

**Filipe Zardini Shinohara**

**"ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA  
FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL:  
efeitos da ovariectomia e posterior reposição prolongada pela  
progesterona e testosterona"**

**"MORPHOFUNCTIONAL ASPECTS OF GERBIL'S  
FEMALE PROSTATE DURING THE ESTROUS CYCLE:  
effects of ovariectomy and subsequent prolonged replacement  
by progesterone and testosterone"**

**Campinas, 2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Filipe Zardini Shinohara**

**“ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA  
FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL:  
efeitos da ovariectomia e posterior reposição prolongada pela  
progesterona e testosterona”**

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga  
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara Santos

**"MORPHOFUNCTIONAL ASPECTS OF GERBIL'S  
FEMALE PROSTATE DURING THE ESTROUS CYCLE:  
effects of ovariectomy and subsequent prolonged replacement  
by progesterone and testosterone"**

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

*Master thesis presented to the Cellular and Structural Biology Postgraduation Programme of the Institute of Biology of the University of Campinas to obtain the Ms. grade in Cellular Biology.*

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno *Filipe Zardini Shinohara* e orientado pelo Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga.

  
Assinatura do Orientador

**Campinas, 2012**

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

Sh63a	<p>Shinohara, Filipe Zardini, 1987- Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral: efeitos da ovariectomia e posterior reposição prolongada pela progesterona e testosterona / Filipe Zardini Shinohara. – 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. Imunohistoquímica. 4. Progesterona. 5. Testosterona. 6. 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's female prostate during the estrous cycle: effects of ovariectomy and subsequent prolonged replacement by progesterone and testosterone

**Palavras-chave em Inglês:**

Female prostate  
Ovariectomy  
Immunohistochemistry  
Progesterone  
Testosterone  
Gerbil

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]  
Luis Antônio Justulin Junior  
Daniele Lisboa Ribeiro

**Data da defesa:** 28-09-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de Setembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Luis Antônio Justulin Jr.



Assinatura

Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro



Assinatura

Prof. Dr. Wagner José Favaro

Assinatura

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

Assinatura

**“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria justificativa racional para existir. Não perca nunca essa sacrossanta curiosidade.”**

**Albert Einstein**

## DEDICATÓRIA

A Deus que sempre iluminou os meus caminhos, a força maior do meu viver.

Aos meus amados pais Rosângela e Milton, pelo amor incondicional dedicado aos filhos, pelos sábios conselhos que aconchegam a alma, pela batalha diária para que nada nos falte, focando principalmente na educação, a base de um cidadão consciente.

Ao meu irmão Gustavo por todos os momentos agradáveis que passei ao seu lado, pelas muitas risadas, pelas conversas, pelas brigas e pelo amor de irmão.

Aos meus familiares que comprovam a frase: “família unida é família feliz”, a todos meus primos pelo nosso grande companherismo, a todos meus tios, principalmente tia Beth e tia Vera, pessoas da mais pura iluminação divina.

Ao meu avô Antônio que nos deixou uma grande saudade...

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela confiança dedicada ao longo desses anos, pelos conhecimentos repassados e por acreditar no meu trabalho.

A minha Coorientadora Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, pela disposição e prontidão em ajudar, pelos esclarecimentos e pela amizade.

Ao querido técnico de laboratório Luiz Roberto Falleiros Junior pela competência desempenhada no ambiente de trabalho, que, com humor, cativa a todos, transformando o laboratório em uma grande família feliz.

Aos professores que prontamente se dispuseram para análise prévia e banca do meu trabalho, contribuindo no seu enriquecimento com correções e sugestões: Prof. Dr. Luis Antônio Justulin Jr., Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro, Prof. Dr. Wagner José Favaro, Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

A todos os amigos do laboratório, Ana, Bibi, Cintia, Carol loira, Carolzinha, Carol Cristante, Elô, Fabi, Mãe, Marina, Mané, Mari, Ricardin, Sil, Thi, Vanessinha, sim, são muitos, agradeço cada segundo da companhia de vocês, que tornaram o nosso laboratório um ambiente descontraído e de muita alegria.

A Marianna e ao Diego, companheiros de projeto, agradeço pelo espírito de equipe, pelas ajudas, pelas dúvidas que encontramos ao longo do caminho e que, com total certeza, contribuíram para um belo encerramento de nossos trabalhos.

Aos meus verdadeiros amigos Mari, Maurício, Dino e Tiago, por todos os momentos que desfrutamos juntos sempre rodeados de muita diversão, pelo companherismo, pela cumplicidade, pelos erros, pelos acertos e vitórias, por serem a família que eu escolhi.

A secretária do PPG em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp Liliam Panagio, por desempenhar seu trabalho com muita dedicação, prontidão e paciência em ajudar os seus amigos de longa distância.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp.

A CAPES pelo auxílio financeiro.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO.....	7
Morfogênese Prostática.....	7
Próstata feminina – perspectiva histórica .....	10
Próstata feminina do Gerbilo da Mongólia.....	11
Modulação hormonal da próstata.....	13
<i>O papel dos andrógenos</i> .....	13
<i>O papel dos estrógenos</i> .....	14
<i>Progesterona: atuação glandular</i> .....	15
OBJETIVO .....	17
ARTIGO .....	18
TABELA .....	44
FIGURAS .....	47
CONCLUSÕES GERAIS .....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
ANEXOS.....	59

## RESUMO

A próstata feminina é uma glândula funcionalmente ativa encontrada em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos e roedores. O estudo da morfofisiologia prostática nas fases do ciclo estral tem mostrado que a próstata feminina é influenciada pelas oscilações sorológicas de estradiol e progesterona. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração prolongada de progesterona isoladamente ou associada à testosterona sobre a próstata feminina do gerbilo ovariectomizado. Para isso, os ovários das fêmeas adultas foram cirurgicamente removidos. Após a recuperação, receberam doses de progesterona e progesterona associada à testosterona durante 30 dias, a cada 48 horas. A ovariectomia causou atrofia e diminuição da atividade secretora glandular, estes aspectos ocorreram devido à supressão hormonal. O tratamento utilizando a progesterona isoladamente demonstrou uma parcial reorganização glandular, com alguns focos de lesões, as células apresentaram núcleos ativos demonstrando uma intensa atividade secretória. O tratamento progesterona combinado à testosterona, por outro lado, levou a lesões pronunciadas, como hiperplasia epitelial e estromal indicando inflamação, não havendo, no entanto, atividade secretória na glândula. A expressão dos AR epitelial e estromal foi semelhante em todos os grupos. ER $\alpha$  e ER $\beta$  apresentaram uma intensa expressão epitelial nos dois grupos com tratamento hormonal. O grupo tratado somente com progesterona mostrou forte imunoreatividade para PR epitelial, com expressão semelhante, tanto epitelial quanto estromal para os demais grupos. Os resultados ainda sugerem uma possível competição entre progesterona e testosterona. Desta forma, o tratamento apenas com a progesterona, apresentou melhores efeitos para manutenção da próstata feminina de gerbilos, embora a homeostase deste órgão necessite do balanço deste e de outros hormônios.

Palavra Chave: próstata feminina, ovariectomia, imunohistoquímica, progesterona e testosterona

## ABSTRACT

The female prostate is a functionally active gland found in several species of mammals, including humans and rodents. The study of prostate morphophysiology in the estrous cycle phases has shown that the female prostate is influenced by oscillations in serum levels of estradiol and progesterone. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of prolonged administration of progesterone combined or not with testosterone on the ovariectomized female gerbil prostate. For this, adult females had the ovaries surgically removed. After recovering, they received progesterone and progesterone+testosterone doses through 30 days, each 48 hours. Ovariectomy caused atrophy and decreased glandular secretory activity, these aspects occurred due to hormonal suppression. Progesterone replacement therapy caused a partial glandular reorganization, exhibiting with discrete injuries foci, but cells showed active nuclei and intense secretory activity. On the other hand, progesterone associated to testosterone treatment led to pronounced lesions, epithelial and stromal hyperplasia, inflammation, and absence of secretory activity in prostate. AR distribution in the epithelial and stromal cells was similar in all groups. ER $\alpha$  and ER $\beta$  had intense epithelial staining in both treated groups. The group treated only with progesterone showed strong immunoreactivity for epithelial PR, with similar reaction in epithelium and stroma in the others groups. The results also suggest a possible competition between progesterone and testosterone. Thus, the treatment with progesterone, showed better effects for maintenance of the female gerbil's prostate, while other hormones are required for the homeostatic balance of this gland.

**Keywords:** female prostate, ovariectomy, immunohistochemistry, progesterone and testosterone.

## INTRODUÇÃO

### *Morfogênese Prostática*

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor dos mamíferos que, no homem, é responsável por uma grande fração do fluido seminal. Ela é composta por dois compartimentos distintos, o epitelial e o estromal (Hayward et al., 1996).

A morfogênese prostática inicia-se no estágio fetal pela diferenciação do seio urogenital. O desenvolvimento gonadal em seus estágios primordiais é idêntico em embriões masculinos e femininos, esta fase é denominada estágio indiferenciado ou ambissexual da diferenciação sexual. Em camundongos, as gônadas masculina e feminina tornam-se morfologicamente distinguíveis apenas aos 13 dias de gestação (Staack et al., 2003).

A próstata desenvolve-se a partir do seio urogenital (SUG), que é um tubo endodérmico derivado do intestino primitivo e que termina na cloaca. A cloaca é dividida pelo septo uroretal em SUG ventralmente e em canais retal e anal dorsalmente. Em camundongos, os dois derivados do SUG são claramente demarcados entre o 13º e 14º dias de gestação (Staack et al., 2003). O SUG é morfologicamente indistinguível em machos e fêmeas até o 17º-18º dia de gestação em camundongos e até a 10º-12º semanas em humanos. A partir desse período, tem início a morfogênese prostática, um processo que é iniciado e dependente de andrógenos (Marker et al., 2003). O evento de indução em machos e fêmeas está ilustrado na figura 1.

O crescimento e o desenvolvimento da próstata são dependentes dos andrógenos circulantes, produzidos pelos testículos. A partir do 14º dia de gestação, nos testículos fetais ocorre a diferenciação das células de Leydig que passam a secretar testosterona (Pointis et al., 1980). A testosterona evita a morte celular programada do ducto mesonéfrico, estimulando o seu desenvolvimento para formar o epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal e ductos eferentes. Paralelamente, as células de Sertoli iniciam a produção da substância inibidora Mülleriana (MIS), que provoca a regressão do ducto paramesonéfrico.

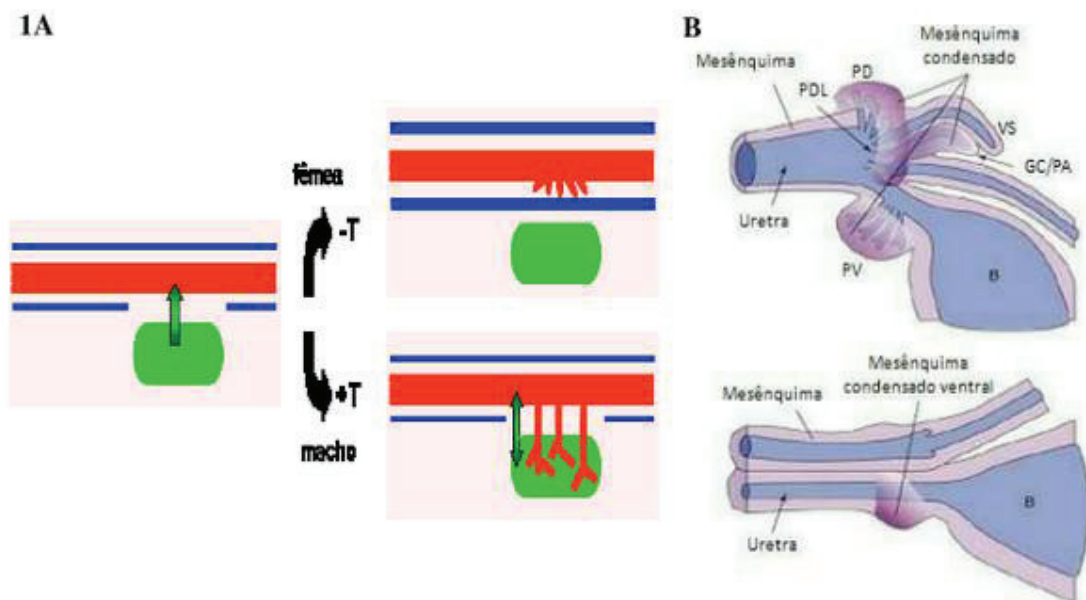
Em machos, o crescimento de brotos epiteliais sólidos do epitélio do seio urogenital (UGE) em direção ao mesênquima circundante do seio urogenital (UGM) é o evento inicial

da morfogênese prostática. Em roedores durante o período neonatal, os cordões crescem invadindo o UGM, eles começam a bifurcar-se em ramos laterais, originando três lobos prostáticos distintos: o lobo ventral, o lobo dorsolateral e a glândula coaguladora ou lobo anterior (Marker et al., 2003). Esses lobos podem ser identificados por sua anatomia, morfologia ou através dos diferentes tipos de secreções (Sugimura et al., 1985). Simultaneamente ao processo de morfogênese de ramificação ductal, ocorre a canalização ductal (formação do lúmen) e a citodiferenciação epitelial e estromal (Wang et al., 2001).

