno *et al.*, 1995; Sloboda *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2001; Sharifi-Aghdas and Ghaderian, 2004; Kato *et al.*, 2005; McCluggage *et al.*, 2006; Konecki *et al.* 2009). Estudos do nosso laboratório observaram que os desníveis hormonais provocados com o envelhecimento (Custódio *et al.*, 2006), com a suplementação hormonal pela testosterona (Santos *et al.*,

2006; 2007) e com tratamentos por drogas anti-estrogênicas (revisados em Santos e Taboga, 2006) comprometem a próstata feminina com as mesmas lesões descritas para a glândula masculina, tais como: prostatites, hiperplasias, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas (Santos *et al.*, 2006).

A diminuição na imunorreatividade do ER- α coincidiu com a involução prostática causada pela castração. De fato, muitos dados na literatura relacionam a expressão maciça deste receptor com proliferação aberrante em machos ou seres humanos, formação de neoplasias, onde geralmente aparecem super-expressos, metaplasias e avanço para doenças prostáticas de caráter maligno (Bonkhoff e Berges, 2008; revisão em Ellem e Risbridger, 2009). Isso explica a expressiva marcação observada para o ER- α nos grupos tratados com estradiol e estradiol+testosterona, onde grande número de desordens foi observado, além de uma maior celularidade tanto do epitélio quanto do estroma glandular. Em relação ao ER- β , apesar de haverem evidências de que sua expressão diminua com a castração em ratos adultos (Oliveira *et al.*, 2007) ou em avançados graus de neoplasias intraepiteliais (Bonkhoff e Berges, 2008), essas características não foram observadas neste estudo, posto que em todos os grupos experimentais, o padrão de expressão se manteve semelhante.

Uma observação importante de se ressaltar é que, mesmo após a castração, os níveis séricos de estradiol, cuja principal fonte eram os ovários, não sofreram alterações significativas. Esses dados nos parecem intrigantes, pois os sítios extragonadais produtores de estrógeno no organismo feminino, tais como as células do tecido adiposo e as adrenais apenas mantêm níveis hormonais essenciais para o organismo (Siiteri & MacDonald, 1973; Simpson *et al.*, 1997). Uma vez que o estradiol seja um hormônio de extrema importância para muitas das funções no organismo feminino, pode-se sugerir uma possível compensação na produção de estrógenos extragonadais seguintes à castração. Em adição, a reposição de estradiol parece alterar os níveis séricos dos outros hormônios esteróides. Neste estudo, animais sob exposição estrogênica após a castração cirúrgica, mostraram uma recuperação nos níveis séricos de progesterona e, apesar de não serem estatisticamente significantes, os níveis de testosterona demonstraram uma tendência de aproximação dos valores encontrados no grupo controle. Estudos adicionais são necessários para se definir de que forma essa interação pode ocorrer.

Em conclusão, os hormônios ovarianos são de grande importância para a manutenção da fisiologia da próstata feminina, uma vez que a ovariectomia causou regressão glandular e diminuição da atividade secretora. O estradiol isolado ou combinado com a testosterona mostrou ter efeito proliferativo sobre o epitélio e provocou o aumento da atividade secretora, o que prova que esses hormônios, assim como nos machos, estão envolvidos nos processos biológicos que ocorrem nesse órgão na fêmea. Entretanto, a exposição apenas a estes dois hormônios permitiu a recuperação da atividade secretora da glândula, mas não de sua histoarquitetura normal. Além disso, o estradiol mostrou ter algum efeito regulatório sobre os níveis de progesterona e testosterona. Dessa forma, estudos aprofundados sobre as ações do estrógeno na próstata, isolado ou conjugado com outros hormônios, podem abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos de importantes doenças prostáticas.

Referências bibliográficas

- Ali SZ, Smilari TF, Gal D, Lovecchio JL, Teichberg S. 1995. Primary adenoid cystic carcinoma of Skene's glands. *Gynecol Oncol*, 57:257-261.
- Asano K, Maruyama S, Usui T, Fujimoto N. 2003. Regulation of estrogen receptor α and β expression by testosterone in rat prostate gland. *Endocrine Journal* 50(3):281-287.
- Bonkhoff H e Berges R. 2008. The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and Progression of Prostate Cancer. *European urology* 55:533–542.
- Custódio AMG, Jesus GP, Falleiros-Jr LR, Taboga, SR 2006. Secretor epithelium of the old female gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate and its lipofuscinogenesis age-dependent. Senescence and estereoidal therapy induce alterations of the epithelial cells phenotypes in the gerbil female prostate. *International Symposium on Extracellular Matrix – SIMEC Anais*, Búzios, RJ.
- Dodson MK, Cliby WA, Keeney GL, Peterson MF, Podratz KC. 1994. Skene's gland adenocarcinoma with increased serum level of prostate-specific antigen. *Gynecol Oncol*, 55:304-307.

- Dodson MK, Cliby WA, Pettavel PP, Keeney GL, Podratz KC. 1995. Female urethral adenocarcinoma: evidence for more than one tissue of origin? *Gynecol Oncol*, 59:352-357.
- Ebisuno S, Miyai M, Nagareda T. 1995. Clear cell adenocarcinoma of the female urethra showing positive staining with antibodies to prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase. *Urology*, 45:682-685.
- Ellem SJ, Risbridger GP. 2009. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. *Steroid Enzymes and Cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1155:174-186.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod.* 79(6):1084-91.
- Gräfenberg E. 1950. The role of the urethra in female orgasm. *Int J Sexol*, 3:145-148.
- Huffman JW. 1948. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am J Obstet Gynecol*, 55:86-101.
- Huffman JW. 1951. Clinical significance of the paraurethral ducts and glands. *Arch Surg*, 62:615-625.
- Islam AHMM, Kato H, Hayama M, Kobayashi S, Ota H, Nishizawa O. 2001. Adenocarcinoma of the female paraurethral duct showing neuroendocrine differentiation. *Urology*, 58:1058.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. 2005. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119.
- Konecki T, Salagierski M, Sosnowski M. 2009. Treatment of paraurethral cysts in female patients – description of three cases. *Central European Journal of Urology* 62(2):111-113.
- McCluggage WG, Ganesan R, Hirschowitz L, Miller K, Rollason TP. 2006. Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix and vagina: report of a series with a detailed immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*, 30:209-215.
- McCrea LE. 1952. Malignancy of the female urethra. *Urol Surv*, 2:85-149.
- Oliveira AG, Coelho PH, Guedes FD, Mahecha GAB, Hess RA, Oliveira CA. 2007. 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -

dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids* 72:914–922.

- Oliveira SM, Vilamaior PSL, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. 2006. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. *Cell Biology International* 31:235-245.
- Prins GS, Korach KS. 2008. The role of Estrogens and Estrogen Receptors in Normal Prostate Growth and Disease. *Steroids* 73(3):233-244.
- Santos FC, Leite RP, Custodio AM, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Goes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 75(3):370-9.
- Santos FCA, Custódio AMG, Campos SGP, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. 2008. Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries. *Biology of Reproduction* 79(4):674-685.
- Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2007. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624.
- Santos FCA, Rochel-Maia SS, Fochi RA, Justulin Jr LA, Santos SAA, Vilamaior PSL, Felisbino SL, Góes RM, Taboga SR. 2011. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology* 173:419–427.
- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3(1):3-18.
- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3(1):3-18.
- Scarano W R, Souza DE, Campos SGP, Corradi LS, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *International Journal of Experimental Pathology* 89:25-37.
- Sharifi-Aghdas F, Ghaderian N. 2004. Female paraurethral cysts: experience of 25 cases. *BJU Int*, 93:353-356.

- Siiteri PK & MacDonald PC. 1973. Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. *In Handbook of Physiology*, Vol 2, pp 619-629. Eds RO Greep & EB Astwood. Washington DC, USA: American Physiological Society.
- Silva DAL, Shinohara FZ, Santos FCA, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. 2009. Effects of ovariectomy and subsequent estradiol replacent therapy on the gerbil female prostate. *Annals of Braz. J. Morphol Sci*.
- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. 1999. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 6:131-137.
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR & Mendelson CR. 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Progress in Hormone Research* 52:185-213.
- Sloboda J, Zaviacic M, Jakubovský J, Hammar E, Johnsen J. 1998. Metastasizing adenocarcinoma of the female prostate (Skene's paraurethral glands). Histological and immunohistochemical prostate markers studies and first ultrastructural observation. *Pathol Res Pract*, 194:129-136.
- Tepper SL, Jagirdar J, Heath D, Geller SA. 1984. Homology between the female paraurethral (Skenes's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med*, 108(5): 423-425.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, 129:1905-1912.
- Thomson AA. 2001. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121:187-195.
- Timms BG, Petersen SL, Vom Saal FS. 1999. Prostate gland growth during development is stimulated in both male and female rat fetuses by intrauterine proximity to female fetuses. *J Urology*, 161:1694-1701.
- Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, 12:131-155.
- Wernet N, Albrecht M, Sesterhenn I, Goebbels R, Bonkhoff H, Seitz G, Inniger R, Remberger K. 1992. The "female prostate": location, morphology, immunohistochemical characteristics and significance. *Eur Urol*, 22:64-69.
- Zaviacic M, Jakubovská V, Belošovic J, Breza J. 2000a. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embriol (Berl)*, 201:51-61.

Zaviacic M, Sidlo J, Borovský M. 1993. Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene's paraurethral glands and ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423:503-505.

Zaviacic M, Zajíčková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviacic T, Holomán K, Breza J. 2000b. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *J Histotechnol*, 23:61-69.

Zaviacic M. 1993. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *J Sex Res*, 30:148-151.

Zaviacic M. 1999. *The female prostate: from vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate*. Bratislava, Slovakia: Slovak Academic Press. 171pp.

Legenda das Figuras

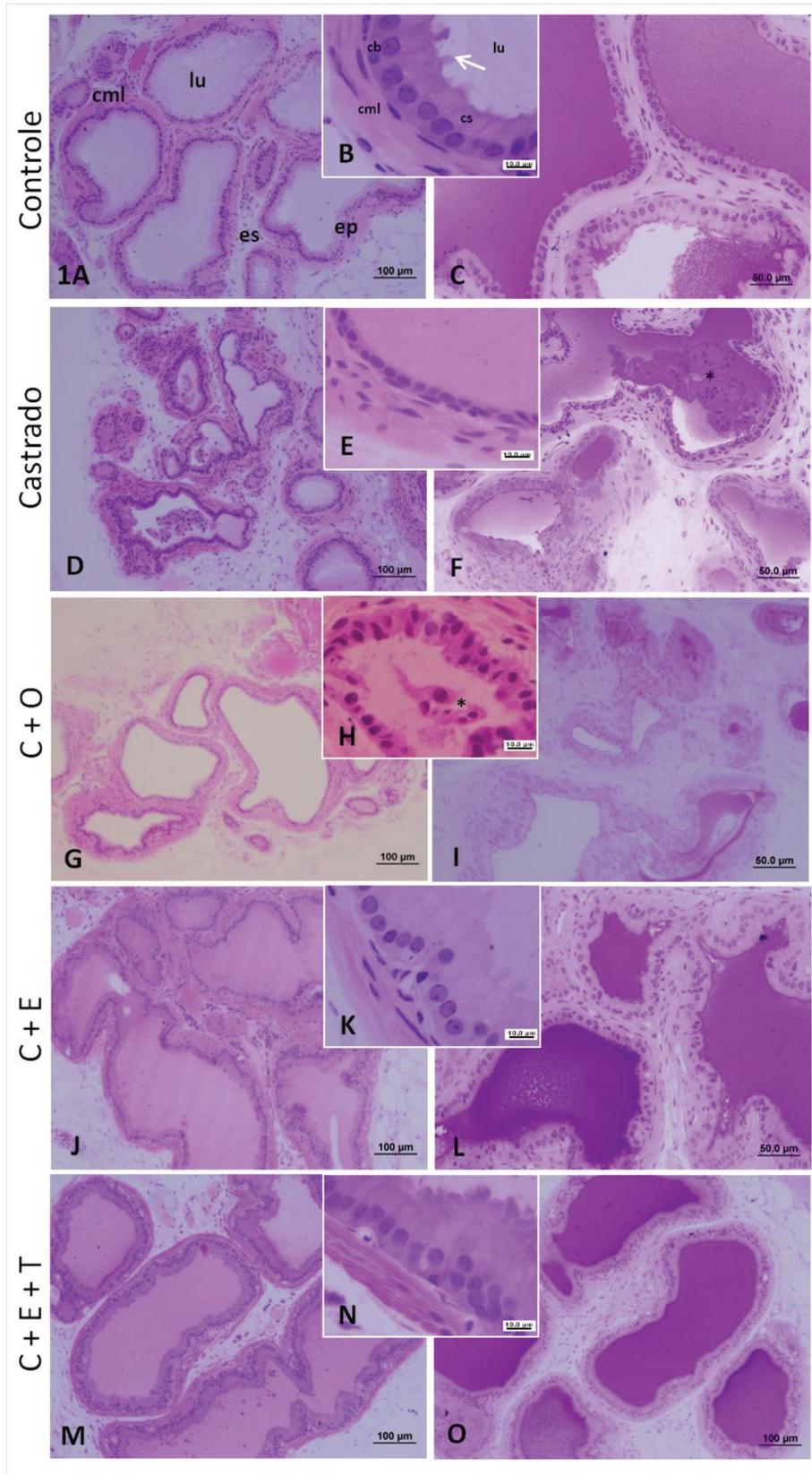
Figura 1 – Aspectos morfológicos e da atividade secretora em cada um dos grupos experimentais. Coloração H&E: A, B, D, E, G, H, J, K, M e N. Coloração PAS: C, F, I, L, O. Ácinos com epitélio desenvolvido podem ser observados nos grupos controle (A, B), castrado+estradiol (J, K) e castrado+estradiol+testosterona (M, N) e com intensa atividade secretora (C, L, O). Ácinos regredidos podem ser observados nos grupos castrado (D, E) e castrado+óleo (G, H) e com atividade secretora muito reduzida (F, I). cml: célula muscular lisa, lu: lumen, es: estroma, ep: epitélio, cb: célula basal, cs: célula secretora, seta branca: *blebs* de secreção; *: debris celulares.

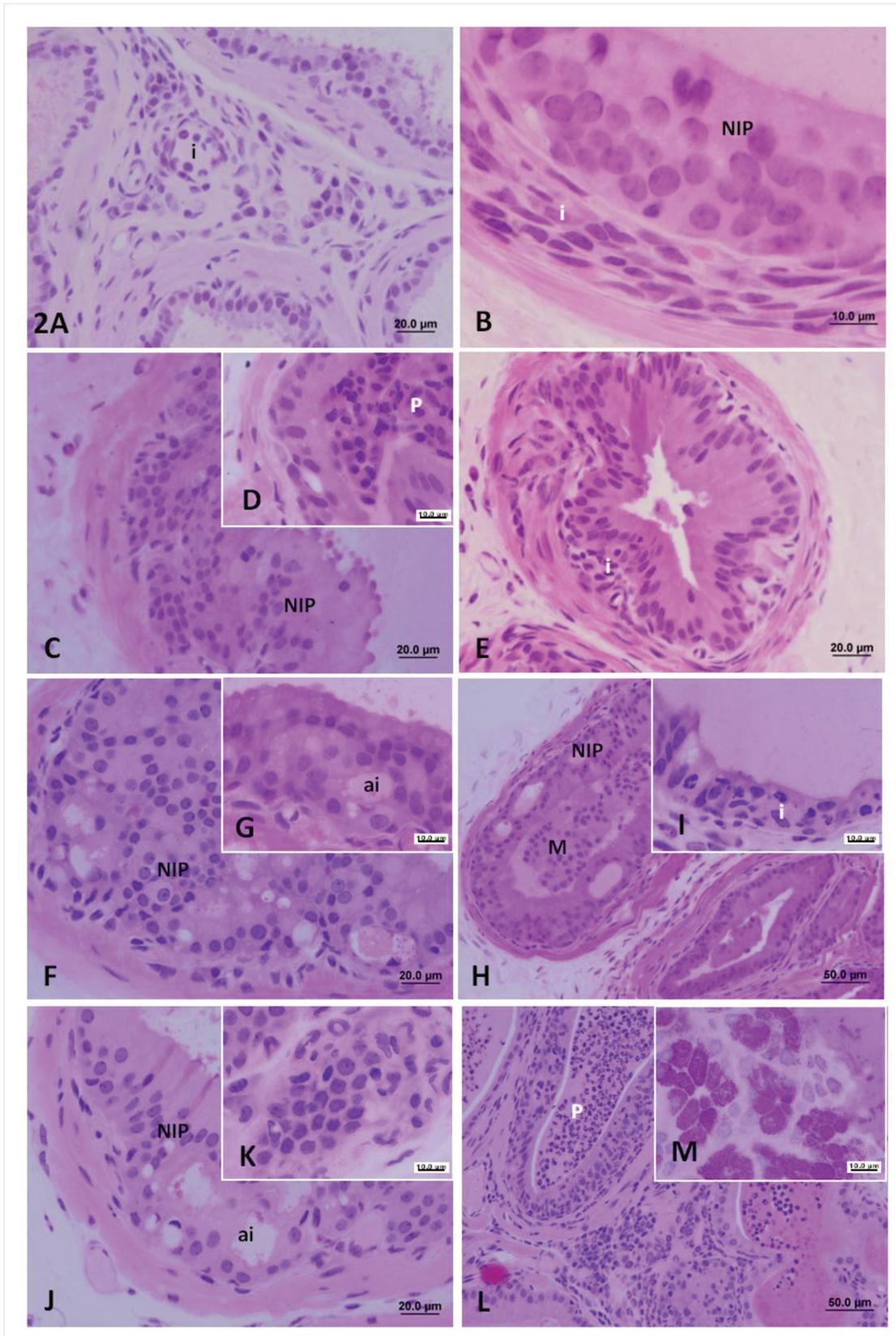
Figura 2 – Focos de lesões encontradas em todos os grupos experimentais. Coloração H&E: (A-K). Coloração PAS: (L). (A, B) Controle. (C, D) Castrado. (E) Castrado+óleo. (F-I) Castrado+estradiol. (J-M) Castrado+estradiol+testosterona. Na figura (L) pode ser observada uma citodiferenciação anômala do grupo castrado+estradiol+testosterona. i: inflamação, NIP: neoplasia intraepitelial prostática, P: prostatite, ai: arco intraepitelial, M: metaplasia escamosa.

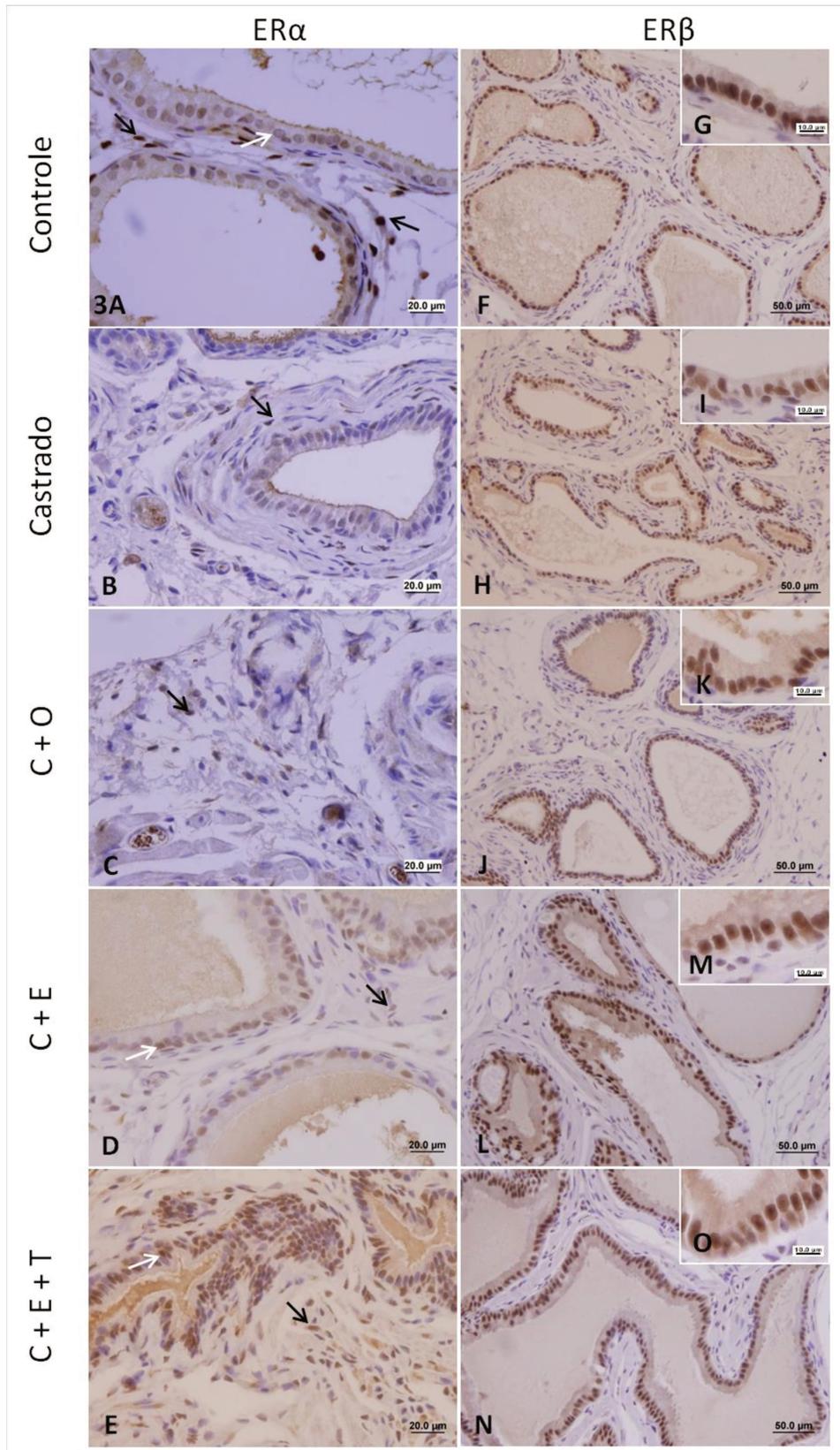
Figura 3 – Marcação imuno-histoquímica dos receptores de estrógeno nos grupos experimentais. ER α : A – E. Marcação observada principalmente nas células estromais, com redução de positividade nos grupos castrado e castrado+estradiol. ER β : F – O. Marcação observada nas células epiteliais, com positividade muito semelhante entre todos os grupos. Setas brancas: núcleos de células epiteliais; seta escura: núcleos de células estromais.

Tabela I - Estatística descritiva da biometria, sorologia, estereologia, morfometria e cariometria da próstata feminina do gerbilo em todos os grupos experimentais. Os valores indicados representam a média e o desvio padrão, respectivamente. *Diferenças estatisticamente significativas $p \leq 0,05$ (ANOVA, Tukey). #Diferenças estatisticamente significativas $p \leq 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn). ^{a,b,c}Superíndices distintos indicam diferenças entre os grupos experimentais. Co = controle; Ca = castrado, Ca+O = castrado + óleo; Ca+E = castrado + estradiol; Ca+E+T= castrado + estradiol + testosterona; CML = célula muscular lisa.

	Grupos Experimentais				
	Co	Ca	Ca+O	Ca+E	Ca+E+T
Biometria (n=10)					
Corpo (g)	59,4 ± 4,3	63,4 ± 3,7	57,8 ± 5,5	63,9 ± 4,9	61,8 ± 2,0
Complexo prostático* (g)	0,055 ^a ± 0,02	0,039 ^b ± 0,01	0,034 ^b ± 0,006	0,051 ^a ± 0,01	0,083 ^c ± 0,02
Peso relativo* (x10 ⁻⁴)	9,4 ^a ± 3,2	6,1 ^b ± 1,8	5,9 ^b ± 1,2	7,9 ^a ± 2,6	13,3 ^c ± 3,3
Sorologia (n=5)					
Estradiol [#] (pg/ml)	23,0 ^a ± 4,2	22,9 ^a ± 3,4	15,6 ^a ± 4,6	132,3 ^b ± 7,9	80,0 ^c ± 15,0
Progesterona [#] (ng/ml)	7,2 ^a ± 2,0	0,5 ^b ± 0,2	0,4 ^b ± 0,3	8,8 ^a ± 2,6	7,9 ^a ± 2,0
Testosterona (ng/ml)	0,1 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,12 ± 0,1	0,13 ± 0,05
Estereologia (n=40)					
Epitélio* (%)	30,2 ^a ± 5,9	27,8 ^a ± 10,1	27,3 ^a ± 8,9	28,7 ^a ± 8,8	33,7 ^b ± 7,5
Estroma* (%)	34,0 ^a ± 8,6	33,0 ^a ± 11,2	24,5 ^b ± 7,9	22,0 ^b ± 7,7	23,0 ^b ± 7,8
CML* (%)	16,2 ^a ± 7,0	19,3 ^a ± 7,2	25,1 ^b ± 4,7	22,9 ^b ± 8,2	21,5 ^b ± 6,9
Lúmen (%)	19,6 ± 8,5	19,9 ± 8,3	23,1 ± 11,5	26,4 ± 8,2	21,7 ± 12,1
Morfometria (n=200)					
Epitélio* (µm)	19,3 ^a ± 5,5	15,9 ^b ± 7,5	11,6 ^c ± 5,6	27,4 ^d ± 8,4	32,9 ^e ± 8,5
CML* (µm)	14,5 ^a ± 5,5	13,1 ^a ± 7,4	10,7 ^b ± 4,2	16,9 ^c ± 7,8	17,8 ^c ± 7,7
Cariometria (n=200)					
Área* (µm ²)	29,5 ^a ± 6,5	19,1 ^b ± 9,7	12,3 ^c ± 6,0	24,6 ^d ± 8,2	29,1 ^a ± 6,8
Perímetro* (µm)	20,4 ^a ± 2,3	16,1 ^b ± 4,3	13,1 ^c ± 2,9	18,9 ^a ± 3,3	20,7 ^a ± 2,4







CONCLUSÕES GERAIS

1. A histoarquiteta normal da próstata feminina está relacionada ao equilíbrio entre os hormônios produzidos pelos ovários. Ainda, é possível afirmar que dentre esses hormônios, o estradiol e a testosterona são fundamentais para a manutenção de sua morfologia.
2. O estradiol mostrou ter efeito proliferativo sobre as células prostáticas, bem como sua associação com a testosterona.
3. A função secretora da próstata feminina é dependente do equilíbrio entre os hormônios esteróides.
4. Embora ainda seja necessário compreender de que forma, existe uma possível atuação do estradiol na regulação dos níveis séricos da testosterona e da progesterona

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali SZ, Smilari TF, Gal D, Lovecchio JL, Teichberg S. 1995. Primary adenoid cystic carcinoma of Skene's glands. *Gynecol Oncol*, 57:257-261.
- Cheng E, Lee C, Aaronson SA, Grayhack J. 1993. Endocrinology of the prostate. In: Lepor H, Lawson RE, eds. *Prostate disease*. W. B. Saunders Co.; 57-71.
- Coffey DS. 1992. The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughn JED, eds. *Campbell's urology*, ed. 6. W. B. Saunders Co.; 1381-1428.
- Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. 2004. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biology International*, 28:335-344.
- Custódio AMG, Jesus GP, Falleiros-Jr LR, Taboga, SR 2006. Secretor epithelium of the old female gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate and its lipofuscinogenesis age-dependent. Senescence and estereoidal therapy induce alterations of the epithelial cells phenotypes in the gerbil female prostate. *International Symposium on Extracellular Matrix – SIMEC Anais*. Búzios, RJ.
- de Graaf R. 1672. De mulierum organis generationi inservientibus. Tractatus novus demonstrans tani homines et animália caetera omnia, quac vivípara dicuntur, haud minus quam vivípara ab ovo origenem ducere. *Leyden*, 66p.
- Dodson MK, Cliby WA, Keeney GL, Peterson MF, Podratz KC. 1994. Skene's gland adenocarcinoma with increased serum level of prostate-specific antigen. *Gynecol Oncol*, 55:304-307.
- Dodson MK, Cliby WA, Pettavel PP, Keeney GL, Podratz KC. 1995. Female urethral adenocarcinoma: evidence for more than one tissue of origin? *Gynecol Oncol*, 59:352-357.
- Ebisuno S, Miyai M, Nagareda T. 1995. Clear cell adenocarcinoma of the female urethra showing positive staining with antibodies to prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase. *Urology*, 45:682-685.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the

Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod.* 79 (6): 1084-91.

- Gräfenberg E. 1950. The role of the urethra in female orgasm. *Int J Sexol*, 3:145-148.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat*, 155:81-93.
- Huffman JW. 1948. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am J Obstet Gynecol*, 55:86-101.
- Huffman JW. 1951. Clinical significance of the paraurethral ducts and glands. *Arch Surg*, 62:615-625.
- Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. 1994. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Seminars in Cancer Biology*, 5:391-400.
- Islam AHMM, Kato H, Hayama M, Kobayashi S, Ota H, Nishizawa O. 2001. Adenocarcinoma of the female paraurethral duct showing neuroendocrine differentiation. *Urology*, 58:1058.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. 2005. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119.
- Konecki T, Salagierski M, Sosnowski M. 2009. Treatment of paraurethral cysts in female patients – description of three cases. *Central European Journal of Urology* 62 (2): 111-113.
- Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N. 1992 Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 131:1571–1573
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253:165-174.
- McCluggage WG, Ganesan R, Hirschowitz L, Miller K, Rollason TP. 2006. Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix and vagina: report of a series with a detailed immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*, 30:209-215.
- McCrea LE. 1952. Malignancy of the female urethra. *Urol Surv*, 2:85-149.

- Nishino N, Totsukawa K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45 (3): 283-288.
- Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue & Cell*, 35:447-457.
- Santos FCA, Corradi LS, Taboga SR. 2001. Cytochemical characterization of the stromal compartment in gerbil female prostate. In *Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis*. Águas de Lindóia, Brazil, Suppl C. pp.207.
- Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2007. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624.
- Santos FCA, Rochel-Maia SS, Fochi RA, Justulin Jr LA, Santos SAA, Vilamaior PSL, Felisbino SL, Góes RM, Taboga SR. 2011. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology* 173:419–427.
- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18.
- Schmidt S, Franke M, Lehmann J, Loch T, Stöckle M, Weichert-Jacobsen K. 2001. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology*, 57:717-720.
- Schubach G. 2002. The G-spot is the female prostate. *Am J Obstet Gynecol*, 186(4): 850.
- Shapiro E, Huang H, McFadden DE, Masch RJ, NG E, Lepor H, Wu XR. 2004. The prostatic utricle is not a Müllerian duct remnant: immunohistochemical evidence for a distinct urogenital sinus origin. *J Urol*, 172:1753-1756.
- Sharifi-Aghdas F, Ghaderian N. 2004. Female paraurethral cysts: experience of 25 cases. *BJU Int*, 93:353-356.
- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. 1999 Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 6:131–137.
- Skene AJC. 1880. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am J Obstetr Diss Women Child*, 13:265-270.

- Sloboda J, Zaviacic M, Jakubovský J, Hammar E, Johnsen J. 1998. Metastasizing adenocarcinoma of the female prostate (Skene's paraurethral glands). Histological and immunohistochemical prostate markers studies and first ultrastructural observation. *Pathol Res Pract*, 194:129-136.
- Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carrol P. 2003. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*, 71:402-413.
- Staub NL, Beer MD. 1997. The role of androgens in female vertebrates. *Gen Compar Endocrinology*, 108: 1-24.
- Taboga SR, Góes RM, Zanetoni C, Santos FCA. 2001. Ultrastructural characterization of the prostate secretory cells: a comparative study between the male and female organs. In *Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis*. Águas de Lindóia, Brazil, Suppl C. pp.205.
- Taplin ME, Ho SM. 2001. The Endocrinology of Prostate Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (8): 3467–3477.
- Tepper SL, Jagirdar J, Heath D, Geller SA. 1984. Homology between the female paraurethral (Skenes's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med*, 108(5): 423-425.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, 129:1905-1912.
- Thomson AA. 2001. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121:187-195.
- Timms BG, Petersen SL, Vom Saal FS. 1999. Prostate gland growth during development is stimulated in both male and female rat fetuses by intrauterine proximity to female fetuses. *J Urology*, 161:1694-1701.
- Tsugaya M, Harada N, Tozawa K, Yamada Y, Hayashi Y, Tanaka S, Maruyama K, Kohri K. 1996. Aromatase mRNA levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Int J Urol* 3:292–296
- Wernet N, Albrecht M, Sesterhenn I, Goebbels R, Bonkhoff H, Seitz G, Inniger R, Remberger K. 1992. The "female prostate": location, morphology, immunohistochemical characteristics and significance. *Eur Urol*, 22:64-69.
- Zaviacic M, Ablin RJ. 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and

reasons for using the term “prostate” in human female. *Histol Histopathol*, 15:131-142.

Zaviacic M, Danihel L, Ružicková M, Blažeková J, Itoh Y, Okutani R, Kaway T. 1997a. Immunohistochemical localization of human protein 1 in the female prostate (Skene’s Gland) and the male prostate. *Histochem J*, 29:219-227.

Zaviacic M, Jakubovská V, Belošovic J, Breza J. 2000a. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene’s gland). *Anat Embriol (Berl)*, 201:51-61.

Zaviacic M, Ružicková M, Blažeková J, Zaviacic T, Itoh Y, Okutani R, Kawai T. 1997b. Immunohistochemical distribution of rabbit polyclonal antiurinary protein 1 antibody in the female (Skene’s gland) and male prostate: new marker for neuroendocrine cells? *Acta Histochem*, 99:267-275.

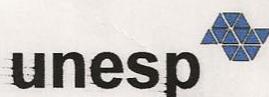
Zaviacic M, Sidlo J, Borovský M. 1993. Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene’s paraurethral glands and ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423:503-505.

Zaviacic M, Zajícková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviacic T, Holomán K, Breza J. 2000b. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *J Histotechnol*, 23:61-69.

Zaviacic M. 1993. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *J Sex Res*, 30:148-151.

Zaviacic M. 1999. *The female prostate: from vestigial Skene’s parauretral glands and ducts to woman’s functional prostate*. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press. 171pp.

CERTIFICADO E DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

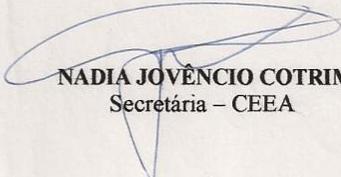
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 16/07-CEEA, sobre “*Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral*”, sob a responsabilidade de **SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da *COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)*, nesta data.

Botucatu, 30 de março de 2007.



Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **"ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL: efeitos da ovariectomia e posterior exposição prolongada ao estradiol e estradio + testosterona"**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 16107-CEEA , Instituição: Unesp - Campus de Botucatu - Instituto de Biociências

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Diego A. L. da Silva
Aluno: Diego Augusto Lopes da Silva

Sebastião Roberto Taboga
Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura