

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Lara Silvia Corradi



200333892

Efeito inibidor da finasterida sobre a enzima 5-alfa-redutase na próstata de gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Lara Silvia Corradi</i> <i>[Signature]</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
a obtenção do Título de Mestre em Biologia
Celular e Estrutural na área de Biologia celular

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP C817e
V	EX
TOMBO BCI	56390
PROC.	16-12-4/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00162009-8

Bib id 305155

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C817e

Corradi, Lara Silvia

Efeito inibidor da finasterida sobre a enzima 5-alfa-redutase na próstata de gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*) / Lara Sílvia Corradi. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Prostata. 2. Matriz extracelular. 3. Citoquímica. I. Taboga, Sebastião Roberto.

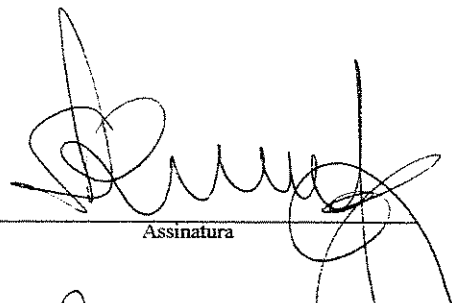
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

III. Título.

Campinas, 20 de agosto de 2003

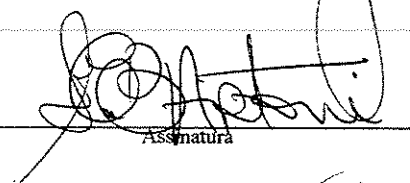
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (orientador)



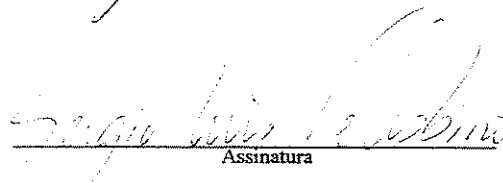
Assinatura

Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi-Artoni



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino



Assinatura

Dr. Luis Antônio Violin Dias Pereira

Assinatura

DEDICATÓRIA

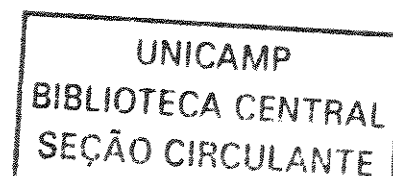
Aos meus pais Hélio e Astride

Ao meu irmão Hélio André

À minha irmã Mariana

Ao Leonardo meu amor

Se todos fossem iguais a vocês ...



*Primeiro faça o necessário; depois faça o possível;
e, de repente, você vai perceber que pode fazer o impossível.*

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela orientação durante este trabalho e por todas as oportunidades que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, e especialmente, por sempre incentivar-me a ir além...

Aos Professores Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, Dr. Sérgio Luís Felisbino e Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira, pelas valiosas e importantes sugestões na análise prévia da tese.

À Profa. Dra. Rejane Maira Góes, por toda sua atenção e dedicação para que este estudo pudesse ser concluído.

À Profa. Dra. Maria Astride Saad Corradi, muito mais que bióloga e professora brilhante, uma mãe exemplar e amiga de todas as horas, principal responsável pelo meu amor pela ciência. Obrigada por todas as sugestões para este trabalho.

À Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel, pelo empenho e dedicação como Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia.

Aos Docentes do Departamento de Biologia Celular, que muito me ensinaram sobre a ciência e sobre a vida pela ciência.

À secretária do Departamento de Biologia Celular, Líliam Panagio, por sua presteza, disponibilidade e atenciosa colaboração, recebendo-nos sempre com um amável sorriso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo imprescindível suporte financeiro.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE – UNESP, em particular ao Departamento de Biologia, pela disponibilização de todas as suas dependências.

Ao Técnico de Apoio Acadêmico do Laboratório de Microscopia e Microanálise da UNESP de São José do Rio Preto, Luiz Roberto Falleiros Junior, pelo indispensável auxílio na execução dos experimentos, por estar sempre pronto a ajudar e

por sua amizade. À Técnica Rosana Silistino de Souza, pela confecção dos cortes ultra-finos.

À Dra. Creusa Manzalli de Toledo, pela aquisição da droga utilizada, sem a qual a realização deste trabalho teria sido impossível.

À Silvana, Cristiani, Fernanda e Ana Maria, amigas importantes para meu dia a dia. Juntas aprendemos muito, erramos e crescemos aproveitando as vitórias e as derrotas. Sozinhas, nada teríamos conseguido. Obrigada pelos conselhos e por estarem sempre ao meu lado. Uma amizade verdadeira vai muito mais além do que conseguimos entender...

Ao Renato e ao Wellerson, amigos e pesquisadores que muito admiro e que têm as palavras certas para as horas certas.

Aos amigos Sérgio, Tati, Dani, Flávia, Alexandre, Mirian, Rodrigo, Daniel, Lucilene, Glaura, Fernanda Egídio e Maê, por encherem de vida o laboratório, tornando especial cada dia do nosso convívio.

À Maristela e ao Manuel, pois mesmo distantes, não deixamos de ser amigos.

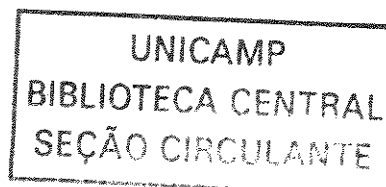
À Isabele e ao Diego, amigos e irmãos, por vibrarem a cada conquista minha.

Ao Revmo. Pe. Francisco Janssen, MSC, da paróquia de São José em Campinas que, pelo seu exemplo de vida, é para mim um grande incentivador.

À família Taboga, pelos momentos de alegria e felicidade. Obrigada Sebaka, por antes de tudo, sermos amigos. Obrigada Pat, por tornar real o significado da palavra amizade para mim. Obrigada Ana Laura, por encher a minha vida de encanto, paz e luz.

À família Blanck, que pelo Léo, tornou-se minha também. Ao S. Ademar e D. Lúcia por todo apoio e carinho, à Vanessa, pela presença amiga.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente acompanharam-me durante todo este trabalho.



Agradeço especialmente:

Ao meus pais, Hélio e Astride, e aos meus irmãos, Dé e Má, por serem para mim a forma concreta do amor. Obrigada por me ensinarem tudo o que sei, por me indicarem sempre o melhor caminho, por mostrarem a força de uma família unida e, principalmente, por sermos amigos. Juntos os obstáculos parecem menores, os medos são vencidos e as vitórias, além de inesquecíveis, têm significados muito maiores. Amo vocês.

À minha querida avó Odette, por sua alegria radiante, suas orações e todos os seus conselhos. Ao meu avô materno Alfredo e aos meus avós paternos, Alcides e Albertina, hoje estrelas no céu e sempre estrelas no meu coração.

Ao Leonardo, meu Léo, meu grande amor. Obrigada por me completar, por me encorajar a ser forte e a lutar pelos meus e pelos nossos sonhos. “Seus olhos meu clarão, me guiam dentro da escuridão. Seus pés me abrem o caminho, eu sigo e nunca me sinto só...”

À Santa Rita de Cássia pela proteção.

A Deus por tudo e para tudo...

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
1. Estrutura da próstata	14
1.1. A próstata do gerbilo	17
2. Controle hormonal na próstata	18
2.1. A 5 α -redutase e a finasterida	23
OBJETIVO	31
ARTIGO	32
Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle cells dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate	33
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

O desenvolvimento e diferenciação da próstata são induzidos por andrógenos, via interações epitélio-mesenquimais, e na vida adulta, a glândula é mantida funcionalmente ativa por interações semelhantes entre o epitélio e o estroma. Descompensações hormonais, geralmente observadas durante a senescência, causam um desequilíbrio destas interações homeostáticas e podem promover o aparecimento de patologias prostáticas. A hiperplasia e o câncer estão entre as doenças que mais freqüentemente atingem a próstata e os hormônios androgênicos, juntamente com outros fatores, exercem papel importante na etiologia destas lesões. O entendimento da fisiologia androgênica e sua função no desenvolvimento e manutenção da próstata normal e no envolvimento com as doenças que a afetam é fundamental para a compreensão das interações epitélio-estroma. Na próstata a ação androgênica é acentuada devido à conversão da testosterona em diidrotestosterona pela 5 α -redutase, enzima presente, principalmente, em células basais e estromais. Por essas razões, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações na morfologia tissular da próstata ventral do gerbilo adulto (*Meriones unguiculatus*), incluindo modificações na arquitetura tecidual, na ultra-estrutura celular, além do arranjo das fibras da matriz extracelular, decorrentes do tratamento com finasterida, um inibidor competitivo da enzima 5 α -redutase. Os resultados obtidos após 10 dias de tratamento oral, com 100mg/kg/dia de finasterida, revelaram uma intensa reorganização do compartimento estromal e modificações epiteliais frente a nova situação hormonal. O compartimento glandular epitelial reduziu-se de tamanho e teve a atividade sintética diminuída, enquanto no compartimento estromal as fibras de colágeno e

as reticulares acumularam-se de maneira marcante na base do epitélio, assumindo fenótipos bem diferentes dos observados na próstata dos animais controle. A camada de músculo liso tornou-se menos compactada, com abundante material granular amorfo e fibras colágenas e reticulares entremeando as células musculares lisas. Além disso, este material granular amorfo também acumulou-se notavelmente na base do epitélio. Algumas das células da camada muscular lisa por sua vez, passaram a apresentar aspecto desdiferenciado, com contorno irregular e espinhoso, enquanto outras mostraram-se bem reduzidas, com citoplasma condensado e várias vesículas de pinocitose na membrana celular. Deste modo, estes resultados permitem indicar que a inibição da atividade enzimática da 5 α -redutase afetou as interações homeostáticas entre epitélio e estroma, o que pode estar potencialmente envolvido com alterações hormonais.

Prostatic development and differentiation are induced by androgens acting via mesenchymal-epithelial interactions, and during adult life the gland is maintained functionally active by reciprocal homeostatic stromal-epithelial interactions. Hormonal alterations, usually associated with the physical aspects of aging, leads to disruptions of this homeostatic interactions and may initiate and promote several prostate diseases. The benign prostatic hyperplasia and cancer are among the most frequently prostatic pathologies and androgens, together with others factors, play important roles in the etiology of these lesions in the prostate. Understanding the physiology of androgen production and its role in development and maintenance of the normal prostate and in prostate cancer, it is vital in order to comprehend the complex interactions between epithelium and stroma. Within the prostate, the androgen action is enhanced due to the conversion of testosterone in dihydrotestosterone, by 5 α -reductase, an enzyme mostly present in basal and stromal cells. Thus, the objective of this study was to analyze the alterations in tissular morphology of the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate, including modifications in the tissue architecture, cell ultrastructure and extracellular matrix fibers arrangement, following finasteride therapy, a competitive 5 α -reductase inhibitor. The data obtained after oral finasteride administration, at a dose of 100mg/kg/day through 10 days revealed a striking reorganization of the stromal compartment and epithelial modifications, probably due to the new hormonal situation. The glandular epithelial compartment shrinked and its secretory activity decreased. In the stromal compartment, there was a notable collagen and reticular

fibers accumulation around the epithelium, which assumed very different phenotypes when compared to the control animals' prostate. The smooth muscle layer underwent a loosening, interspersed with abundant amorphous granular material, collagen and reticular fiber. This amorphous granular material also accumulated in the base of the epithelium. Some smooth muscle cells exhibited a dedifferentiated aspect with a highly irregular external contour and numerous spine-like cytoplasmic projections, whereas others were reduced, showing a condensed cytoplasm and many caveolae in the cell surface. In these regards, the results

lend support to conclude that the 5 α -reductase inhibition affected the homeostatic epithelial-stromal interactions, what can be critically involved with the alterations of hormonal levels.

1. Estrutura da próstata

A próstata humana tem estrutura firme e compacta, com peso ao redor de 25g, formato semelhante a uma noz e localiza-se envolvendo a uretra, quando esta emerge da bexiga. No aparelho reprodutor masculino, a próstata e as vesículas seminais são consideradas glândulas acessórias sexuais, envolvidas na manutenção da viabilidade e motilidade do espermatozóide, além de garantirem a sua bem sucedida transferência para o aparelho reprodutor feminino. Estas glândulas exócrinas são as responsáveis pela formação do produto ejaculado e liberam suas secreções diretamente na uretra, no momento da ejaculação (Kirby et al., 1996, Coffey, 1998).

Histologicamente, a próstata humana é uma glândula túbulo-alveolar, composta de ductos e ácinos, com atividade secretora principalmente ligada à porção alveolar, porém os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (Reese et al., 1986). A camada celular epitelial consiste de, pelo menos, quatro tipos de células: basal, secretora, intermediária e neuroendócrina que dependem dos hormônios esteróides mas reagem diferentemente a eles (De Marzo et al., 1998, Rumpold et al., 2002). Pesquisas têm demonstrado que as células intermediárias do epitélio prostático reagem a anticorpos anti-queratinas de baixo peso molecular específicos de células basais e de alto peso molecular, marcadores de células secretoras (De Marzo et al., 1998).

O compartimento estromal prostático, que entremeia as porções glandulares, exibe uma complexa organização de células e matriz extracelular (MEC). As células

encontradas neste compartimento incluem fibroblastos, macrófagos teciduais, mastócitos, células endoteliais vasculares e células musculares lisas (CML). Os fibroblastos, juntamente com as CML sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da MEC, que é composta de fibras de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos, entre outras moléculas que se associam a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas remodeladoras (Tuxhorn et al., 2001). O colágeno e as fibras elásticas fornecem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, além de servirem de substrato para adesão e migração celular, processos mediados por glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e laminina. Os proteoglicanos regulam a estrutura da MEC e sua permeabilidade, ligam-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases (Kreis & Vale, 1999). Os fatores de crescimento, enzimas remodeladoras e seus inibidores, junto com os componentes fibrilares da MEC participam ativamente de vários processos fisiológicos e patológicos da próstata, permitindo proliferação e migração dos tipos celulares envolvidos na manutenção e reparo tecidual desse órgão (Tuxhorn et al., 2001, Thomson et al., 2002).

As CML e os fibroblastos são os principais tipos celulares do estroma prostático, sendo que as primeiras representam 22% da área total da próstata humana (Shapiro et al., 1992), predominando ao redor dos ductos, em íntimo contato com a membrana basal das células epiteliais. Além disso, as CML têm um importante papel nos mecanismos de estimulação parácrina (interações a curta distância), especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999) e apresentam plasticidade funcional, sendo capazes de modular seu fenótipo frente a situações fisiológicas e patológicas (Worth et al., 2001). Grande importância tem sido atribuída as CML, tanto no controle homeostático, quanto no

desenvolvimento e estabelecimento de neoplasias da próstata (Cunha et al., 1996, Farnsworth, 1999).

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino encontrada em todos os mamíferos, inclusive nos monotremos, permitindo desde estudos anatomo-patológicos até os de natureza evolutiva. A anatomia comparada de alguns mamíferos permitiu, já na década de 60, a descrição macro e microscópica deste órgão em ratos, coelhos, camundongos, macacos e cães. Os componentes epitelial e estromal prostáticos assumem características funcionais comuns nos diferentes animais, independentemente do aspecto macroscópico da glândula, permitindo uma correlação na homologia morfo-funcional (Price, 1963, Karr et al., 1995).

A próstata humana não apresenta lobos, mas é subdividida em três zonas: central, periférica e transicional. Já na maioria dos roedores, a próstata apresenta-se subdividida em lobos distintos morfológica e bioquimicamente, nomeados de acordo com sua localização anatômica: anterior (ou glândula coaguladora), dorsal, dorso-lateral e ventral (Price, 1963, McNeal, 1983). Assim, como nas zonas da próstata humana, estes lobos diferem-se na composição celular, organização tecidual, conteúdo de suas secreções e respectivos processos secretórios (Jesik et al., 1982, Aumüller & Seitz, 1990, Colombel & Buttyan, 1995).

1.1 - A próstata do gerbilo

O gerbilo (*Meriones unguiculatus*) tem se revelado um bom modelo de estudo prostático (Zanetoni, 2002), pois sua próstata é muito semelhante à humana, no que se refere à compacidade e fusão de seus lobos, características ausentes no rato e no camundongo (Price, 1963).

A glândula prostática desses animais é constituída de dois lobos ventrais à bexiga urinária, exatamente no ponto em que a uretra recebe dois ductos espermáticos. Estes lobos estão ligados na junção da bexiga com as vesículas seminais (Williams, 1974). Os compartimentos epitelial e estromal são bem distintos, sendo identificadas no epitélio prismático simples uma população de células secretórias apócrinas e merócrinas, além de células basais e intermediárias. O estroma é ricamente vascularizado e com abundante musculatura lisa bem compartimentalizada ao redor dos ácinos e ductos. Entremeando as CML há poucas fibras de colágeno, que aparecem em maior concentração na base do epitélio prostático, juntamente com fibras reticulares, próximas à membrana basal. Existem, porém, poucas fibras do sistema elástico entre as células da musculatura lisa. Estes dados, quando comparados com os de outros roedores, mostram que na próstata do gerbilo, a disposição das CML na região periacinar acaba por limitar e confinar os elementos da MEC em uma área restrita do estroma (Zanetoni, 2002). Em ratos, o estroma apresenta material fibroso fino e pouco agregado, além de esparsas CML (Carvalho et al., 1996, 1997a, b). O epitélio glandular prismático simples, a heterogeneidade das células deste compartimento e

a disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares da próstata do gerbilo assemelham-se muito ao encontrado no homem (Zanetoni et al., 2002).

Partindo-se destas semelhanças morfo-funcionais pré-estabelecidas e devido ao papel fundamental da próstata no funcionamento do aparelho reprodutor masculino, pode-se criar situações experimentais que permitam a extrapolação dos resultados para o homem. O estudo das respostas do epitélio e dos componentes do estroma da próstata de ratos em relação a agentes químicos (Pollard e Luckert, 1987), ablação hormonal (Carvalho et al., 1996 e 1997a,b) ou até mesmo relacionadas com o climatério (Zanetoni, 2002) revela a biologia e fisiologia prostática, além de indicar caminhos para a prevenção e prognóstico de doenças que afetam esta glândula. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das interações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e moleculares da glândula prostática, tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento da fisiologia da próstata humana.

2. Controle hormonal na próstata

A próstata e a vesícula seminal são dependentes de andrógenos, tanto para o desenvolvimento e diferenciação durante a embriogênese, quanto para sua manutenção na vida adulta. A ação destes hormônios, que também regulam as ações co-dependentes das interações epitélio-estroma, é mediada via receptores de andrógenos (RA) (Cunha et al., 1985, 1996, Hsing et al., 2002). Uma série de dados sustentam a hipótese que os RA prostáticos desempenham papel-chave na ação androgênica (Hsing et al., 2002), porém nem

todos os tipos celulares prostáticos possuem RA, indicando que somente células específicas são alvos diretos deste tipo de ação hormonal (Prins et al., 1991). Estudos experimentais mostram que na ausência de andrógenos, hormônios não-androgênicos como o estradiol, a vitamina D e fator de crescimento tipo-insulina, em combinação com os RA podem induzir a ação androgênica. Assim, a ação hormonal na próstata é determinada não somente pela concentração de andrógenos, mas também por vários outros fatores, como os níveis de RA e seus co-ativadores, presença de fatores de crescimento, e talvez outros fatores que ainda venham a ser identificados (Hsing et al., 2002).

Durante o desenvolvimento da próstata, os processos morfogenéticos exigem uma mediação ativa das células estromais, enquanto a manutenção da diferenciação do tecido epitelial adulto pode ser regulada, em grande parte, pela MEC (Cunha et al., 1985). Sugimura et al. (1986) e Nemeth & Lee (1996) sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais. As interações envolvidas no desenvolvimento prostático acontecem de maneira recíproca: o mesoderma derivado do sino urogenital induz a diferenciação epitelial e, este epitélio em desenvolvimento, induz a diferenciação do mesoderma em músculo liso (Cunha et al., 2002). O resultado final desta relação epitélio-mesenquimal é a formação do tecido prostático maduro, no qual o epitélio mostra-se com células fenotipicamente diferenciadas e o estroma composto, predominantemente, por CML. Interações semelhantes durante a fase adulta de um indivíduo mantém a próstata funcionalmente ativa através de uma homeostase, dependente de ação androgênica, entre morte e reposição celular, uma vez que a castração promove apoptose epitelial e depleção estromal, além de reduzir a quantidade de DNA das células prostáticas a 10% em dez dias. Neste casos, com reposição de

hormônios androgênicos, tanto a arquitetura quanto a função prostática podem reestruturar-se por meio de proliferação celular (Kirby et al., 1996, Cunha et al., 2002).

As interações entre epitélio e estroma, mais especificamente entre o epitélio e a musculatura lisa ao seu redor, são de importância fundamental durante a morfogênese da próstata no embrião e a homeostase do órgão adulto (Cunha, 1985, Hayward et al., 1997). No mecanismo de estimulação parácrina, os andrógenos ativam moléculas indutoras do desenvolvimento prostático, produzidas pelas células mesenquimais e estas induzem a diferenciação do epitélio, promovendo o desenvolvimento da próstata. Sugere-se, também, que os andrógenos são capazes de regular a espessura da camada muscular lisa, compreendendo parte de um mecanismo de regulação da indução prostática, durante a embriogênese. Neste caso, o mesênquima é estimulado pelos hormônios a diferenciar-se em CML, as quais produzirão fatores estimulantes para a diferenciação do epitélio (Thomson et al., 2002).

Estudos baseados na privação androgênica têm mostrado que a síntese e organização dos componentes da MEC, juntamente com as CML, apresentam respostas adaptativas a diversas situações hormonais sendo, portanto, em grande parte moduladas por andrógenos. Horsfall et al. (1994) estudando o estroma prostático de cobaia durante o envelhecimento do animal, observaram alterações nos componentes fibrosos, além de um aumento da atividade sintética das fibras musculares lisas modificadas fenotipicamente. Na próstata ventral de ratos submetidos a castração houve um aumento e uma remodelação dos componentes estromais, principalmente colágeno e elastina (Carvalho et al., 1997a, b). Posteriormente, Vilamaior et al. (2000) no mesmo modelo experimental, descreveu as

modificações fenotípicas das CML sugerindo um possível papel para estas células na remodelação e síntese dos componentes da MEC.

Cunha et al. (1996) sugeriram que as CML, sob ação de andrógenos, mantém a estrutura e função do epitélio, que por sua vez, mantém a diferenciação do músculo liso, caracterizando a interação epitélio-estroma da próstata. Segundo estes mesmo autores, depois da castração há uma perda de feixes de músculo liso da próstata, acompanhado de um ordenado e sequencial desaparecimento de muitos marcadores de diferenciação de músculo liso. CML de ratos castrados tornam-se atroficas, com tamanho celular e alguns componentes estruturais reduzidos, porém, mesmo com essa aparente atrofia, sugere-se que a camada estromal aumenta (Zhao et al., 1992, Vilamaior et al., 2000). Wong & Tam (2002) demonstraram que as CML assumem um fenótipo sintético desdiferenciado após a indução de carcinogênese prostática em ratos.

A modulação fenotípica das CML não envolve apenas mudanças quantitativas nas proteínas contráteis e do citoesqueleto, mas também na reorganização destas. O citoesqueleto atua como um regulador espacial da sinalização intracelular e sua reorganização causa, desta forma, um realinhamento das moléculas sinalizadoras que poderão mediar funções associadas com a modulação do fenótipo das CML (Worth et al., 2001). Desta forma, as CML podem apresentar dois fenótipos: um sintético (desdiferenciado e/ou proliferativo) e outro contrátil (diferenciado). Os eventos envolvendo a diferenciação ou desdiferenciação das CML são numerosos, incluindo vias dependentes de citocinas, expressão de proteínas específicas do citoesqueleto e fatores de crescimento (Doevendans & Eys, 2002)

Um desequilíbrio na interação homeostática entre o epitélio e o estroma prostáticos pode iniciar e promover carcinogênese neste órgão (Sung e Chung, 2002) e por isso, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino também estimulado por andrógenos (Hayward et al., 1997, Cunha et al., 2002). Durante o envelhecimento do homem, fase da vida em que as concentrações dos hormônios sofrem um declínio gradual (Hsing et al., 2002), muitas alterações histológicas também acometem a próstata, em resposta a estas descompensações hormonais (Rosai, 1996). A hiperplasia e o câncer estão entre as doenças que mais frequentemente atingem a próstata e os hormônios androgênicos, juntamente com outros fatores, exercem papel importante na etiologia destas lesões (Hayward et al., 1997, Hsing, 2002).

Várias formas de se conseguir alívio dos sintomas da hiperplasia benigna prostática (HBP) e promover a regressão do câncer prostático têm sido obtidas através do estudo das respostas da próstata aos hormônios, sob várias condições, demonstrando que as lesões prostáticas, malignas ou não, podem ser tratadas através de estratégias hormonais (Colombel & Buttyan, 1995, Droller, 1997, Hsing, 2002). A redução dos andrógenos envolvidos com as patologias prostáticas pode ser obtida dos seguintes modos: ablação androgênica gonadal por castração cirúrgica, administração de estrógenos, inibição da síntese e liberação dos hormônios folicúlos estimulante e luteinizante e uso de hormônios agonistas. Além disso, drogas anti-androgênicas, competidoras dos andrógenos pela ligação aos RA e drogas que bloqueiam enzimas importantes para a potencialização da ação de hormônios na próstata têm se revelado importantes instrumentos para tratamento de algumas doenças da próstata (Galbraith & Duchesne, 1997). Porém, estas formas de

manipulação hormonal podem causar desconfortáveis efeitos colaterais: a castração pode gerar um trauma psicológico para o indivíduo, altos índices de complicações cardiovasculares podem ocorrer com o tratamento com estrógeno, o uso de antiandrógenos e hormônios agonistas podem resultar em ginecomastia e, mais recentemente, têm sido relatados casos de anemia e osteoporose (Stege, 2000, Hedlund, 2000).

O entendimento da fisiologia androgênica e sua função, tanto no desenvolvimento e manutenção da próstata normal, quanto no envolvimento com as inúmeras doenças que afetam este órgão, é fundamental para a compreensão das suas respostas frente uma manipulação hormonal.

2.1 - A 5 α -redutase e a finasterida

A próstata normal humana, presente estruturalmente por volta da 12^a semana de vida intrauterina, permanece rudimentar durante toda a infância e desenvolve-se somente depois da puberdade, sob a influência de elevados níveis de andrógenos circulantes. A testosterona (T), um dos hormônios fundamentais nesta fase da vida, é sintetizada nos testículos pelas células de Leydig, em resposta a sinais hormonais enviados do hipotálamo e da pituitária (Kirby et al., 1996). Cerca de 95% da T circulante liga-se a proteínas presentes no plasma sanguíneo, como a albumina e as β -globulinas e os 5% restantes encontram-se livres para difundirem-se entre as células. Outros andrógenos também capazes de estimular o crescimento prostático são os produzidos pelas glândulas adrenais, em pequenas

quantidades como por exemplo, a androstenediona, que é então convertida a T nos tecidos periféricos, como pele e tecido adiposo da tela subcutânea e também na próstata (Kirby et al., 1996, Taplin & Ho, 2001, Ekamn, 2002).

Na próstata, a T é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase (5α -r), acentuando a ação hormonal em tecidos que são alvos dos andrógenos (Fig.1) (Rittmaster, 1994). Este hormônio 5α -reduzido, quando comparado com a T, é de 5 a 10 vezes mais potente e tem maior afinidade com os RA, um dos membros da superfamília de receptores nucleares.

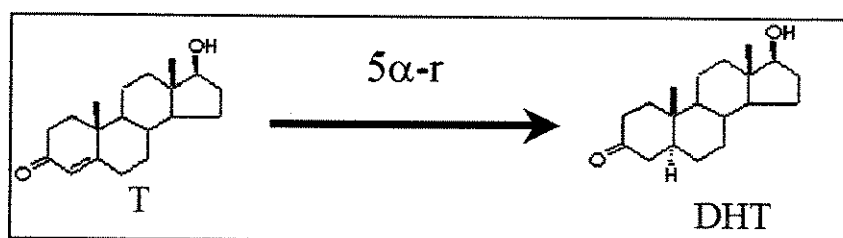


Fig. 1: Estruturas da testosterona (T) e diidrotestosterona (DHT)

A ligação da DHT ao RA resulta uma cascata de eventos necessários para a formação dos fatores de sinalização, tanto para o crescimento quanto para a manutenção da função prostática (Carson & Rittmater, 2003). Estes complexos hormônios-receptores altamente estáveis podem modular a expressão de vários genes pela ativação de seqüências específicas de DNA, chamadas de elementos responsivos aos hormônios, situadas em regiões promotoras de genes específicos (Griffiths et al., 1997), com consequente produção de proteínas, como o antígeno prostático específico (PSA) e proteínas reguladoras importantes para crescimento e função celular (Steers, 2001, Carson & Rittmaster, 2003).

Em indivíduos adultos normais, a DHT, juntamente com outros andrógenos, contribui para a manutenção da homeostase entre os processos de proliferação e morte celular. Indiretamente, este hormônio controla a expressão e secreção de fatores de crescimento, como EGF ("growth-stimulatory epidermal factor"), KGF ("keratinocyte growth factor") e IGF ("insuline-like growth factor") que modulam a proliferação celular. Do mesmo modo, a DHT afeta a atividade do fator de crescimento β , que modula a apoptose (Carson & Rittmaster, 2003).

Mesmo com um papel indispensável para o desenvolvimento prostático, a DHT também tem importância no desenvolvimento da HBP, patologia que caracteriza-se por um aumento estromal e hiperplasia epitelial, principalmente em indivíduos idosos, os quais apresentam diminuição da concentração de T total e livre, enquanto a concentração de DHT não diminui apreciavelmente (Rittmaster, 1994, Steers, 2001, Carson & Rittmaster, 2003). Estudos em homem e animais sugerem que o desenvolvimento da HBP vincula-se a um desequilíbrio da homeostase, mantida pela DHT, entre proliferação e morte celular, com os processos proliferativos predominando em relação aos apoptóticos (Griffiths et al., 1997, Carson & Rittmaster, 2003). Alterações dos níveis androgênicos ou de suas funções, em geral devido a problemas de ligação da DHT ao RA, bem como dos níveis ou funções dos fatores de crescimento que são mediados pela DHT podem ser consideradas causas da ruptura desta homeostase importante para a manutenção morfo-funcional da próstata (Carson & Rittmaster, 2003).

A 5 α -r é uma enzima altamente lipofílica, presente em altas concentrações nos tecidos reprodutivos de indivíduos masculinos, na pele e também no fígado. Na próstata,

esta enzima é encontrada nas membranas intracelulares, principalmente no envoltório nuclear das células basais e estromais (Steers, 2001). Existem duas isoformas desta enzima, designadas tipo 1 e tipo 2. A 5 α -r tipo 2 é encontrada, predominantemente, na próstata e em outros tecidos genitais, enquanto que a 5 α -r tipo 1, além de aparecer na próstata e testículos, expressa-se em outros tecidos como a pele e glândulas sebáceas, sendo que ambas isoformas são encontradas no fígado. Estas isoenzimas têm 50% de semelhança nas seqüências de aminoácidos e diferem em alguns fatores como: pH ótimo para a sua atividade (de neutro a básico para o tipo 1 e ácido para o tipo 2), localização cromossômica (o gene para o tipo 1 está no cromossomo 5 e, para o tipo 2, no cromossomo 2) e resposta a inibidores (Carson & Rittmaster, 2003).

Através de estudos com hibridização *in situ* e imunohistoquímica em tecidos prostáticos humanos (Bonkhoff et al., 1996, Iehlé et al., 1999) detectou-se que o RNAm para a 5 α -r tipo 1 é, preferencialmente, expressado no núcleo das células secretoras e pouco expressado em células estromais, enquanto que o RNAm para 5 α -r tipo 2 aparece tanto no epitélio, principalmente no citoplasma das células basais, quanto no estroma. Na HBP, a expressão dos RNAm de ambas isoenzimas foi ligeiramente aumentada, indicando um importante papel da 5 α -r na patologia e manutenção desta doença (Iehlé et al., 1999).

O papel integral da 5 α -r no desenvolvimento e manutenção da próstata explica-se pela observação de indivíduos com deficiência congênita na enzima 5 α -r tipo 2, os pseudo-hermafroditas, que nascem com o pênis mal formado e persistência de uma bolsa vaginal. Na puberdade, a musculatura destes indivíduos desenvolve-se normalmente, a voz engrossa e há um relativo crescimento do pênis, porém, o crescimento de pêlos no corpo é

esparso e a glândula prostática é pequena; estes indivíduos não desenvolvem HBP ou câncer de próstata. Partindo-se destes motivos, sugere-se que a inibição farmacológica da ação enzimática da 5α -r preveniria o desenvolvimento de doenças prostáticas, não afetando a libido, o desempenho sexual e a musculatura masculina (Rittmaster, 1994).

A caracterização precisa das ações das isoformas 5α -r tipo 1 e tipo 2 é a chave para o entendimento do desenvolvimento e crescimento da próstata (Rittmaster, 1994). Os mecanismos cinéticos e químicos da conversão da T em DHT têm revelado a participação de um co-fator NADPH, que liga-se a 5α -r, e este à T, formando um complexo ternário (Harris & Kozarich, 1997). A estrutura requerida para a produção de inibidores sintéticos da 5α -r inclui uma configuração estável no anel A da molécula (Fig.2), que simule o estado de transição na conversão da T em DHT e permita que o inibidor se ligue fortemente ao sítio ativo da enzima (Rittmaster, 1994). Estudos dos mecanismo da 5α -r na próstata têm possibilitado o desenvolvimento de drogas que inibem as isoenzimas 5α -r tipos 1 e 2, usadas contra doenças em que a DHT aparece relacionada, como no tratamento da HBP (Steers, 2001).

A finasterida (Fig.2), um eficiente inibidor competitivo da 5α -r tipo 2, age impedindo a conversão da T em DHT, mas não afeta a ligação da T ao seu RA, consequentemente não causando efeitos feminilizantes e, nem influenciando na fertilidade masculina (Griffiths et al., 1997). Para o tratamento de HBP, a dose recomendada (de 1mg a 5mg por dia) de finasterida não causa outros efeitos hormonais, nem inibe a formação ou a ação de qualquer outro hormônio esteróide, sendo bem absorvida após administração oral (Rittmaster, 1994). Esta droga é capaz de inibir de 80% a 90% a 5α -r tipo 2 na próstata e

reduzir o tamanho prostático em 20% a 30%, o que relaciona-se com a diminuição dos níveis de DHT intraprostáticos.

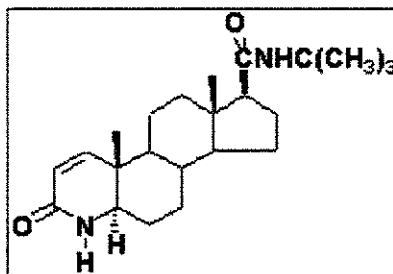


Fig. 2: Estrutura da Finasterida. Da esquerda para a direita, o primeiro anel aromático é o anel A da estrutura.

Os níveis séricos de T são ligeiramente elevados em homens e animais após a administração de finasterida, enquanto que os níveis de DHT diminuem de 70% a 80%. A inabilidade da finasterida em bloquear as duas formas da enzima 5α -r, justifica os 20% de DHT sérica convertida pela 5α -r tipo 1, fracamente inibida pela finasterida (Steers, 2001). Azzolina et al. (1997) propuseram que a ação da finasterida acontece diferentemente entre a 5α -r tipo 1 e tipo 2 de ratos, sendo reversível a inibição da primeira, e tempo-dependente e irreversível a inibição da 5α -r tipo 2. Segundo estes autores, o primeiro passo para o mecanismo de inibição é a enzima reconhecer a finasterida como um substrato alternativo e catalisar a redução da dupla ligação do anel A da droga. Se a enzima é incapaz de promover esta reação, ocorre a inibição reversível pela finasterida.

Embora a inibição da 5α -r seja freqüentemente comparada com a castração, há diferenças importantes entre elas. Enquanto a concentração de T e DHT na próstata é reduzida pela castração, com a inibição enzimática a concentração de T intraprostática

aumenta. A castração reduz somente a fonte testicular de andrógenos e o inibidor enzimático bloqueia a produção de DHT tanto a partir de hormônios da adrenal, quanto de precursores gonadais. A finasterida reduz mais a concentração intraprostática de DHT do que a castração, mas o consequente aumento da T intraprostática enfraquece os efeitos fisiológicos da diminuição da DHT (Geller, 1990). A inibição da 5α -r em ratos causa morte celular em menor extensão e menos frequência, quando comparada com a castração (Rittmaster, 1994). A diminuição na concentração do PSA, no tecido prostático humano, é maior com a castração cirúrgica que com o uso da finasterida, sugerindo que os elevados níveis intraprostáticos de T evitam a supressão total da função da célula epitelial na próstata, fonte de PSA (Rittmaster, 1994), mesmo com o epitélio glandular sofrendo atrofia após o uso de finasterida (Carson & Rittmaster, 2003).

A HBP, doença comum em homens a partir dos 50 anos de idade, caracteriza-se por um aumento da glândula prostática que resulta, principalmente, em obstrução do fluxo de urina. Para seu tratamento, a finasterida têm se mostrado eficiente em reduzir o volume prostático, aumentar o fluxo urinário, melhorar os sintomas e deter a progressão da doença (Harris & Kozarich, 1997).

Segundo Shibata et al.(2000), com a administração da finasterida em cães com HBP, os componentes epiteliais e estromais prostáticos tiveram significativa redução, houve um aumento da proporção de estradiol em relação ao total de andrógeno e o número de células apoptóticas aumentou somente no início do tratamento. Para os autores, os altos níveis de T intraprostáticos, induzidos pela inibição da enzima 5α -r, sofreram uma maior aromatização, resultando no aumento observado de estradiol. Este aumento poderia

teoricamente, inibir a apoptose e, potencialmente induzir o crescimento proliferativo da próstata. A administração crônica de 45mg/kg/dia de finasterida em cachorros durante 53 semanas diminuiu o peso prostático e causou uma atrofia epitelial, demonstrando o encolhimento da glândula ser resultado de uma diminuição tanto do compartimento glandular, quanto do fibromuscular (Laroque et al., 1994). Phrahalada et al. (1998), depois de seis meses tratando ratos com 80mg/kg/dia de finasterida, observou também uma diminuição do peso dos lobos prostáticos e do número de células epiteliais e estromais no lobos dorsolateral e ventral.

A eficiência da finasterida é consistente na melhora dos sintomas da HBP pois, nitidamente reduz o tamanho da glândula prostática. Mesmo assim, ainda há muito a elucidar-se sobre sua ação nas modificações morfológicas e funcionais dos compartimentos epitelial e estromal prostáticos. Para que se compreenda, de modo abrangente, as reações e respostas que causam estas mudanças na próstata, torna-se necessário o entendimento, cada vez maior, das interações homeostáticas entre epitélio e estroma e sua relação com os hormônios androgênicos responsáveis pela manutenção funcional da glândula.

O presente estudo analisou, qualitativa e quantitativamente, as alterações morfológicas e ultra-estruturais dos compartimentos epitelial e estromal da próstata de gerbilo adulto após o tratamento com finasterida, um inibidor da enzima 5α -redutase tipo 2, procurando interpretar os efeitos da inibição desta atividade enzimática e, consequentemente, do bloqueio da produção de diidrotestosterona sobre as interações epitélio-estroma responsáveis pela manutenção da homeostase da próstata.

Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate

Lara S. Corradi¹; Rejane M. Góes²; Hernandes F. Carvalho¹; Sebastião R. Taboga^{2*}

Submetido para a Revista *Differentiation*, em Junho de 2003.

Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate

Lara S. Corradi¹; Rejane M. Góes²;
Hernandes F. Carvalho¹; Sebastião R. Taboga^{2*}

¹Department of Cell Biology, UNICAMP, 13084-971, Campinas, SP and ²Microscopy and Microanalysis Laboratory, Department of Biology, IBILCE/UNESP, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

***Correspondence address**

Dr. Sebastião Roberto Taboga

Microscopy and Microanalysis Laboratory, Department of Biology, IBILCE/UNESP

R. Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth

15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

E-mail: taboga@bio.ibilce.unesp.br

Telephone: +55 17 2212386

Fax number: +55 17 2212390

Abstract

Prostate differentiation during embryogenesis and its further homeostatic state maintenance during adult life depend on androgens. Dihydrotestosterone, which is synthesized from testosterone by 5 α -reductase (5 α -r), is the active molecule triggering androgen action within the prostate. In the present work we examined the effects of 5 α -reductase inhibition by finasteride in the ventral prostate (VP) of the adult gerbil, employing histochemical and electron microscopy techniques to demonstrate the morphological and organizational changes of the organ. After 10 days of finasteride treatment at a dose of 100mg/kg/day, the prostatic complex (VP and dorsolateral prostate) absolute weight was reduced to about 18%. The epithelial cells became short and cuboidal, with less secretory blebs and reduced acid phosphatase activity. The luminal sectional area diminished, suggestive of decreased secretory activity. The stromal/epithelial ratio increased, the stroma becoming thicker but less cellular. There was a striking accumulation of collagen fibrils, which was accompanied by an increase in deposits of amorphous granular material adjacent to the basal lamina and in the clefts between smooth muscle cells (SMC). Additionally, the periacinar smooth muscle became loosely packed. Some SMC were atrophic and showed a denser array of the cytoskeleton, whereas other SMC had a highly irregular outline with numerous spine-like projections. The present data indicate that 5 α -r causes epithelial and stroma changes by affecting the intraprostatic hormone levels. These alterations are probably the result of an imbalance of the homeostatic interaction between the epithelium and the underlying stroma.

Keywords: prostate, 5 α -reductase, finasteride, stromal reorganization, smooth muscle dedifferentiation.

Introduction

Mesenchymal-epithelial interactions play critical roles in the morphogenesis of several glandular tissues, including the prostate. In adulthood reciprocal homeostatic interactions between stroma and epithelium maintain functional differentiation and growth arrest in this organ (Cunha et al., 2002). Both prostate differentiation during embryogenesis and its further maintenance during adult life depend on androgens (Berthaut et al., 1997). Thus, the homeostatic state of the prostate is related to the presence of the systemic androgens, which elicits their morphogenetic effects by acting through androgen receptors; similarly, during embryogenesis, androgens and their receptors are profoundly growth stimulatory (Hayward et al., 1997; Cunha et al., 2002).

Within the prostate, circulating androgen, testosterone (T), is converted to dihydrotestosterone (DHT), which is 5-10 times more potent than T (Bruchovsky and Wilson, 1999; Ekman, 2000; Steers, 2001). The action of two 5 α -reductase (5 α -r) isozymes (type 1 and type 2) is responsible for the local conversion of T into DHT in both prostate and several other androgen target tissues. Even though DHT acts mainly on the epithelium, this conversion up to 90% occurs in the prostatic stromal and basal cells (Steers, 2001), after which DHT is transferred to the epithelium as part of the stromal-epithelial interactions (Ekman, 2000). Therefore, 5 α -r plays a key role in DHT-mediated effects in the prostatic gland. Study of 5 α -r in the prostate has resulted in the development of drugs, as finasteride, an efficient 5 α -r type 2 inhibitor, which has been used clinically for controlling symptoms of benign prostatic hyperplasia (BPH) (Steers, 2001). Consistent with its function in maintaining balance between cellular proliferation and death in the normal prostate, DHT plays an important role in the development of BPH by an increase in cell number arising from both cellular hyperplasia and reduced apoptosis (Carson and Rittmaster, 2003). BPH is characterized by an enlargement of the gland, and the epithelial cell alterations are preceded

by stromal changes (Rumpold et al., 2002). The DHT levels, unlike T levels, remain constant throughout the pathogenesis of BPH suggesting an important role of DHT in BPH (Carson and Rittmaster, 2003).

In the absence of androgen stimulation, the prostate undergoes a well-documented regression characterized by extensive epithelial apoptosis and by a dedifferentiation of the prostatic smooth muscle that assumes a more fibroblastic phenotype (Hayward et al., 1996a). Collagen fibers in the stroma of the rat become reorganized following castration, showing that androgen has a regulatory role in the composition of both the cells and extracellular matrix of the prostate stroma (Vilamaior et al., 2000). Extensive remodeling of the collagen fibers has also been described in human prostate during establishment of benign and malignant lesions in this organ (Taboga and Vidal, 2003). The dedifferentiation process induced by castration is accompanied by a progressive loosening in smooth muscle bundles, leading to an eventual loss of prostatic SMC (Hayward et al., 1996b). In a rat model of prostate carcinogenesis, this pattern of SMC dedifferentiation was also observed around epithelial dysplastic lesions, and some SMC exhibited highly irregular external contours with numerous spine-like cytoplasmic projections. These findings support the hypothesis that abnormal stroma, resulting from dedifferentiation or reduction of SMC, may lead to loss of stromal control over epithelial proliferation and differentiation (Wong and Tam, 2002).

The treatment of the abnormal prostate growth with antiandrogen therapy has also shown an extensive reorganization of the stromal compartment, besides the expected epithelial regression, probably caused by a disruption of the prostatic hormonal equilibrium. The antiandrogen, flutamide, promoted morphological and ultrastructural alterations during postnatal development of Guinea pig lateral prostate, with a striking irregular distribution and apparent decrease in the amount of collagen fibers, both in the base of the epithelial structures and interspersing SMC (Cordeiro et al., 2003). In the human prostate, inhibition of 5 α -r elicits a response that is similar, but not identical to that seen with blockade of the androgen receptor activity (Steers, 2001). Finasteride produces

alterations in intraprostatic T and DHT levels within the human prostate and reduction in prostate size, which are nearly identical to androgen ablation, but has no effects on cellular proliferation (Geller, 1990; Prahalada et al., 1998; Steers, 2001; Huynh, 2002).

Morphological effects of finasteride on the prostate, especially modifications of the epithelial and stromal cells and the extracellular matrix components alterations are poorly understood. The use of 5α -r inhibitors, used to treat BPH (Carson and Rittmaster, 2003), may be useful in elucidating the role of androgens in the maintenance of functional integrity of the prostate gland. To assess the relationship between prostatic androgen levels and the stromal (SMC and extracellular matrix) reorganization, we have used histochemical and electron microscopy techniques to demonstrate the effects of 5α -r inhibition by finasteride on the morphological and organizational features of adult gerbil ventral prostate.

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is a rodent known for its suitability for laboratory use. By nature, it is a curious and friendly rodent, almost without odor, with monogamous behavior and physiological mechanisms of corporal-water conservation, presenting spontaneous attacks of epilepsy and relative absence of natural illnesses.

Methods

Animals and treatment

Twenty adult male gerbils (*Meriones unguiculatus*) three-months-old were housed under standard conventional conditions (25°C, 40-70% relative humidity, 12 h light/12 h dark) and allowed access to chow and water *ad libitum*. Randomly divided, 10 control gerbils received the pharmacological vehicle (0.9% saline solution). The remaining animals were treated with finasteride (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) administered at a dose of 100mg/kg/day as a suspension in a 0.9% saline solution, once daily, for 10 days. Oral administration of 160mg/kg/day of finasteride for 15 days was employed by Prahalada et al (1998) in the rat and was shown a magnitude of decrease in the mean DHT level of 98%, determined by radioimmunoassay. Suspensions of drug and vehicle were given orally, by gavage, at a dosing volume of 0.5ml/animal. All animals were sacrificed 24 hours after the last day of treatment by intramuscular dose of ketamine-chlorohydrate (50mg/kg-body weight) and killed by bleeding. The entire prostatic complex was excised, weighed and processed for light and transmission electron microscopy. Some ventral prostate samples of both groups were immediately frozen in liquid nitrogen to assess acid phosphatase (AP) activity.

Histochemistry

Ventral prostates of control and finasteride-treated groups were cut into fragments and immediately fixed by immersion, for 24 hours in Karnovsky fixative (0.1M Sörensen phosphate buffer pH 7.2 containing 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde). Fixed tissue samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit). Histochemical sections (3-µm) were subjected to hematoxylin-eosin (H&E) staining for general studies and to Gömöri's reticulin (Taboga and Vidal, 2003) staining for collagen and reticular fiber evaluation. Microscopic analyses were performed on Zeiss-Jenaval or Olympus

photomicroscopes, and the microscopic fields were digitized using the Image-Pro®Plus version 4.5 for Windows™ software.

Enzyme histochemistry - Acid phosphatase (AP) activity

The ventral prostatic samples of control and finasteride-treated groups frozen in liquid nitrogen were sectioned in a Leica CM1850 cryostat microtome. Cryosections (10-µm thickness) were fixed for 5 min in 10% Formalin calcium fixative, incubated for 110 min at 37°C in medium with sodium β-glycerophosphate substrate. The histochemical reaction control was obtained using the incubation medium without the substrate or the medium containing 0.01M sodium fluoride, an enzyme inhibitor. After incubation, the cryosections were washed with 0.05M acetate buffer pH 5.0, and treated with 1% ammonium sulfide for 3 min, rinsed in distilled water, and then counterstained with 0.1% Methyl-Green aqueous solution for 5 min (Custódio et al., 2003). Slides were observed and analyzed at light microscopy as described above.

Transmission electron microscopy (TEM)

Ventral prostatic samples of control and finasteride-treated group were minced into small pieces and fixed by immersion with 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer, pH 7.3, containing 0.54% glucose during 24 hours (Cotta-Pereira, 1976). After material washing with the same buffer, samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 hour, washed in buffer, dehydrated in graded acetone series, and embedded in Araldite resin. Ultrathin silver sections were cut using a diamond knife and stained with 2% alcoholic uranyl acetate for 30 min and followed by 2% lead citrate in sodium hydroxide for 10 min. Samples were evaluated by electron microscopy using a LEO – Zeiss 906 transmission electron microscope.

Morphometric-stereological analysis

Fifty random prostatic areas from control and finasteride-treated H&E sections were analyzed by the Image-Pro®Plus version 4.5 for Windows™ software. The morphometric-stereological analyses were obtained by Weibel's multipurpose graticulate with 120 points and 60 test lines (Weibel, 1979) to compare the relative proportion (%) of gland portions (glandular and stromal) in each prostatic tissue compartment (epithelium, lumen, non-muscular stroma and SMC). For the morphometrics analysis, 130 random measures of epithelium height, collagen thickness present subadjacent to the epithelium base and smooth muscle (SM) layer thickness surrounding each acinus were also obtained by Image Pro-Plus system program.

Statistical analysis

The finasteride effects on adult gerbil ventral prostate were evaluated by analyses of mean $\pm$ standard error (SE). The statistical analysis was performed in the Statistica 6.0 software (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). The hypothesis test Anova, and Tukey HSD test were employed and, $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Differences in prostatic complex absolute weight were analyzed by *t*-test, and $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Histochemistry

Acini from the distal region of control ventral prostate showed the glandular epithelial compartment immersed in vascularized connective stroma tissue, in which smooth muscle bundles surrounded each acinus (Fig.1A). Columnar cells constituted the epithelium, and the presence of apical cytoplasm blebs indicated active apocrine secretion (Fig 1B). In the stromal compartment, SMC were well organized in a densely packed layer surrounding the acinar epithelium (Fig.1A and B). Collagen fibers of the connective tissue were interspread throughout the stroma, and were more abundant along the basal aspect of epithelial structures than among SMC (Fig.1B). The Gömöri's method allowed the identification of reticulin fibers, which were straight and aligned with the epithelium and interspersed in between SMC (Fig.1F).

Treatment with finasteride caused notable changes both in the glandular and stromal compartments of gerbil ventral prostate (Fig.1C). The epithelium cells became short and cuboidal (Fig.1D and E), and the lumen area and the quantity of blebs, which are indicative of secretory activity, decreased (Fig.1C). At the interface between epithelium and stroma, the number and density of fibroblasts increased (Fig.1E). The stromal compartment underwent marked alterations, including an increase of extracellular matrix (ECM) components adjacent to the acinar epithelium (Fig.1H) in the interacinar region (Fig.1I) and interspersed between SMC (Fig.1J), when coincided with a marked loosening of the smooth muscle layer (Fig.1D and E). Collagen accumulated around the epithelial structures, including infoldings, and the collagen fibers became undulated and/or sinuous (Fig 1E), which was clearly seen in specimens stained by Gömöri's method (Fig.1G-J). The reticulin fibers became curled and/or wavy (Fig.1G), similar to the collagen fibers, and also became denser sub-adjacent to the epithelium (Fig.1H and I) and interspersed between SMC (Fig.1J). The periacinar smooth muscle layer became loosened and irregular in arrangement, and most of the

SMC exhibited and altered fusiform shape (Fig.1D and E). Some SMC became wrinkled with irregular spine-like cytoplasmic projections (Fig 1D), whereas other SMC showed a reduced diameter and condensed cytoplasm (Fig.1E).

Acid phosphatase activity

Vehicle-treated gerbil ventral prostates showed a great number of distal acini exhibiting an intense AP activity (Fig.1L). On the other hand, a notable decrease in AP enzymatic activity was observed in distal prostatic acini of the finasteride-treated group (Fig.1M). For the negative control of this enzymatic reaction, the incubation medium without the substrate sodium β -glycerophosphate was employed (Fig.1K).

Ultrastructure

Ultrastructural analysis of the vehicle-treated control ventral prostate confirmed the data obtained with light microscopy. The acinar epithelium was composed mostly of secretory cells, in which secretory vesicles were prominently displayed in the cytoplasm indicative of a synthetic phenotype (Fig.2A). Usually, a single discontinuous cell layer of slender fibroblasts was identified between epithelium and SMC layer. The fibroblasts had thin processes of condensed cytoplasm (Fig.2A). The collagen fibrils arranged in different directions were observed adjacent to the basal lamina (Fig.2B and D). The SMC was densely packed and regularly organized into periacinar layers, with only small intercellular spaces between bundles of SMC (Fig.2A and C).

After finasteride treatment, the cytoplasmic volume and the amount of secretory blebs of epithelial cells decreased, and their lateral membranes showed many interdigitations (Fig.3A). In some epithelial cells, osmiophilic myelin figures and bizarre membranous deposits were detected in the apical, basal and lateral cytoplasm and also in the intercellular space (Fig.2E-H). In the stromal compartment, the connective tissue underlying the epithelium exhibited a striking increase in the

number and thickness of collagen fibrils, accompanied by an increase in deposits of amorphous granular material adjacent to the basal lamina and in the clefts among SMC (Fig.3B and D). Fibroblast cytoplasm became denser and more voluminous, and some fibroblasts became markedly electondense (Fig.3C), with an enlargement of the perinuclear space and also a notable increase of the Golgi stacks (Fig.4A). SMC of the periacinar muscle layer underwent morphological alterations (Fig.3E and F). Some SMC exhibited a reduced diameter, a condensed cytoplasm and many the presence of caveolae on their cell surface. In the perinuclear region of these cells, several Golgi stacks were observed (Fig.3E). Other SMC had a highly irregular external contour with numerous spine-like cytoplasmic projections, which were in intimate association with collagen fibrils (Fig.3F). The elastic fibers, microfibrillar elements, like fibrillin, together with collagen fibrils were observed in pericellular to SMC (Fig.4B and 4C).

Quantitative analysis

Table I shows the 5 α -reductase inhibitor finasteride effects upon wet weight and morphometric parameters of the gerbil prostatic complex when dosed at 100mg/kg/day, orally for 10 days. Administration of finasteride resulted in a significant ($p \leq 0,0223$) reduction of the prostatic complex wet weight from 0.715 ± 0.23 mg in the control group to 0.133 ± 0.011 mg in the finasteride-treated group.

In the ventral prostate, it was observed that the glandular epithelial compartment percentage of 51.12 ± 2.02 in the control animals decreased to 43.90 ± 1.89 after finasteride treatment. Concurrently, the 48.87 ± 2.82 percentage of stromal compartment in the control group increased to 56.09 ± 1.89 in the finasteride-treated animals (Fig.5A). Shrinkage of the glandular epithelial compartment was due to a decreased percentage of both the epithelial (17.35 ± 0.89 to 15.03 ± 0.65), and the lumen (33.77 ± 2.20 to 28.87 ± 2.20) components. The increased percentage of stromal

compartment after finasteride therapy can be justified by both the increased percentage of the non-muscular stroma from 28.81 ± 1.84 to 32.04 ± 1.67 and the SMC from 20.06 ± 1.38 to 24.04 ± 1.32 (Fig.5B). Nevertheless, the smooth muscle layer thickness underwent to a decrease from 17.15 ± 0.34 to 15.13 ± 0.45 . The epithelium height decreased from 15.52 ± 0.30 to 11.11 ± 0.23 . The collagen layer present in the base of the epithelium was strikingly thicker (9.33 ± 0.29) than in control animals (2.75 ± 0.09) (Fig.5C). Thus, the morphometric and stereological data confirmed the light and transmission electron microscopy observation described above.

Discussion

Finasteride administration was capable of eliciting many alterations in tissue morphology of the gerbil ventral prostate, including modifications in the tissue architecture, ultrastructure and extracellular matrix. The epithelial alterations, including the reduced AP activity are indicative of a reduced androgen microenvironment. Since finasteride inhibits 5 α -r (Rittmaster et al., 1994; Prahalada et al., 1998), it is concluded that the systemic T levels during this treatment are insufficient to maintain AP expression (Tenniswood et al., 1976; Custódio et al., 2003). Thus, as previously reported in other rodent species (Di salle et al., 1995; Prahalada et al., 1998; Huynh, 2002) and dogs (Shibata et al., 2001; Sirinarumitr et al., 2001), it appears that the treatment with finasteride caused a significant decrease in intraprostatic DHT levels in the gerbil prostate and this resulted in profound consequences to the organ.

After 10 days of finasteride treatment, a notable shrinkage of the glandular epithelial compartment of gerbil ventral prostate occurred, as indicated by a decrease in the relative volume of the acini (epithelium plus lumen). Epithelial cells, which were tall columnar in vehicle-treated animals, became short and cuboidal. Such an inhibitory effect has been also observed previously and is manifested in changes in SGP2 transcript and protein levels as judged by *in situ* hybridization and immunohistochemistry (Astancolle et al. 2000). Thus, both orchiectomy and finasteride administration resulted in transition of the prostatic epithelium from columnar to the cuboidal, indicative of epithelial synthetic arrest. Associated with these epithelial changes, the stromal compartment increased becoming relatively thicker but less cellular than in control animals. This fact can be clearly explained by the increased relative volume of both non-muscular stroma (collagen, elastic system fibers and amorphous granular material) and a reduction in the thickness of the SMC layer. Moreover, there was a striking accumulation of collagen and associated amorphous

material adjacent to the epithelial structures, concurrently with the decreased thickness of the periacinar SMC.

This work shows that the finasteride effects on the morphological and histological composition of gerbil ventral prostatic compartments resembled some aspects observed in castrated adult rats (Hayward et al., 1996a; Carvalho and Line, 1996; Carvalho et al. 1997a, b; Vilamaior et al., 2000). The inhibition of the 5α -r activity in gerbil ventral prostates caused a reorganization and morphological modification of the collagen fibers, which became undulated and/or sinuous bellow the basal lamina and interspersed in between the loosely packed SMC. Carvalho and colleagues (1996, 1997a, b) demonstrated in the regressing prostate a comparable reorganization of collagen, elastic fibers and microfibrils, while laminin and collagen type IV remained associated with a thickened and multi-layered basal lamina and SMC with modified morphological features. The basement membrane ultrastructural alterations in the finasteride treated gerbil prostate were milder than those observed for in the ventral prostate of castrated rats (Carvalho and Line, 1996). However, the increase in the amorphous granular substance around the collagen fibers just bellow the epithelial structures and above the SMC layers following finasteride treatment is unique to the gerbil prostate.

Furthermore, even though finasteride undoubtedly reduces prostatic size, the involution rate of the gland is not comparable to that of castrated animals (Di Sale et al., 1995; Rittmaster et al., 1996). One of the most probable reasons for the observed differences is that systemic T by itself would not suffice to maintain prostatic homeostasis. Another possibility is that T would accumulate in the prostate of both animals and human after finasteride-treatment (Geller, 1990; Di Sale et al., 1995; Rittmaster et al., 1996; Huynh, 2002). Accumulated substrate may theoretically counteract the competitive inhibitors on the active site of the enzyme and reduce the inhibitory effects (Di Salle et al., 1993, Hirosumi et al., 1995). On the other hand, the observed alterations could be related to the production of estradiol by the enzyme aromatase, as a result of the increased

intraprostatic T levels after finasteride-treated. If estradiol is formed and kept in low concentrations it could exhibit a positive effect and retard prostatic regression, but one could anticipate later appearance of dysplastic growth and inflammation. On the other hand, it has been reported that estradiol treatment resulted in an increase of extracellular matrix proteins (collagen, non-collagenous proteins and elastin) (Nakada et al., 1994; Scarano et al., unpublished data), consistent with the present results.

The accumulation of the osmiophilic membranous multilamellae (fingerprint structures) in the pericellular space and cell periphery resembles ceramide-like deposits. Ceramide and their derivatives can accumulate after chemotherapy and irradiation treatments (Radin, 2002). In addition, Kimura et al. (2001) reported that drugs as tamoxifen, flutamide, cyproterone acetate and hydroxyflutamide induced ceramide accumulation and associated this with the undergoing apoptotic cell death (Bleicher and Cabot, 2002). While the current literature is involved with the biochemical evaluation of the ceramide accumulation, this is the first report on the ultrastructural arrangement of ceramide bodies formed during an anti-androgen therapy. These figures are highly similar to the ceramide- and glucosylceramide-rich lamellar bodies found in the stratum corneum of the skin (Reichelt et al., 1999). The association of these ceramide deposits with the cellular processes occurring in the prostatic epithelium will be considered in further studies.

Prostatic SMC have functional androgen receptors and modulate prostatic function by producing paracrine effectors for epithelial function under androgen stimulation (Hayward et al., 1996b). SMC also express 5 α -r (Steers, 2001) and the produced DHT is one of the factors of the epithelial-stromal interactions. It was proposed that the epithelium, in its turn, also produces soluble factors responsible for the maintenance of the SMC (Cunha et al. 1996). Inhibiting the 5 α -r activity we are interfering with the SMC-epithelial cross talk and then inducing the regressive changes in the epithelium. If the above mentioned paracrine scheme is right, then the SMC modifications

would result from the lack of signals from the epithelium that would be responsible for the maintenance of SMC differentiated and contractile phenotype. An alternative possibility is that the DHT formed by the action of 5α -r in the SMC would function as an autocrine regulator, interacting with the androgen receptors in the same SMC. Then T by itself would have only partial, if any, direct action on these cells. As a matter of fact, these two possibilities are not mutually exclusive, since different factors could be necessary for the maintenance of the SMC differentiate and contractile phenotype.

In response to physiological and pathological conditions, the SMC do usually present a shift from the contractile phenotype to a more synthetic phenotype (Doevedans and van Eys, 2002). This was previously described as a response of the ventral prostate SMC to estrogen (Zhao et al., 1992). Wong and Tam (2002) characterized the patterns of stromal remodelling in rats undergoing carcinogenesis in response to T and estradiol treatment. They observed changes in a number of SMC differentiation markers, and revealed a preferential loss of myosin, desmin and laminin besides marked morphological alterations in the smooth muscle associated with the dysplastic and malignant epithelium, and suggested that these cells are involved in the hormone-induced carcinogenesis process.

If this transition involves a dedifferentiation process is still a matter of debate, specially because of the use of different molecular markers (Boesch et al., 1999; Doevedans and van Eys, 2002).

Besides the alterations of the SMC, it seems that most of the extracellular matrix modifications occur in an intermediate region between the base of the epithelium and the SMC layers. This event distinguishes the present model from the usual castration model using rats, in which a clear association between the SMC and collagen fibers was described (Vilamaior et al., 2000). Additionally, the granular amorphous material which concentrates around collagen fibers in

this region does not react with basic dyes at both light and electron microscopy levels and may represent a novel component not yet describe in the prostatic stroma.

These results, in association with the easy handling of the animals plus the anatomical characteristics of the prostatic complex (Pinheiro et al. 2003), and the presence of the female counterpart of this organ (Santos et al., 2003, Custodio et al., 2003) make the gerbil an excellent model system for those interested in prostate biology.

Acknowledgements

This study is part of a thesis presented by L.S.C. to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirements for a Master degree, and was supported by fellowship from the Brazilian agency CAPES. S.R.T. received grants from FAPESP. The authors express their gratitude to Luiz Roberto Faleiros Jr. and Rosana Silistino de Souza for the technical assistance and to Dr. Álvaro Luis Hattnghner for english revision. Thanks are also due to Dr. Anne A Donjacour and Dr. Y Z Wang for helpful suggestions to the initial form of the manuscript.

References

- Antonioli, E., Della-Colleta, H.H.M. and Carvalho, H.F. (2003) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* – Accepted for publication.
- Astancole, S., Guidetti, C., Pinna, C., Corti, A. and Bettuzzi S. (2000) Increased levels of clusterin (SGP-2) mRNA and protein accompany rat ventral prostate involution following finasteride treatment. *J Endocrinol* 167:197-204.
- Berthaut, I., Mestayer, C., Portois, M.C., Cussenot, O. and Mowszowicz I. (1997) Pharmacological and molecular evidence for the expression of the two steroid 5 α -reductase isozymes in normal and hyperplastic human prostatic cells in culture. *Prostate* 32:155-163.
- Bleicher, R.J. and Cabot, M.C. (2002) Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 1585:172-178.
- Boesch, S.T., Corvin, S., Zhang, J., Rogastsch, H., Bartsch, G. And Klocker, H. (1999) Modulation of the differentiation status of cultured prostatic smooth muscle cells by an α 1-adrenergic receptor antagonist. *Prostate* 39: 226-233.
- Bruchovsky, N. and Wilson, J.D. (1999) Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. *Steroids* 64: 753-759.
- Carson, C. and Rittmaster, R. (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61 (Suppl 4):2-7.
- Carvalho, H.F. and Line, S.R.P. (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20:809-819.
- Carvalho, H.F., Vilamaior, P.S.L. and Taboga, S.R. (1997a). Elastic system fibers of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* 32:27-34.
- Carvalho, H.F., Vilamaior, P.S.L. and Taboga, S.R. (1997b). Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibrils network of the prostatic stroma. *Tissue Cell* 29:163-170.

- Cotta-Pereira, G., Rodrigo, F.G. and David-Ferreira, J.F. (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* 51:7-11.
- Cordeiro, R.S., Scarano, W.R., Góes, R.M. and Taboga, S.R. (2003) Tissular alterations in the Guinea pig prostate following the antiandrogen flutamide therapy. *Bio Cell* (in press).
- Cunha, G.R., Hayward, S.W. and Wang, Y.Z. (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70:473-485.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Dahiya, R. and Foster, B.A. (1996) Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155:5-17.
- Custódio, A.M., Góes, R.M. and Taboga, S.R. (2003) Acid phosphatase activity in gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate: comparative study in female and male glands during postnatal development. *Cell Biol Int* (in press).
- Di Sale, E., Giudici, D., Briatico, G., Ornati, G. and Panzeri A. (1993) Hormonal effects of turosteride, a 5 α -reductase inhibitor, in the rat. *J Steroid Molec Biol* 46:549-555.
- Di Sale, E., Giudici, D., Biagini, L., Cominato, C., Briatto, G. and Panzeri A. (1995) Effects of 5 α -reductase inhibitors on intraprostatic androgens in the rat. *J Steroid Molec Biol* 53(1):381-385.
- Doevedans, P.A. and van Eys, G. (2002) Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovascular Res* 54:499-502
- Ekman, P. (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl* 10:14-18.
- Geller, J. (1990) Effects of finasteride, a 5 α -reductase inhibitor on prostate tissue androgens and prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1552-1555.
- Hayward, S.W., Cunha, G.R. and Dahiya R. (1996a) Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 784:50-62.
- Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Foster, B.A., Cunha, A.R., Dahiya, R., Prins, G.S. and Cunha G.R. (1996b) Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155:94-103.

- Hayward, S.W., Rosen, M.A. and Cunha, G.R. (1997) Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 (Suppl.2):18-26.
- Hirosumi, J., Nakayama, O., Chida, N., Inami, M., Fagan, T., Sawada, K., Shigematsu, S., Kojo, H., Notsu, Y. and Okuara, M. (1995) FK 143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: (2) in vivo effects on rats and dog prostates. *J Steroid Biochem Molec Biol* 52 (4):365-373.
- Huynh, H. (2002) Induction of apoptosis in rat ventral prostate by finasteride is associated with alteration in MAP kinase pathways and Bcl-2 related family of proteins. *Int J Oncol* 20:1297-1303.
- Kimura, K., Markowski, M., Bowen, C. and Gelmann, E.G (2001) Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells. *Cancer Res* 61:5611-5618.
- Marks, L.S., Partin, A.W., Dorey, F.J., Gormley, G.J., Epstein, J.I., Garriss, J.B., Macairan, M.L., Shery, E., Santos, P.B, Stoner, E. and Dekernion, J.B. (1999) Long-term effects of finasteride on prostate tissue composition. *Urology* 53 (3):574-580.
- Nakada, T., Kubota Y., Sasaqawa, I., Suzuki, H., Watanabe, M. and Suzuki, Y. (1994) The effects of oestradiol-17 β on connective tissue protein in rat prostate. *Int Urol Nephrol* 26:327-335.
- Pinheiro, P.F.F., Almeida, C.C.D., Segatelli, T.M., Martinez, M., Padivani, C.R. and Martinez, F.E (2003) Structure of the pelvic and penile urethra-relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Anat* 202: 431-444.
- Prahalada, S., Rhodes L., Grossman, S.J., Heggan, D., Keenan, K.P., Cukiersky, M.A., Hoe, C.M., Berman, C. and Zwieten, M.J. (1998) Morphological and hormonal changes in the ventral and dorsolateral prostatic lobes of rats treated with finasteride, a 5- α reductase inhibitor. *Prostate* 35:157-164.
- Radin, N.S. (2002) Cancer progression in the kidney and prostate: vital roles of shingolipids in chemotherapy. *Urology* 60:562-568.

- Reichelt, J., Doering, T., Schnetz, E., Fartach, M., Sandhoff, K. and Magin, T.M. (1999) Normal ultrastructure, but altered stratum corneum lipid and protein composition in a mouse model for epidermolytic hyperkeratosis. *J Inv Dermatol* 113 (3):329-334.
- Rittmaster, R.S. (1994) Drug therapy: finasteride. *N Engl J Med* 330:120-125.
- Rittmaster, R.S., Norman R.W., Thomas L.N. and Rowden G. (1996) Evidence for atrophy and apoptosis in the prostate of men given finasteride. *J Clin Endocrinol Metab* 81:814-819.
- Rumpold, H., Untergasser, G., Madersbacher, S. and Berger, P. (2002) The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. *Exp Gerontol* 37:1001-1004.
- Santos F.A., Góes, R.M., Carvalho, H.F. and Taboga, S.R. (2003) Structural, cytochemistry and ultrastructural characterization of the stromal and epithelium compartment of the gerbil female prostate (*Meriones unguiculatus*). *Tissue & Cell*. 2003. In press.
- Shibata, Y., Fukabori, Y., Ito, K., Suzuki, K. and Yamanaka, H. (2001) Comparision of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *J Urol* 165:289-293.
- Sirinarumitr, K., Johnston, S.D., Kustritz, M.V., Johnston, G.R., Sarkar, D.K. and Memon, M.A. (2001) Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hyperplasia. *JAVMA* 218 (8):1275-1279.
- Sung, S.Y. and Chung W. (2002) Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanisms and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation* 70:506-521.
- Steers, W. (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl. 6A):17-24.
- Taboga, S.R. and Vidal, B. C. (2003) Collagen fibres in humam prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35 (1):1-6.
- Tenniswood, M., Bird, C.E. and Clark, A.F. (1976) Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can J Biochem* 54:350-357.

- Vilamaior, P.S.L., Felisbino, S.L., Taboga, S.R. and Carvalho, H.F. (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258.
- Weibel, E.R. (1978) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*. 12:131-155.
- Wong, Y.C. and Tam, N.N.C. (2002) Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation* 70:633-645.
- ~~Zhao, G.Q., Holterhus, P.M., Dammshäuser, I. Hofbauer, G. and Aumüller, G. (1992) Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21:183-199.~~

Figures captions

Figure 1. 1A - 1E: Hematoxylin-eosin stain. *A and B: Control group.* **A:** General aspect of ventral prostate exhibiting acini (a) and periacinar smooth muscle (sm) layer, which is surrounded by in the connective tissue - stromal (s) compartment. 180x. **B:** The epithelium (ep) wall tall columnar and active in the secretory activity - blebs (arrow). Smooth muscle (sm) densely packed with thin scant collagen fibers (co) interspersed in between SMC. 900x. *C - E: Finasteride-treated group.* **C:** Aspect of ventral prostatic acini with a decreased lumen (l). Collagen fibers (co) accumulation is seen surrounding the epithelium. 180x. **D:** Increased density of collagen (co) adjacent to the epithelial structures. Some SMC assumed an irregular wrinkled contour with numerous spine-like cytoplasmic projections (arrow). Fibroblast (arrowhead). 900x. **E:** Collagen fiber (co) accumulation adjacent to the short cuboidal epithelial cells (ep). Collagen fibers have become denser, more undulated and sinuous. Fibroblasts (arrowheads). Loose periacinar smooth muscle layer exhibits SMC on altered fusiform shape. 900x. **1F - 1J: Gömöri's reticulin method.** *F: Control group.* **F:** Straight and aligned reticular fibers (arrows) in the basal aspect of the epithelium (ep) and interspersed in between SMC. 900x. *G - J: Finasteride-treated group.* **G:** Reticular fibers become denser, wavy and/or curly (arrow) in periacinar region and interspersed in between SMC, assuming a sinuous aspect (thick arrow) 900x. **H:** Collagen (co) accumulation around the epithelial structures (ep) and reticular fiber (thick arrow) among SMC. 350x. **I:** In the interacinar region, thin reticular fibers (arrows) having a loose and thin texture. 725x. **J:** Curly and/or wavy reticular fibers (thick arrows) interspersed in between SMC. 725x. **1K - 1M: Enzymatic histochemistry - Acid phosphatase activity.** **K:** Negative control of the enzymatic reaction. Epithelium (ep). 725x. **L:** Intense AP activity in the epithelium (ep) of vehicle-treated animals ventral prostate. 725x. **M:** Very low AP activity in the prostatic epithelium (ep) of finasteride-treated animals. 725x.

Figure 2. TEM of the control ventral prostate. 2A – 2D: Control group. **A:** Epithelial cells (ep) with a great number of secretory vesicles (v). Nucleus (N). Between the epithelium and the densely packed layer SMC are fibroblasts (arrow) with slender cytoplasmic process associated with collagen fibrils (co). 5000x. **B:** Collagen fibrils (co) intimately associated with the thin basal lamina (arrowhead) and SMC. 22000x. **C:** SMC layer well organized and densely packed interspersed with the amorphous granular ground substance (*). 16300x. **D:** Collagen fibrils (co) arranged in different directions at the interface between epithelial (ep) and SMC. 13500x. **2E – 2H Finasteride-treated group.** **E:** Epithelial cells (ep) showing osmiophylic membranous structures along the lateral membrane and in the cytoplasm periphery (arrow). 15500x. **F:** Osmiophylic membranous structure along lateral membrane and intercellular space. 28000x. **G:** Osmiophylic membranous structures at the base of epithelium cell (arrows). Nucleus (N). 24500x. **H:** High magnification of the osmiophylic membranous structures with concentric ceramide-like deposits. 180000x.

Figures 3. TEM of the finasteride-treated ventral prostate. **A:** Epithelial cells (ep) exhibiting a decreased cytoplasmic volume and reduction in secretory vesicles (v), showing lateral membrane interdigitations (arrow). Increased amounts of collagen fibrils (co) and dilated cytoplasmic process of fibroblast (thick arrow). Prominent basal lamina (arrowhead). Nucleus (N). 9000x. **B:** Region between the epithelial cells (ep) and SMC showing the increase of both collagen fibrils (co) and amorphous granular ground substance (*). 14000x. **C:** The increased collagen fibril layer (co) in register with an epithelial infolding. Fibroblast (F). Epithelial cell nucleus (N). 10900x. **D:** Collagen fibrils (co) intimately associated to the basal lamina (arrowhead) and scattered throughout the amorphous granular ground substance (*). 35000x. **E:** SMC exhibiting a condensed cytoplasm, Golgi stacks (GS) in the perinuclear region (N) and small inconspicuous caveolae (arrows) in the cell membrane surface. Collagen fibrils (co). 18000x. **F:** Dedifferentiated SMC exhibiting the

wrinkled contour with numerous short, irregular spine-like projections, which are in close association with collagen fibrils (co). Mitochondria (M). Caveolae (arrows). 29800x.

Figure 4. TEM of the finasteride-treated ventral prostate. A: Fibroblast with an enlargement of the perinuclear space (*) and prominent Golgi stacks (GS). Collagen fibrils (co) and a site of elastin deposition (arrow) associated with microfibrillar elements. Nucleus (N). 29800x. **B:** Prominent epithelial basal lamina (arrowheads). Abundant collagen fibrils (co), dilated cytoplasmic processes of fibroblast (arrow), some extracellular microfibrils (thick arrow) and thin elastic fibers in a sagittal section (double arrowhead). 31000x. **C:** Short elastic fiber (E). Collagen fibrils (co) arranged in different directions. Sites of elastin deposition associated with fibrillin (arrows). 38500x.

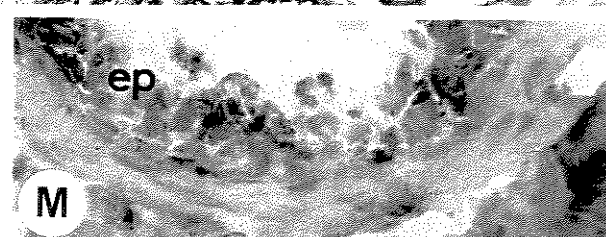
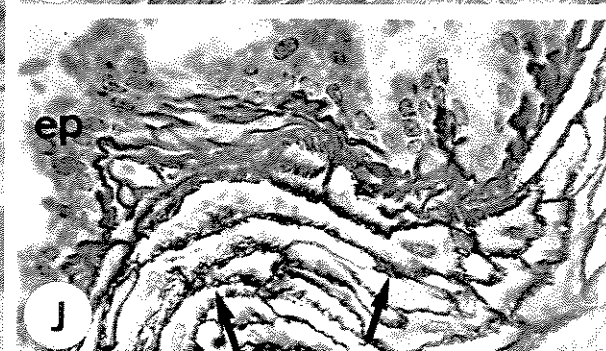
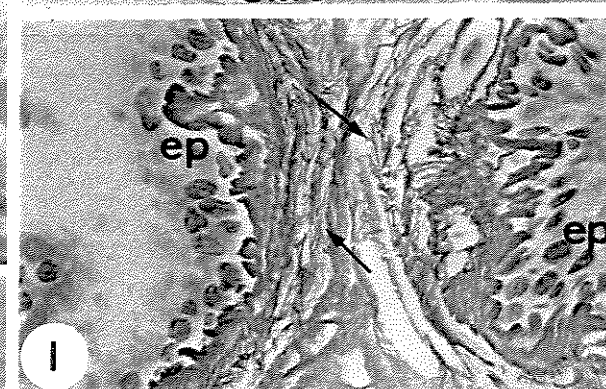
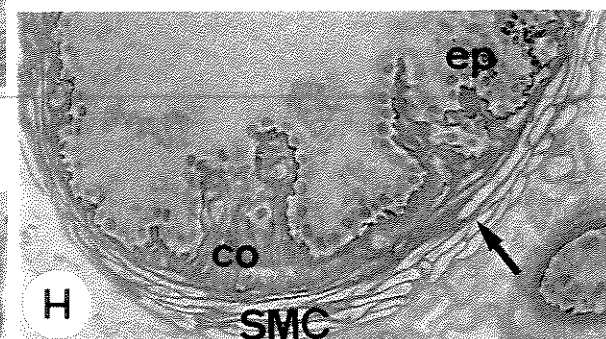
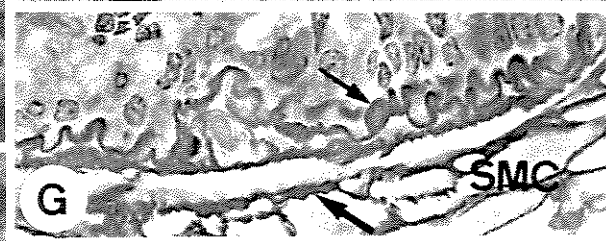
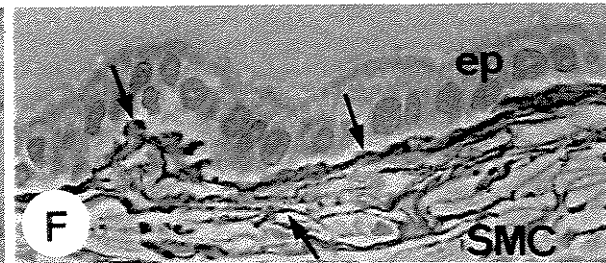
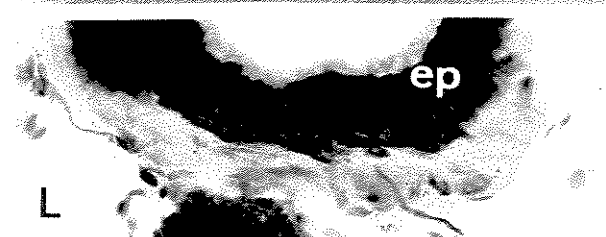
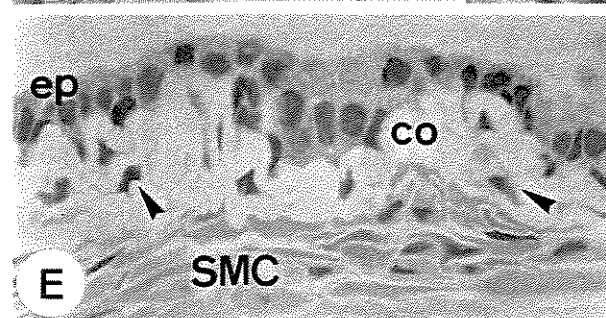
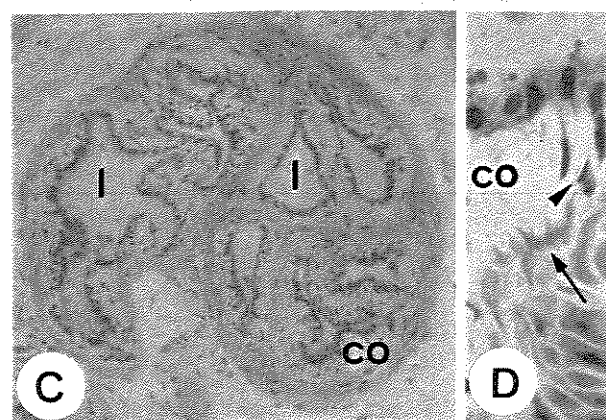
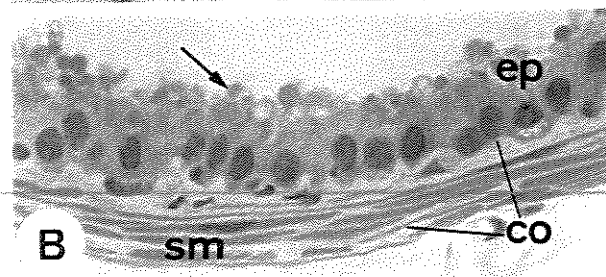
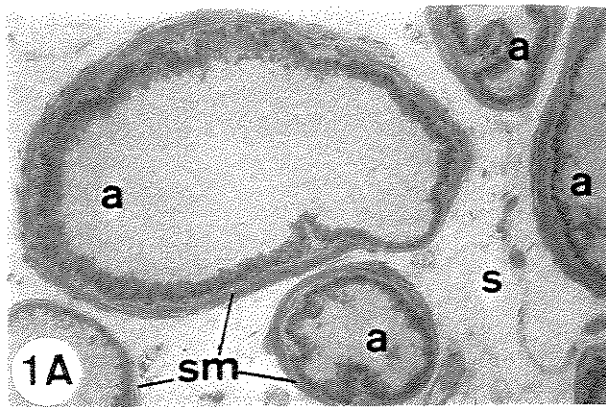
Figure 5. A: Relative frequency of adult gerbil ventral prostatic compartments (mean and SE). On the finasteride-treated group there was a significant ($*p<0.05$) decrease of the glandular epithelial compartment concurrent with a significant ($*p<0.05$) increase of the stromal compartment, as compared to control group. **B:** Relative frequency of ventral prostate tissue components (mean and SE). The percentage of the epithelium and lumen from finasteride-treated ventral prostates underwent a significant ($*p<0.05$) and a nonsignificant decrease, respectively. The percentages of the non-muscular stroma (not significant) and SMC ($*p<0.05$) increased. **C:** Thickness of prostatic acini components (mean and SE). A highly significant ($**p<0.000001$) decrease was observed in the prostatic epithelium height of finasteride treated group and a highly significant increase was also noticed in collagen thickness adjacent to the epithelial structures. The periacinar smooth muscle (SM) underwent a highly significant decrease, as compared to control group.

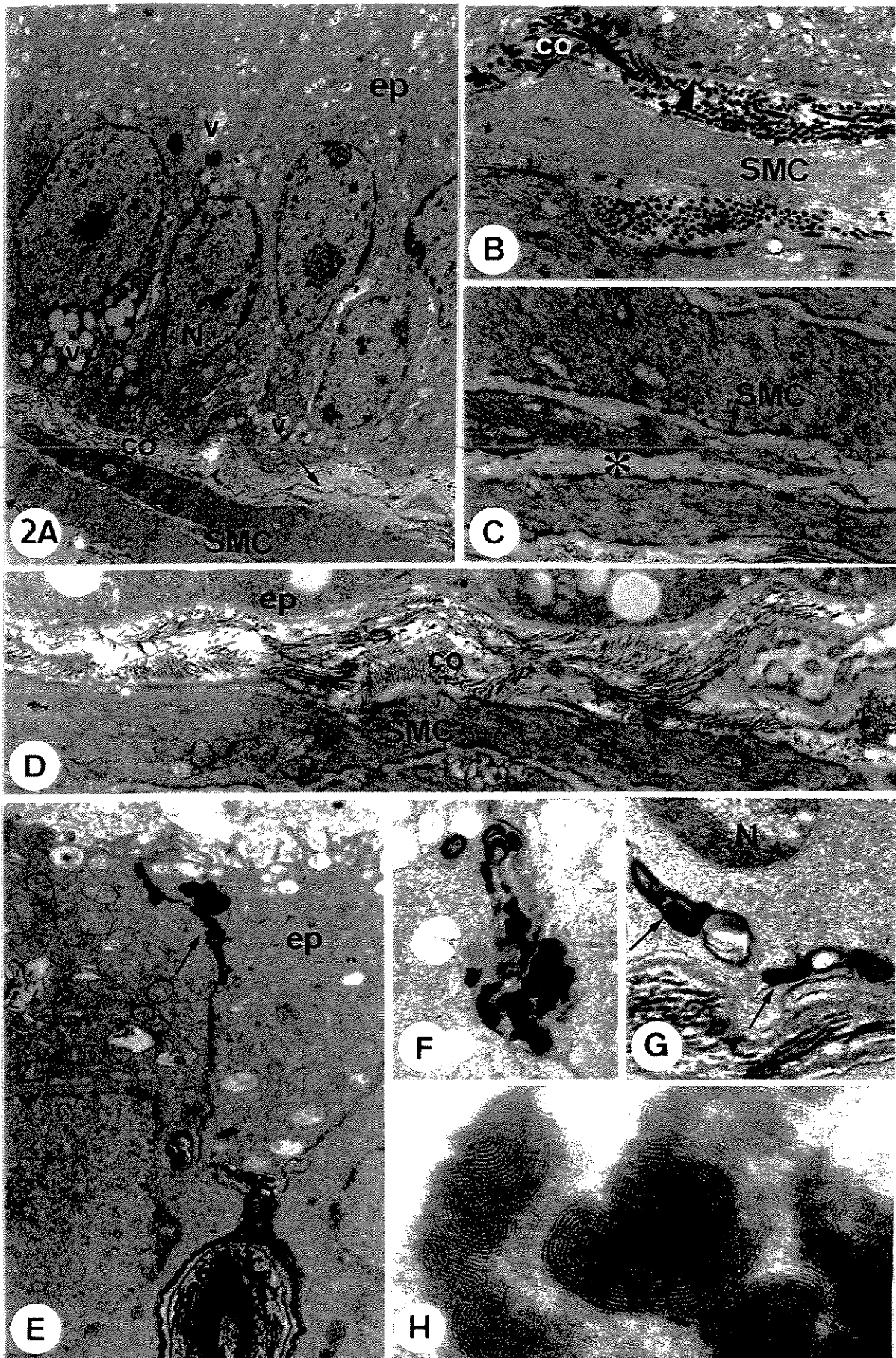
Table I

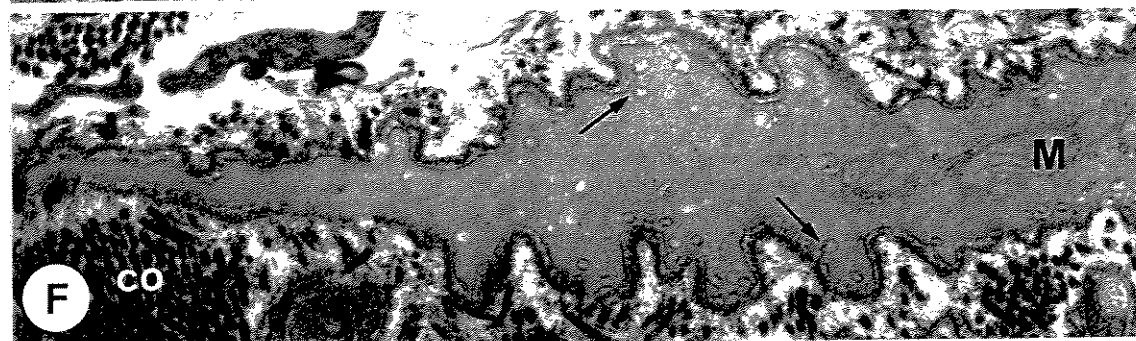
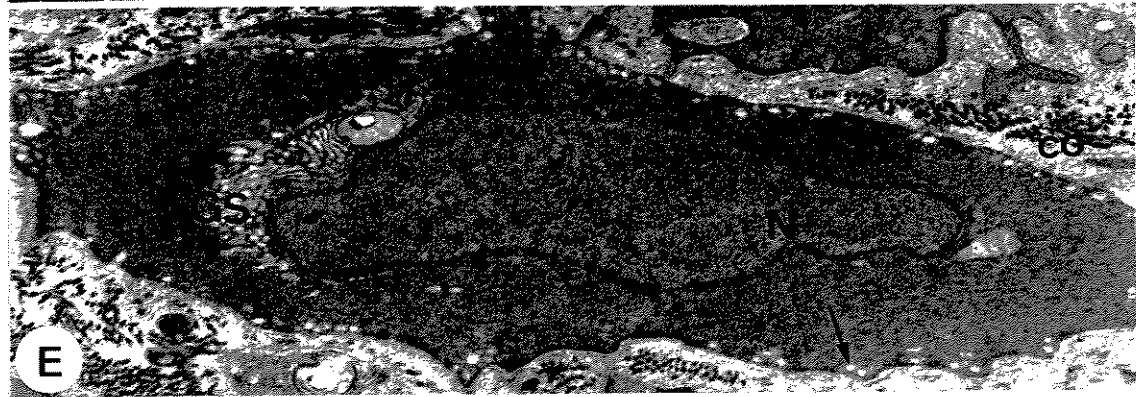
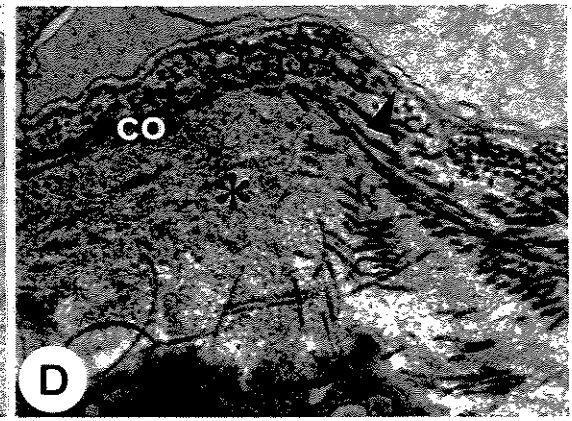
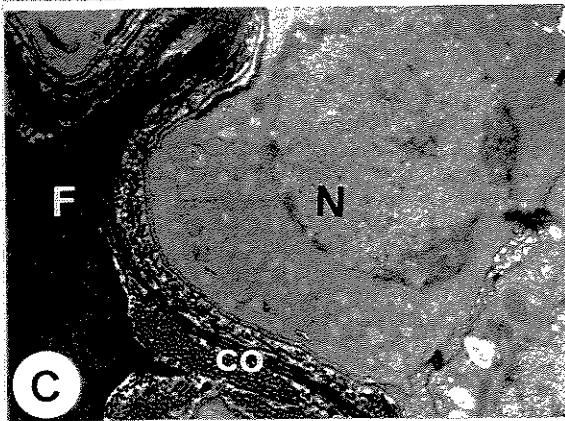
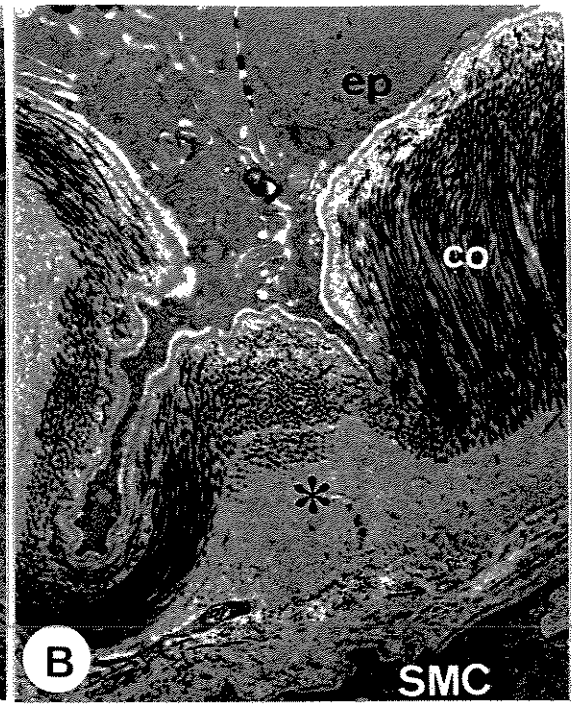
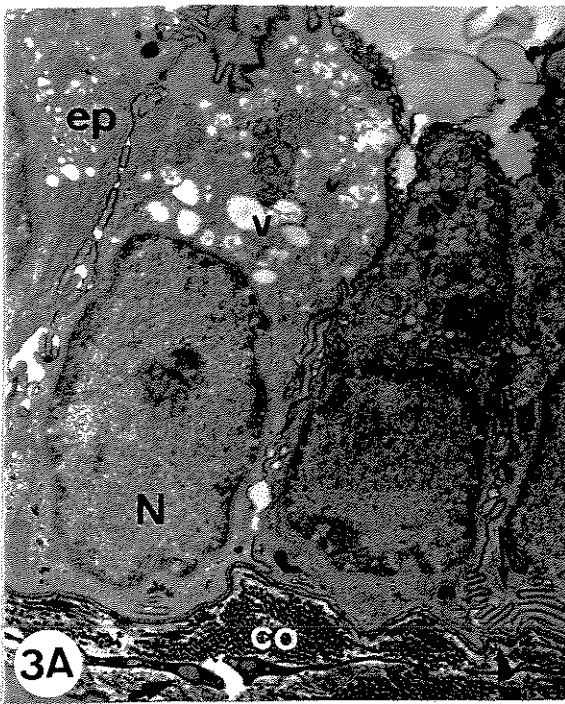
Numeric values of the prostatic complex absolute weight (g) and morphometric-stereological data finasteride effects evaluation in the adult gerbil ventral prostates.

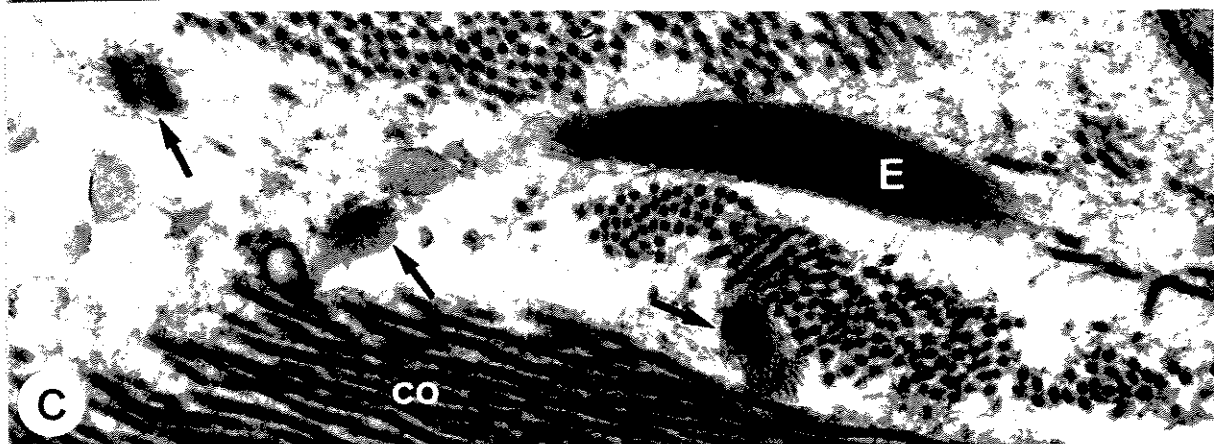
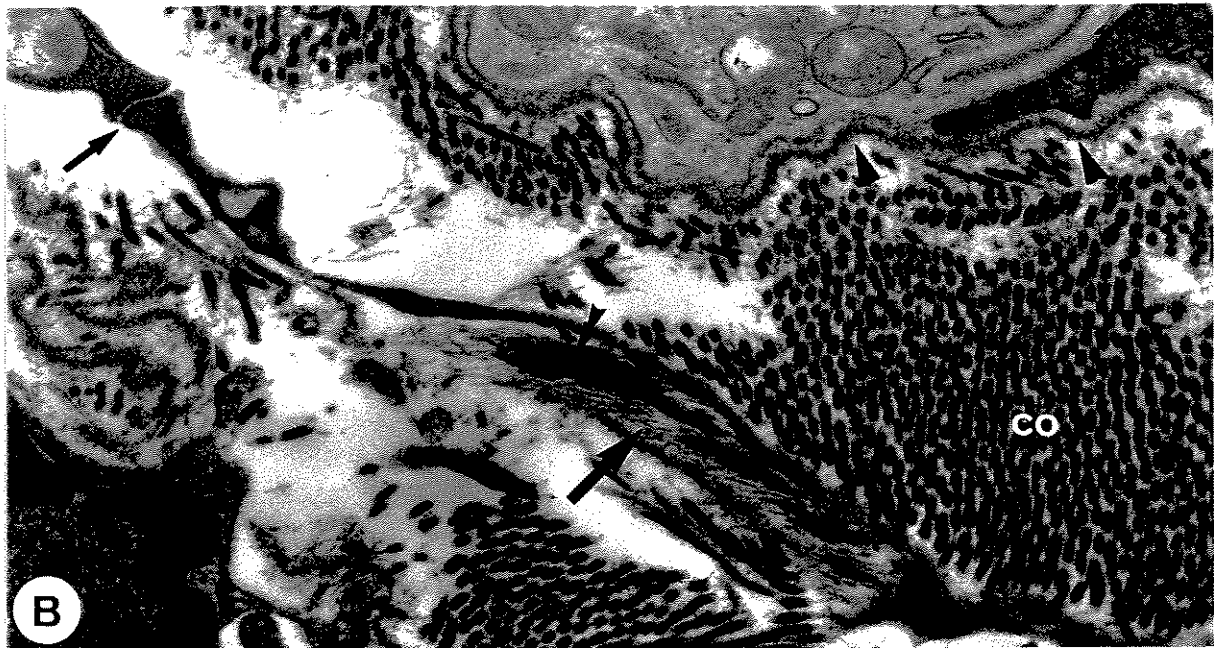
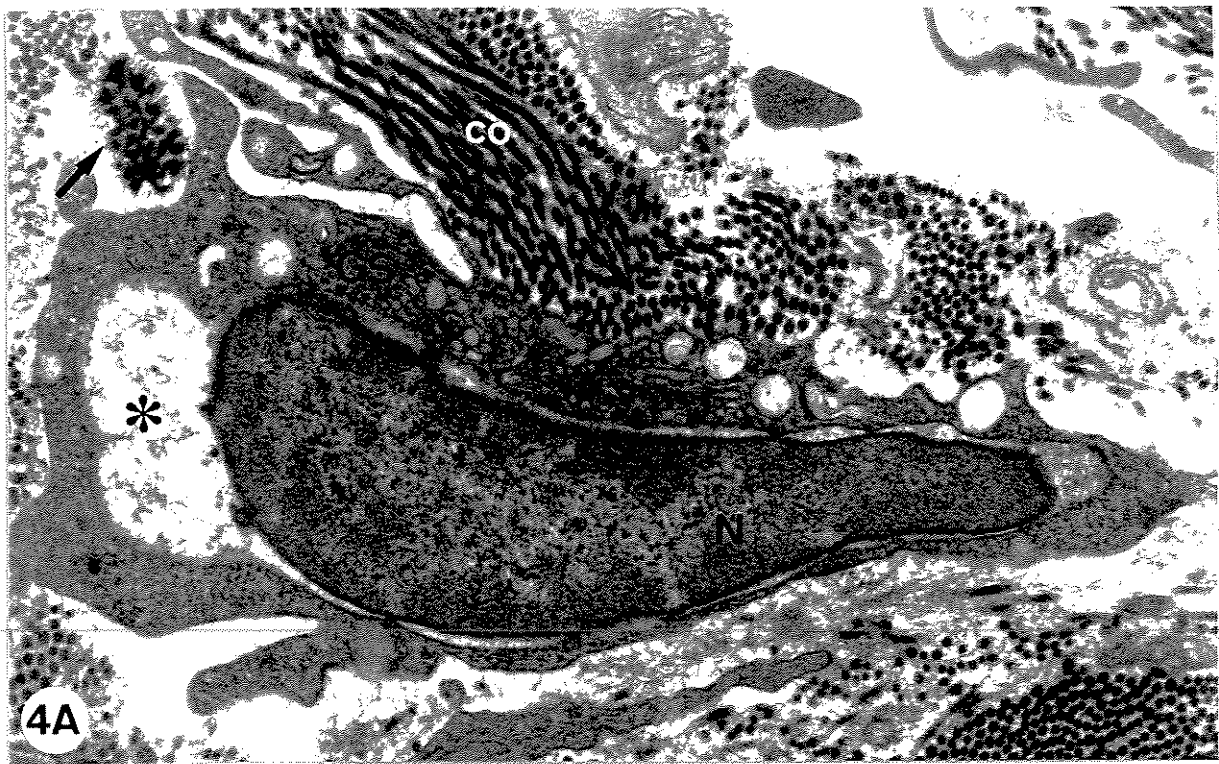
Prostatic measurements	Groups	
	<i>Control</i>	<i>Finasteride</i>
<i>Prostatic complex weight (mg)¹</i>	0.715 ± 0.23	0.133 ± 0.011*
<i>Percentage of compartment (%)²</i>		
Glandular epithelial	51.12 ± 2.02	43.90 ± 1.89*
Stromal	48.87 ± 2.02	56.09 ± 1.89*
<i>Percentage of tissues components (%)²</i>		
Epithelium	17.35 ± 0.89	15.03 ± 0.65*
Lumen	33.77 ± 2.20	28.87 ± 2.02
Non-muscular stroma	28.81 ± 1.84	32.04 ± 1.67
Smooth muscle cells (SMC)	20.06 ± 1.38	24.04 ± 1.32*
<i>Morphometry (μm)</i>		
Epithelium height	15.52 ± 0.30	11.11 ± 0.23**
Collagen thickness adjacent to epithelial structures	2.75 ± 0.09	9.33 ± 0.29**
Smooth muscle (SM) layer thickness	17.15 ± 0.34	15.13 ± 0.45**

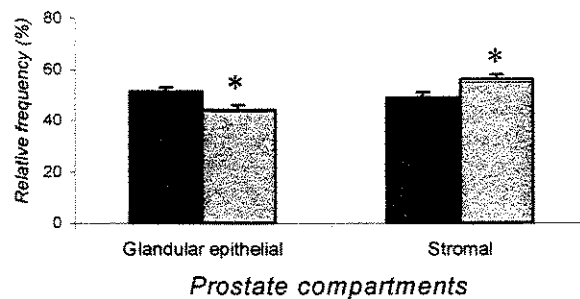
Values represent mean ± SE. ¹Statistical analysis based on *t*-test. ²Statistical analysis based on the Anova and Tukey Tests. * Significant ($P \leq 0.05$), ** High Significant ($P \leq 0.0000001$) vs. vehicle-treated group.



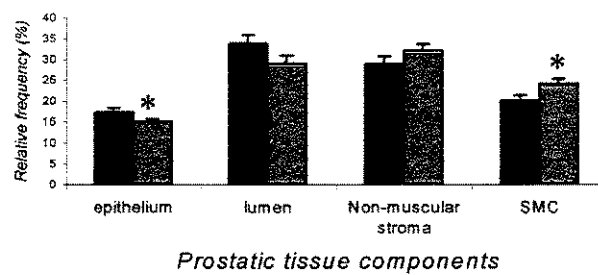




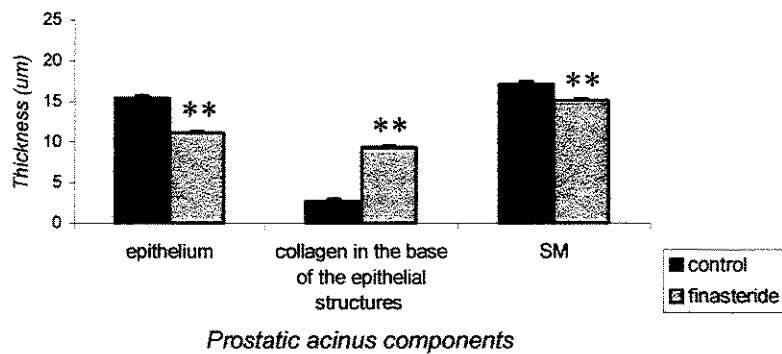




5A



B



C

1. A inibição da enzima 5α -redutase pela finasterida promoveu um desbalanço nas interações homeostáticas entre o epitélio e o estroma prostáticos, causando modificações epiteliais e reorganização estromal.
2. No compartimento glandular houve redução de tamanho e diminuição de atividade secretora, comprovando esta função prostática ser altamente dependente do andrógeno diidrotestosterona.
3. A notável presença de depósitos multilamelares, semelhantes a depósitos de ceramidas, nos espaços intercelulares e pericelulares do epitélio, relaciona-se com a resposta citotóxica da terapia anti-androgênica da finasterida.
4. O compartimento estromal apresentou-se diferentemente organizado, assumindo um aspecto mais frouxo e menos denso. Uma remodelação das fibras colágenas e reticulares associada ao fenótipo desdiferenciado das células musculares lisas demonstra que os hormônios exercem papel fundamental para a manutenção da integridade prostática.
5. O uso da finasterida revela-se como uma eficiente ferramenta para o estudo da fisiologia androgênica e seu papel na manutenção da próstata normal, uma vez que sua ação de inibidora sobre a 5α -redutase, impede a formação do principal hormônio intraprostático.
6. Parte dos resultados obtidos neste estudo fortalecem o papel da finasterida como um agente redutor dos sintomas da hiperplasia benigna prostática, pois corroboram dados alcançados em pacientes portadores desta doença tratados com a referida droga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aumüller, G. & Seitz, J. (1990) Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int Rev Cytol* 121:127-231.
- Azzolina, B., Ellsworth, K., Andersson, S., Geissler, W., Bull, H.G., Harris, G.S. (1997) Inhibition of rat α -reductase by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Molec Biol* 61(1-2):55-64.
- Bonkhoff, H., Stein, U., Aumüller, G., Remberger, K. (1996) Differential expression of 5α -reductase isozymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *Prostate* 29:261-267.
- Carson, C. & Rittmaster, R. (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61 (Suppl 4):2-7.
- Carvalho, H.F. & Line, S.R.P. (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20:809-819.
- Carvalho, H.F., Taboga, S.R., Vilamaior, P.S.L. (1997a) Collagen type VI is a component of extracellular matrix microfibril network of prostatic stroma. *Tissue Cell* 29:163-170.
- Carvalho, H.F., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R. (1997b) Elastic system of the ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* 32:27-34.
- Coffey, D. (1998) What is the prostate and what is it function? In: *Handbook of Andrology*. Allen Press, KS, pp21-24.
- Colombel, M.C. & Buttyan, R. (1995) Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. In: Schwartz LM, Osbone BA, Eds. *Methods in Cell Biology Cell Death V 46* Academic Press, NY, pp369-385.

- Cunha, G.R., Bigsby, R.M., Cooke, P.S., Sugimura, Y. (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ* 17:137-148.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Dahiya, R., Foster, B.A. (1996) Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155:5-17.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z. (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70:473-485.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.L., Epstein, J.I., Coffey, D.S. (1998). Prostate stem cell compartment: Expression of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol* 153(3):911-919.
- Doevendans, P.A. & van Eys, G. (2002) Smooth muscle cell on the move: the battle for actin. *Cardiovasc Res* 54:499-502.
- Droller, M.J. (1997) Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol* 79:42-52.
- Ekman, P. (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl* 10:14-18.
- Farnsworth, W.E. (1999) Prostate stroma: physiology. *Prostate* 38:60-72.
- Galbraith, S.M. & Duchesne, G.M. (1997) Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur J Cancer* 33(4):545-554.
- Geller, J. (1990) Effects of finasteride, a 5-alpha-reductase inhibitor, on prostate tissue androgens and prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1552-1555.
- Giffiths, K., Morton, M.S., Nicholson, R.I. (1997) Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 32:24-40.

- Harris, G.S. & Kozarich J.W. (1997) Steroid 5 α -reductase inhibitors in androgen-dependent disorders. *Curr Opin Chem Biol* 1: 254-259.
- Hayward, S.W., Rosen, M.A., Cunha, G.R. (1997) Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 (Suppl):18-26.
- Hedlund, P.O. (2000) Side effects of endocrine treatment and their mechanism: castration, antiandrogens and estrogens. *Prostate Suppl* 10:32-37
- Hsing, A.W., Reichardt, J.K.V., Stanczyk, F.Z. (2002) Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52:213-235.
- Horsfall, D.J., Mayne, K., Ricciardelli, C., Rao, M., Skinner, J.M., Henderson, D.W., Marshall, V.R., Tilley, W.D. (1994) Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* 70 (Suppl):753-793.
- Iehlé, C., Radvanyi, F., Medina, S.G.D., Ouafik, L.H., Gerard, H., Chopin, D., Raynaud, J., Martin, P.M. (1999) Differences in steroid 5 α -reductase iso-enzyme expression between normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:189-195.
- Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C. (1982) An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3:81-97.
- Karr, J.F., Kantor, J.A., Hand, P.H., Eggensperger, D.L., Scholm, J. (1995) The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and expression of recombinant human prostate-specific antigen in transfected murine cell line. *Cancer Res* 55:2455-2462.
- Kirby, R.S., Christmas, T.S., Brawer, M. (1996) Prostate cancer. Mosby ed. London, 170p.
- Kreis, T. & Vale, R. (1999) Guidebook to the extracellular matrix anchor, and adhesion proteins. New York: Oxford University Press.

- Laroque, P.A., Phahalada, S., Gordon, L.R., Noblot, S.M., Bagdon, W.J., Duprat, P., Peter, C.P., Van Zwieten, M.J. (1994) Effects of chronic oral administration of selective 5 alpha-reductase inhibitor, finasteride, on the dog prostate. *Urology* 43(5):680-685.
- McNeal, J.E. (1983) The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monographs in Urology* 4:3-37.
- Nemeth, J.A. & Lee, C. (1996) Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* 28:124-128.
-
- Prahalada, S., Rhodes L., Grossman, S.J., Heggan, D., Keenan, K.P., Cukiersky, M.A., Hoe, C.M., Berman, C., Zwieten, M.J. (1998) Morphological and hormonal changes in the ventral and dorsolateral prostatic lobes of rats treated with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Prostate* 35:157-164.
- Pollard, M. & Luckert, P.H. (1987) Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate* 11:219-227.
- Prins, G.S., Birch, L., Greene, G.L. (1991) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129:3187-3199.
- Price, D. (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr* 12:1-27.
- Reese, J.H., McNeal, J.E., Redwine, E.A., Samloff, I.M., Stamey, T.A. (1986) Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesical. *J Urol* 136:1148-1152.
- Rittmaster, R.S. (1994). Finasteride (review article). *N Engl J Med* 330(2):120-125.
- Rosai, J. (1996) Male reproductive system. In: J. Rosai ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby-Year, INC., 8ed., St.Louis-USA, 1:1221-1256.

- Rumpold, H., Untergasser, G., Madersbacher, S., Berger, P. (2002) The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. *Exp Gerontol* 37:1001-1004.
- Shapiro, E., Hartanto, V., Becich, M.J., Lepor, H. (1992) The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic BPH. *J Urol* 147:1293-1297.
- Shibata, Y., Fukabori, Y., Ito, K., Suzuki, K., Yamanaka, H. (2001) Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *J Urol* 165:289-293.
- Stege, R. (2000) Potencial side-effects of endocrine treatment of long duration in prostate cancer. *Prostate (Suppl 10)*:38-42.
- Sugimura, Y., Cunha, G.R., Donjacour, A.A. (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34:961-971
- Sung, S.Y. & Chung, W. (2002) Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation* 70:506-521.
- Steers, W. (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl 6A):17-24.
- Taplin, M.E. & Ho, S. (2001) The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metabol* 86(6):3467-3477.
- Thomson, A.A., Timms, B.G., Baton, L., Cunha, G.R. (2002) The role of smooth muscle in regulation prostatic induction. *Development* 129:1905-1912.

- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Rowley, D.R. (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166:2472-2483.
- Vilamaior, P.S.L., Felisbino S.R., Taboga, S.R., Carvalho, H.F. (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: An possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258.
- Williams, W.M. (1974) The anatomy of Mongolian Gerbil. Tumblebrook Fram, Inc., USA. 107p.
-
- Wong, Y.C. & Tam, N.N.C. (2002) Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation* 70:633-645.
- Worth, N.F., Rolfe, B.E., Song J., Campbel G.R. (2001) Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 49:130-145.
- Zanetoni, C. (2002) Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*): aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas-SP. 61p.
- Zhao, G.Q., Holterhus, P.M., Dammshäuser, I., Hoffbauer G., Aumüller, G. (1992) Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21:183-199.