O mesênquima do seio urogenital 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 é formada em ambos os sexos, porém somente nos machos é que ocorre o desenvolvimento completo da próstata ventral, devido à ação androgênica. Se andrógenos forem administradas às fêmeas, ou se o VMP feminino for enxertado em um anfitrião do sexo masculino, o VMP feminino irá induzir o desenvolvimento de uma próstata ventral (Timms et al., 1995).

O evento chave da morfogênese que determina a diferenciação da próstata masculina e feminina é a diferenciação de parte do mesênquima do SUG em músculo liso, pois é este evento que regula a sinalização parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002). Em machos (Fig. 1A), 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. Em fêmeas (Fig. 1B), a ausência de testosterona induz o SUG a originar a porção inferior da vagina e a uretra, em embriões de ratos e humanos (Shapiro et al., 2004). Neste sentido, a ausência de andrógenos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002). Assim, o reduzido tecido prostático observado em fêmeas de várias espécies é originário do SUG que não sofreu estímulo androgênico, porém, esta apresenta um epitélio secretor diferenciado e funcionalmente ativo (Zavaičič et al., 2000a; Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004).

O surgimento de uma da próstata funcional em fêmeas é bastante comum. Na espécie humana, cerca de 90% das mulheres desenvolvem um tecido prostático maduro e ativo nos processos de secreção (Zaviačič et al., 2000). A existência de uma próstata feminina recebe um suporte adicional com relatos de casos raros de câncer de próstata em mulheres (Meis et al., 1987; Pongtippan et al., 2004; Kazakov et al., 2010). Em um destes casos, o antígeno específico da próstata (PSA) foi bastante elevado, 1,3 mU/ml (variação normal, 0,0-0,8 mU/ml) como seria esperado em um paciente com câncer de próstata masculino típico (Pongtippan et al., 2004).



**Figura 1.** 1A. Modelo descritivo da indução da próstata ventral em embriões femininos e masculinos de ratos. Do lado esquerdo pode-se observar o VMP (verde) durante os estágios iniciais de indução prostática (17-18 dias de gestação). Observe que a camada de músculo liso (azul) é descontínua e permite a sinalização entre o VMP e o epitélio uretral (vermelho). Do lado direito pode-se observar a morfogênese prostática em machos e fêmeas (a partir de 21,5 dias de gestação). Em fêmeas, a ausência de testosterona permite que o músculo liso forme uma camada espessa e contínua, impedindo a sinalização parácrina entre os brotos prostáticos em crescimento (vermelho) e o VMP. Em machos, a testosterona induz a formação de uma camada muscular delgada e descontínua que permite a interação epitélio-mesenquimal. Os brotos que emergem do epitélio uretral (vermelho) invadem o VMP. Neonatalmente, esses brotos sofrem bifurcações laterais dentro do VMP, originando a próstata ventral (modificado por Santo, et al. 2006). 1B. Anatomia dos trato urogenital de ratos machos (cima) e fêmeas (baixo) ao nascimento (dia 0). Epitélio está demonstrado em azul, mesênquima em rosa e mesênquima condensado em rosa sombreado. Em ambos tratos, a porção cranial está a direita, caudal a esquerda, dorsal acima e ventral abaixo. B: bexiga; GC/PA: glândula coaguladora/ próstata anterior; PDL: próstata dorsolateral; PD: próstata dorsal; VS: vesícula seminal; PV: próstata ventral; (Thomson, 2001).

### *Próstata feminina – perspectiva histórica*

O debate sobre a existência de uma próstata feminina vem sendo muito discutido nos meios científicos e muitos pesquisadores buscam desvendar os mistérios desta glândula, que já havia sido observada desde muito tempo antes de Cristo, quando o anatomista grego Herophilos em 300 a.C escreveu sobre a próstata feminina (De Graaf, 1972).

O termo próstata feminina foi introduzido pela primeira vez na literatura pelo fisiologista e anatomista holandês Reinier De Graaf em 1672, onde relatava um conjunto de glândulas e ductos ao redor da uretra feminina (De Graaf, 1972).

Em 1853, Virchow descreveu cálculos que havia encontrado nas glândulas da uretra feminina, fazendo alusão que essas glândulas eram homologas à próstata.

Em 1880, Alexander Skene relatou a presença de glândulas que se encontravam intimamente associadas à uretra, chamando-as glândulas de Skene, um órgão feminino parecido com a próstata feminina (Skene, 1880).

A existência da glândula parauretral semelhante à próstata de homens também foi relatada na década de 1950 (Huffman, 1948, 1951; McCrea, 1952).

A presença da glândula prostática em fêmeas adultas foi também descrita para várias espécies de roedores (Shehata, 1975, 1980; Flamini et al., 2002; Santos et al., 2003). Gross e Didio (1987), comparando a próstata de machos e fêmeas do roedor *Praomys natalenses*, observaram a homologia entre estes órgãos em ambos os sexos.

Estudos avançados utilizando ultrasonografia observaram uma glândula parauretral que é "distribuída ao longo do comprimento total da uretra feminina". Este tipo de distribuição foi encontrado em cerca de 6% do material da autópsia utilizado por Zaviacic (Zaviacic, 1998). A confirmação da próstata feminina é suportada por inúmeros estudos histológicos, bioquímicos e ultra-estruturais que encontraram reatividade positiva para o antígeno específico da próstata (PSA) e para a fosfatase ácida alcina (PSAP) na glândula (Wernet et al., 1992; Tepper et al., 1984; Zaviacič et al., 1997a,b; Sloboda et al., 1998).

Imunohistoquimicamente o PSA é o principal marcador dos tecidos da próstata masculina. Wernet e colaboradores (1992) realizaram testes imunohistoquímicos para PSA

e PSAP em tecidos parauretral glandular feminino e observaram positividade em 66,7% dos casos que analisaram.

Somente em 2001 o termo foi aceito, após reexaminar o estado atual de conhecimento e tentando esclarecer uma melhor compreensão anatômica, a Comissão Federativa de Terminologia Anatômica rebatizou oficialmente as glândulas de Skene (1880), incluindo a massa associada de tecido que envolve a uretra, de volta para o termo original "próstata feminina" que Reinier De Graaf propôs em 1672.

### *Próstata feminina do Gerbilo da Mongólia*

Como mencionado anteriormente, a próstata feminina, tanto humana quanto de roedores, já foi descrita morfológicamente por vários pesquisadores (Shehata, 1980; Gross and Didio, 1987; Zaviačič, 1999; Flamini et al., 2002; Santos et al., 2003). Embora a existência da próstata feminina em humanos já tenha sido descrita, o estudo experimental de material humano é muito limitado, pois a próstata feminina só pode ser obtida a partir de necropsias de mulheres que sofreram morte cerebral (Zaviačič, 2000a). Desta forma, torna-se necessária a adoção de modelos experimentais que apresentem uma glândula prostática semelhante à da mulher, a fim de se extrapolar os dados para a espécie humana.

O gerbilo (*Meriones unguiculatus*), também conhecido como esquilo da Mongólia é um murídeo da subfamília Gerbillinae, proveniente das regiões áridas da China e Mongólia (Schwentker, 1963). Este mamífero tem sido extensivamente adotado em experimentos biológicos e biomédicos nas áreas da fisiologia, farmacologia, parasitologia e endocrinologia (Neumann et al., 2001). Além do mais, tem apresentado ótimos resultados com estudos do sistema reprodutor, tanto masculino (Rochel et al., 2007; Pinto et al., 2010), quanto feminino (Nishino e Totsukawa, 1996; Santos et al., 2006; Fochi et al., 2008; Custódio et al., 2010; Lv e Shi, 2010).

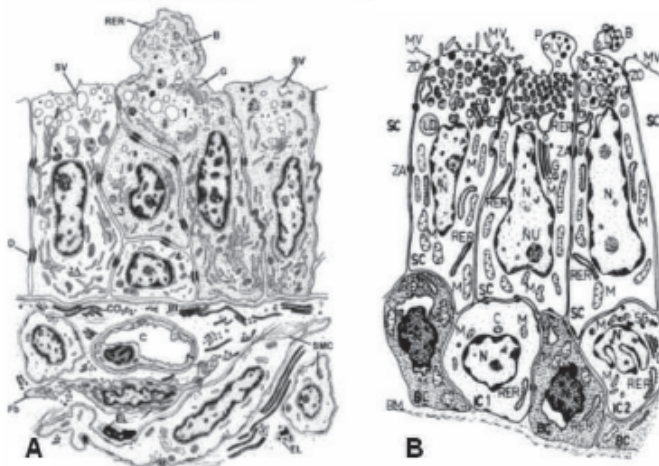
As fêmeas de *Meriones unguiculatus*, assim como de outros mamíferos (Shehata, 1980; Gross e Didio, 1987; Flamini et al., 2002), apresentam em seu sistema reprodutor uma glândula prostática funcionalmente ativa com grande homologia para a próstata feminina humana (Fig. 2B) e para a próstata ventral do gerbilo macho (Taboga et al., 2001). Segundo Santos e colaboradores (2003), 80% das fêmeas possuem glândula prostática



desenvolvida e ativa nos processos de secreção, apresentando cerca de 10% do peso prostático masculino.

Anatomicamente, a próstata feminina do gerbilo é composta por um conjunto de glândulas e ductos que se concentram em ambos os lados da uretra mediana e distal. Os ductos estão inseridos na musculatura envolvente da uretra, e se abrem em vários pontos da luz uretral (Santos et al., 2003)

A região secretora da próstata de fêmeas adultas do gerbilo é formada por um epitélio que varia de cúbico simples a colunar pseudoestratificado. A porção epitelial é formada por dois tipos de células: as basais, que formam uma camada descontínua de células-fonte para a manutenção do crescimento prostático, e as secretoras que apresentam um citoplasma rico em organelas envolvidas nos processos de síntese e secreção de glicoproteínas (Fig. 2A) (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., 2003). Análises estruturais e ultra-estruturais da próstata feminina adulta de gerbilos indicam que as células secretoras encontram-se em plena atividade e revelam semelhanças morfológicas com o lobo ventral do gerbilo macho adulto (Santos et al., 2003; Pegorin et al., 2006). Adicionalmente, a próstata feminina do gerbilo apresenta similaridade com a próstata feminina humana descrita por Zaviacic (1999), no que se refere à estrutura alveolar e tecidual (Santos e Taboga, 2006). Além disso, tem sua atividade modulada de acordo com as alterações hormonais do ciclo estral, que no gerbilo tem duração de 4 a 5 dias (Nishino e Totsukawa, 1996; Fochi et al., 2008).



**Figura 2.** Aspectos ultra-estruturais da próstata feminina do gerbilo (A – Santos et al., 2003) e humana (B - Zaviacic et al., 2000a). 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 (EI). A – 1: célula secretora apócrina; 2A: célula secretora merócrina clara; 2B célula secretora merócrina típica; 3: célula intermediária; 4: célula basal. B – SC: célula secretora; BC: célula basal; IC1 e IC2 células intermediárias. B: "blebs" apicais; BM: membrana basal; C: capilar; G: complexo de Golgi; M: mitocôndrias; RER: retículo endoplasmático rugoso; SV: vesículas de secreção.

## *Modulação hormonal da próstata*

### *O papel dos andrógenos*

Os hormônios androgênicos são fundamentais para o início do desenvolvimento prostático e são essenciais para que ocorra o crescimento embrionário e neonatal para que, posteriormente, para que se inicie a atividade secretória prostática na puberdade (Isaacs et al., 1994; Prins e Putz, 2008).

O principal andrógeno circulante na próstata é a testosterona (T), que se origina da produção testicular (95%) e da produção das glândulas supra-renais (5%) (Aumüller e Seitz, 1990). Além do mais, na próstata ocorre a conversão da T em dihidrotestosterona (DHT), pela ação enzimática da 5 $\alpha$ -redutase, sendo o composto formado um andrógeno com potencial de 2 a 10 vezes maior para indução da transcrição de genes específicos, comparado com a testosterona (Deslypere et al., 1992; Wilson, 1996; Wright et al., 1999). Esses dois andrógenos atuam de forma distinta no sistema reprodutor, sendo que a T regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, enquanto que a DHT tem papel fundamental durante a virilização embrionária puberal, além de ser responsável pela funcionalidade da próstata do indivíduo adulto (Soronen et al., 2004).

A ação da T e da DHT na próstata é mediada através do mesmo receptor de andrógeno (AR, do inglês androgen receptor). Estes ARs são membros da superfamília de receptores nucleares, podendo ser encontrados tanto em células prostáticas epiteliais como estromais, onde atuam como fatores de transcrição, sendo responsável por regular a expressão de mais de 100 genes na próstata, bem como de sequências específicas de DNA conhecidas como elementos andrógeno-responsivos (Nelson et al., 2002; Chatterjee, 2003; Black e Paschal, 2004). Na próstata adulta, os andrógenos agem diretamente nas células epiteliais via AR, estimulando a síntese e secreção dos componentes prostáticos como PSA, auxiliando a manutenção estrutural e funcional da glândula (Nelson et al., 2002; Chatterjee, 2003; Black e Paschal, 2004). Nas células estromais, os andrógenos, estimulam a produção de fatores de crescimento (andromedinas), e nas células musculares lisas, os ARs estão indiretamente relacionados à modulação do epitélio adulto quanto a proliferação e sua diferenciação (Cunha et al., 2002).

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é outro composto androgênico com ação efetiva na biologia intra-prostática (Labrie, 2010). A DHEA é um pró-hormônio de origem adrenal e atua como um reservatório para a biosíntese tanto de andrógenos como de estrógenos nos tecidos periféricos (Labrie et al., 2005). Embora a função biológica da DHEA como precursor de esteróides sexuais já tenha sido estabelecida, o mecanismo de ação celular ainda não foi totalmente elucidado (Arnold e Blackman, 2005; Labrie et al., 2005; Labrie, 2010). Acredita-se, no entanto, que muitos dos seus efeitos ocorram via receptor de andrógeno e/ou estrógeno após sua conversão enzimática nesses hormônios sexuais (Labrie et al., 2001).

### *O papel dos estrógenos*

Os estrógenos desempenham importante papel na regulação do crescimento da próstata em todos os estágios da vida, porém, no homem os níveis estrogênicos precisam ser balanceados a um nível ótimo, uma vez que a falta do estrógeno pode levar a hipertrofia e hiperplasia prostática, e o excesso deste hormônio ocasiona respostas adversas ao epitélio prostático, como proliferação, inflamação e câncer (Chen et al., 2008; Scarano et al., 2008; Ellem e Risbridger, 2009). Na próstata adulta, diversos estudos apontam que algumas modificações epiteliais como hiperplasia, metaplasia escamosa, queratinização epitelial, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) são induzidas por estrógenos (Prince, 1936; Leav et al., 1988).

Na próstata adulta, diversos estudos apontam que algumas modificações epiteliais como hiperplasia, metaplasia escamosa, queratinização epitelial, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) são induzidas por estrógenos (Prince, 1936; Leav et al., 1988).

Diversos estudos apontam o papel importante dos estrógenos, especialmente o estradiol (E), no desenvolvimento e na homeostase da próstata (Chen et al., 2008; Scarano et al., 2008; Ellem e Risbridger, 2009). Adicionalmente, os estrógenos podem ser produzidos localmente, dentro da próstata, via conversão da testosterona em  $17\beta$ -estradiol pela enzima aromatase, expressa no estroma prostático (Matzkin e Soloway, 1992; Risbridger et al., 2003), desta forma, a ação de estrógenos na próstata pode ocorrer independente dos níveis séricos deste esteróide.

A ação do E na próstata é mediada através de dois tipos de receptores de estrógeno alfa e beta (ER $\alpha$  e ER $\beta$ , do inglês estrogen receptor) membros de uma super-família de fatores de transcrição nuclear. ER $\alpha$  está localizado principalmente nas células estromais da próstata adulta de homens, macacos, cachorros e roedores (Schulze e Claus, 1990; Tsurusaki et al., 2003). Estudos imunohistoquímicos revelaram que apenas uma parcela das células estromais apresenta positividade para ER $\alpha$ , sendo estas responsáveis pela estruturação da glândula prostática antes da puberdade (Omoto et al., 2005). A presença aumentada dos ER $\alpha$  em lesões pré-malignas e metastáticas sugere que o estrógeno pode afetar a carcinogênese prostática e a progressão tumoral (Bonkhoff et al., 1999). Por outro lado, o ER $\beta$  está principalmente localizado em células epiteliais dos lumens diferenciados e parece apresentar uma maior importância durante períodos mais tardios do desenvolvimento prostático, agindo juntamente com o AR na regulação da diferenciação e atividade funcional do tecido adulto (McPherson et al., 2008; Prins e Putz, 2008). A expressão de ER $\beta$  é baixa ao nascimento, aumenta à medida que as células epiteliais sofrem uma citodiferenciação e atinge uma expressão máxima com o início da capacidade de secreção durante a puberdade, o que sugere para o ER $\beta$  um papel diferenciado na próstata de roedores (Prins et al., 1998). Em oposição ao ER $\alpha$ , o ER $\beta$  diminui nas lesões malignas da próstata, mostrando o seu possível papel protetor no epitélio prostático (Horvath et al., 2001).

#### *Progesterona: atuação glandular*

A progesterona é um hormônio esteróide ovariano imprescindível para manutenção e desenvolvimento das funções reprodutivas das fêmeas dos mamíferos. Encontra-se em altas concentrações durante a fase luteal do ciclo menstrual, com importante papel na diferenciação glandular do endométrio, na proliferação epitelial da glândula mamária e manutenção da gravidez (Anderson e Clarke, 2004). Sua atividade biológica é mediada através de receptores nucleares de progesterona (PR), expresso em duas isoformas PR-A e PR-B, os quais induzem uma cascata de eventos transcripcionais após a sua ligação com o hormônio (Evans, 1988; DeMarzo, 1991).

transcrição e morfogênese em uma variedade de diferentes vias de sinalização (Wang e Dey, 2006). PR é de importância fundamental para o a implantação do embrião fertilizado e decidualização subsequente do estroma uterino durante o pós-implante (Mulac-Jericevic et al., 2000; Wang e Dey, 2006).

Poucos estudos têm relacionado o papel da progesterona na próstata humana. Dados de investigações anteriores sobre a expressão de PR, especialmente aqueles que utilizaram técnicas imunohistoquímicas são bastante conflitantes (Brolin et al., 1992; Wernert et al., 1988). Muitos trabalhos têm demonstrado que os PR estão localizados exclusivamente no compartimento estromal de pacientes com hiperplasia prostática benigna e não em pacientes com carcinoma prostático (Wernert et al., 1998). Mobbs e Liu (1990), por outro lado, informaram que os PR apresentaram localização exclusiva no estroma prostático de pacientes que apresentavam tanto hiperplasia prostática benigna quanto carcinoma prostático. Hiramatsu e colaboradores (1996) demonstraram em seu estudo uma ampla distribuição dos PR em células epiteliais hiperplásicas de pacientes com hiperplasia prostática benigna e nas células cancerígenas de pacientes com carcinoma prostático.

Em fêmeas de gerbilo, durante o ciclo estral, uma constante oscilação hormonal é responsável pelas modificações estruturais e funcionais na próstata destes indivíduos. A glândula apresenta as maiores modificações hormonais durante a fase de estro e diestro II, com picos de estradiol e progesterona respectivamente (Santos et al., 2011). Os níveis hormonais de testosterona mantem-se constante durante todos os estágios do ciclo. Desta forma, a abordagem da próstata frente à ação hormonal da progesterona é de fundamental importância para o esclarecimento da morfofisiologia deste órgão, visto que o organismo feminino está submetido a picos regulares de progesterona a cada novo ciclo reprodutivo.

## **OBJETIVO**

Esta investigação teve como objetivos avaliar, por métodos estruturais, qualitativos e quantitativos, histoquímicos e imunocitoquímicos, o efeito isolado da longa exposição de progesterona sobre a próstata feminina de gerbilos ovariectomizados, bem como avaliar o efeito combinado da progesterona com testosterona sobre a manutenção da morfofisiologia prostática.

**ARTIGO**

**PROGESTERONE RESTORES THE FEMALE PROSTATE SECRETORY  
ACTIVITY IN OVARECTOMIZED GERBIL AND MAY ACT AS POTENTIAL  
COMPETITOR OF TESTOSTERONE IN INTRAPROSTATIC ENVIRONMENT.**

**Progesterone restores the female prostate secretory activity in ovariectomized Gerbil and may act as potential competitor of testosterone in intraprostatic environment.**

Filipe Z. Shinohara<sup>1</sup>, Diego A. L. Silva<sup>1</sup>, Marianna Zanatelli<sup>1</sup>, Rejane M. Góes<sup>1,2</sup>, Patricia S. L. Vilamaior<sup>2</sup>, Fernanda C. A. Santos<sup>1,3</sup>, Sebastião R. Taboga<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Univ. Estadual Paulista, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, Brasil

\*Corresponding Author

Sebastião Roberto Taboga

Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP

Rua Cristovão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth

15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Telephone: +55 17 32212386. FAX: +55 17 32212390

E-mail: [taboga@ibilce.unesp.br](mailto:taboga@ibilce.unesp.br)



## **Abstract**

**Aims:** Little is known about the effect of progesterone on gerbil female prostate. It is known that normal oscillation in the progesterone and estradiol levels during the estrous cycle phases influences the morphophysiology of this gland. The aim of the present study was to evaluate the isolated effect of prolonged administration of progesterone combined or not with testosterone on the prostate of ovariectomized female gerbil .

**Main methods:** To observe the morphological changes caused by castration in the prostate of different groups it was used stereologic analyses of all prostate compartments, analysis of nuclear area and perimeter, and morphometric measurements of epithelial and smooth muscle cells layers. In addition, immunocytochemistry was performed to investigate the distribution of the androgen, estrogen alfa, estrogen beta and progesterone receptors in the different prostatic compartments.

**Key findings:** this study demonstrated that both treatments partially recovered the structure of the gland. In the group treated with progesterone plus testosterone occurred a higher incidence of epithelial and stromal disorders, besides the absence of secretory activity. Thus, treatment with progesterone alone showed better results in the restoration of glandular homeostasis mainly seen by the regulation of the secretory activity.

**Significance:** Collectively, the findings of this study indicate that progesterone may have a significant role on the maintenance of prostate morphophysiology, and showed an interesting evidence of hormonal competition between progesterone and testosterone

## **Introduction**

The female prostate is a gland found functionally active in mammals, with important biological function during reproduction. In the female gerbil, prostate is formed by a set of ducts and acini embedded in a fibromuscular stroma, with intimate contact with the wall of media and distal urethra. The morphological description of the female prostate, both human and rodent has already been achieved by several researchers (Shehata 1980; Gross and Didio 1987; Zaviačić 1999; Flamini et al. 2002, Santos et al., 2003).

The study of prostate morphophysiology during the phases of the estrous cycle has shown that the female prostate is influenced by fluctuations in serum levels of estradiol and progesterone, and the largest development and glandular activity coincide with the peak of estradiol levels during the estrous phase. Conversely, lower development and secretory activity of the female prostate occur in diestrus II phase marked by a peak in serum progesterone (Santos et al. 2011). These oscillations change the morphological structure of the prostate gland during the estrous cycle of the female gerbil, and testosterone hormone levels are constant during all stages.

The ovarian hormones are extremely important in the regulation of reproductive functions of females and their balance is responsible for the homeostasis of the entire reproductive tract. The hormones estrogen and testosterone are essential in the development and maintenance of the adult gland, guided respectively by the ER and AR receptor (Santos et al. 2006; Weihua et al. 2001), besides, these hormones are directly related to prostate carcinogenesis (Ricke et al. 2007). On the other hand, the action of progesterone and

estrogen linked to pregnancy are related to some kind of prevention of breast cancer (Guzman et al. 1999, Medina 2004; Sivaraman and Medina 2002). Little is known about real role that progesterone exerts on prostatic morphophysiology, moreover, many studies (REF) use the progesterone receptor (PR) only as markers of estrogenic action, there is shortage of knowledge about the role of progesterone acting on its own receptors and its relation with the development of prostatic lesions. Thus, the objective of this study was to evaluate the isolated effect of prolonged exposure of progesterone and progesterone associated with testosterone on the prostate gland of ovariectomized female gerbil, using histochemical and immunocytochemical methods.

## **Material and Methods**

### *Experimental Design*

For this study, 40 adult female virgins (90 days) gerbil (*Meriones unguiculatus*, Gerbillinae: Muridae) were used. All females were kept in the Animal Institute of Biological Sciences, Letters and Science of UNESP, São José do Rio Preto (SP) under light conditions, proper temperature, food and water *ad libitum*, in accordance with the standards internal Ethics and Animal Welfare Unesp and COBEA (Protocol 16/07-CEEA).

All females, except the control group went through bilateral ovariectomy after anesthetized by ketamine (100mg) / xylazine (30µL) (1ml/kg). After ten days of recovery from the surgery, four groups were formed with eight animals each that received hormonal

treatment from 10<sup>th</sup> to 40<sup>th</sup> day after castration. Castrated + oil (Ca + O), received 0.1 mL subcutaneous doses of mineral oil (Nujol / Mantecorp); castrated + progesterone (Ca + P), received progesterone (Sigma) 0.1 mg / kg, diluted in 0.1 ml of mineral oil (Nujol); castrated + testosterone + progesterone (P + Ca + T), received progesterone (Sigma) 0.1 mg / kg + testosterone cypionate (Deposteron-Novartis/Sigma) 0.1 mg / kg, diluted in 0.1 ml of mineral oil (Nujol). Two controls were used in this investigation: Co – intact females and Ca – ovariectomized female without hormonal treatment

The subcutaneous application of the hormone / vehicle always occurred between 8:00 and 10:00 am. The animals in each group were killed 24 hours after the last application of the hormone / vehicle (41th days). They subjected to inhalation of CO<sub>2</sub>, and after weighing, they were decapitated for blood collection. The prostates (associated to the urethra) were weighed and prepared for different analysis.

#### *Morphological analysis*

The prostate complex (urethra + prostatic tissue associated) from five animals in each experimental groups was fixed by immersion in Karnovsky solution (5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2), the remaining prostates from the other three animals were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 24 hours. After fixation, tissues were washed in water, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, embedded in resin glycol methacrylate (Historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany) or Paraplast (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany), and sectioned at 3µm in automatic rotary microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany).

Histological sections of the female prostate were stained with Hematoxylin-Eosin, Gomori's reticulin and the periodic acid and Schiff staining (Bancroft and Gamble 2002). The tissues were examined and photographed under Olympus BX60 light photomicroscope (Olympus, Hamburg, Germany).

### *Immunocytochemistry*

The histological sections of female prostate fixed in paraformaldehyde 4% underwent immunocytochemistry for detection of androgen receptors (AR), estrogen alpha ( $ER\alpha$ ) and beta receptors ( $ER\beta$ ) and progesterone receptors (PR), according adaptation of protocols previously described (Vilamaior et al. 2005; Santos et al. 2006). Primary antibodies for AR (polyclonal rabbit anti-human, SC-816, Santa Cruz Biotechnology),  $ER\alpha$  (Clone 1D5 Code M7047 Monoclonal mouse anti-human, Dako)  $ER\beta$  (polyclonal rabbit anti-human, SC-8974, Santa Cruz Biotechnology) and PR (polyclonal rabbit anti-human, SC-538) were applied to various dilutions (1:50 to 1:200 according to the specifications of each antibody). The sections were incubated with secondary biotinilated antibodies followed by Avidin – Biotin - Peroxidase complex (Rabbit ABC Staining System SC-2018 - Santa Cruz Biotechnology, for AR,  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , and PR) and revealed with diaminobenzidine (DAB). The sections were counterstained with Harris hematoxylin. Tissues photographs of immunoreaction were analysed by the software Image-Pro Plus, Version 4.5 for Windows. The intensities of epithelial (nuclear and cytoplasmic) and stromal reactions for these four receptors were graded on a scale of 0-3 +, including 1 + to fewer than 10% epithelial and stromal positive labeling, 2 + from 10% to 50% epithelial and stromal positive labeling and 3 + to more than 50% of epithelial and stromal positive labeling (modified Bass et al. 2009). The count was employed using 1000 cells per animal

in each experimental group, in images with a 40x objective lens. From numerical values the percentages was calculated.

#### *Morphometric, stereologic and karyometric analysis*

The morphometric and stereological analyzes were performed from slides stained with Hematoxylin and Eosin, and the microscopic fields were digitalized using the Image-Pro Plus, version 4.5 for Windows. The relative volume of the tissue compartments of the female prostate was determined according to the multipoint M130 system proposed by Weibel (1978) and applied to the prostate by Huttunen et al. (1981). For this, 30 random fields were collected from each experimental group (six fields per animal). The bulk density was then calculated by counting the number of points that coincide with each gland tissue compartments (epithelium, lumen, muscular stroma and non-muscular stromal). The absolute volumes could not be determined because it was not possible to separate the female prostate from urethra to determine its exact weight. For morphometric analysis, 180 measurements of the height ( $\mu\text{m}$ ) of epithelial secretory cells and the thickness ( $\mu\text{m}$ ) of the muscle cell were performed. For karyometric analysis, nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ ) and perimeter ( $\mu\text{m}$ ), were measured in 200 epithelial cells from each experimental group.

#### *Statistical analysis*

Exploratory analysis and statistical processing of stereological and morphometric data were performed in spreadsheets and charts using Statistic 6.0 software (Copyright StatSoft, Inc., Tulsa, OK). Hypothesis tests used to demonstrate the significance of the

results were analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for multiple comparisons with a significance level of 5% ( $p \leq 0.05$ ).

## **Results**

### *Biometric analysis*

Statistical analysis of the body weight of the female gerbil (Table I) indicates no significant differences between the different groups. However, the absolute weight and relative weight of the prostatic complex were significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) in Ca, Ca + O and C + P + T groups.

### *Morphological analysis*

In Co group, the prostatic acini were lined with a simple epithelium ranging from simple cubic to prismatic, large lumens store the glycoprotein product secretion (Fig. 1 c). The prostatic stroma provides support to the acini and ducts via a network rich in fibers, smooth muscle cells and skeletal striated, and blood vessels (Fig. 1 c). Reticular fibers are in the basal epithelium and in contact with muscle cells (Fig. 2, b).

Ca and Ca + O groups, both ovariectomized, presented large structural similarities of their prostates. The hormonal deprivation caused significant glandular regression (Fig. 1d, g). The epithelium became cubic low with scarce cytoplasm and small strongly basophilic nuclei (Fig. 1e, h). The lumens became smaller and very tortuous, with little or complete absence of secretion (Fig. 1f, j). Several ciliated cells were observed (Fig. 1i), as

well as unusual cell type exhibiting extensive chromophobe cytoplasm and nucleus poorly stained, similar to that found in group Ca + P + T (Fig. 1r). Following acini reduction, the stromal compartment became denser, with sinuous reticular fibers on the basis of the epithelium and between the layers of smooth muscle cells that circumscribe the acini, besides thicker layers of collagen fibers in the inter-acinar stroma (Fig. 2 c-f)

In Ca + P group most acini were lined by a high columnar secretor epithelium, demonstrating the recovery of synthetic activity (Fig. 1n; p). However, a few acini became tortuous and lined by a cubic epithelium, indicating a partial recovery with progesterone treatment (Fig. 1n; p). In some epithelial regions, can be observed clear hypertrophic cell proliferation (Figure 1k). Some lumens had abundant secretion and basophilic corpuscles, called amylaceous bodies (Fig. 1o). Detachment of epithelial portions, "debris" were found in some lumens (Fig. 1l). A few foci of atypical epithelial growth were observed, especially toward the lumen (Fig. 1m). There was an increase in the amount of reticular fibers, as well as its thickness, making them more dense and interspersed along the smooth muscle cells, and in the epithelial base (Fig. 2g, h). It was observed in the epithelium adjacent regions a normal disposition of the fibers, on the other hand, in portions not adjacent reticular fibers formed complex networks within the stroma, discrete portions containing the interalveolar collagen (Fig. 2h). The smooth muscle that surrounds the acini was recovered from castration, presenting a thicker profile (Fig. 1n).

Group Ca + P + T presented a significant recovery of the prostatic epithelium (Fig. 1t, v). Secretory epithelial cells became high cubical or cylindrical (Fig. 1t). The normal characteristic of the epithelium was altered by the emergence of disorders derived by cell proliferation. Some disorders such as prostate intraepithelial neoplasia (PIN) (Fig. 1q) and



dysplasias were observed in most of the prostate glands. Cell in division process and ciliated cells were localized in the upper portion of the epithelium (Fig. 1u). Also in the epithelium atypical cells were observed, showing a large chromophobic cytoplasm with small vesicles, presenting a core little basophils, giving no impression of the core (Fig. 1r). Portions of cell debris became constant in lumen (Fig. 1s). The stromal compartment was hyperplastic, with particular leukocytes and fibroblasts (Fig. 1s). Delicate reticular fibers were observed in the basis of the epithelium (Fig. 2, ij). The collagen fibers formed thick and compact bundles around the acini and in deep regions of interacinar stroma (Fig. 2i, j). Large amount of smooth muscle cells were observed around the alveoli and in association with collagen fibers in the interacinar stroma (Fig. 2j).

#### *Stereological Analysis*

The relative frequencies of the prostatic compartments in different groups of females (Table II) showed significant variations ( $p \leq 0.05$ ). The epithelial compartment remained constant in both groups, Ca, Ca + O and Ca + P + T, but showed a small decrease in group Ca + P.

The luminal compartment of the groups Ca + P and Ca + T + P presented a regression of the relative volumes if compared to the Co, Ca and Ca + O groups that showed similar frequencies.

The volume of non-muscular stroma showed variations between groups, Ca + O and Ca + P + T showed a decrease when compared to other ones.

The relative frequency of the smooth muscle layer surrounding the prostatic acini in the stroma showed an increase in the Ca + O, Ca + P and Ca + P + T groups in regard to Co and Ca.

### *Morphometric Analysis*

The morphometry of epithelial and muscle compartments varied in the different groups (Table II). Regarding Co group, whose epithelium had a thickness of  $19.2 \pm 5.5 \mu\text{m}$ , all other groups showed a significant reduction in epithelial cells. Thickness analysis of the smooth muscle cells that circumscribe the prostatic acini showed that there was a significant reduction in this layer in the Ca + O group, whereas the group treated with progesterone showed a recovery of this thickness. Data related to the karyometric analysis indicated a decrease in nuclear size and circumference in all experimental groups, and significant recovery being close to normal of the cells in Ca + P group.

### *Immunohistochemistry*

#### *Androgen receptor*

There was a similar pattern of nuclear reaction in the secretory cells of the epithelium (2+) and stroma (1-2+) of all groups (Table III). All groups showed a weak labeling for fibroblasts and smooth muscle cells. Secretory epithelial cells of the Co group presented nuclear staining to AR, whereas Ca, Ca + O, Ca + P and Ca + P + T groups exhibited nuclear and cytoplasmic staining (Fig. 3).

#### *Estrogen receptor $\alpha$*

Castration did not affect the nuclear positivity of the epithelial cells (2+) and, all groups showed a similar pattern to the prostatic stroma cells (2+). The treatment resulted in strong nuclear (3+) and cytoplasmic epithelial labeling of both groups Ca + P and Ca + P + T (Table III) (Fig. 3).

#### *Estrogen receptor $\beta$*

The staining pattern in the epithelial and stromal cells (2+) was very similar in all groups (Table III). In the treated groups, the epithelial reaction was more intense (3+), with strong cytoplasmic staining in Ca + P + T group (Fig. 3).

#### *Progesterone receptor*

The Ca + P group showed a strong epithelial labeling (3+), the other ones showed a similar pattern (2+) for the epithelial and stromal cells. All groups showed cytoplasmic staining at different intensities, which was more pronounced in the Ca + P + T group (Fig. 3).

## **Discussion**

This study demonstrated that the treatment with of progesterone alone or associated with testosterone to ovariectomized females caused major histophysiological changes in the prostate gland. In addition, hormone deprivation resulted in a profound glandular involution, decreases in luminal volume, in the thickness of epithelial layer and in the nuclear area and perimeter showing the characteristic of cystic atrophy of secretory gland. The relative frequency of the smooth muscle layer increased, there was a reorganization of this portion in order to follow cellular involution, thereby increasing its area in the groups that underwent castration. In normal female gerbil during the estrous cycle occur hormonal fluctuations that determine important morphophysiological changes in the prostate (Fochi et al. 2008).

The long-term progesterone treatment can reverse, but not entirely, the characteristics induced by castration. The prostate restored, in part, the epithelial functionality, evidenced by various apocrine secretory vesicles ("blebs"). The castration associated to progesterone, modified the stromal structure, with an increase of reticular fibers and its thickness in the adjacent portions of the epithelial layer, and favorably influenced the synthesis of smooth muscle cells. The restoration of the thickness of smooth muscle layer together with the fibroblasts is directly related to the process of expelling the acinar secretions during ejaculation, as well as synthesis of structural and regulatory components present in the extracellular matrix (Horsfall et al. 1994; Tuxhorn et al. 2001). In other hand, the progesterone treatment caused slight, foci of intraepithelial neoplasia and hypertrophy of epithelial cells. Such proliferating regions are marked by disruption of the normal architecture of epithelial portions, targeted to the lumen or to the prostatic stroma.

The presence of cellular "debris" was directly associated with the acinis that presented cell proliferation, since the epithelium cannot accommodate all the cells, part of it is discarded into the lumen.

The treatment of castrated females with P+T showed numerous foci of inflammation and cell proliferation. The epithelium exhibited many hypertrophic cells, some with expanded cytoplasm and nuclei, with no secretory activity. The treatment did not restore the thickness of smooth muscle. Androgen therapy in the prostate of normal female rat caused regression of the thickness of smooth muscle cells (Biancardi et al. 2010), thus testosterone may be acting inhibiting the action of progesterone, since it contributed to the restructuring of the smooth muscle layer in the group Ca+P. There was stromal hyperplasia in some glands in the Ca+P+T group, which in fact resulted in scarcity of reticular fibers and an increase in collagen, indicating a possible focus of prostatic inflammation, which contributed to compression of the urethra causing mechanical obstruction to the flow of urine, thus leading to stagnation of urine in the bladder, favoring the appearance of urinary tract infection, which may have spread to the prostate (Srougi et al. 2008).

Some studies in the female prostate using only testosterone showed similar characteristics to treatment P+T, as the increase in epithelial areas (Biancardi et al. 2010) and decrease in lumen volume (Santos et al. 2006), however, in both studies there was strong labeling pattern for prostatic secretions, which was not found in this investigation. The effects of short-term treatment caused either by testosterone (Santos et al. 2006) or by progesterone (unpublished data), in the gerbil female prostate, are very aggressive but with an intense secretory activity. In the treated group P+T lesions such as neoplasia, hyperplasia and inflammation were amplified, however, the physiological characteristic of

the gland, particularly demonstrated in the secretory activity has not been reestablished. In fact, the effect of castration made it impossible that all hormone routes were restored and only P+T, were unable to recover the entire structure of the gland. Despite the partial recovery of most of the alveoli in both treatment groups, the gland does not seem to reestablish to the optimal histoarchitecture of adult prostate, where the lumen contributes greatly to increase the prostate volume. The Ca+P group resembles the early phase of secretory activity observed in rats (Vilamaior et al. 2006) and the Ca+P+T group did not even presented secretory activity.

The AR that are mainly nuclear located presented strong cytoplasm labeling in the Ca+O and Ca+P groups, due to the absence of androgen, receptors have not been linked to the hormone staying dispersed in the cell cytoplasm (Black and Paschal 2004). The same occurred in the group Ca+P+T, the prostate may be increasing the expression of AR to maintain its functions after castration, due to absence of main female hormones.

The reason of the epithelial / stromal location for ER $\alpha$  was practically the same in all groups. Studies have shown ER $\alpha$  labeling is almost exclusively in the stromal components, but others, exhibit secretory epithelial cells location (Lau et al. 1998; Prins and Birch 1997). The strong epithelium labeling in groups treated with hormones, was predominantly nuclear and cytoplasmic, hypothesizing eth evidence of cell lesions. According to Prins and colleagues (2001), the ER $\alpha$  is the dominant ER subtype in stromal cell prostate of mice and is responsible for mediating inflammation, aberrant proliferation and eventually cancer. It is known that responses to estrogen in the prostate requires both paracrine mechanism played by stromal ER $\alpha$ , as well as by the direct action of estrogen on epithelial ER $\alpha$  (Risbridger et al. 2001), this compartment showed strong expression in the

treated groups and possibly progesterone should be influencing this result in the absence of estradiol.

ER $\beta$  was positive for the stromal cells, however, positive labeling was significantly epithelial. The groups Ca+P and Ca+P+T showed 3+ epithelial staining intensity, implying thereby that estrogen exhibited direct effects on prostatic epithelial layer. Studies with prostate cancer indicate that ER $\beta$  acts in opposite ways to the growth of abnormal cells, because when in the absence or in low expression, directly influences the growth of cancer cells both epithelial and stromal (Bardin et al. 2004; Fixemer et al. 2003; Latil et al. 2001). The intense staining for this receptor raises the possibility that is occurring estrogen production by other sources, since the females were castrated. The adrenal glands or even the aromatization of testosterone may be contributing to the production of this steroid, resulting in this strong reaction for ER $\beta$ . Progesterone probably increased the expression of ER $\beta$ , which contributed in a significant prevention of malignancies in this organ, evidenced by low foci of lesions in Ca+P group, not being the same for the Ca+P+T group.

The PR was distributed uniformly in the ratio of epithelial / stromal. The strong epithelial marking (3 +) in Ca+P group was expected since doses of exogenous progesterone stimulated increase in the expression of this receptor. The increased expression of PR is used as a marker of estrogenic response in different female reproductive tissue, as observed after estrogen treatment in the prostate of rodents and humans (Kesteren et al. 1996; West et al. 1988). Thus, the strong labeling in dysplastic portions of Ca+P+T group, in fact, can be explained by aromatization of testosterone into estrogen. The presence of aromatization within the prostate is highly controversial. Some studies have demonstrated the successful expression of aromatase by RT-PCR as well as by

histochemical studies (Stone et al. 1987; Negri-Cesi et al. 1999), however other studies have failed to demonstrate the presence or activity of the aromatase in prostate (Smith et al. 1982; Harada et al. 1993). Moreover, Lau (1998) by performing assembly treatment with estrogen and testosterone demonstrated in several mouse prostate lobes, that the PR expression was found in dysplastic epithelium more than double that found in normal epithelium. The role of progesterone receptors in the prostate is unknown, although this is consistently found in normal cells and cancerous prostate cells, and thus, these receptors should play a relevant role in these cells (Tilley et al. 1980; Srinivasan et al. 1995)

The progesterone can be acting antagonistically to the androgenic effects in two ways, by reducing the formation of dihydrotestosterone (DHT) (Frederiksen and Wilson 1971), inhibiting the enzyme 5 $\alpha$ -reductase or competing for the binding sites of DHT (Fang and Liao 1971) by its substrate, dihydroprogesterone (DHP), since both hormones have a high structural homology. Thus, the development of lesions and particularly the absence of secretion in Ca+P+T group may be the result of the apparent hormone competition between progesterone and testosterone. Several studies use only the progesterone receptor as a marker of estrogen action in various organs. The real role of progesterone acting on its own receptors lacks studies and demonstrates a need, since the data showed strong evidence that progesterone and its receptors act directly on prostatic morphophysiology either in the development of lesions or assisting in the restructuring of the prostate next to the normal organ.

The data presented in this work reveal that the normal morphophysiology of the female prostate is maintained by a balance between ovarian hormones, since castration caused regression and decreased glandular secretory activity. Both treatments, progesterone



and progesterone + testosterone partially recovered the structure of the gland, and there was an impairment of secretory activity and higher lesion incidence in the Ca+P+T group. Thus, treatment with only progesterone showed better results in the restoration of the glandular homeostasis mainly by regulating the secretory activity. Further studies of the combined action of these hormones will clarify the possible effects of competition supposed here and will bring future elucidations to a better understanding of the events that regulate the normal functioning of the female organ.

### **Acknowledgments**

The author is grateful to Mr. Luiz Roberto Falleiros Junior for technical assistance, as well as all researchers' friends at the Laboratory of Microscopy and Microanalysis. This paper is part of the Thesis presented by FZS to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for Master in Science degree. This work was supported by National Council of Scientific and Technological Development (CNPq): Research Fellowship to SRT (Procs. Nr. 301111/05-7 and Nr. 301596/2011-5), São Paulo Science Foundation (FAPESP Proc. Nr. 2006/06876-1).

## References

- Bancroft JD and Gamble M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. 5th ed. London, Churchill Livingstone.
- Bass R, Perry B, Langenstroer P, Thrasher JB, Dennis KL, Tawfik O. e Holzbeierlein J. 2009. Effects of short-term finasteride on apoptotic factors and androgen receptors in prostate cancer cells. *Journal of Urology* 181, 615–619.
- Bardin A, N Boulle, G Lazennec, F Vignon and P Pujol. 2004. Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer* 11 537–551.
- Biancardi MF, Santos FC, Madi-Ravazzi L, Góes RM, Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR. 2010. Testosterone Promotes an Anabolic Increase in the Rat Female Prostate (Skene's Paraurethral Gland) Which Acquires a Male Ventral Prostate Phenotype. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 Dec; 293(12):2163-75.
- Black E, Paschal M. 2004. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 15, Issue 9, 411-417.*
- Fang, S. & Liao, S. 1971. Androgen receptors. Steroid and tissue-specific retention of 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate. *J Biol Chem* 246: 16–24.
- Fixemer T., Remberger K., e Bonkhoff H. 2003. Differential Expression of the Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ) in Human Prostate Tissue, Premalignant Changes, and in Primary, Metastatic, and Recurrent Prostatic Adenocarcinoma. *The Prostate* 54:79-87.
- Flamini, M.A., Barbeito, C.G., Gimeno, E.J., Portiansky, E.L., 2002. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann. Anat.* 184, 341–345.
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Go'es RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod* 79:1084–1091.
- Frederiksen, D.W. & Wilson, J.D. 1971. Partial Characterization of the Nuclear Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate:  $\Delta^4$ -3-Ketosteroid 5 $\alpha$ -Oxidoreductase of Rat Prostate. *J. Biol. Chem.* 246, 2584.
- Gross, S.A., Didio, L.J.A., 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol.* 19 (1), 77–84.

- Guzman RC, Yang J, Rajkumar L, Thordarson G, Chen X, Nandi S. 1999. Hormonal prevention of breast cancer: mimicking the protective effect of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2520–2525.
- Harada N, Utsumi T, Takagi Y. 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1;90.
- Horsfall D.J., Mayne K., Ricciardelli C. et al. (1994) Age-related in guinea pig prostate stroma. *Lab. Invest.* 70, 753–763.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anatomy*, 3:357-370.
- Kesteren P, Meinhardt W, Valk P, Geldof A, Megens J, Gooren L. 1996. Effects of Estrogens Only on the Prostates of Aging Men. *The Journal of Urology*, Volume 156, Issue 4, 1349–1353.
- Latil A, Bièche I, Vidaud D, et al. 2001. Evaluation of Androgen, Estrogen (ERa and ERb), and Progesterone Receptor Expression in Human Prostate Cancer Chain Reaction Assays by Real-Time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Progesterone Receptor Expression in Human Prostate Cancer. *Cancer Res*;61:1919-1926.
- Lau, WAK & Pennefather, JN 1998. Muscarinic receptors subtypes in the rat prostate gland. *Eur. J. Pharmacol.*, 343 , 151-156.
- Lau KM, Leav I e Ho SM. 1998. Rat Estrogen Receptor- $\alpha$  and - $\beta$ , and Progesterone Receptor mRNA Expression in Various Prostatic Lobes and Microdissected Normal and Dysplastic Epithelial Tissues of the Noble Rats. *Endocrinology*, vol. 139 no. 1 424-427
- Medina D., 2004. Brest cancer: the protective effect of pregnancy. *Clin. Cancer Res.* 10, 380S-384S.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Poletti A e Motta M .1999. 5-Alpha-reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* 41 224–232.
- Prins, GS, and Birch L, (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 138, 1801–1809.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS. 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alpha ERKO and beta ERKO mice. *Cancer Res* 61: 6089–6097.

- Ricke WA, Wang Y, Cunha GR. 2007. Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. *Differentiation*. 75:871–88.
- Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G. 2001. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology* 142: 2443–2450.
- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Goés RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 75:370–379.
- Santos FC, Rochel-Maia SS, Fochi RA, Justulin LA Jr, Santos SA, Vilamaior PS, Felisbino SL, Góes RM, Taboga SR. (2011). MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol*. Sep 15;173(3):419-27.
- Shehata, R., 1980. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat*. 107, 286–288.
- Sivaraman L, Medina D. 2002. Hormone-induction protection against breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 7, 77-92.
- Smith IE, Harris AL, Morgan M, Gazet JC e McKenna JA. 1982. Tamoxifen versus aminoglutethimide versus combined tamoxifen and aminoglutethimide in the treatment of advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* , 42(suppl.), 3430 - 3433.
- Srinivasan G, Campbell E, Bashirelahi N. Androgen, estrogen, and progesterone receptors in normal and aging prostates. *Microsc Res Tech* 1995; 30:293–304.
- Srougi M, Ribeiro LA, Piovesan AC, Colombo JR, A Nesrallah. 2008. Prostate diseases. *Rev Med (São Paulo)*. 2008 jul.-set.;87(3):166-77.
- Stone NN, Laudone VP, Fair WR & Fishman J. 1987. Aromatization of androstenedione to oestrogen by benign prostatic hyperplasia, prostate cancer and expressed prostatic secretions. *Urology Research* 15 165–167.
- Tilley WD, Keightley DD, Marshall VR. Oestrogen and progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia in humans. *J Steroid Biochem* 1980; 13:395–9.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley D.R. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.*, 166, pp. 2472–2483.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec* 288A:885–892.

- Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, 12:131-155.
- Weihua Z, S Makela, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M e Gustafsson J. 2001. A role for estrogen receptor b in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 6330-6335.
- West NB, Roselli CE, Resko JA, Greene GL, Brenner RM, 1988. Estrogen and progesterin receptors and aromatase activity in rhesus monkey prostate. *Endocrinology* 123:2312-22.
- Zaviačič, M., 1999. *The Female Prostate: From Vestigial Skene's Paraurethral Glands and Ducts to Woman's Functional Prostate*. Slovak Academic Press, Bratislava, Slovakia.

**Table captions:**

**Table I.** Body and prostatic complex weight of all experimental groups.

The values represent the mean and standard deviation, respectively. \*Statistically significant differences  $p \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey). a,b,c superscripts indicate distinct differences between experimental groups. Co = control; Ca = castrated; Ca+O = castrated + oil; Ca+P = castrated + progesterone; Ca+P +T = castrated + progesterone + testosterone.

**Table II.** Variations in stereological, morphometrical, and kariometric parameters of female prostate of all experimental groups.

The values given are expressions for the mean  $\pm$  standard deviation. \*Statistically significant differences  $p \leq 0.05$  (ANOVA, Tukey). a,b,c,d indicate distinct differences between experimental groups. Co = control; Ca = castrated; Ca+O = castrated + oil; Ca+P = castrated + progesterone; Ca+P+T = castrated + progesterone + testosterone.

**Table III.** Nuclear intensity, of the epithelial and stromal cells, for the androgen receptor (AR), estrogen alpha (ER $\alpha$ ), estrogen beta (ER $\beta$ ) and progesterone (PR) in the gerbil female prostate of control and experimental groups.

Nuclear intensities were graded on a score of 0 to 3+ modified from Bass et al. (2009), where (1+) to fewer than 10% of epithelial (nuclear and cytoplasmic) and stromal marking,

(2+) from 10% to 50% of epithelial and stromal positive marking and (3+) to more than 50% epithelial and stromal positive nuclei. Co = control; Ca = castrated; Ca+O = castrated + oil; Ca+P = castrated + progesterone; Ca+P+T = castrated + progesterone + testosterone.

**Figure captions:**

**Figure 1.** Histology and histochemistry of the adult gerbil female prostate staining by hematoxylin and eosin (H&E) and reaction with periodic acid-Schiff (PAS). 1 a-c, prostate of the control group (Co); 1 d-f, prostate of the castrated group (Ca); 1 g-j, prostate of the castrated plus oil group (Ca+O); 1 k-p, prostate of the castrated group plus progesterone (Ca+P); 1 q-v, prostate of the castrated plus progesterone plus testosterone group (Ca+P+T). Epithelium (Ep), stroma (st), lumen (\*), smooth muscle cell (sml), blood vessel (v), prostatic secretion (S), clear cell (cc), debris cell (dc), inflammation (inf), prostatic intraepithelial neoplasia (Pin), basal cell (empty arrow), apocrine secretion (filled arrow) and cell with extensive chromophobic cytoplasm (white arrows). 1, i. Detail of the epithelium highlighting ciliated cells. 1, o. Detail of the amylaceous body. 1, u. Detail of the epithelium showing a dividing cell, a ciliated cell and an amylaceous body.

**Figure 2.** Gomori reticulin to demonstrate reticular fibers and collagen in the prostate of adult female gerbil. 2 a-b, prostate of the control group (Co); 2 c-d, prostate of the castrated group (Ca); 2 e-f, prostate of the castrated plus oil group (Ca+O); 2 g-h, prostate of the

castrated plus progesterone group (Ca+P ); 2 i-j, prostate of the castrated plus progesterone plus testosterone group (P+T+Ca). Epithelium (Ep), stroma (st), lumen (\*), collagen fibers (co) reticular fibers (arrows). 2, h. Detail of the network of reticular fibers just below the epithelium. 2, j. Detail of a thick collagen layer underlying the epithelium.

**Figure 3.** Immunohistochemical reaction of sections of the gerbil female prostate counterstained with Harris hematoxylin for androgen receptor (AR), estrogen alfa receptor (ER $\alpha$ ), estrogen beta receptor (ER $\beta$ ) and progesterone receptor (PR). Control group (Co), castrated group (Ca), castrated plus oil (Ca+O), castrated plus progesterone group (Ca+P) and castrated plus progesterone plus testosterone group (Ca+P+T).



Table 1

Biometry (g)	Experimental groups				
	Co	Ca	Ca+O	Ca+P	Ca+P+T
Body weight	59.4 ± 4.3	63.4 ± 3.6	57.8 ± 5.5	58.9 ± 7.1	59.6 ± 5.3
Prostatic complex weight	0.054 <sup>a</sup> ± 0.018	0.038 <sup>a,b,c</sup> ± 0.011	0.033 <sup>b,c</sup> ± 0.006	0.051 <sup>a,b</sup> ± 0.022	0.027 <sup>c</sup> ± 0.010
Relative wieght* (10 <sup>-3</sup> )	0.9 <sup>a</sup> ± 0.3	0.6 <sup>a,b</sup> ± 0.2	0.6 <sup>a,b</sup> ± 0.1	0.9 <sup>a</sup> ± 0.4	0.4 <sup>b</sup> ± 0.2

Table 2

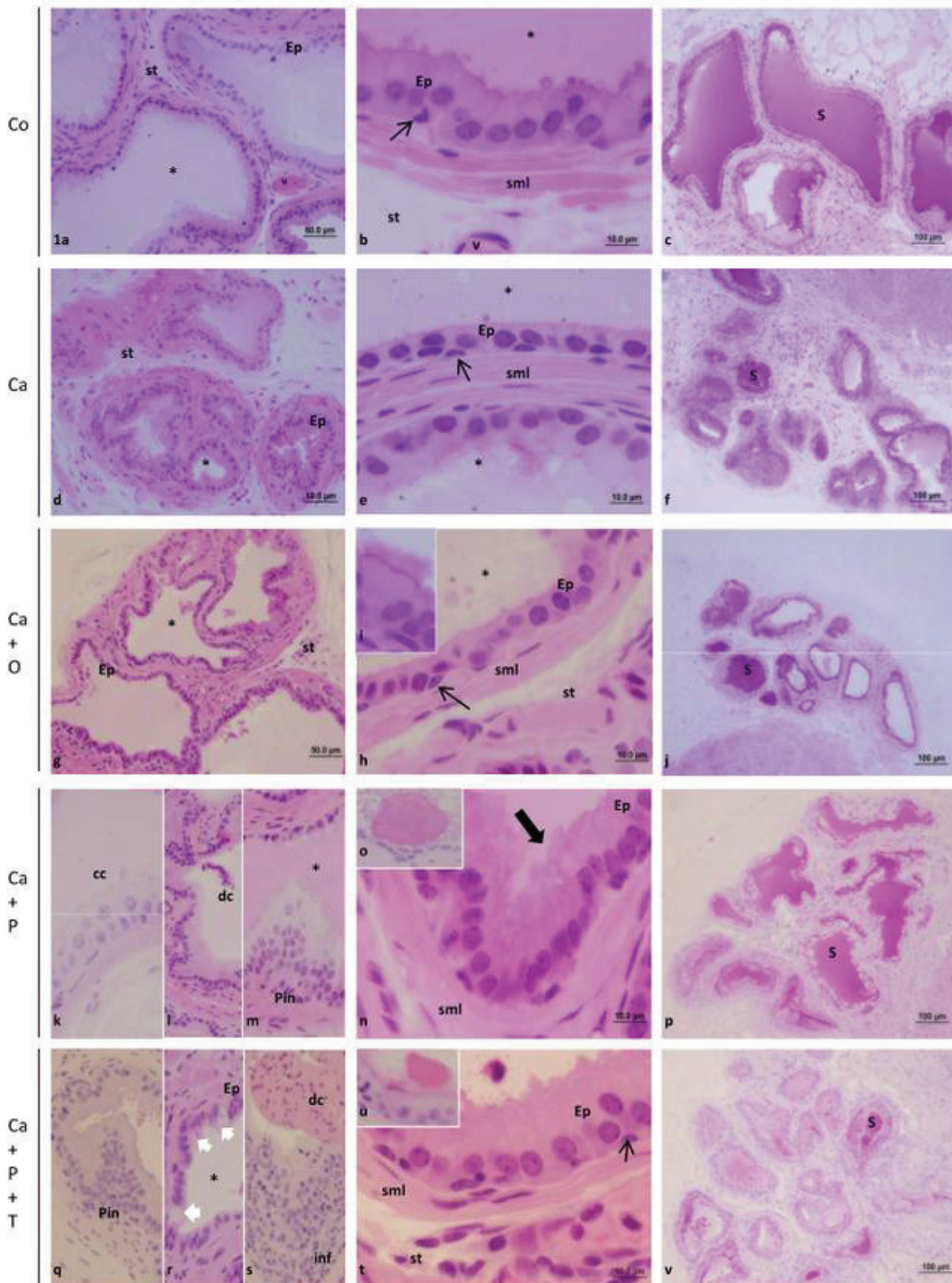
Estereology data	Experimental groups				
	Co	Ca	Ca+O	Ca+P	Ca+P+T
Epithelium* (%)	30.2 <sup>a</sup> ± 5.9	27.8 <sup>a,b</sup> ± 10.1	27.3 <sup>a,b</sup> ± 8.9	24.3 <sup>b</sup> ± 5.2	30.9 <sup>a</sup> ± 8.1
Estroma* (%)	34.0 <sup>a</sup> ± 8.6	33.0 <sup>a</sup> ± 11.2	24.5 <sup>b</sup> ± 7.9	31.9 <sup>a</sup> ± 8.5	27.1 <sup>b</sup> ± 9.3
SMC* (%)	16.2 <sup>a</sup> ± 7.0	19.3 <sup>a</sup> ± 7.2	25.1 <sup>b</sup> ± 4.7	26.8 <sup>b</sup> ± 7.2	27.1 <sup>b</sup> ± 7.7
Lumen* (%)	19.6 <sup>a</sup> ± 8.5	19.9 <sup>a</sup> ± 8.3	23.1 <sup>a</sup> ± 11.5	17.0 <sup>b</sup> ± 11.1	14.9 <sup>b</sup> ± 9.7
<b>Morphometry data</b>					
Secretory cell height*(µm)	19.2 <sup>a</sup> ± 5.5	16.0 <sup>b</sup> ± 7.5	11.5 <sup>c</sup> ± 5.5	14.4 <sup>d,b</sup> ± 6.3	16.0 <sup>b</sup> ± 4.8
Smooth muscle*(µm)	14.8 <sup>a</sup> ± 5.6	13.3 <sup>a</sup> ± 7.5	10.8 <sup>b</sup> ± 4.3	14.1 <sup>a</sup> ± 5.7	11.9 <sup>b</sup> ± 6.0
<b>Kariometric data</b>					
Nuclear perimeter* (µm)	20.3 <sup>a</sup> ± 2.3	15.6 <sup>b</sup> ± 4.2	12.9 <sup>c</sup> ± 2.7	17.6 <sup>d</sup> ± 3.4	15.8 <sup>b</sup> ± 3.7
Nuclear área* (µm <sup>2</sup> )	29.5 <sup>a</sup> ± 6.5	18.0 <sup>b</sup> ± 9.3	12.0 <sup>c</sup> ± 5.6	21.5 <sup>d</sup> ± 8.3	18.5 <sup>b</sup> ± 10.0

Table 3

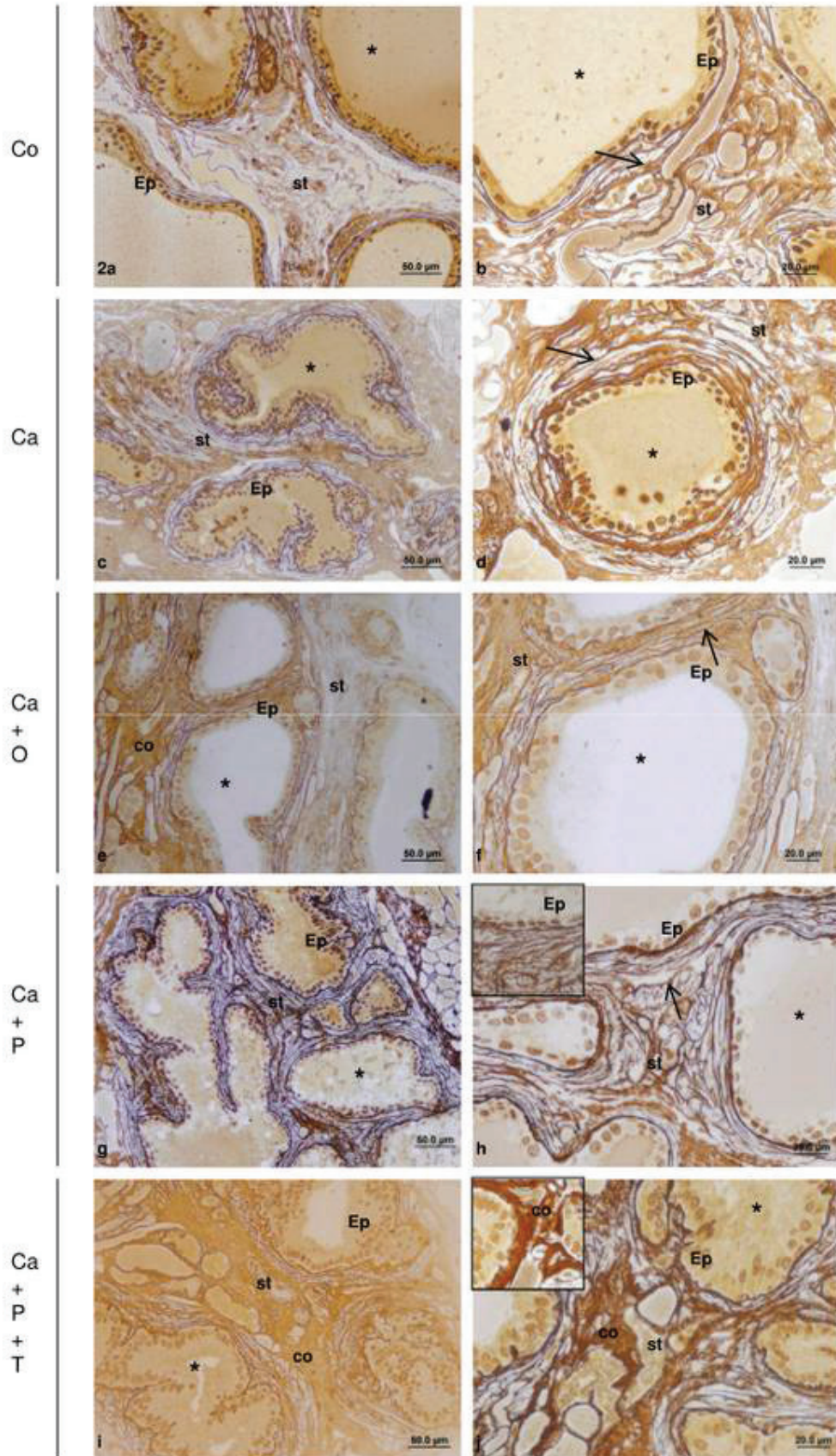
	Epithelium/Stroma							
	AR		ER $\alpha$		ER $\beta$		PR	
Co	25.7 (2+)	6.5 (1+)	23.5 (2+)	32.2 (2+)	47.7 (2+)	14.7 (2+)	38.1 (2+)	30.9 (2+)
Ca	37 (2+)	19 (2+)	14.2 (2+)	18.4 (2+)	45.4 (2+)	12 (2+)	49.3 (2+)	23.4 (2+)
Ca+O	38.1 (2+)	26.3 (2+)	27.1 (2+)	20.7 (2+)	43 (2+)	15.3 (2+)	40.9 (2+)	33.9 (2+)
Ca+P	34.05 (2+)	6.6 (1+)	56.3 (3+)	20.7 (2+)	62 (3+)	13.2 (2+)	50.8 (3+)	21 (2+)
Ca+P+T	37.9 (2+)	5.9 (1+)	50.8 (3+)	19 (2+)	56.4 (3+)	11.2 (2+)	47.6 (2+)	19.3 (2+)

Hematoxylin-eosin

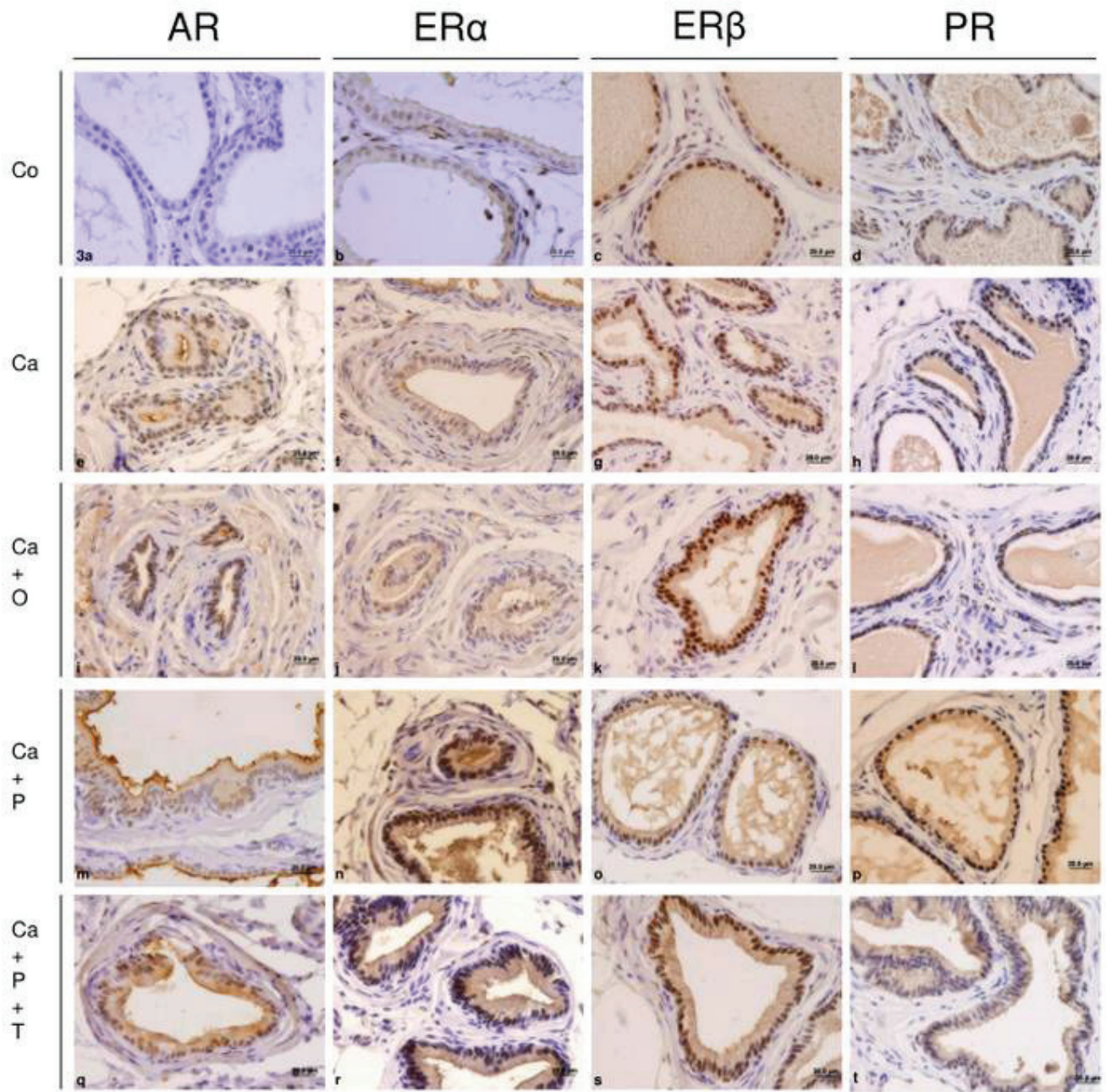
P.A.S



# Gömöri's Reticulin



# Immunohistochemistry



## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A morfofisiologia normal prostática é mantida pelo balanço entre os hormônios ovarianos, já que a castração causou regressão glandular e diminuição da atividade secretora.
- ✓ O tratamento associado da progesterona e da testosterona comprometeu a atividade secretora da glândula, houve um maior desenvolvimento de lesões neste tratamento.
- ✓ A progesterona isoladamente apresentou melhores resultados no restabelecimento da homeostase glandular demonstrado principalmente através da regulação da atividade secretora.
- ✓ A redução da atividade secretora no tratamento associado testosterona e progesterona sugere que possa ter ocorrido uma interação competitiva entre esses hormônios, fato que pode ter tornado a próstata feminina do gerbilo mais suscetível ao desenvolvimento de lesões.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. 1998. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*;11:155±168.
- Arnold J e Blackman MR. 2005. Does DHEA Exert Direct Effects on Androgen and Estrogen Receptors, and Does It Promote or Prevent Prostate Cancer? *Endocrinology* 146(11): 4565-67
- Aumüller G, Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121:127-231.
- Elizabeth A. and Clarke R. B. 2004. Steroid Receptors and Cell Cycle in Normal Mammary Epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 9, No. 1.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. May 13;240(4854):889–895.
- Black BE e Paschal BM, 2004. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. Nov;15(9):411-7.
- Bonkhoff H, Fixemer T, I. H, Remberger K. Estrogen receptor in prostate cancer and premalignant lesions. *Am J Pathol* 1999;155(2):641–647.
- Brolin, J., Skoog, L., and Ekman, P. 1992. Immunohistochemistry and biochemistry in detection of androgen, progesterone, and estrogen receptors in benign and malignant human prostatic tissue. *Prostate*, 20: 281–295.
- Chatterjee B. 2003. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem*. 253(1-2):89-101.
- Chen GG, Zeng W, Tse GMK. 2008. Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal Research Reviews*, 28(6): 954-974.
- Cunha GR, Hayward SW e Wang YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70:473–485.
- Custodio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Oliveira SM, Góes RM, Taboga SR. 2010. Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands). *Int J Exp Pathol*. 91(2): 132-43.
- De Graaf R. New treatise concerning the generative organs of women. First published 1672, reprint in *J Reprod Fertil* 1972;17(suppl):103–7.



- DeMarzo AM, CA Beck, SA Onate, DP Edwards. 1991. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein Proc Natl Acad Sci USA, 88, pp. 72–76.
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. Mol Cell Endocrinol 1992;88:15–22.
- 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.
- Fajer AB, Holzbauer M, Newport HM. 1971. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. J Physiol. Apr;214(1):115–126.
- Flamini, M.A., Barbeito, C.G., Gimeno, E.J., Portiansky, E.L., 2002. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. Ann. Anat. 184, 341–345.
- 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.
- Gross, S.A., Didio, L.J.A., 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. J. Submicrosc. Cytol. 19 (1), 77–84.
- Gwazdauskas F.C., Thatcher W.W., Wilcox C.J. 1972. Adrenocorticotropin Alteration of Bovine Peripheral Plasma Concentrations of Cortisol, Corticosterone, and Progesterone. J. of Dairy Science V. 55, Issue 8, August, p. 1165–1169.
- 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.
- Hayward, S.W., Haughney, P.C., Rosen, M.A., Greulich, K.M., Weier, H.U., Dahiya, R. and Cunha, G.R. (1998) Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. Differentiation 63:131–140.
- Hayward, S.W. and Cunha, G.R. (2000) The prostate: development and physiology. Radiol Clin North Am 38:1–14.
- Hiramatsu M, I. Maehara, S. Orikasa, H. Sasano. 1996. Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in prostatic hyperplasia and carcinoma Histopathology, 28, pp. 163–168

- Horvath, L. G., Henshall, S. M., Lee, C. S., Head, D. R., Quinn, D. I., Makela, S., Delprado, W., Golovsky, D., Brenner, P. C., O'Neill, G., et al. (2001). Frequent Loss of Estrogen Receptor- $\beta$  Expression in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 61, 5331–5335.
- Huffman, J.W., 1948. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 55, 86–101.
- Huffman, J.W., 1951. Clinical significance of the paraurethral ducts and glands. *Arch. Surg.* 62, 615–626.
- Ismail PM, Li J, DeMayo FJ, O'Malley BW & Lydon JP 2002. A novel LacZ reporter mouse reveals complex regulation of the progesterone receptor promoter during mammary gland development. *Molecular Endocrinology* 16 2475–2489.
- Isaacs JT. 1994. Etiology of benign prostatic hyperplasia. *Eur. Urol.* v.25 (1), p. 6-9.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. 2001. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol.* 22(3): 185-212.
- Labrie F. 2010. Hormonal therapy of prostate cancer. *Prog Brain Res.* 182: 321-41.
- Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol.* 187(2): 169-96.
- Leav I, Ho S, Ofner P, Merk F, Kwan P, Damassa D. 1988. Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Nat'l Canc Inst;*80(13): 1045–1053.
- Lv XH, Shi DZ. 2010. Variations of serum estradiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim.* 59(2): 231-7
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology,* 253:165-174.
- Martin L, Das RM, Finn CA. 1973. The Inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. *J Endocrinol,* 57: 549-554.
- Matzkin H, Soloway MS. Immunohistochemical evidence of the existence and localization of aromatase in human prostatic tissues. *Prostate* 1992;21:309–314.
- Meis JM, Ayala AG, Johnson DE. 1987. *Adenocarcinoma of the Urethra in Women,* *Cancer* 60:1038-1052.
- Miller BG, Moore NW, Leigh Murphy and Stone G. M. 1977. Early Pregnancy in the Ewe: Effects of Oestradiol and Progesterone on Uterine Metabolism and on Embryo Survival *Aust. J. Biol. Sci.,* 30, 279-88.

- Mobbs BG and Liu Y, 1990. Immunohistochemical localization of progesterone receptor in benign and malignant human prostate. *Prostate*, 16 (1990), pp. 245–251.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*. 289:1751-1754.
- Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. 2002. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11890–11895.
- Neumann, K., Maak, S., Stuermer, I.W., von Lengerken, G., Gattermann, R., 2001. Low microsatellite variation in laboratory gerbils. *J. Hered.* 92, 71–74.
- Nishino N, Totsukawa K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim.* 45(3): 283-8.
- Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Goes RM, Taboga SR. 2006. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec. A Discov Mol Cell Evol Biol* 288(7):723-33
- Pinto ME, Egydio Fde M, Taboga SR, Mendis-Handagama SM, Góes RM. 2010. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. *Microsc Res Tech.* 73(2): 119-27.
- Pointis G, Latreille MT, Cedard L. 1980. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. *J Endocrinol*, 86:483-488.
- Pongtippan A, Malpica A, Levenback C, Deavers MT, Silva EG. 2004. Skene's Gland Adenocarcinoma Resembling Prostatic Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathology*, 23:71-74.
- Price D. 1936. Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. *Am J Anat*; 60:79–127.
- Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang WY, Kuiper G, Gustafsson JA, Birch L. Estrogen receptor-  $\beta$  messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology* 1998;139(3):874–883. [PubMed: 9492016.
- Prins, G.S., Putz, O., 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 6, 641–659.
- Resko, J. A. 1969. Endocrine control of adrenal progesterone secretion in the ovariectomized rat. *Science* 164, 70-71.

- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, McPherson SJ. Estrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003;10:187–191.
- Rochel S.S., Bruni-Cardoso A., Taboga S.R., Vilamaior P.S. and Góes R.M. (2007). Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat. Rec. (Hoboken)* 290, 1233-47.
- Santos, F. C. A. et al. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35 447-457.
- Santos FCA e Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biologic repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim. Reprod.*, 3(1): 3-18 Schwentker, V. (1963) The gerbil. A new laboratory animal. *Illinois Vet.* 6, 5.
- Santos FC, Rochel-Maia SS, Fochi RA, Justulin LA Jr, Santos SA, Vilamaior PS, Felisbino SL, Góes RM, Taboga SR. 2011. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol.* Sep 15;173(3):419-27.
- Scarano WR, de Sousa DE, Campos SG, Corradi LS, Vilamaior PS, Taboga SR. 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodeling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J Exp Pathol.* 89(1):25-37.
- Schulze H, Claus S. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. *Prostate* 1990;16:331–343. [PubMed: 1695369.
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE. 2007. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev*;28:387–439.
- 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.
- Shehata, R., 1975. Female prostate in *Arvicantihis niloticus* and *Meriones lybicus*. *Acta Anat.* 92, 513–523.
- Shehata, R., 1980. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat.* 107, 286–288.
- Shyamala G, Schneider W & Schott D 1990 Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 126 2882–2889.

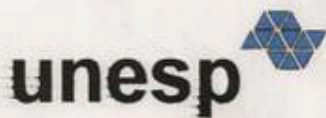
- Silberstein, G., H.K. Van, G. Shyamala, and C. Daniel. 1996. Progesterone receptors in the mouse mammary duct: Distribution and developmental regulation. *Cell Growth Differ.* 7: 945–952.
- Simanainen U, Allan CM, Lim P, McPherson S, Jimenez M, Zajac JD, Davey RA, Handelsman DJ. 2007. Disruption of prostate epithelial androgen receptor impedes prostate lobe-specific growth and function. *Endocrinology* 148: 2264–2272.
- Skene, A.J.C. Skene.1880. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am. J. Obstet. Dis. Women Child*, 13 (1880), pp. 265–270.
- Sloboda, J., Zaviačič, 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.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, KaijamH, Isomaa V, Vihko P. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92(4): 281-6.
- Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carrol P. 2003. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*, 71:402-413.
- Stanbrough M, Leav I, Kwan PW, Bubley GJ, Balk SP. 2001. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10823–10828.
- Sugimura Y, Norman JT, Cunha GR, Shannon JM, 1985. Regional differences in the inductive activity of the mesenchyme of the embryonic mouse urogenital sinus. *Prostate* 7:25 3-60.
- Tepper, S.L., Jagirdar, J., Heath, D., Stephen, A., Geller, S.A., 1984. Homology between the female paraurethral (Skene's) glands and the prostate. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108 (5), 423–425.
- Thomson, A.A. 2001 Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction* 121: 187–195.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC 2002 The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 129:1905–1912.
- Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T. Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endo Metab* 2003;88(1333–1340)
- Virchow R. 1853. Kleinere mittheilungen. *Arch Pathol Anat Physiol*; 5:403– 6.

- Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68:270-279.
- Wang, H., Dey, S.K. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 7:185-199.
- Wernert, N., Gerdes, J., Loy, V., Seitz, G., Scherr, O., and Dhom, G. 1988. Investigations of the estrogen (ER-ICA test) and the progesterone receptor in the prostate and prostatic carcinoma on immunohistochemical basis. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 412: 387–391.
- 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.
- Wernet N, Kern L, Heitz PH, Bonkhoff H, Goebbels IR, Seitz G, Inniger R, Remberger K, Dhom G. 1990. Morphological and immunohistochemical investigations of the utriculus prostaticus from the fetal period up to adulthood. *Prostate*;17:19–30.
- Wernert N, Gerdes J, Loy V, Seitz G, Scherr O, Dhom G. 1998. Investigations of the estrogen (ER-ICA-test) and the progesterone receptor in the prostate and prostatic carcinoma on immunohistochemical basis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*;412:387±391.
- Wiebe J.P., D. Muzia, J. Hu, D. Szwajcer, S.A. Hill, J.L. Seachrist, 2000. The 4-pregnene and 5 $\alpha$  pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion, *Cancer Res.* 60 (4) (2000) 936–943.
- Wiebe JP, Beausoleil M, Zhang G, Cialacu V., 2010. Opposing actions of the progesterone metabolites, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ P) and 3 $\alpha$ -dihydroprogesterone (3 $\alpha$ HP) on mitosis, apoptosis, and expression of Bcl-2, Bax and p21 in human breast cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 118 125–132.
- Wilson JD. 1996. Role of dihydrotestosterone in androgen action. *Prostate Suppl.* 6:88-92.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5 $\alpha$ -reductase. *Endocrinology* 1999;140:4509–15.
- Wu CT, Altuwaijri S, Ricke WA, Huang SP, Yeh S, Zhang C, Niu Y, Tsai MY, Chang C. 2007. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12679–12684.

- Zaviačič, M., Danihel, L., Ružičková, J., Blažeková, J., Itoh, Y., Okutani, R., Kawai, T., 1997a. Immunohistochemical localization of human protein 1 in the female prostate (Skene's gland) and the male prostate. *Histochem. J.* 29 (3), 219–227.
- Zaviačič, M., Ružičková, M., Blažeková, J., Zaviačič, T., Itoh, Y., Okutani, R., Kawai, T., 1997b. Immunohistochemical distribution of rabbit polyclonal antiurinary protein 1 antibody in the female (Skene's) and male prostate: new marker for neuroendocrine cells? *Acta Histochem.* 99 (3), 267–275.
- Zaviačič, M. The female prostate (correspondence). *J Natl Cancer Inst* 1998;90:713–4.
- Zaviačič, M., 1999. *The Female Prostate: From Vestigial Skene's Paraurethral Glands and Ducts to Woman's Functional Prostate.* Slovak Academic Press, Bratislava, Slovakia.
- Zaviačič M, Jakubovská V, Belošovič J, Breza J. 2000a. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embriol (Berl)*, 201(1):51-61.
- Zaviačič, M., Jakubovská, V., Belošovič, M., Breza, J., 2000b. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat. Embryol.* 201 (1), 51–61.
- Zondek T, Mansfield MD, Attree SL, Zondek LH. 1986. Hormone levels in the fetal and neonatal prostate. *Acta Endocr*;112:447–456.

# ANEXOS





**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 reposição prolongada pela progesterona e testosterona"**:

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

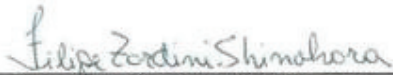
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

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

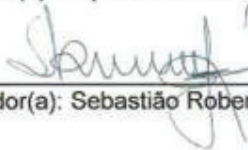
( X ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 16/07 CEEA , Instituição: UNESP- Campus de Botucatu – Instituto de Biociências

( ) 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.*



Aluno(a): Filipe Zardini Shinohara



Orientador(a): Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GURRALDO  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura