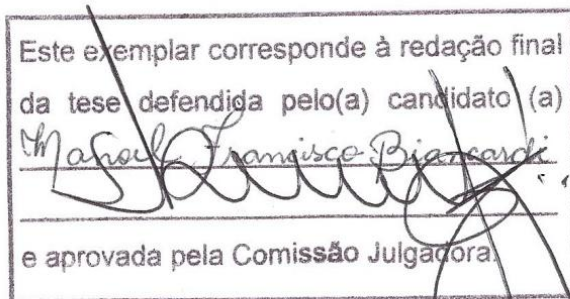




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MANOEL FRANCISCO BIANCARDI

**AÇÃO ANDROGÊNICA INTRA-UTERINA E
PÓS-NATAL SOBRE A PRÓSTATA DE ROEDORES**



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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Campinas, 2010

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

B47a

Biancardi, Manoel Francisco

Ação androgênica intra-uterina e pós-natal sobre a próstata de roedores / Manoel Francisco Biancardi. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testosterona. 2. Próstata - Desenvolvimento. 3. Disruptores endócrinos. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Intrauterine and postnatal androgen action on the rodents prostate.

Palavras-chave em inglês: Testosterone; Prostate - Development; Endocrine disruptors.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Sebastião Roberto Taboga, Hélio Chiarini-Garcia, Luis Antonio Justulin Junior.

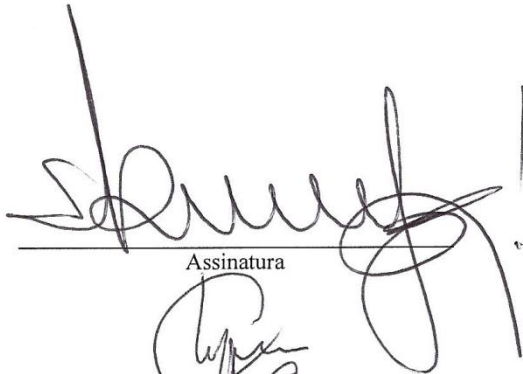
Data da defesa: 18/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 18 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)

A large, stylized handwritten signature in dark ink, featuring a prominent vertical stroke on the left and a complex, swirling pattern on the right.

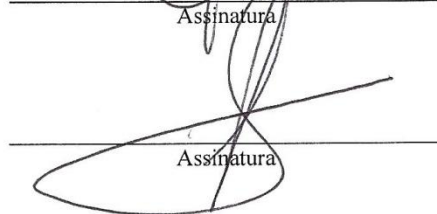
Assinatura

Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia

A smaller, more compact handwritten signature in dark ink, with a circular loop at the top and a horizontal base.

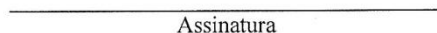
Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

A handwritten signature in dark ink, characterized by a large, sweeping loop on the left and a vertical stroke on the right.

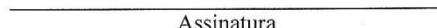
Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

A horizontal line indicating the space for a signature.

Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

A horizontal line indicating the space for a signature.

Assinatura

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela sua inestimável amizade e por confiar no meu trabalho como pesquisador, tornando possível a minha realização profissional.

Aos meus pais, Fátima e João, por todo amor e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, João Fernando, por todo amor e amizade desde sempre.

Ao meu amor, Fernanda, pela sua atenção, amizade e por toda sua dedicação em todas as etapas no desenvolvimento desta dissertação.

À minha avó, Carmem, e à minha tia, Aparecida, por todo carinho e cuidados ao longo de minha vida.

Ao meu tio, Antonio Cabrera, que com poucas palavras conseguiu me mostrar caminhos até então desconhecidos para mim.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Vilamaior pela sua amizade e dedicação na correção dos artigos desta dissertação.

À Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maira Góes pela amizade e pelas inestimáveis contribuições durante o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Aos meus companheiros de laboratório, Ana Paula, Ana Maria, Sérgio, Ricardo, Mãe, Silvana, Wellerson, Renato, Lara, Diego, Filipe, Bianca, Sabrina, Daniele, Flávia, Samantha e Cintia que, de uma forma ou de outra, sempre estiveram dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Ao amigo e técnico do laboratório, Luis Roberto, pela inestimável ajuda e eficiência em todos os momentos necessários.

À Liliam Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela amizade, dedicação e admirável profissionalismo.

Aos professores da pré-banca e da banca de mestrado, Prof. Dr. Hélio Chiarini-Garcia, Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Werneck de Avellar, Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior, Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Prof^ª. Dr^ª. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, por toda atenção e dedicação destinados a este trabalho de dissertação.

Aos professores do departamento de Biologia Celular e Estrutural de Campinas que foram fundamentais para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos neste campo tão vasto da biologia.

À FAPESP e a CAPES/PROEX pelos incentivos através de bolsas e auxílios de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela inestimável oportunidade de realização do meu mestrado.

A todos aqueles que foram essenciais para que tudo isso pudesse acontecer, mas que no momento cometo a injustiça de não me recordar.

À vida.

Dedico:

A todos aqueles que, com muito esforço e dedicação, lutam diariamente para tornar a vida e o ser humano melhores.

Não fiques em terreno plano.
Não subas muito alto.
O mais belo olhar sobre o mundo
Está a meia altura.

Friedrich Nietzsche

Sumário

Resumo	10
Abstract	12
Introdução	14
1. Embriogênese Prostática	14
2. Aspectos morfofisiológicos da glândula prostática	18
3. Características dos disruptores endócrinos	20
Objetivo	24
Artigos	25
1. Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype	26
2. A exposição androgênica durante a vida intra-uterina e pós-natal causa alterações morfofuncionais na próstata masculina e feminina do gerbilo da Mongólia (<i>Meriones unguiculatus</i>)	61
Conclusões gerais	100
Referências	103
Anexos	109

A próstata é uma glândula encontrada não somente em machos de mamíferos, podendo estar presente em fêmeas de alguns roedores e também em mulheres. Os andrógenos são essenciais durante o desenvolvimento e também para a manutenção da homeostasia prostática ao longo da vida. No entanto, sensíveis interferências, principalmente em momentos críticos do desenvolvimento, podem predispor este órgão a desenvolver lesões durante a vida adulta e senil. Pesquisas tem demonstrado que o programa de expressão gênica controlado pelo receptor de andrógeno durante a organogênese prostática é muito semelhante ao que é ativado durante a instalação do câncer de próstata. Aliado a isso, um grande número de estudos tem demonstrado que a predisposição às desordens prostáticas tem sua origem nos momentos iniciais da vida. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição androgênica intra-uterina e pós-natal pode interferir na morfofisiologia da próstata de roedores, podendo levar ao surgimento de desordens prostáticas durante a vida adulta. Para isto, este trabalho foi dividido em duas etapas. Primeiro, grupos de ratos *Wistar* jovens e adultos não tratados e de ratas adultas tratadas com testosterona (1 mg/Kg/48 horas) durante 7, 14 e 21 dias foram analisadas. As próstatas destes animais foram submetidas a análises morfométrico-estereológicas, imunohistoquímicas e ultra-estruturais. Em uma segunda etapa, grupos de gerbilos machos e fêmeas expostos à testosterona durante a vida embrionária (100 µg ou 1 mg) e pós-natal (100 µg) foram avaliados na vida adulta. As glândulas prostáticas destes animais foram submetidas a análises morfométrico-estereológicas, imunohistoquímicas, além da reconstrução tridimensional. Os resultados mostraram que as próstatas das ratas sujeitas a terapias androgênicas durante a vida adulta

apresentaram um intenso desenvolvimento, tornando-se mais ativas nos processos de síntese e secreção. Além de sofrer um intenso desenvolvimento, a glândula prostática destes animais tornou-se, morfológica e fisiologicamente, muito semelhante à próstata ventral dos ratos. Entretanto, apesar das próstatas das ratas tratadas sofrerem um expressivo desenvolvimento induzido pela ação androgênica, não foram observadas a presença de lesões nestas glândulas. Já os machos e as fêmeas de gerbilos que sofreram exposição androgênica anormal durante o período embrionário, apresentaram uma alta incidência de lesões prostáticas na vida adulta, podendo-se evidenciar a presença frequente de focos inflamatórios e de neoplasias intra-epiteliais. Os resultados mostraram que o excesso de andrógeno interfere significativamente na homeostasia prostática, levando a um intenso desenvolvimento glandular ou mesmo predispondo esta glândula a desenvolver lesões durante a vida adulta. Estes aspectos são de grande interesse, pois é cada vez maior o número de relatos na literatura mostrando que o desbalanço hormonal durante os momentos iniciais do desenvolvimento prostático podem predispor este órgão a manifestar doenças durante a vida adulta e senil.

The prostate is a gland found not exclusively in male mammals, may also be present in female of some rodents and also in women. The androgens are essential for the development and maintenance of prostatic homeostasis throughout life. However, sensible interferences, especially during critical stages of development, can predispose this organ to develop lesions in adult and senile life. Researches have shown that the gene expression program controlled by androgen receptor during prostatic organogenesis is very similar to that activated during the installation of prostate cancer. Moreover, a large number of studies have demonstrated that the predisposition to prostate disorders has its origin in the early stages of life. Thus, the objective of this study was to evaluate whether intrauterine and postnatal androgen exposure alters the morphophysiology of rodents prostate leading to the development of prostatic disorders in adulthood. For this, the work was divided into two stages. At first, groups of untreated young and adult male Wistar rats and adult female rats treated with testosterone (1mg/Kg/48 hours) for 7, 14 and 21 were analyzed. The prostates of these animals were subjected to morphometric-stereological, immunohistochemical and ultrastructural analyses. In a second step, groups of male and female gerbils exposed to testosterone (100 µg or 1 mg) during embryonic and postnatal (100 µg) life were analyzed at adulthood. The prostatic glands of these animals were subjected to morphometric-stereological, immunohistochemical and also to three-dimensional reconstruction analyses. The results showed that prostates of female rats subjected to androgen therapy during adulthood had an intense development, presenting a more active synthesis and secretion status. In addition to this intense development, the prostate gland of these animals became morphologically

and physiologically very similar to the ventral prostate of adult male rats. However, despite the prostates of treated rats suffered a significant development caused by the androgenic action, it was not observed the presence of lesions in these glands. In other hand, males and females gerbils submitted to abnormal androgen exposure during the embryonic period exhibited a high incidence of prostatic lesions in adulthood, being frequent the presence of inflammatory foci and intraepithelial neoplasia. The results showed that androgen excess interfere significantly in the prostate homeostasis, leading to an intense glandular development or even predisposes this gland to develop lesions during adulthood. These aspects are of great interest because a growing number of reports in the literature has shown that the hormonal imbalance during the early stages of prostate development may predispose this organ to manifest disease during adulthood and senescence.

1. Embriogênese Prostática

Em embriões de camundongos, a diferenciação das gônadas ocorre no 13º dia embrionário (E13), quando os testículos e os ovários tornam-se morfologicamente distintos. Na ausência dos andrógenos testiculares fetais secretados pelas células de Leydig a partir do E13-E14, os ductos de Wolffian, nas fêmeas, sofrem regressão, enquanto que nos machos a regressão dos ductos de Muller inicia-se no 15º dia embrionário (E15), em decorrência da produção de uma substância inibidora Mulleriana (MIS) pelas células de Sertoli. Nos machos, os ductos de Wolffian dão origem ao epidídimo, aos vasos deferentes, aos ductos eferentes e à vesícula seminal, enquanto que os ductos de Muller, nas fêmeas, são responsáveis pela formação dos ovidutos, do útero, do cérvix e da porção superior da vagina (Staack et al., 2003).

O seio urogenital (UGS) juntamente com a bexiga, os testículo ou ovários, os ductos de Wolffian ou de Muller formam o trato urogenital. O UGS é uma estrutura embrionária indiferenciada de origem endodérmica, formada por uma porção epitelial (UGE) e por uma porção mesenquimal (UGM). O UGS é encontrado tanto em machos quanto em fêmeas de mamíferos em um estágio indiferenciado aproximadamente no 13º dia embrionário (7 semanas de gestação em humanos) (Wilhelm, 2006), sendo o ambiente hormonal em que estas estruturas se encontram um dos fatores determinantes para a formação de órgãos reprodutivos característicos de cada sexo.

Diferentemente da maioria das glândulas sexuais acessórias dos machos, que se desenvolvem a partir dos ductos de Wolffian (tecido mesodérmico), a próstata tem uma herança endodérmica, pois se origina a partir do UGE (Prins e Putz, 2008), uma porção de tecido epitelial do UGS. O tecido mesenquimal (UGM) que envolve o epitélio do UGS é formado por três zonas distintas. A mais adjacente ao UGE é chamada de mesênquima periuretral e permanece como tecido mesenquimal durante os estágios pré-natais do desenvolvimento. Paralela a este mesênquima periuretral situa-se outra zona que, durante os estágios embrionários, se diferenciará em musculatura lisa. Por fim, a terceira zona do UGM é denominada de pé mesenquimal ventral (VMP), sendo formada por uma camada de mesênquima condensado adjacente à zona mesenquimal que originará a musculatura lisa uretral (Thomson et al., 2002).

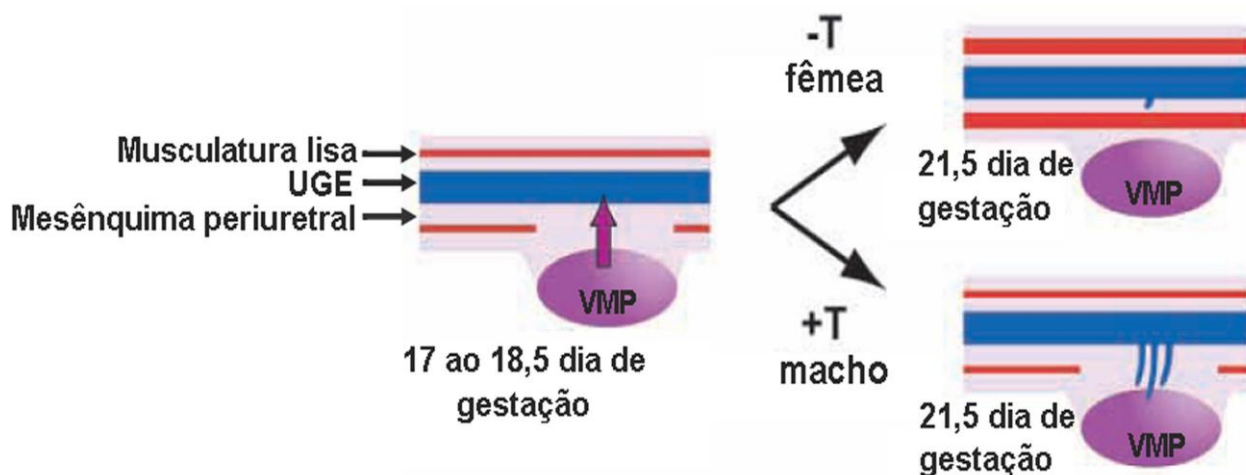


Figura 1. Modelo descrevendo a indução prostática ventral em embriões de ratos. Do lado esquerdo está representada uma porção do seio urogenital (UGS) durante os estágios iniciais da indução prostática. A camada de musculatura lisa (vermelho) é descontínua, permitindo a sinalização entre o VMP e o epitélio uretral (UGE). Do lado direito superior da figura, está representado o UGS feminino no 21,5 dia de gestação, podendo-se observar o impedimento na comunicação entre o VMP e o UGE em decorrência do fechamento completo pela musculatura lisa. Brotos prostáticos residuais podem estar presentes, mas eles não penetram no VMP e eventualmente regredem. Do lado direito inferior da figura está representado o UGS masculino no 21,5 dia de gestação, onde pode-se observar a presença da camada de musculatura lisa descontínua, permitindo a invasão dos brotos uretrais no VMP adjacente, onde subseqüentemente eles crescem e entram no processo de morfogênese de ramificação (adaptado de Thomson et al., 2002).

O VMP é a região mesenquimal do UGS responsável pela indução prostática do UGE durante o período de desenvolvimento. Em ratos, o VMP é visível a partir do 17º-18º dia embrionário até, aproximadamente, o 12º-15º dia pós-natal. Segundo Thomson (2002), tendo em vista propósitos de nomenclatura, o VMP deve ser classificado como mesênquima condensado ventral até o 20º-21º dia embrionário, momento a partir do qual o VMP passa a ser invadido por brotos epiteliais prostáticos e que, após a invasão, deve ser chamado de próstata ventral.

Durante a organogênese prostática, as células mesenquimais do VMP expressam receptores androgênicos (ARs) (Thomson et al., 2002). Embora tenha sido relatada uma reduzida expressão destes receptores no UGE, sabe-se que o AR epitelial é dispensável para o início da indução do desenvolvimento prostático (Prins e Putz, 2008; Schaeffer et al., 2008). A testosterona produzida pelos testículos fetais se liga nestes receptores e a via de sinalização do AR é ativada. O complexo testosterona/AR é direcionado para o interior nuclear onde se ligará a sítios específicos de ligação do AR no DNA, dando início a transcrição de genes andrógeno-dependentes necessários para o desenvolvimento prostático.

As células mesenquimais do VMP que expressam AR, sob estímulo androgênico, produzem moléculas de ação parácrina que irão agir no UGE, levando ao início da formação dos brotos prostáticos. Alguns destes reguladores parácrinos, como os fatores de crescimento de fibroblastos (Fgf7, Fgf10) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) já foram identificados (Thomson et al., 2002). Além destes, existem muitos outros genes morforegulatórios que são expressos durante a organogênese prostática, como, por exemplo, Nkx3.1, Bmp-4, Bmp-7, FOXA1, Hoxb13, Hoxd-13, Hoxa-13, Wnt 2, Wnt 5a, Shh, além de outros (Prins e Putz, 2008a). Entretanto, o que ainda não se conhece são as vias pelas quais o AR

controla, direta ou indiretamente, a expressão destes genes reguladores do desenvolvimento prostático (Thomson, 2008).

Segundo Black e Paschal (2004), o AR é responsável por regular a expressão de mais de 100 genes na próstata e em linhagens de células cancerosas prostáticas. Como muitos destes genes estão envolvidos com o crescimento e a diferenciação desta glândula, é de elevada importância conhecer os mecanismos de ação do AR tendo em vista possíveis terapias para o câncer de próstata.

Diferentemente do mesênquima, o AR epitelial só começa a ser expresso, significativamente, assim que as células epiteliais progenitoras se diferenciam. A partir deste momento, estas células passam a sintetizar fatores parácrinos que irão agir na diferenciação das células musculares lisas do tecido mesenquimal. No entanto, além do AR, outros receptores nucleares, como o ER α (receptor de estrógeno alfa) e o ER β (receptor de estrógeno beta), determinantes para o desenvolvimento da próstata, passam a ser expressos em locais e momentos específicos durante a organogênese prostática. Enquanto que o ER α é expresso predominantemente no mesênquima, durante estágios iniciais do desenvolvimento, o ER β tem sua expressão localizada no epitélio durante as fases de diferenciação das células epiteliais prostáticas (Prins e Putz, 2008).

Em roedores, durante os últimos dias da vida embrionária, tem início a formação dos brotos prostáticos a partir do UGE. Em ratos, os primeiros brotos começam a aparecer entre o 17º e 18º dia embrionário. Neste momento, a musculatura lisa uretral, já diferenciada, localizada adjacente à zona periuretral do UGM, apresenta-se descontínua tanto em machos quanto em fêmeas. Este intervalo existente está localizado justamente entre o VMP e o epitélio uretral

adjacente, permitindo as interações, epitélio-mesenquimais, dos fatores parácrinos necessários ao desenvolvimento prostático (Thomson, 2008).

Segundo Thomson (2008), nos ratos machos, devido ao ambiente rico em testosterona, esta camada de musculatura lisa permanece descontínua durante o desenvolvimento da próstata, permitindo o fluxo de moléculas de ação parácrina do mesênquima para o epitélio, favorecendo a organogênese prostática completa. No entanto, nas fêmeas, aproximadamente no 20º dia embrionário, devido à ausência de testosterona, esta camada de musculatura se fecha completamente e impede a ação dos fatores parácrinos a partir do VMP, levando a não expansão desta glândula.

Por outro lado, a presença de brotos prostáticos em fêmeas de ratos Wistar e Sprague-Dawley pode ser observada em frequências variáveis nestes animais. Entretanto, não se sabe quais as causas da formação dos brotos nestas fêmeas, embora tenha sido sugerido que a posição intra-uterina seja um fator (Thomson et al., 2002).

2. Aspectos morfofisiológicos da glândula prostática

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar do sistema reprodutor que apresenta diferenças anatômicas e fisiológicas relativas entre as diversas espécies de mamíferos. O termo próstata tem sua origem na palavra grega ‘prohistani’, usada em 335 a.C. por Herophilus da Alexandria e que significa ‘estar em frente à’, se referindo a sua localização frontal em relação bexiga urinária (Kirby, 1996).

Nos homens, a próstata é dividida em três zonas distintas (transição, central e periférica) (McNeal, 1983). A principal função desta glândula é a de produzir uma secreção glicoprotéica

essencial na maturação dos espermatozoides e para manutenção de um ambiente adequado ao sucesso reprodutivo. Em mulheres, embora a função desta glândula ainda não esteja totalmente elucidada, estudos mais atuais têm mostrado que a secreção prostática tem uma composição bioquímica muito semelhante àquela encontrada na secreção da próstata de homens (Wimpissinger, 2007, 2009).

Em roedores machos, a próstata normalmente é subdividida em lobos. Segundo Rochel e colaboradores (2007), a próstata do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) apresenta três lobos distintos, sendo denominados de ventral, dorsal e dorsolateral. Em ratos, a próstata é dividida em lobos ventral, dorsal e lateral (Timms, 2008).

A existência de uma glândula prostática em fêmeas de roedores (Mahoney e Witschi, 1947; Shehata, 1972, 1975, 1980; Santos et al., 2003, 2006; Brambell e Davis, 1940; Gross e Didio, 1987; Flamini et al., 2002) e em mulheres (Zaviačič, 1999) tem sido relatada há muito tempo na literatura. No entanto, ainda não se conhece detalhadamente quais são os eventos que levam à formação da próstata nestas fêmeas.

Em fêmeas de alguns roedores, uma glândula prostática (historicamente conhecida como glândula de Skene) homóloga à próstata ventral dos machos pode ser encontrada na base da bexiga e ao redor da uretra destes animais. Segundo Thomson (2008), a formação da próstata em fêmeas de alguns roedores é variável e pode estar relacionada a diversos fatores, como níveis aberrantes de testosterona, aumento da sensibilidade androgênica ou mesmo em decorrência de um programa intrínseco da organogênese.

Estudos em nosso laboratório tem mostrado que, em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), os níveis plasmáticos de testosterona são, em média 0,29 ng/mL. No entanto, segundo Fochi (2008) fêmeas do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) apresentam concentrações plasmáticas

de testosterona que variam, em média, de 0,5 a 0,8 ng/mL. Esta concentração plasmática mais elevada de testosterona, peculiar dos gerbilos, talvez possa explicar a alta frequência (80%) da próstata nas fêmeas desta espécie em comparação com ratas Wistar, cuja glândula prostática pode ser encontrada em aproximadamente 29% dos animais, de acordo com Mahoney e Witschi (1947).

Estudos realizados em nosso laboratório têm levado a um melhor entendimento da ação de alguns hormônios como a testosterona na homeostasia da próstata em fêmeas do gerbilo da Mongólia. Segundo Santos e colaboradores (2006), fêmeas de gerbilos adultos expostas a níveis anormais de andrógenos apresentaram glândulas prostáticas significativamente alteradas, podendo-se evidenciar um intenso desenvolvimento glandular em associação ao surgimento de lesões displásicas. O que torna este aspecto mais relevante é que esta glândula é encontrada em mulheres (Zaviačič, 1999) com a mesma frequência (80%) daquela observada em gerbilos (Santos e Taboga, 2006).

Tendo em vista estes aspectos, o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) se credencia como um ótimo modelo para se estudar os efeitos da administração de hormônios sobre a glândula prostática, pois pode contribuir para um melhor entendimento dos fatores envolvidos com o surgimento de lesões ao longo da vida.

3. Características dos disruptores endócrinos

Disruptores endócrinos são substâncias exógenas que mimetizam hormônios esteróides e que tem o potencial de causar danos ao sistema endócrino, de forma a afetar diretamente o metabolismo de hormônios no organismo (Biggsby, 1999; Toppari, 2008). Além de afetar o

sistema endócrino, estas substâncias podem agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo, tanto de machos quanto de fêmeas, tendo em vista que muitas destas substâncias competem com os esteróides endógenos pelos sítios de ligação nos receptores específicos. Estas alterações, causadas pelos disruptores endócrinos, tem sido denominadas de *imprint*.

Segundo Söder (2005), o *imprint* é uma condição na qual os eventos pré-natais, principalmente de natureza nutricional e metabólica, são memorizados pelo organismo em desenvolvimento e, se inapropriados para a situação pós-natal, podem levar ao desenvolvimento de doenças durante estágios mais avançados da vida. Durante o período embrionário, em especial, os disruptores endócrinos podem ser responsáveis por causar um *imprint* em alguns tecidos que constituem o seio urogenital (UGS), responsável pela formação de órgãos do sistema reprodutor tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estas alterações (*imprint*) podem ser mantidas ao longo do desenvolvimento, podendo manifestar-se mais tardiamente em algum momento da vida.

Algumas destas substâncias agem como disruptores androgênicos e outras como estrogênicos. Muitos destes compostos químicos de disrupção endócrina (EDCs) já foram estudados e relatados extensivamente na literatura. Alguns deles, como o dietilstilbestrol, foram responsáveis por causar diversas alterações em mulheres expostas a estas substâncias durante o período embrionário (Prins et al., 2008). Estas mulheres durante a vida adulta apresentaram displasia epitelial na vagina superior além de um maior risco em desenvolver adenocarcinoma no colo do útero e da vagina (Söder, 2005).

A exposição a agentes de disrupção androgênica vem crescendo nos últimos anos. O acetato de trembolona, por exemplo, é uma substância muito utilizada para promover o rápido crescimento do gado (Hotchkiss, 2007), além, também, de ser usada como esteróide anabolizante

por humanos. Outras, entretanto, são provenientes de pesticidas e outras substâncias químicas, sendo responsáveis por contaminar o meio ambiente (Orlando et al., 2004) e consequentemente o ser humano.

Pesquisas feitas com camundongos expostos a diidrotestosterona (DHT) no período pré-natal mostraram que o programa de expressão gênica controlado pelo AR e responsável por guiar o desenvolvimento da próstata (organogênese) também é ativado durante a formação do câncer prostático. Isto comprova que os programas de expressão gênica embrionários, sensíveis a andrógenos, também são ativados durante os processos de iniciação e progressão do câncer prostático. Estas pesquisas mostraram que os genes associados a eventos como angiogênese, apoptose, migração, motilidade e proliferação, característicos do processo de carcinogênese, são muito similares àqueles envolvidos nos programas do desenvolvimento prostático (Schaeffer et al., 2008).

Segundo Singh e Handelsman (1999), doenças prostáticas como hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata tem sua origem cedo na vida, sendo a exposição anormal aos andrógenos durante o período embrionário um dos fatores de maior risco. Entretanto, ainda não se conhece os mecanismos de longa duração da predisposição induzida por andrógenos e a sua relação com o surgimento de doenças prostáticas durante a vida adulta e senil (Singh e Handelsman, 1999).

Existem diversos fatores e situações que podem estar influenciando este equilíbrio durante os períodos embrionários mais críticos, tais como algumas disfunções como hiperandrogenismo e síndrome do ovário policístico, na qual a concentração de andrógenos aumenta no sangue em decorrência de um aumento na produção pela adrenal e/ou ovários (Yarak et al., 2005), devido ao uso indiscriminado de esteróides anabolizantes por gestantes, ao consumo de alimentos

industrializados que contem substâncias químicas (EDCs) que mimetizam os andrógenos e à exposição aos EDCs ambientais.

Levando em conta que o período relacionado ao desenvolvimento prostático é extremamente sensível a pequenas interferências, torna-se cada vez mais preocupante os efeitos que estes disruptores androgênicos podem ter sobre a organogênese prostática, tendo em vista que esta glândula carrega um potencial muito grande para desenvolver doenças na vida adulta e senil. Desta forma, é importante que se conheça os fatores que podem interferir na manutenção da homeostasia prostática durante a vida embrionária, favorecendo, desta forma, o entendimento de alguns mecanismos que podem predispor esta glândula a desenvolver tumores benignos ou malignos durante a vida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por métodos estruturais, citoquímicos, ultra-estruturais e imunohistoquímicos, o impacto da exposição androgênica intra-uterina e pós-natal na morfofisiologia da próstata de roedores.

Artigo 1: TESTOSTERONE PROMOTES AN ANABOLIC INCREASE IN THE RAT FEMALE PROSTATE (SKENE'S PARAURETHRAL GLAND) WHICH ACQUIRES A MALE VENTRAL PROSTATE PHENOTYPE.

Artigo 2: A EXPOSIÇÃO ANDROGÊNICA DURANTE A VIDA INTRA-UTERINA E PÓS-NATAL CAUSA ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NA PRÓSTATA MASCULINA E FEMININA DO GERBILO DA MONGÓLIA (*Meriones unguiculatus*).

Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype

Manoel F Biancardi¹; Fernanda CA Santos²; Liliam Madi-Ravazzi³; Rejane M Góes³; Patrícia SL Vilamaior⁴; Sérgio L Felisbino⁵; Sebastião R Taboga³.

^{1,3}Department of Cell Biology – Institute of Biology - UNICAMP, CP 6109 - 13084-864 - Campinas; ²Department of Morphology - Federal University of Goiás – UFG – 13174001-970 - Goiânia; ³São Paulo State University – UNESP/IBILCE, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, 15054-000 - São José do Rio Preto; ⁴Rio Preto University Center – UNIRP, Biological Sciences and Veterinary Medicine School, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil; ⁵São Paulo State University – UNESP/IB – Institute of Biology, Botucatu, São Paulo, Brazil

Running Title: Effects of testosterone in rat female prostate

Keywords: female prostate, ventral male prostate, androgens, rat, morphology

***Correspondence and reprint requests:**

Dr. Sebastião Roberto Taboga (e-mail: taboga@ibilce.unesp.br)

Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP - Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil, Zipcode: 15054-000 Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390.

This work was supported by National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and São Paulo State Research Foundation (FAPESP).

Abstract

The female prostate (Skene's paraurethral gland) in the rat is morphologically similar to the ventral lobe of male adults and has been described in other rodent species and humans. Previous studies on prostate morphogenesis suggest that female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) do not develop this gland due to absence of testosterone during the embryonic and neonatal periods. On the other hand, studies conducted in our laboratory have shown that some females of this species can present an undeveloped but functional prostate. Recent studies on this gland have caused scientific interest because, besides being active in the processes of synthesis and secretion of prostatic material, it is also targeted by both malignant and benign lesions, mainly during senescence. Thus, the present work aims to evaluate the structure of female prostate of adult rats (*Rattus norvegicus*) under normal conditions and under the effect of testosterone treatment and carry out comparative studies on the ventral prostate of young and adult male rats. Morphological and morphometric stereological analyses and immunocytochemical and ultrastructural studies were conducted. The results have shown that the prostate gland of rats exposed to androgen therapy have experienced intense growth, becoming more active in relation to synthesis and secretion. It may be concluded that the prostate in control adult female rats is morphologically very similar to the prostatic ventral lobe of young male rats. Besides, under androgenic action, the female prostate grows considerably and becomes similar to the prostatic ventral lobe in male adults.

Introduction

The prostate gland is not an organ exclusive to the male reproductive system since it has been found in females of some mammalian species including some rodents (Mahoney and Witschi 1947; Price 1963; Shehata 1972, 1980) and humans (Zaviačič 1999). The female prostate, historically known as Skene's gland, is located around the urethra at the bladder base. Male prostates produce a glycoprotein secretion that is essential to maintaining an adequate environment for spermatozoid survival and is thus critical for reproductive success in mammals that present internal fertilization. Recent studies have shown that women's prostatic secretion has a biochemical composition very similar to the one found in prostatic plasma of men (Wimpissinger et al. 2007).

Studies by Shehata (1972) on the female prostate of experimental rodents have indicated that this gland can be found both in *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*. Mahoney and Witschi (1947) observed that wild female albino Wistar rats showed prostate glands at an approximate frequency of 29%, could be greatly increased by selective inbreeding to a 99%. Recent studies on prostatic development have shown that the existence of prostatic tissue in females of some species are due to factors such as deviant testosterone levels, increase in androgenic sensitivity, or even on account of an intrinsic prostatic organogenesis program (Thomson 2008).

Since the 60's there are a growing number of researches showing the important role of androgens on development and prostatic maintenance in the adult rodents. According to Price (1963) androgen administration in female rats has caused secretion of citric acid in the prostate, a metabolic substance normally produced by male rat's ventral prostate under androgenic stimulation. Santos and co-workers (2006) have shown the stimulatory effects of testosterone on

gerbil female prostate. They have demonstrated that androgenic administration has a biphasic effect, inducing epithelial cell proliferation and differentiation in the early phase, and a secretory activity and dysplasia in the late moment.

Taking account the development and functionality of the female prostate in rats, the present work aimed to characterize the morphophysiology of this gland in normal conditions and under the effect of testosterone treatment, as well as to carry out comparative studies with the ventral prostate of control male rats. Thus, the findings of this work may clarify some possible factors involved in the formation and maintenance of this gland in female rodents. In order to achieve that goal, we have employed different approaches that had not been used previously to study female rat prostates, such as scanning electron microscopy, as well as immunocytochemical analyses.

Material and Methods

Animals and Experimental Design

Young (2 weeks) and adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 90-120 days were obtained from the animal breeding center of São Paulo State University (UNESP) (São José do Rio Preto, SP). The female rats used in this experiment underwent selective inbreeding to ensure that all female offspring had the prostate gland. Animals were maintained in polyethylene cages under controlled conditions of light and temperature, and were provided water and rodent food *ad libitum*. Animal handling and experiments were performed according to the ethical guidelines of the São Paulo State University (UNESP), following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH).

Ten 4-months old adult females and ten males (five 2-weeks old young and five 4-months old adult) were utilized as control. Additional groups of ten females were treated with subcutaneous injections of 1 mg/Kg/48 hours of testosterone cypionate (Deposteron – Novaquímica/Sigma) on alternate days for 7, 14 and 21 days, based on the procedures of Santos and co-workers (2006). Animals were killed by CO₂ inhalation followed by decapitation. Blood samples were collected and the female rats were weighed. For the male rats, only the ventral prostate lobes were dissected out. For the females, a section at the base of the bladder was employed to isolate a block of a tissue containing the entire urethra and prostate tissue. This fragment was dissected out using an Olympus SD-ILK stereoscopic microscope (Olympus Optical Co. LTD, Japan) to remove the adipose tissue and isolate the urethral segment plus the associated prostatic tissue (UPT).

Plasma total Testosterone, Estradiol and PSA-like protein dosages

Blood serum samples of female rats were collected by decapitation from the ruptured cervical vessels and the serum was separated by centrifugation (3000 rpm) and stored at -20°C for subsequent hormone analysis. Circulating serum testosterone, estradiol, and PSA-like (prostatic specific antigen-like) protein levels were determined by chemiluminescence immunoassay in a Vitros-ECi automatic analyzer (Johnson & Johnson, Orthoclinical Diagnostics Division, Rochester, NY). The PSA levels were evaluated indirectly because it is well known that rats and mice do not express prostatic specific antigen (PSA) (Olsson et al. 2004). Previous work using the gerbil model described this analysis considering a PSA-like protein or a Kallikrein family serinoprotein that shows cross-reactivity with the antibodies employed in the present work

(Santos et al. 2006, 2008). The sensitivity was 0.1-150 ng/ml for testosterone, 0.1-3814 pg/ml for estradiol, and 0.1-100 ng/ml for human PSA. For testosterone, estradiol, and human PSA, the respective intra-assay variations were 1%, 1.1%, and 0.97% while the inter-assay ones were 2.1%, 1.5% and 1.75%.

Light Microscopy

Male ventral prostate and female UPT were fixed by immersion in Karnovsky's solution (5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) or in 4% paraformaldehyde, for 24 h. After fixation, the tissues were washed under running tap water, dehydrated in an ethanol series, cleared in xylene, and embedded in paraffin (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany) or glycol methacrylate resin (Historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany). Tissue sections (thickness 3µm) were obtained with an automatic rotatory microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin-eosin (HE) for general morphological analysis (Behmer et al. 1976). Prostatic secretion was identified by periodic acid-Schiff (PAS) test. The specimens were analyzed with a Zeiss-Jenaval light microscope (Zeiss-Jenaval, Jena, Germany) or Olympus BX60 light microscope (Olympus, Hamburg, Germany), and the images were digitalized using the software Image-Pro Plus version 6.1 for Windows.

Immunocytochemistry

Sections of 4% paraformaldehyde-fixed female and male prostates were subjected to immunocytochemistry for the detection of androgen receptor (AR), as described in protocols applied to the prostate (Vilamaior et al. 2005; Santos and Taboga 2006). Primary antibodies reactive to AR (rabbit polyclonal IgG, N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

were employed at a dilution of 1:100. Peroxidase-conjugated specific antibodies (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) were used as secondary antibodies and peroxidase substrate. The sections were revealed with diaminobenzidine and counterstained with Harris's hematoxylin.

Morphometry and Stereology

The stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 130 points and 60 test lines (Weibel 1978) to compare the relative proportion (relative volume) of each prostatic tissue component (epithelium, lumen and stroma) as described by Huttunen and colleagues (1981) for prostatic tissue. Thirty microscopic fields were chosen at random. In summary, the relative values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. Morphometric analysis also included the determination of epithelial cell height, smooth muscle layer thickness and karyometric data of epithelial cell, like nuclear perimeter (μm), nuclear area (μm^2) and nucleus/cytoplasm ratio. All morphometric parameters were taken using the software Image-Pro Plus version 6.1 for Windows.

Scanning Electron Microscopy

The female UPTs were fixed by immersion in 3% glutaraldehyde solution diluted in Millonig buffer pH 7.3 for 24h. The material was post-fixed in osmium tetroxide 1% for 2h, dehydrated in graded ethanol and submitted to drying in liquid carbon dioxide (Critical Point Emitech K850). After, the preparations were coated with gold by sublimation in sputtering

(Emitech K550). The samples were observed in a Leo-Zeiss Scanning Electron Microscope (435 VPi).

Transmission Electron Microscopy

The female and male prostate fragments were fixed for 24 hours by immersion in 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig buffer, pH 7.3, containing 0.54% glucose. After washing with the same buffer, they were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 2 hours, washed again, dehydrated in graded acetone series, and embedded in Araldite resin (Cotta-Pereira et al. 1976). Ultrathin sections (50-75 nm) were cut using a diamond knife and contrasted with 2% uranyl acetate for 30 min (Watson 1958), followed by 2% lead citrate in sodium hydroxide solution for 10 min (Venable and Coggeshall 1965). The samples were evaluated with a LEO-Zeiss 906 (Zeiss, Cambridge, UK) transmission electron microscope operated at 80 kV.

Statistics

All the statistical tests were performed using Statistica 6.0 software (Copyright©StarSoft, Inc. 1984-1996, Tulsa, OK, USA). The quantitative results are expressed as mean $\pm$ standard error, and the analysis of variance (ANOVA) and Tukey Honest Significant Difference (HDS) tests were applied, with statistical significance defined as $p \leq 0.05$.

Results

Biometric analysis

Testosterone treatment of female rats for progressively longer periods of time tend to increase the body weight (Table I); however, only after 21 days of treatment did this elevation become statistically significant (287.0 ± 7.5 g to 238.6 ± 0.5 g of control rats). Androgen administration also increased the UPT weight but statistical significance was detected only in the 14-day treatment group (0.122 ± 0.039 g against 0.035 ± 0.007 g of control). Statistically significant differences were not found in the prostatic relative weight.

Hormonal serum dosage evaluation

As expected, testosterone levels increased drastically in direct proportion to the period of testosterone administration (Table I). On the other hand, no significant alterations were found in estradiol or PSA-like protein levels (Table I, $p \leq 0.05$).

Scanning electron microscopy analysis

The use of scanning electron microscopy (Fig. 1) enabled the observation of some general morphological aspects of the gland. In control animals, the glands were not fully developed (Fig. 1A), and formed by small acini with reduced lumen and highly abundant stroma (Fig. 1C). After androgenic treatment, however, the prostate presented expressive development (Fig. 1B), as shown by acini with enlarged lumen and reduced stroma (Fig. 1D).

Morphology of female prostate glands

The morphology reveals that the prostate gland in control animals is formed by small acini with reduced lumen yet is rich in glycoprotein secretion identified by PAS reaction and immersed in a highly developed stromal environment (Fig. 2A, B). These acini present a simple epithelium, formed mainly by secretory epithelial cubic or columnar cells (Fig. 2C) and by a layer of basal cells.

The prostates of animals that have received testosterone cypionate presented significant structural changes. After the first seven treatment days it was possible to observe an expressive increase in the size of the glandular acini, which started to present larger lumens with richer secretion (Fig. 2D, E) and secretory epithelial cells that were taller and more active (Fig. 2F).

As the treatment went on (14- and 21-day groups), it was possible to observe a continuous glandular development. The acini became increased, exhibiting an enlarged lumen and abundant secretion (Fig. 2G, J) and tall secretory epithelial cells (Fig. 2H, K). Furthermore, it was possible to observe copious secretory vesicles (Fig. 2I) and an area occupied by the Golgi complex in the secretory epithelial cells (Fig. 2L).

Morphological characteristics of the prostate in control males

Figure 3 shows morphological aspects of the male rat prostate. In young rats (2 weeks old), the prostate gland presented small acini still in development, many of which have either a reduced or nonexistent lumens (Fig. 3A), very similar to the prostate of control adult female rats.

The epithelial compartment was formed mainly by secretory epithelial cells and basal cells (Fig. 3B, C).

In male adult rats, as well as in female rats exposed to testosterone, the prostate gland was characterized by an increasing acinar size and by a decreasing area of adjacent stromal compartment (Fig. 3D). The acini of these glands displayed full development with copious secretion of glycoprotein in their interior and an epithelial compartment formed by tall columnar secretory cells that presented a very active secretory process (Fig 3E, F).

Stereology from female prostate

Stereological data referring to females is presented in Table II. All parameters analyzed presented statistically significant alterations ($p \leq 0.05$).

The epithelial area in treated groups increased expressively, reaching an average of $37.41 \pm 1.8\%$ during the first 7 days of treatment while the control group presented epithelial area of $16.18 \pm 0.7\%$.

The area corresponding to the lumen of prostatic acini of animals treated for 7, 14 and 21 days presented a very significant increase, ranging from an average of $1.51 \pm 0.2\%$ (control group) to $40.38 \pm 2.3\%$ in 7-day animals, $54.05 \pm 1.3\%$ in the 14-day group, and $52.82 \pm 2.8\%$ at 21 days.

The area of the stromal component displayed a significant decrease in the prostatic tissue of treated animals. The average diminution of the stromal area ranged from $82.25 \pm 0.76\%$

(control) to $22.2 \pm 1\%$ (7-day animals), $21.10 \pm 1.1\%$ (14-day group), and $20.92 \pm 1.6\%$ (21-day group).

Morphometry from female prostate

The morphometric data displayed in Table II shows that the height of secretory epithelial cells of prostate in untreated female rats presented an average of $14.12 \pm 0.2 \mu\text{m}$, and increased significantly ($20.72 \pm 0.2 \mu\text{m}$) after 21 days of androgen exposure, which represents the highest rise among the experimental groups.

The thickness of smooth muscle layer in the glands of treated animals showed an expressive decrease, ranging from $21.67 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (control group) to $7.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ in 7-day animals.

Not only the nuclear perimeter but also the nuclear area decreased significantly ($p \leq 0.05$) in treated animals. The prostate cell nuclear perimeter ranged from an average of $21.63 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in controls to $14.51 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in animals treated for 21 days, while its nuclear area varied from a high of $29.75 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in controls down to $12.92 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in the group treated for 14 days (Table II).

The nuclear-cytoplasmic ratio was significantly lower in animals subjected to treatment, reaching an average of 0.14 ± 0.01 in the 14-day group versus 0.36 ± 0.01 among controls (Table II).

Stereology from Male Prostates

The stereological data referring to males are displayed in Table III. All parameters analyzed presented statistically significant alterations ($p \leq 0.05$).

The luminal area rose significantly in adult animals (12 weeks), averaging $68.14 \pm 4.38\%$ while in young animals the value was $31.03 \pm 3.67\%$. The values corresponding to epithelial and stromal areas were significantly lower in adult animals. The epithelial area decreased at an average ranging from $39.10 \pm 3.69\%$ (young animals) to $22.56 \pm 3.05\%$ (adult animals) while the stromal area decreased from $29.87 \pm 2.0\%$ (young animals) to $9.29 \pm 1.67\%$ (adult animals).

Immunocytochemical analysis

Immunocytochemical studies showed AR-positive reaction in the nuclei of secretory cells of prostatic epithelium of the female prostate in all groups analyzed (control, 7, 14 and 21 days). However, control females showed a more intense cytoplasmic reaction and absence of reaction in fibroblasts and smooth muscle cells (Fig. 4A). The treated groups displayed not only a strong nuclear reaction but also some marked stromal cells (Fig. 4B).

In the prostates of both young and adult males, a strong reaction was observable in the nuclei of secretory epithelial cells, fibroblasts and stromal smooth muscle cells. (Fig. 4D, E).

Ultrastructural analysis

Ultrastructural analysis helped to corroborate the findings of the morphological analyses. The secretory epithelial cells of glands from control females (Fig. 5A) and young males (Fig. 5B)

were characterized by the presence of an undeveloped nucleolus and relatively few organelles of the biosynthetic-secretory route, such as rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex.

In both treated females (Fig. 5C) and adult males (Fig. 5D), however, the epithelium was formed by tall secretory epithelial cells, which showed a developed rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and secretory vesicles and a fully developed nucleolus.

Similarly to the stromal components, the control females possessed copious fibroblasts, smooth muscle cells, and fibrillar elements such as collagen (Fig. 6A). In glands of treated females, however, it was possible to observe signs of activation of fibroblasts and smooth muscle cells (Fig. 6B).

In both young (Fig. 6C) and adult (Fig. 6D) males, the prostatic stroma was highly active with large quantities of fibrillar elements, such as collagen, as well as fibroblasts and very active smooth muscle cells.

Discussion

The occurrence of a prostate in females in some rodents has been previously reported by several studies (Brambell and Davis 1940; Mahoney and Witschi 1947; Shehata 1972, 1975, 1980; Gross and Didio 1987; Satoh et al. 2001; Flamini et al. 2002; Santos et al. 2003, 2006, 2007; Santos and Taboga 2006). In the gerbil *Meriones unguiculatus*, the prostate is found in approximately 80% of the animals (Santos et al. 2006; Santos and Taboga 2006), a proportion very similar to that in human females (Zaviačič 1999). For the rats, the presence of a prostate in females is variable, occurring in *Rattus rattus*, Wistar (*Rattus norvegicus*) (Mahoney and Witschi

1947; Shehata 1972), and Brown-Norway lineages (Sato et al. 2001). Besides the interspecific variation, there is a wide intraspecific variation referring to the prostatic frequency in some rodent species. In addition, the female prostate incidence can be increased to 99% in some rat species by employing selective inbreeding (Mahoney and Witschi 1947).

These interspecific differences can be explained in part by variations in plasma androgen levels, particular to each species. Adult female gerbils, for example, present greater plasma testosterone concentrations (Fochi et al. 2008) than adult female rats. This can explain why control adult gerbil females have a naturally developed and highly secretory prostate, which is very similar to the prostatic ventral lobe of control adult gerbil males.

Based on the results of this work, it is possible to infer that despite the low frequency and poor development of the prostate in control female rats (*Rattus norvegicus*), it indeed presents secretory activity. It is believed that in control adult females, like young males, this secretory activity is regulated by low levels of testosterone present in the organism of these animals. However, when exposed to androgenic stimuli, the prostate gland of these females underwent an intense development, becoming very similar to the ventral lobe of the prostate in control adult male rats. This reinforces the hypothesis that androgens are essential to both maintaining and stimulating normal prostatic development as described by Thomson (2008).

The rat females subjected to testosterone treatment have generally gained body mass, which shown a generalized anabolic action upon these rodents. The prostate gland has also presented an expressive mass gain after androgenic exposure, which indicates that the female prostate, like the male one, is sensitive to androgenic action. The observation of no significant difference between 7- and 21-day experimental groups, however, can be related to the variable

presence of prostate tissue around the urethra, which can be found either unilaterally or bilaterally thus influencing the weight of the prostatic complexes (Mahoney and Witschi 1947). This laterality of the female prostate in *Rattus norvegicus* is variable and depends of intrinsic aspects of prostatic organogenesis, which determine if the animal will have a prostate located unilaterally or bilaterally around the urethra. Thus, this laterality can't be changed by androgenic stimuli during adult life, taking account that this characteristic had already been established during development (Thomson, 2008).

The serological analyses showed the presence of statistically significant alterations only in terms of testosterone levels. There is evidence of a gradual and intense augmentation of this hormone in the serum of animals subjected to hormonal exposure, matching the phases of androgenic treatment and the long permanence of this hormone in their organisms.

Other relevant aspect not studied here, have been shown by Juang and co-workers (1994), which evaluated the citrate concentration in the prostate gland. The production of citrate, a major function of prostate, according these authors, is modulated by testosterone and prolactin. Studies involving citrate has been used as a resource for understanding important implications on pathogenesis of prostate neoplasms.

Despite the variations among the groups, it was not possible to detect any statistically significant difference in estradiol or PSA-like protein levels. However, even not observing statistically significant differences in relation to estradiol levels, it was possible observe an increase of this hormone in female rats treated during 21 days with testosterone. This may be due to high disponibility of testosterone which is converted to estradiol by aromatase enzyme.

By using scanning electron microscopy, it was possible to observe that the prostate of control adult female rats (*Rattus norvegicus*) is undeveloped, presenting small acini, reduced

lumen and abundant stromal tissue. Females treated with testosterone, however, presented a much more developed prostate with larger acini, enlarged lumens and a reduced stromal tissue surrounding the acini.

Morphological and stereological analyses have shown that the prostate of control females is very similar to the prostatic ventral lobe of young male rats, and is comprised of small acini with reduced lumen and an epithelium with secretory cells that show little activity in relation to synthesis and secretion. The existence of homology between the prostate of female rats and the prostatic ventral lobe of male rats was reported many years ago (Korenchevsky 1937, Price 1963). This tissue homology was the major reason for choosing the male ventral lobe to comparison with female prostate.

Females subjected to androgenic treatment presented prostatic morphological characteristics very similar to the prostatic ventral lobe of adult male rats. The glandular acini were highly developed and became much larger and richer in glycoprotein secretion. The secretory epithelial cells became taller and more active in the processes of synthesis and secretion, while it was easier to visualize clear areas corresponding to the Golgi complex, as well as many secretory vesicles in the cellular apex. The most relevant fact was, however, the enlargement of luminal area, which became approximately 36 times greater in the prostate of females treated for 14 days. The thickness of the smooth muscle layer decreased in animals subjected to androgenic therapy. This decrease actually corresponded to a rearrangement experienced by the stromal compartment to accompany acinar development, as observed in control adult male rats (Vilamaior et al. 2006).

AR immunocytochemistry showed a deeper cytoplasmic reaction in prostatic epithelial cells of control females, which matches the low plasma testosterone concentration in the organism of these female rats. As there is not enough androgen to bind to the androgenic receptors, these receptors accumulate in the cytosol (Black and Paschal 2004).

However, when the female rats were exposed to androgen, it was possible to observe an exclusively nuclear reaction, similar to what occurs in adult male rats, due to the high testosterone concentration that ends up saturating the androgen receptors. This evidence indicates that the prostate of control female rats has the potential to develop normally even though low androgen concentration in these animals is a limiting factor to such development.

Another aspect observed in the prostate of control animals was the absence of fibroblasts with AR-positive reaction, in contrast to treated groups, which presented intensely reactive fibroblasts. The reaction of these cells matches prostatic activation by androgen, which causes an intense remodeling of the stromal compartment in order to follow the expansion of glandular acini. In young male rats, however, unlike what has been observed in control females, there is evidence of AR-positive fibroblasts, which shows that since early stages of development the stroma undergoes constant changes to accompany glandular growth.

Ultrastructural analysis has enabled the verification of androgenic influence on the cells of male and female prostate epithelial and stromal compartments. It was possible to observe a high development of glandular epithelium and some other structures typical of cells active in protein synthesis, such as rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and secretory vesicles, as well as nuclei with highly loose chromatin and very conspicuous nucleoli. These evidences have shown

that the epithelial cells of androgen-induced female gland acquired an equivalent phenotype to the male ventral prostate in regard to the biosynthetic-secretory pathway organelles.

Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) females presented maximum prostatic growth up to day 14 of testosterone treatment (Santos et al. 2006), unlike female rats (*Rattus norvegicus*) that continued to show progressive prostate development after the same period of androgen exposure. Another variable aspect between female rats and gerbils involves development of lesions due to androgenic therapy. In gerbils, 21 days after testosterone treatment, all glands were altered by prostate disorders (Santos et al. 2006), as opposed to what happens in female rats, whose hormonal action seems *a priori* to be more related to a continuous or progressive development than to the appearance of dysplastic alterations.

The initial formation of prostatic buds from the urogenital sinus (UGS) is a process that takes place naturally in both males and females of several species. According to Thomson (2008), however, in both human and rodent females the presence of a prostate can be related to abnormal testosterone levels during development, to increasing androgenic sensitivity (as in cases of different alleles to AR), or to an intrinsic program of prostate organogenesis.

Experiments have shown that the plasma testosterone concentration is higher in control gerbils (*Meriones unguiculatus*) (Fochi et al. 2008) than in *Rattus norvegicus* (Vilamaior et al. 2006). This peculiar characteristic of gerbils can determine the formation of a prostate in females of these two species, which may explain the high incidence (80%) of this gland in *M. unguiculatus*.

From the present work, it may be concluded that control adult female rats (*Rattus norvegicus*) can present an undeveloped prostate that is very similar to the prostatic ventral lobe

of young male rats. However, when subjected to androgenic treatment, these female rats start to present a gland that is much more developed and similar to the ventral lobe of the prostate found in control adult male rats. This suggests that even though the prostate of control females is not fully developed, it has an intrinsic potential to grow when provided with factors essential to its metabolism. On the other hand, the mechanisms that determine prostate formation from the UGS and the maintenance of the gland in the adult organism remain somewhat unclear (Thomson 2008). Therefore, future studies are extremely important to identify what factors determine prostate development and, most importantly, the relationship of these factors to the appearance of benign prostatic hyperplasia and cancer.

Acknowledgements

This paper is part of the thesis presented by MFB to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a Master in Science degree, and was supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP – São Paulo Research Foundation (Procs. Nrs. 05/04647-2; 06/06876-1; 07/06862-3) and CNPq - Brazilian National Research and Development Council (Procs. Nrs. 301111/05-7 and 300163/2008-8 research fellowships to SRT). The authors wish to thank to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior and Rosana Silistino de Souza for their technical assistance, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory. Acknowledgement is also due to Mrs. Ricardo S Sobreira and James Welsh for English-language revision of this paper.

References

- Behmer AO, Tolosa EMC, Neto AGF (1976) Manual de práticas para histologia normal e patológica. Edart-Edusp, São Paulo, pp 144-145
- Black BE, Paschal BM (2004) Intranuclear organization and function of the androgen receptor. Trends Endocrinol Metabol 15(9):411-417
- Brambell FWR, Davis DHS (1940) The normal occurrence structure and homology of prostate glands in adult female *Mastomys erythroleucus* temm. J Anat 75:64-75
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. Stain Technol 51:7-11
- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL (2002) Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. Ann Anat 184:341-345
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA (2008) Hormonal Oscilations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). Biol Reprod 79:1084-1091
- Gross SA, Didio LJA (1987) Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. J Submicrosc Cytol 19(1):77-84
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ (1981) A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. J Anat 3:357-370

- Juang HH, Costello LC, Franklin RB (1995) Androgen modulation of multiple transcription start sites of the mitochondrial aspartate aminotransferase gene in rat prostate. *J Biol Chem* 270(21):12629-34
- Korenchevsky V (1937) The female prostatic gland and its reaction to male sexual compounds. *J. Physiol* 90:371-376
- Mahoney JJ, Witschi E (1947) Genetics of the female prostate in rats. *Genetics* 32:369-378
- Price D (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst Monogr* 12:1-27
- Santos FC, Custódio AM, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR (2008) Antiestrogen therapies affect tissue homeostasis of gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and ovaries. *Biol Reprod* 79:674-685
- Santos FC, Falleiros-Júnior LR, Corradi LS, Vilamaior PS, Taboga SR (2007) Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res* 328(3):617-24
- Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR (2003) Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35:447-457
- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2006) Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 75:370-379
- Santos FCA, Taboga SR (2006) Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod* 3(1):3-18

- Satoh H, Mori K, Furuhashi K (2001) Morphological and Immunohistochemical Characteristics of the Heterogeneous Prostate-Like Glands (Paraurethral Gland) Seen in Female Brown-Norway Rats. *Toxicol Pathol* 29: 237-241
- Shehata R (1972) Female prostate in the house rat *Rattus rattus*. *Acta anat* 83(3):426-34
- Shehata R (1975) Female prostate in *Arvicantihis niloticus* and *Meriones lybicus*. *Acta Anat* 92:513-523
- Shehata R (1980) Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat* 107:286-288
- Thomson AA (2008) Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. *Differentiation* 76:587-598
- Venable JH, Coggeshall R (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25:407-408
- Vilamaior PSL, Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Biancardi MF, Fochi RA, Taboga SR (2005) Comparative histology of gerbil and rat female prostate: morphological evidences of different functional state during distinct phases of post-natal development. *Braz J Morphol Sci* 3(Suppl):28
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF (2006) Postnatal Growth of the Ventral Prostate in Wistar Rats: A Stereological and Morphometrical Study. *Anat Rec* 288A:885-892
- Watson ML (1958) Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4:475-478
- Weibel ER (1978) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12:131-155

Wimpissinger F, Stifter K, Grin W, Stackl W (2007) The Female Prostate Revisited: Perineal Ultrasound and Biochemical Studies of Female Ejaculate. *J Sex Med* 4:1388-1393

Zaviačič M (1999) The Female Prostate: From vestigial Skene's paraurethral glands and ducts to woman's functional prostate. 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press: 171p

Legends

Figure 1. Scanning electron microscopy of the prostate of adult female rats. **1a.** General view of the prostatic gland (PR) plus urethra (UPT) of control female rat disposed unilaterally to enable observation of its reduced dimension and its location at the bladder neck (BN) and around the urethra (U). **1b.** General view of the prostatic gland plus urethra (UPT) of an animal subjected to testosterone treatment for 14 days. The prostate gland (PR) shows expressive increase and is located bilaterally around the urethra and at the bladder neck (BN) **1c.** Detail of the gland from control female, where it is possible to observe the epithelium (EP) and the abundant surrounding stroma (S), the luminal compartment (L) and secretion (asterisk) in the lumen of the acini. **1d.** Detail of glandular acini of a rat treated for 7 days with testosterone, where the epithelial (EP), stromal (S), luminal compartment (L) and secretion (asterisk) are visible.

Figure 2. Prostate histology of a female rat corresponding to all experimental groups. In the prostate of control animals (A-C), it is possible to observe reduced acini with secretion (asterisk) inside the lumen, a thin epithelium (EP) and abundant surrounding stromal (S) tissue. In animals treated with testosterone for 7 (D-F), 14 (G-I) and 21 days (J-L), the prostate generally presented

more developed acini with secretory (asterisk) activity, surrounded by stromal (S) tissue, which is more reduced when compared to the prostate of untreated females. Secretion vesicles (arrowhead), area of Golgi complex (arrows). Stains: PAS (A, D, G, J) and HE (B, C, E, F, H, I, K, L).

Figure 3. Histology of the ventral prostate of both young (2 weeks) and adult (3-month-old) male rats stained by HE. In young male rats (A-C), the prostate is formed by small acini (Ac), surrounded by a stromal (S) tissue that bears a thinner secretory epithelium (EP) and a normally reduced lumen (L). However, the prostate of adult male rats (D-F) is constituted by fully developed acini (AC) with a very ample lumen (L) and an epithelium (EP) formed by tall secretory cells, which are very active in the processes of synthesis and secretion. Stroma (S); Stromal area (S) corresponding to the Golgi complex (arrows).

Figure 4. Immunocytochemical reactions for androgen receptor (AR) in female (A, B) and male (D, E) rat prostates. Negative control of reaction in female prostate is shown in (C). Control female prostates (A) exhibited an intense cytoplasmic reaction (asterisk) and a weak nuclear reaction (arrows), as well as the absence of AR-positive fibroblasts. After 7 days of testosterone treatment (B), as in other groups (14 and 21 days), a strong nuclear reaction (arrows) was detected not only in secretory epithelial cells, but also in some stromal cells like fibroblasts and smooth muscle cells (thick arrows) of the prostatic stroma. Ventral prostate of both young (D) and adult (E) male rats showed a similar pattern of AR nuclear reaction (arrows) both in acinar

epithelium as in stroma. Fibroblasts and smooth muscle cells (thick arrows); epithelial cell nuclei (thin arrows).

Figure 5. Ultrastructure of the ventral prostate of an adult control female rat (A), of young male rat (B), of a female treated for 21 days (C) and of an adult male rat (D). Epithelium (EP), Lumen (L), secretory vesicles (arrowheads), Rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi complex (black arrow), mitochondria (white arrows).

Figure 6. Ultrastructure of the prostatic stroma of an adult control female rat (A), of young male rats (B), of a female treated for 14 days (C), and of an adult male rat (D). Fibroblasts (Fb), collagen (CO), smooth muscle cell (SMC).

TABLE I. Body and prostatic complex weight data and plasma total testosterone, estradiol and PSA-like protein levels of female rats. Values are means $\pm$ SEM (n = 5).

<i>Parameter</i>	Control	Testosterone treatment		
		7 Days	14 Days	21 Days
Body weight (g)	238.6 $\pm$ 0.5 ^a	258.5 $\pm$ 8.7 ^a	266.2 $\pm$ 7.7 ^a	287.0 $\pm$ 7.5 ^b
Prostatic complex weight (UPT) (g)	0.035 $\pm$ 0.007 ^a	0.051 $\pm$ 0.006 ^a	0.122 $\pm$ 0.039 ^b	0.09 $\pm$ 0.0006 ^a
Relative weight [†]	0.00014 $\pm$ 0.000032 ^a	0.00019 $\pm$ 0.00020 ^a	0.00045 $\pm$ 0.00015 ^a	0.00031 $\pm$ 0.00001 ^a
<i>Serum hormone levels</i>				
Estradiol (pg/mL)	29.76 $\pm$ 4.81 ^a	33.22 $\pm$ 1.67 ^a	20.00 $\pm$ 0 ^a	40.25 $\pm$ 12.73 ^a
PSA-like protein (ng/mL)	0.008 $\pm$ 0.002 ^a	0.010 $\pm$ 0 ^a	0.030 $\pm$ 0.02 ^a	0.02 $\pm$ 0.004 ^a
Testosterone (ng/mL)	0.29 $\pm$ 0.22 ^a	4.87 $\pm$ 1.0 ^b	7.56 $\pm$ 0.35 ^b	11.52 $\pm$ 0.63 ^c

Superscript letters (a, b, c) represent statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the experimental groups.

[†] Relative weight corresponds to the ratio between the weight of the prostate and that of the whole body.

FIGURE 1

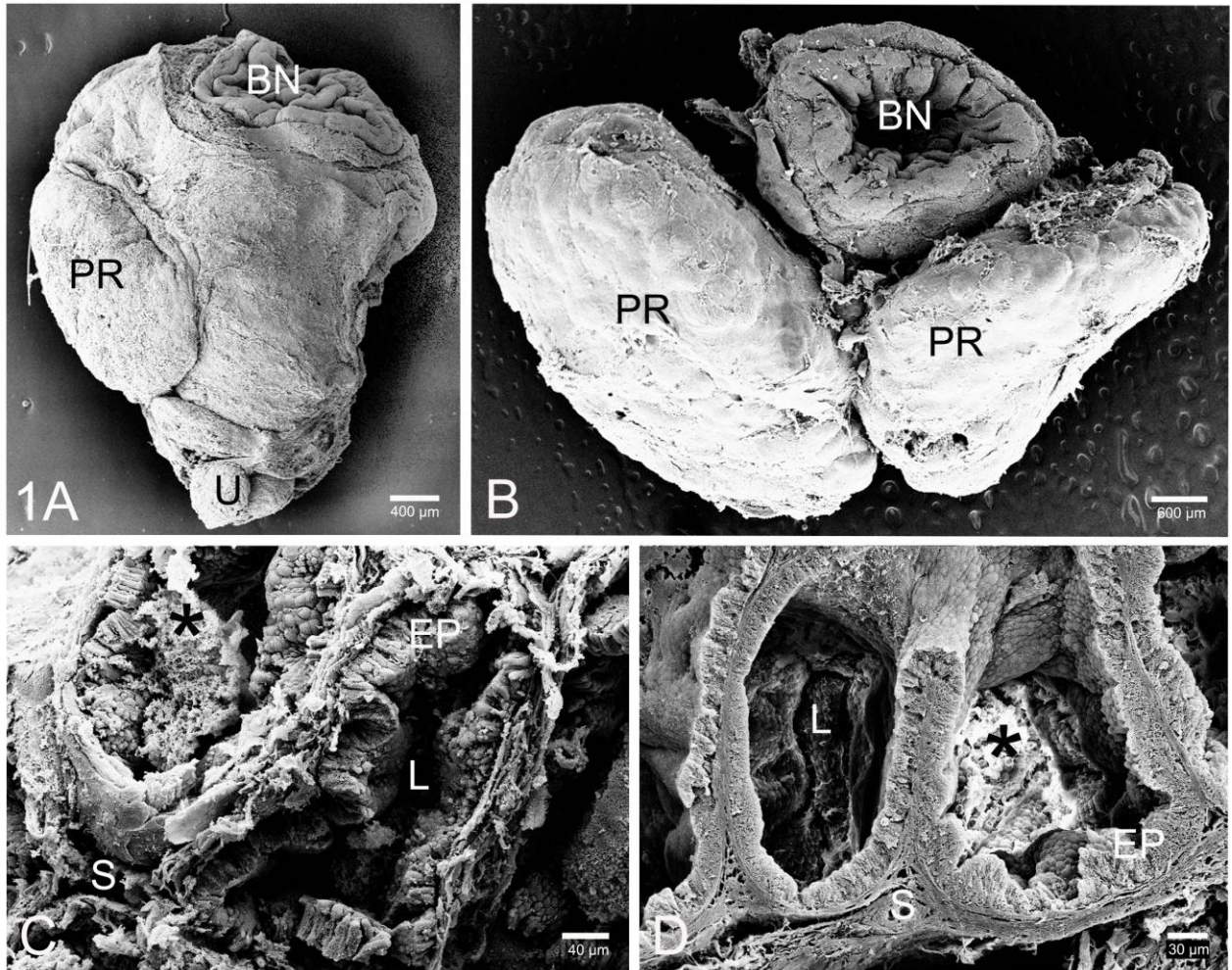


FIGURE 2

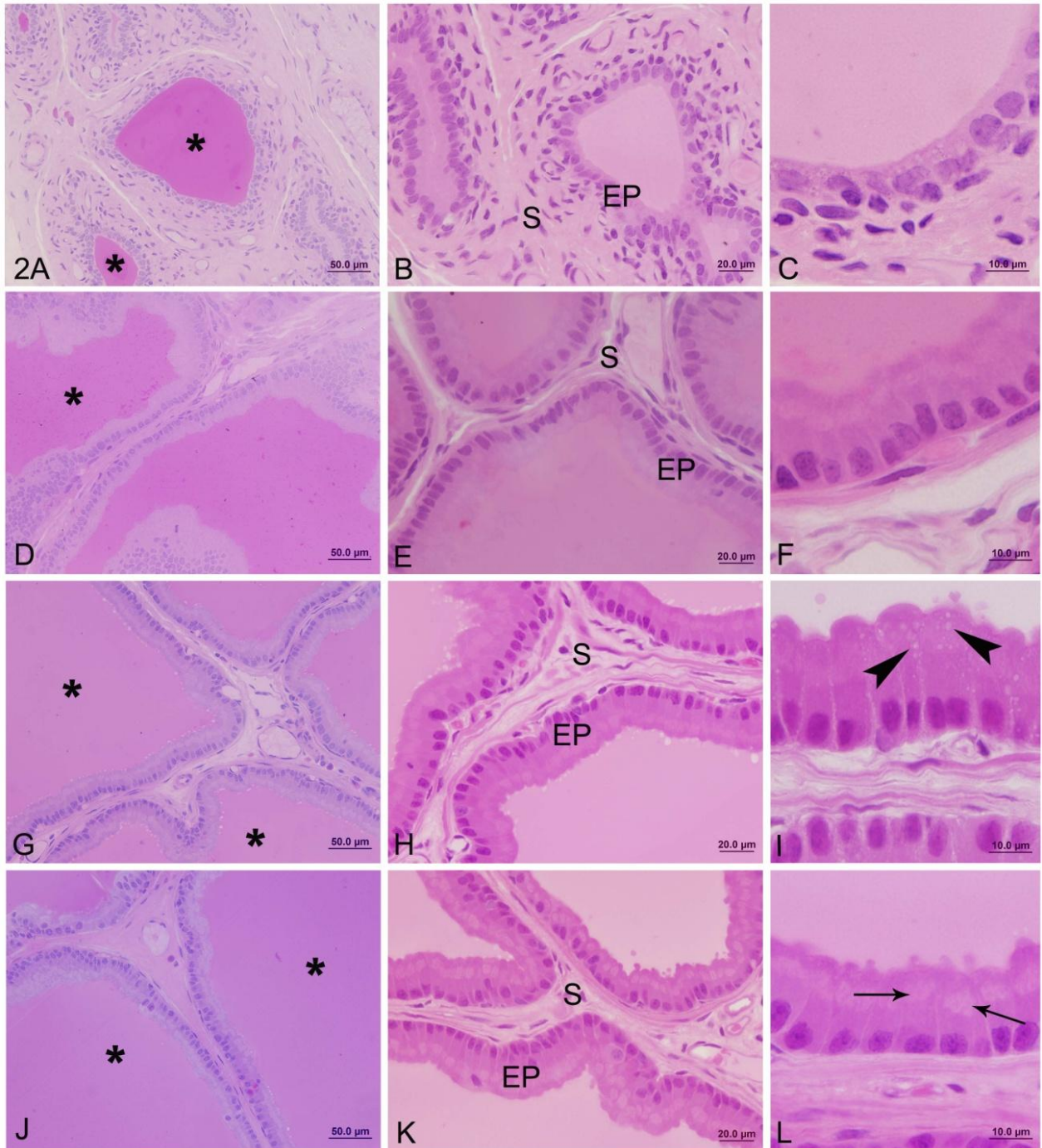


FIGURE 3

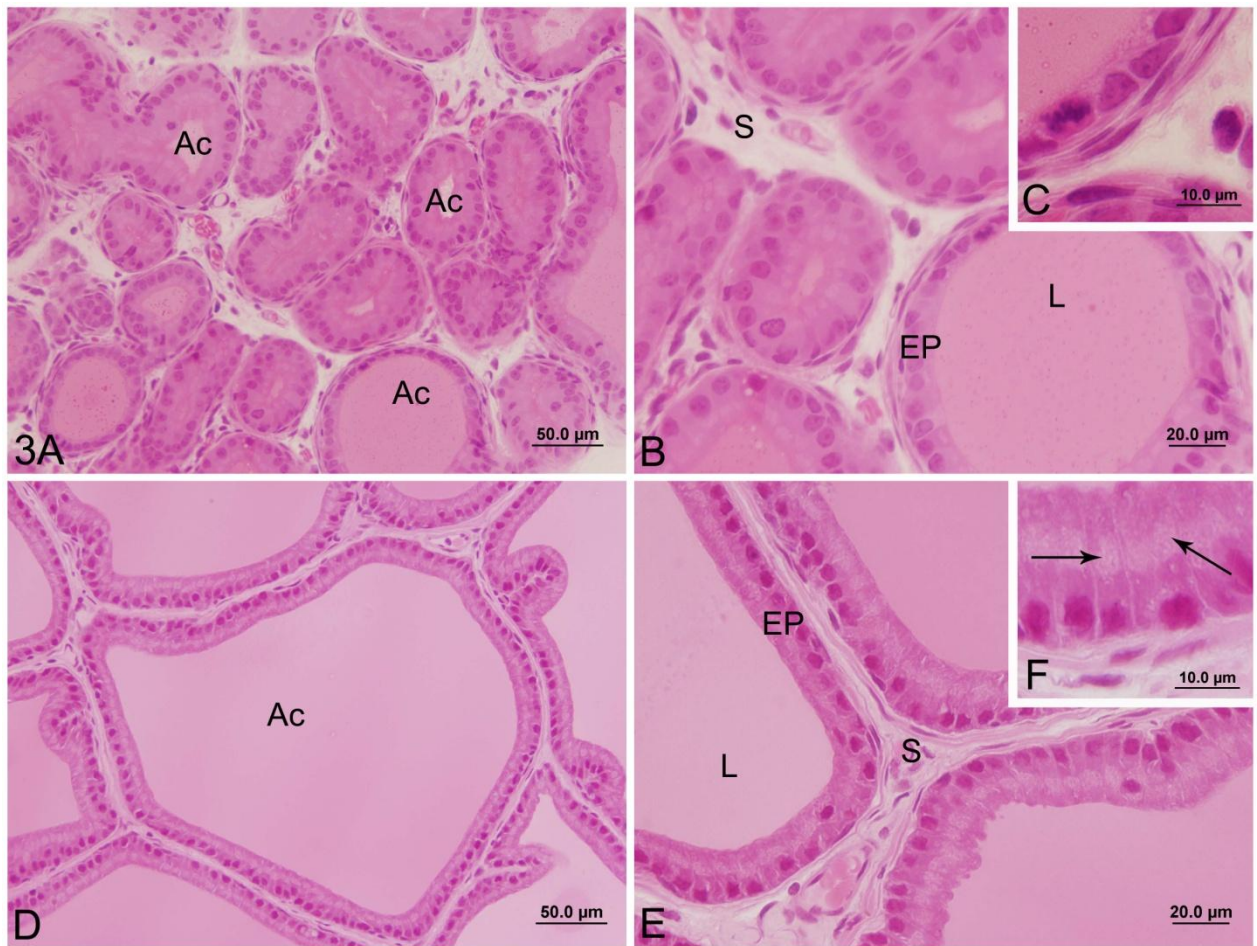


TABLE II. Variations in stereological, morphometrical and kariometric parameters of female prostate during testosterone treatment (mean $\pm$ SEM).

Parameter	Control	Testosterone treatment		
		7 Days	14 Days	21 Days
Stereology data				
Epithelium (%)	16.18 ± 0.7 ^a	37.41 ± 1.8 ^b	24.85 ± 1.3 ^c	26.51 ± 1.7 ^c
Lumen (%)	1.51 ± 0.2 ^a	40.38 ± 2.3 ^b	54.05 ± 1.3 ^c	52.82 ± 2.8 ^c
Stroma (%)	82.25 ± 0.76 ^a	22.2 ± 1.0 ^b	21.1 ± 1.1 ^b	20.92 ± 1.6 ^b
Morphometry data [†]				
Secretory cell height (µm)	14.12 ± 0.2 ^a	18.64 ± 0.2 ^b	18.27 ± 0.2 ^b	20.72 ± 0.2 ^c
Smooth muscle (µm)	21.67 ± 0.5 ^a	7.2 ± 0.5 ^b	7.29 ± 0.2 ^b	8.46 ± 0.2 ^b
Karyometric data [†]				
Nuclear perimeter (µm)	21.63 ± 0.1 ^a	16.38 ± 0.1 ^b	14.52 ± 0.1 ^c	14.51 ± 0.1 ^c
Nuclear área (µm ²)	29.75 ± 0.4 ^a	16.26 ± 0.3 ^b	12.92 ± 0.2 ^c	13.62 ± 0.3 ^c
Nucleus/cytoplasm ratio	0.36 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^c	0.21 ± 0.01 ^b

Superscript (a, b, c) represent statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the experimental groups.

[†]n = 200 measurements in five animals/group.

TABLE III. Stereologic data obtained from the young and adult male rat ventral prostate (mean $\pm$ SEM).

<i>Parameter</i>	Male groups	
	Young (2 weeks)	Adult (12 weeks)
<i>Stereology data</i>		
Ephitelium (%)	39.10 $\pm$ 3.69 ^a	22.56 $\pm$ 3.05 ^b
Lúmen (%)	31.03 $\pm$ 3.67 ^a	68.14 $\pm$ 4.38 ^b
Stroma (%)	29.87 $\pm$ 2.0 ^a	9.29 $\pm$ 1.67 ^b

Superscript (a, b) represent statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between the experimental groups.

FIGURE 4

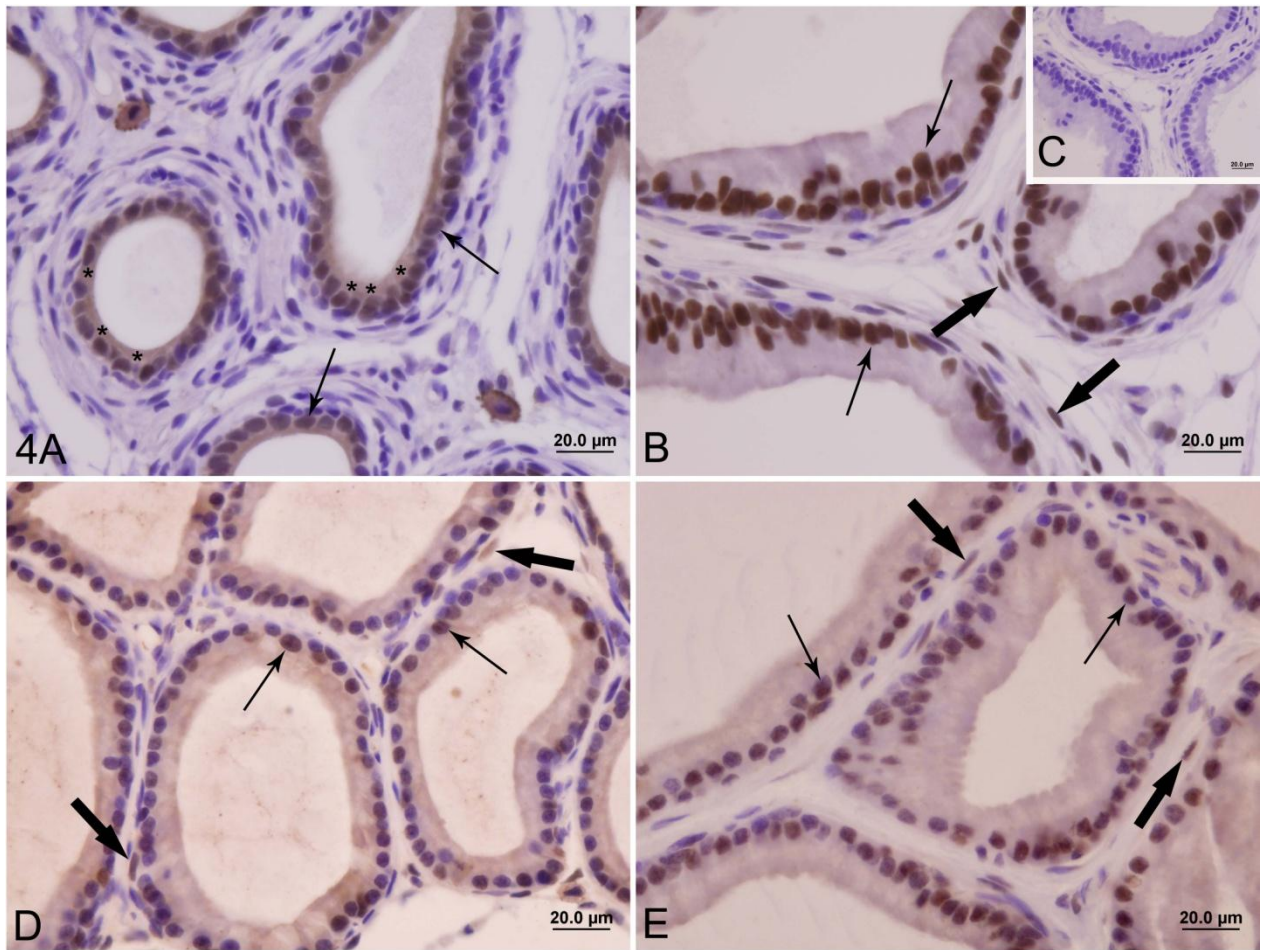


FIGURE 5

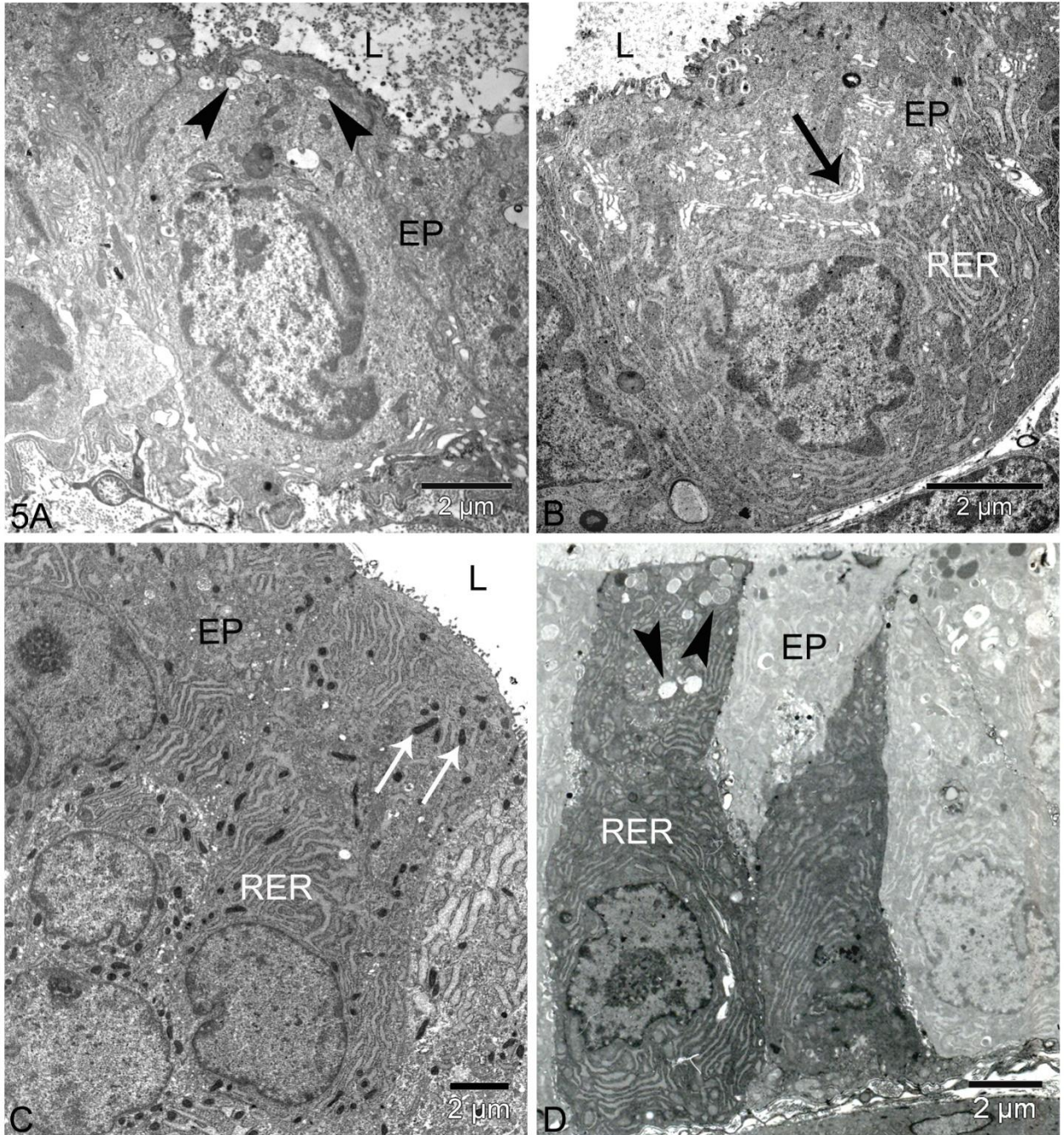
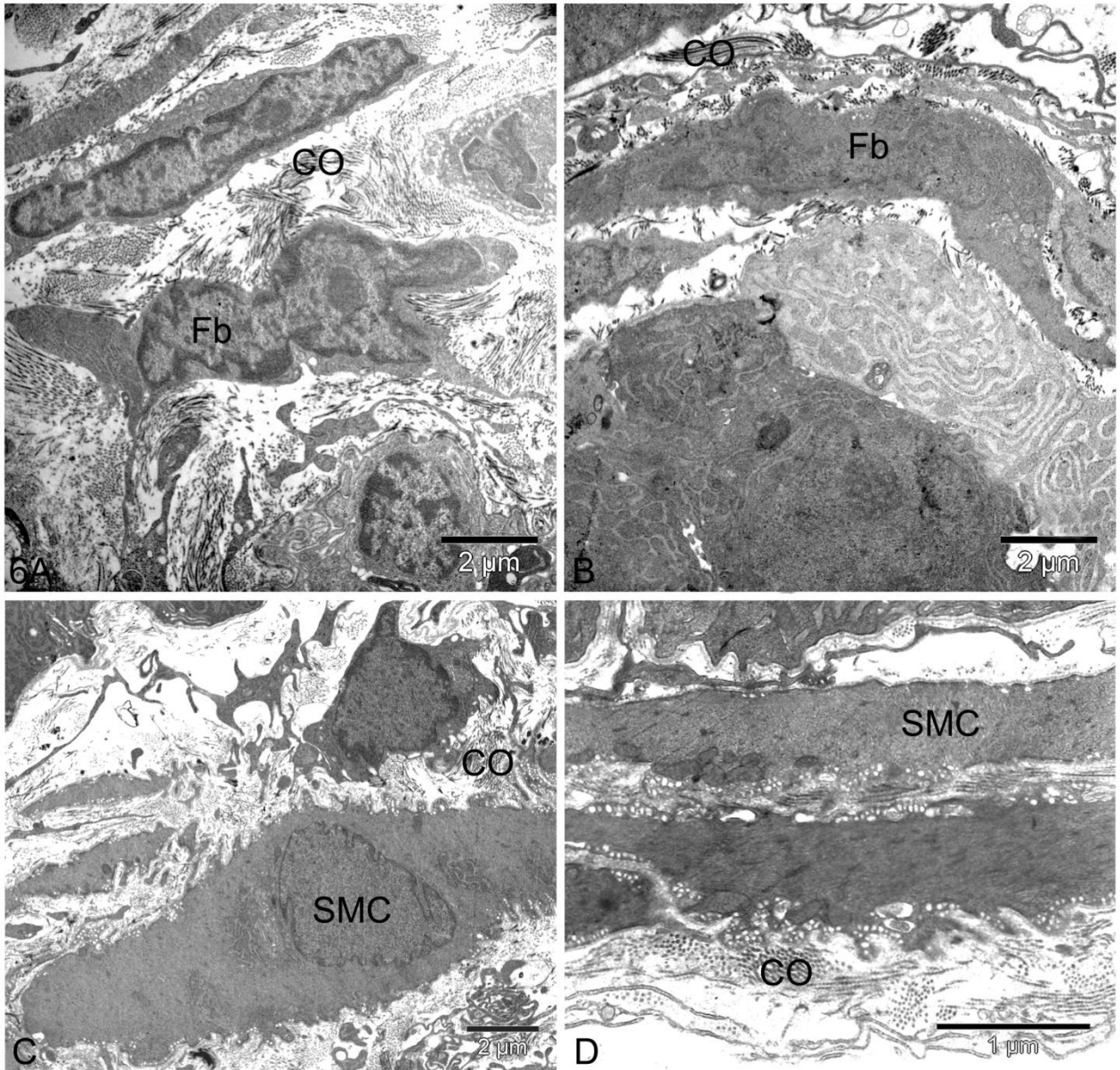


FIGURE 6



A EXPOSIÇÃO ANDROGÊNICA DURANTE A VIDA INTRA-UTERINA E PÓS-NATAL CAUSA ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NA PRÓSTATA MASCULINA E FEMININA DO GERBILO DA MONGÓLIA (*Meriones unguiculatus*).

Manoel F Biancardi¹; Fernanda CA Santos²; Ana PS Perez¹; Rejane M Góes³; Patrícia SL Vilamaior⁴; Sebastião R Taboga².

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

³Departamento de Biologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, UNIRP, Centro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

***Endereço para correspondência:**

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

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

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

Resumo

O desenvolvimento da próstata depende de um controle androgênico regulado e preciso, de forma que sensíveis interferências podem predispor esta glândula a desenvolver doenças como hiperplasia benigna prostática e câncer durante a vida senil. Estes aspectos são de grande interesse e preocupação, tendo em vista que é cada vez maior o número de compostos químicos de disrupção endócrina aos quais os seres humanos estão expostos. Alguns destes compostos têm o potencial de competir pelos receptores androgênicos presentes no tecido prostático, podendo ativar cascatas de eventos que levam a expressão de genes específicos ou mesmo causar alterações epigenéticas no DNA. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a próstata de fêmeas e machos adultos do gerbilo da Mongólia sujeitos a exposição anormal de andrógenos na vida intra-uterina e adulta. Para isto, as próstatas dos animais expostos durante a vida intrauterina (100 µg e 1mg de cipionato de testosterona) e durante a vida adulta (100 µg durante 14 dias) foram submetidas a análises morfométrico-estereológicas, sorológicas, imunohistoquímicas e de reconstrução tridimensional. Os resultados mostraram que a exposição androgênica intra-uterina favorece o surgimento de malformações e de características masculinas nas fêmeas, evidenciadas pelo aumento da distância anogenital, ausência de abertura vaginal e desenvolvimento atípico de tecido prostático ao redor da vagina. Além disso, a exposição anormal aos andrógenos favoreceu o desenvolvimento, já no início da vida adulta, de patologias prostáticas como neoplasias e inflamação nos machos e fêmeas adultos. Estes dados chamam a atenção para a preocupação com o aumento da exposição aos químicos de disrupção endócrina, tendo em vista que estas substâncias agem sobre órgãos do sistema reprodutor favorecendo o desenvolvimento de alterações patológicas durante a senescência.

Introdução

Os disruptores endócrinos são substâncias exógenas que tem um potencial de causar danos ao sistema endócrino, de forma a afetar diretamente o metabolismo de hormônios no organismo (Bigsby, 1999; Toppari, 2008). Além desta peculiaridade, estas substâncias também podem agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo, tanto de machos quanto de fêmeas, tendo em vista que muitas destas substâncias competem com os esteróides endógenos pelos sítios de ligação nos receptores específicos.

Durante o período embrionário, a ação destas substâncias pode levar ao *imprint* de alguns tecidos que formam o seio urogenital (UGS), estrutura a partir da qual se origina a próstata tanto nos machos quanto nas fêmeas. Esta alteração pode ser carregada ao longo do desenvolvimento, podendo manifestar-se mais tardiamente em algum momento da vida do indivíduo.

A suscetibilidade a algumas doenças como hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata tem início já nos primeiros dias de vida, sendo a exposição aos andrógenos, em especial durante o desenvolvimento, um dos fatores de maior risco. Entretanto, ainda não são conhecidos os mecanismos de longa duração da predisposição induzida por andrógenos e a sua relação com o surgimento de doenças prostáticas durante a vida adulta e senil (Singh e Handelsman, 1999).

Estudos realizados com camundongos que foram expostos a diidrotestosterona (DHT) no período pré-natal mostraram que o programa de expressão gênica, controlado pelo AR e que guia o desenvolvimento prostático (organogênese), também é ativado durante a instalação do câncer prostático. Estes aspectos mostram que este programa de expressão gênica, sensível a andrógenos, também atua durante os processos que dão origem a iniciação e a progressão do câncer prostático. Estes estudos mostraram que os genes associados a eventos como angiogênese,

apoptose, migração, motilidade e proliferação, característicos do processo de carcinogênese, são muito similares aos genes envolvidos nos programas do desenvolvimento prostático (Schaeffer et al., 2008).

Diversos trabalhos realizados em nosso laboratório (Santos et al., 2006; Fochi et al., 2008; Corradi et al., 2009) tem mostrado que o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um excelente modelo para se estudar os efeitos de alguns fármacos e de terapias hormonais. Esta característica se deve ao fato de que a próstata destes animais, tanto de machos quanto de fêmeas, é extremamente sensível aos desbalanços hormonais, respondendo a sensíveis interferências hormonais exógenas ou endógenas.

Tendo em vista todos estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através de análises morfológicas, morfométrico-estereológicas, imunohistoquímicas e de reconstrução tridimensional, as glândulas prostáticas da prole de fêmeas e machos de gerbilos expostos ao cipionato de testosterona durante a gestação.

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Para este estudo foram utilizadas 25 fêmeas e 25 machos adultos virgens (90 dias) do gerbilo (*Meriones unguiculatus*, Gerbillinae: Muridae). Foram estabelecidas 25 famílias e, após o acasalamento, as fêmeas grávidas foram submetidas a diferentes formas de manipulação no 18º dia de gestação. Após o nascimento, os filhotes machos e fêmeas foram subdivididos em 5 grupos distintos. Grupo 1 (C): prole proveniente de mães isentas de manipulação. Grupo 2 (OG + O) prole exposta uma única dose (100 µl) do veículo de diluição no 18º gestação e também durante

o 105° ao 120° dias após o nascimento (100 µl/48 horas). Grupo 3 (TGB): prole exposta a uma única dose mais baixa de cipionato de testosterona (T – 100 µg/100 µl de óleo de milho) durante o 18° dia de gestação. Grupo 4 (TGB + T): prole exposta a uma única dose mais baixa de T durante o 18° dia de gestação (T – 100 µg/100 µl de óleo de milho) e também durante o 105° ao 120° dias após o nascimento (T - 100 µg/48 horas). Grupo 5 (TGA): prole exposta a uma única dose mais alta de T (1 mg/100 µl de óleo de milho) durante o 18° dia de gestação. Todas as fêmeas grávidas manipuladas receberam o hormônio ou o veículo de diluição no 18° dia após o acasalamento, e como o gerbilo apresenta período de gestação variável (24-26 dias), só foram utilizados os animais que nasceram entre o 6° e 8° dia após aplicação. Os filhotes machos e fêmeas dos grupos experimentais foram isolados e mantidos em diferentes caixas até completarem 120 dias de idade.

No momento do sacrifício, as medidas dos pesos corporais, dos complexos prostáticos dos machos (uretra + próstata ventral, dorsal e dorsolateral) e das fêmeas (uretra + próstata), dos testículos, dos ovários e das adrenais foram obtidas. Os fragmentos foram dissecados com a utilização de microscópio estereoscópico Olympus SD-ILK (Olympus Optical Co. LTD, Japan). Nos machos, apenas a próstata ventral foi considerada para as análises histológicas. As medidas de distância anogenital (DAG) foram obtidas com a utilização de paquímetro digital (King Tools).

Todos os animais foram mantidos em Biotério de manutenção da Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, sob condições de luminosidade, temperatura adequada e alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Unesp e do COBEA. Somente as fêmeas em proestro foram utilizadas neste estudo, sendo a

técnica de esfregaço vaginal o meio para se averiguar esta fase do ciclo (Nishino e Totsukawa, 1996).

Dosagem hormonal sérica

Os níveis plasmáticos de testosterona (T), estradiol (E₂) e progesterona (Pr) foram determinados por métodos imunohistoquímicos. Seis amostras de cada grupo experimental foram centrifugadas a 3000rpm e armazenadas a -20°C para posteriores análises. As medidas foram realizadas em aparelho automatizado Vitros ECI-Johnson & Johnson para análise quimioluminescente ultra-sensível. A sensibilidade do método foi de 0,1-150 ng/ml para testosterona, 0,1-3814 pg/ml para estradiol e 0,1-100 ng/ml para progesterona.

Análise morfológica

O complexo prostático (uretra + tecido prostático associado) foi fixado por imersão em solução de Karnovsky (paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) 48 horas. Depois da fixação, os tecidos foram lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e embebidos em resina de glicol metacrilato (Historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany), sendo posteriormente seccionados a 3µm em micrótomo rotatório automático (Leica RM2155, Nussloch, Germany). Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina (H&E) e pela reticulina de Gömöri. Os tecidos foram analisados e fotografados em fotomicroscópio de luz Zeiss Jena (Zeiss-Jena, Jena, Germany) ou Olympus (Olympus, Hamburg, Germany).

Análises morfométrica e estereológica

As análises morfométricas e estereológicas foram realizadas a partir de lâminas coradas pela técnica de HE que foram analisadas em Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus (Média Cybernetics). A frequência relativa dos compartimentos teciduais da próstata feminina foi determinada de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978) e aplicado à próstata por Huttunen et al. (1981). Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal; N = 5). A frequência relativa foi calculada depois da contagem do número de pontos que coincidiram com cada um dos compartimentos teciduais da glândula (epitélio, lúmen e estroma).

Para as análises morfométricas, foram realizadas 200 medidas (4 medidas por campo; 10 campos por animal; N= 5) de altura das células epiteliais (μm) e de espessura da camada muscular lisa (μm).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no software Statistica 6.0 (Copyright©StarSoft, Inc. 1984-1996, Tulsa, OK, USA). Os testes de hipóteses utilizados para comprovar a significância dos resultados foram a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Reconstrução Tridimensional

Para observar o padrão de brotamento acinar da próstata de machos e fêmeas, foi realizada a reconstrução de um segmento de 20 cortes da região central do complexo prostático. Após o processamento histológico, uma glândula prostática das fêmeas e dos machos dos grupos C e

TGA foram seccionadas à 3µm em série e coradas pela HE. A obtenção à microscopia de luz e o processamento das imagens digitais sequenciais foram realizadas no software Image-Pro AMS 6.0 (Media Cybernetics). Após o alinhamento das imagens, a uretra, a vagina, os ductos e os alvéolos prostáticos foram selecionados separadamente para determinar a forma e a localização destas estruturas nos respectivos cortes. Subseqüentemente, o software reconstruct (Fiala, 2006) criou uma interface de ligação entre cada corte, e, em seguida, gerou o modelo 3D de cada grupo experimental.

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos das próstatas foram fixados em paraformol 4% durante 24 horas ou em metacarn (metanol, clorofórmio e ácido acético) por 3 horas. Depois da fixação, os tecidos foram lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e embebidos em paraplast (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany), sendo posteriormente seccionados a 5µm em micrótomo rotatório automático (Leica RM2155, Nussloch, Germany) para a obtenção dos cortes histológicos. Por fim, as seções histológicas foram submetidas a reações imunohistoquímicas para a detecção dos receptores de andrógeno (AR), receptores de estrógenos (ER- α), p63, PCNA e α -actina. Os anticorpos primários para AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology), ER- α (rabbit polyclonal IgG, MC-20, Santa Cruz Biotechnology), p63 (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-843, 4A4, Santa Cruz Biotechnology), PCNA (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-56, PC10, Santa Cruz Biotechnology) e α -actina (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology) foram aplicados em uma diluição de 1:100. Posteriormente, as seções histológicas foram incubadas com anticorpos específicos conjugados à peroxidase

(Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) ou com polímeros (Post Primary Block e Polymer) do kit Novocastra (Newcastle Upon Tyne, UK), por 45 minutos em 37°C. A 3,3'-diaminobenzidina foi utilizada como substrato da peroxidase. Os cortes foram contracorados com a hematoxilina de Harris. As lâminas com os cortes histológicos foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio de luz Zeiss Jenaval (Zeiss-Jenaval, Jena, Germany) ou Olympus (Olympus, Hamburg, Germany).

Resultados

Análise biométrica

As análises biométricas (Tabela I) mostraram que não houve variação significativa em relação ao peso corporal dos animais machos. Já os pesos dos complexos prostáticos sofreram uma redução estatisticamente significativa nos animais tratados, atingindo os menores valores nos grupos TGB + T e TGA. Em relação às medidas dos pesos relativos dos complexos prostáticos dos machos, todos os grupos tratados (TGB, TGB + T e TGA) e mais o grupo controle com veículo (OG + O) apresentaram valores significativamente menores para este parâmetro em relação ao grupo controle (C). Além disso, foram observadas diferenças deste parâmetro entre os machos OG + O e TGA. Não houve variação significativa em relação ao peso das glândulas adrenais entre nenhum grupo dos machos analisados. Em relação aos pesos dos testículos, foram observadas diferenças significativas apenas para o grupo de machos TGB + T, que apresentaram os menores valores entre os grupos experimentais analisados.

As análises biométricas de peso corporal, peso do complexo prostático, peso relativo e peso da adrenal não foram significativas entre nenhum grupo experimental das fêmeas analisadas.

Entretanto, os dados de peso ovariano mostraram que as fêmeas do grupo TGA apresentaram os maiores valores analisados, ao passo que o grupo TGB + T teve o menor valor, sendo estatisticamente diferente dos grupos C e TGB. Os valores referentes à medida da distância anogenital (DAG) foram significativamente maiores apenas para o grupo das fêmeas TGA. As medidas de peso do complexo prostático e peso relativo das fêmeas do grupo TGA não foram obtidas em decorrência da formação de uma massa teratogênica no trato urogenital destes animais, dificultando o isolamento do complexo prostático.

Dosagem hormonal sérica

As análises das dosagens hormonais séricas (Tabela I) de testosterona, tanto de machos quanto de fêmeas, mostraram diferenças significativamente maiores apenas para o grupo TGB + T, os quais receberam testosterona na vida adulta durante 14 dias antes de serem sacrificados. As medidas de estradiol foram significativamente maiores apenas para as fêmeas do grupo TGB e OG + O. Os valores para a progesterona não foram estatisticamente significativos entre nenhum grupo experimental analisado, tanto dos machos quanto das fêmeas.

Aspectos anatômicos observados durante a dissecação dos animais adultos

Nenhuma alteração macroscópica do sistema reprodutor dos animais machos foi observada no momento da dissecação. Já nas fêmeas do grupo TGA, foi possível observar a ausência de abertura vaginal, aumento da distância anogenital (DAG) além da formação de hidrometrocolpos.

Características morfológicas da glândula prostática de machos e fêmeas

Através da análise morfológica pela técnica de HE (Fig. 1), foi possível observar que as glândulas prostáticas dos machos dos grupos C (Fig. 1a) e OG + O (Fig. 1b), apresentaram padrões normais no que diz respeito à disposição epitelial e estromal. Entretanto, todos os grupos de machos tratados (TGB, TGB + T e TGA) apresentaram alterações prostáticas de várias naturezas. Entre elas, pôde-se observar a formação de neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP) (Fig. 1c, d, e) e a presença de focos inflamatórios tanto no compartimento epitelial como estromal (Fig. 1e).

Da mesma forma que os machos, as próstatas das fêmeas C (Fig. 1f) e OG + O (Fig. 1g), apresentaram padrões morfológicos normais no que diz respeito aos componentes epiteliais e estromais. Contudo, nos grupos das fêmeas tratadas (TGB, TGB + T e TGA) foi freqüente a observação de lesões prostáticas, principalmente nos animais do grupo TGA. Lesões como neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP) (Fig. 1h, j) e metaplasia epitelial escamosa (Fig. 1i) puderam ser verificadas. Entretanto, a presença de focos inflamatórios, frequente nos machos, foi raramente observada nas próstatas das fêmeas tratadas.

Através da técnica de reticulina de Gomori, foi possível observar a disposição normal das fibras reticulares nas próstatas de machos controle (C) (Fig. 2a), em detrimento de regiões com desorganização destes elementos que puderam ser evidenciadas nas glândulas de machos tratados (TGA) (Fig. 2b). Além disso, a imunohistoquímica para α -actina também permitiu a caracterização do padrão de distribuição da camada de musculatura lisa adjacente ao epitélio prostático tanto nas glândulas de machos controle (C) (Fig. 2c) quanto de animais tratados (TGA) (Fig. 2d). Nas próstatas dos animais machos do grupo TGA foi possível observar regiões de

descontinuidade da camada de musculatura lisa, subjacentes a neoplasias intraepiteliais prostáticas, sugerindo possíveis focos de proliferação de células epiteliais em direção ao estroma.

Nas fêmeas, aspectos morfológicos semelhantes aos dos machos puderam ser observados. Nos animais controle (grupo C) (Fig. 2e), foi possível observar um padrão normal de distribuição das fibras reticulares, ao passo que nas fêmeas tratadas do grupo TGA as fibras reticulares apresentaram-se significativamente alteradas, com regiões de completa desorganização ou mesmo de ausência destas fibras (Fig. 2f). Através da reação de imunohistoquímica para α -actina, foi possível observar padrões normais de disposição da camada de musculatura lisa nas próstatas das fêmeas do grupo C (Fig. 2g). Entretanto, de forma semelhante ao verificado nas próstatas dos machos TGA, foram observadas regiões de completa desorganização e de descontinuidade da camada de musculatura lisa nas próstatas das fêmeas do grupo TGA, caracterizando focos de intensa remodelação estromal adjacente ao epitélio secretor (Fig. 2h).

Dados estereológicos da próstata de machos e fêmeas

Através da análise estereológica (Tabela II) da próstata dos machos, foi possível observar um aumento estatisticamente significativo dos compartimentos epiteliais e luminais dos grupos TGB + T e TGA. Já em relação ao estroma, a única diferença significativa foi observada no grupo OG + O, cuja proporção do compartimento estromal foi a de menor valor observada.

A estereologia das próstatas das fêmeas (Tabela II) mostrou uma menor proporção epitelial das glândulas no grupo OG + O. Já o compartimento luminal sofreu uma expressiva redução no grupo experimental TGA, ao contrário do que ocorreu com a área estromal, aumentando significativamente neste mesmo grupo e atingindo os maiores valores observados.

Aspectos morfométricos das próstatas dos machos e das fêmeas

De forma geral, a morfometria (Tabela II) apontou um significativo aumento na altura do epitélio prostático nas glândulas dos machos TGB e TGB + T, sendo os valor médio para o grupo TGB + T o maior entre todos. Em relação à espessura camada de musculatura lisa, somente os machos dos grupos TGB e TGB + T apresentaram valores médios significativamente diferentes dos demais, mesmo sendo estes valores muito próximos entre si.

Nas fêmeas, todos os grupos expostos aos andrógenos na gestação (TGB, TGB + T e TGA) apresentaram um aumento significativo na altura do epitélio prostático dos animais adultos (Tabela II). Em relação à espessura da camada de musculatura lisa, os maiores valores também foram observados nas fêmeas dos grupos TGB, TGB + T e TGA.

Reconstrução tridimensional

A reconstrução tridimensional demonstrou um típico padrão de localização e distribuição ventral da próstata nos machos C (Fig. 3a) e TGA (Fig. 3b). No entanto, as fêmeas do grupo TGA (Fig. 3d), diferentemente das fêmeas C (Fig. 3c), apresentaram um padrão totalmente atípico de distribuição glandular, onde além dos ácinos para-uretrais típicos pode-se observar inúmeros ácinos ao redor da parede vaginal.

Imunohistoquímica (AR, ER- α , P63 e PCNA)

Receptor androgênico - AR

A reação imunohistoquímica para receptor androgênico (AR) (Fig. 4a - e) mostrou um padrão semelhante de reação nuclear nas próstatas de todos os grupos experimentais de machos

analisados. Além das células epiteliais secretoras serem AR positivas, também foi possível identificar células estromais (Fig. 4c, e) como fibroblastos e células musculares lisas com marcação positiva para AR.

A reação de AR para todos os grupos experimentais das fêmeas (Fig. 4f - j) também mostrou um perfil homogêneo de marcação. Entretanto, diferente do observado nas glândulas prostáticas dos machos, as células epiteliais das próstatas das fêmeas apresentaram, preferencialmente, uma reação positiva para AR citoplasmático. A única exceção foi o grupo TGB + T (Fig. 4i), o qual apresentou uma marcação nuclear mais intensa quando comparado aos outros grupos de fêmeas. Além disso, não foi tão comum a identificação de células estromais (Fig. 4f) (fibroblastos e células musculares lisas) com marcação positiva para receptor androgênico.

Receptor estrogênico - ER- α

Em relação à imunohistoquímica para receptor de estrógeno alfa, foi possível observar uma reação estromal e epitelial positiva em todas as próstatas dos grupos experimentais (C, OG + O, TGB, TGB + T e TGA) dos machos analisados (Fig. 5a - e). Entretanto, poucas células estromais da próstata destes machos (Fig. 5b, c), como fibroblastos e células musculares lisas, foram verificadas com reação positiva para ER- α . Entretanto, nos animais do grupo TGA foi possível observar uma reatividade epitelial e estromal mais intensa, principalmente em regiões glandulares onde se localizavam lesões como neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs) (Fig. 5e).

O padrão de marcação para os receptores de estrógeno alfa nas próstatas das fêmeas (grupos C, OG + O, TGB, TGB + T e TGA) (Fig. 5f - g) mostrou certa semelhança com a dos

machos, com reatividade tanto estromal quanto epitelial. No entanto, nas fêmeas, a localização de células estromais (fibroblastos e células musculares lisas) com reação positiva para ER- α foi bem mais freqüente quando comparada à dos machos.

Proteína P63

A reação imunohistoquímica para o marcador de célula basal p63 mostrou um padrão de marcação semelhante para a maioria dos grupos analisados (C, OG + O, TGB, TGB + T), tanto de machos (Fig. 6a - d) quanto de fêmeas (Fig. 6f - i), com exceção do grupo TGA. Na próstata dos machos deste grupo, em regiões afetadas por lesões neoplásicas intraepiteliais (NIP), observou-se a marcação de células em regiões não basais do epitélio prostático (Fig. 6e). Já nas próstatas das fêmeas, foi possível notar um aumento de células basais em regiões com intensa inflamação (Fig. 6j).

Antígeno nuclear de proliferação celular - PCNA

A reação com o marcador de proliferação PCNA mostrou um padrão semelhante de células em proliferação para os grupos C, OG + O, TGB e TGB + T, tanto para machos (Fig. 7a - d) quanto para fêmeas (Fig. 7f - i). Entretanto, nas próstatas dos machos (Fig. 7e) e das fêmeas (Fig. 7j) do grupo TGA foi possível observar um grande número de células em proliferação em regiões com neoplasias intraepiteliais prostáticas, muito comuns nos animais deste grupo experimental

Discussão

Existem diversos estudos avaliando os efeitos de disruptores endócrinos (EDCs) com ação estrogênica sobre o trato reprodutivo de roedores, em especial sobre a próstata (Prins et al., 2008; Söder, 2005; Timms et al., 2005). Entretanto, não existem estudos sobre os efeitos da exposição intra-uterina aos disruptores androgênicos na próstata de gerbilos.

De forma geral, este estudo mostrou que a exposição androgênica intra-uterina altera o padrão morfofisiológico da glândula prostática de machos e fêmeas adultas do gerbilo da Mongólia, levando a um quadro patológico caracterizado pela presença de lesões como neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs), metaplasia epitelial escamosa, além de focos com infiltrados de células inflamatórias.

A análise biométrica apontou uma significativa redução no peso testicular dos machos do grupo TGB + T. Trabalhos com ratos mostraram que mesmo a administração de baixas dosagens de testosterona pode causar a supressão da espermatogênese e também levar à apoptose de células da linhagem germinativa (Lue et al., 2000), acarretando na diminuição da massa dos testículos. Isso pode explicar a diminuição significativa no peso dos testículos nos machos do grupo TGB + T.

Os resultados sugerem que a redução significativa nos pesos dos complexos prostáticos nos machos dos grupos TGB, TGB + T e TGA pode ser uma resposta à interferência da testosterona exógena durante a vida intra-uterina. Entretanto, novos estudos serão necessários para responder quais os possíveis mecanismos envolvidos que levam a estas alterações no peso dos complexos prostáticos.

As alterações mais significativas foram observadas nas fêmeas do grupo TGA. Além de desenvolverem várias lesões prostáticas, estas fêmeas foram masculinizadas pela exposição aos andrógenos durante o desenvolvimento. Dentre as alterações, as mais evidentes foram o aumento da distância anogenital, a desconfiguração no padrão de formação dos brotos prostáticos, o desenvolvimento de hidrometocolpos e o aparecimento de neoplasias intraepiteliais prostáticas.

A maioria destas alterações causadas pela exposição à andrógenos durante o desenvolvimento já foram descritas em trabalhos anteriores (Singh e Handelsman, 1999; Wolf et al., 2002; Hotchkiss et al., 2007a,b) feitos com outros roedores, mas não com o gerbilo da Mongólia. Além disso, não existem relatos na literatura sobre a ação de EDCs com ação androgênica sobre o desenvolvimento da próstata feminina (Glândula de Skene) e os seus efeitos durante a vida adulta.

A reconstrução tridimensional mostrou que as fêmeas expostas a uma dose alta de propionato de testosterona na vida intra-uterina apresentaram um padrão totalmente atípico de distribuição acinar, caracterizado pela presença destas estruturas também ao redor da vagina. Estes resultados reforçam as evidências de que os andrógenos tem um papel essencial durante a organogênese prostática, influenciando o padrão de formação e de ramificação dos brotos prostáticos, como demonstrado em outros estudos com roedores (Thomson et al. 2002; Thomson, 2008).

No momento da dissecação das fêmeas TGA, foi verificada uma severa distensão e retenção de fluido uterino, além de atresia vaginal, anomalia caracterizada como hidrometrocolpos. Pesquisas anteriores mostraram que a exposição à propionato de testosterona durante o desenvolvimento (14º-19º dia de gestação) leva ao aparecimento de hidrometrocolpos em fêmeas de ratos Sprague-Dawley (Wolf et al. 2002).

As análises hormonais mostraram um aumento significativo da testosterona no plasma dos animais tratados durante 14 dias na vida adulta. Nas fêmeas do grupo TGB + T, este aumento da concentração androgênica resultou em um maior desenvolvimento da próstata, além de uma diminuição no peso ovariano. Estudos anteriores (Santos et al., 2006) já haviam relatado sobre os efeitos da administração de testosterona sobre a próstata das fêmeas e os ovários de gerbilos adultos. De acordo com Santos e colaboradores (2006), a testosterona promove uma rápida resposta proliferativa das células epiteliais seguida de um brusco aumento na atividade secretora glandular. Nos ovários, o tratamento androgênico resulta no aparecimento de gônadas com fenótipo policístico, além do desenvolvimento de hiperplasia das células estromais (Santos et al., 2006).

O aumento da distância anogenital (DAG) somente nas fêmeas do grupo TGA, e não nos grupos TGB e TGB + T, mostra a resposta dose-dependente à testosterona. Pesquisas feitas com ratos Sprague-Dawley mostraram que as fêmeas recém nascidas expostas à dosagem de 1 mg de propionato de testosterona durante a gestação (14º-19º dia de gestação) tiveram um aumento da DAG, ao passo que os machos não apresentaram nenhuma alteração deste parâmetro, nem mesmo quando expostos a concentrações mais elevadas (Wolf et al., 2002). Estudos feitos com ratos Wistar também demonstraram que a exposição fetal à andrógenos provoca um aumento da distância anogenital, que é um marcador da ação androgênica fetal (Welsh et al., 2009). Contudo, diferente da metodologia adotada por Wolf e colaboradores (2002) e Welsh e colaboradores, na qual os andrógenos eram administrados diariamente por um período prolongado, o nosso estudo mostrou que uma única dose de 1 mg de testosterona por animal foi o suficiente para causar um aumento da DAG nas fêmeas do grupo TGA.

A resposta dose-dependente pode ser explicada pelo papel que a placenta tem como barreira placentária. Estudos feitos com ratos Sprague-Dawley mostraram que a placenta pode bloquear a passagem ou mesmo metabolizar os andrógenos em outros esteróides, modulando, desta forma, a concentração de hormônios fetais (Hotchkiss et al., 2007b). Um destes eventos é a aromatização (pela enzima p450 ou aromatase) da testosterona na placenta, o que torna difícil definir a quantidade exata de testosterona que atinge os fetos (Welsh et al., 2009).

As alterações estromais puderam ser estudadas com as técnicas de reticulina de Gomori e imunohistoquímica para α -actina. As principais alterações foram observadas nos animais do grupo TGA, podendo-se encontrar regiões com desorganização das fibras reticulares adjacentes ao epitélio prostático. A imunohistoquímica para α -actina mostrou áreas de descontinuidade da camada de musculatura lisa, caracterizando regiões de intensa remodelação estromal, em decorrência da proliferação celular e da infiltração de células inflamatórias no estroma adjacente. A imunohistoquímica para α -actina tem sido utilizada como nos estudos de caracterização das lesões prostáticas (Shappell et al., 2004), apresentando-se como uma boa técnica para a identificação de alterações estromais e possíveis focos de proliferação acompanhada de infiltração epitelial no estroma.

De uma maneira geral, as análises estereológicas mostraram que as próstatas dos machos e das fêmeas TGB, TGB + T e TGA tiveram um aumento da área correspondente ao epitélio, uma diminuição do volume luminal e um aumento do compartimento estromal. Estas evidências estão de acordo com as características morfológicas apresentadas pelas glândulas dos animais expostos aos andrógenos na vida intra-uterina, sendo caracterizada por uma glândula prostática composta por um epitélio mais proliferativo e um lúmen mais reduzido.

A morfometria também mostrou, de forma geral, um significativo aumento na altura do epitélio prostático tanto dos machos quanto das fêmeas expostas aos andrógenos durante a gestação. Outro aspecto relevante é que a administração adicional de testosterona durante a vida adulta nas fêmeas do grupo TGB + T não causou um maior crescimento das células epiteliais prostáticas destes animais quando comparados às das fêmeas dos grupos TGB e TGA, cujos valores foram muito semelhantes. Estes aspectos sugerem que estas células foram, de alguma forma, afetadas pelos andrógenos durante a organogênese prostática, tornando-se morfo-fisiologicamente diferentes de células epiteliais da próstata de animais controle.

Outro aspecto relevante, mais destacável nas fêmeas TGA, foi o aumento significativo da área correspondente ao estroma. Além da estereologia, a análise morfométrica também apontou para um estroma mais desenvolvido, caracterizado pelo aumento da camada de musculatura lisa principalmente nas fêmeas dos grupos TGB, TGB + T e TGA. Estudos mais recentes tem sugerido que uma das características da hiperplasia prostática benigna (HPB) é a transição de células epiteliais em mesenquimais e posteriormente a sua diferenciação em miofibroblastos, o que resulta em um aumento significativo da área estromal glandular (Alonso-Magdalena et al., 2008).

Os estudos imunohistoquímicos para AR mostraram um padrão de marcação nuclear deste receptor em todos os grupos de machos analisados, ao passo que nas fêmeas a marcação foi predominantemente citoplasmática, exceto as do grupo TGB + T. Estas diferenças no padrão de localização celular dos ARs ocorrem em decorrência da presença ou não de andrógenos. Estudos mostraram que os andrógenos regulam a localização dos ARs na célula (Black e Paschal, 2004). Como a concentração de andrógenos plasmáticos nas fêmeas é muito mais baixa que a dos machos, estes receptores não estão saturados, permanecendo, predominantemente, no citoplasma

celular. Entretanto, nos machos, a concentração androgênica elevada faz com que a maioria dos receptores estejam ligados aos andrógenos e consequentemente localizados no interior do núcleo celular.

Pesquisas recentes tem comparado os diferentes papéis dos receptores estrogênicos ER- α e ER- β na próstata (Morani et al., 2008; McPherson et al., 2008; Ellem e Risbridger, 2009). Segundo a literatura, a ativação do ER- α está relacionada à proliferação celular aberrante, inflamação e desenvolvimento de lesões pré-malignas, enquanto que o ER- β desempenha funções críticas na sinalização epitélio-estroma e na mediação dos efeitos anti-proliferativos dos andrógenos sobre o epitélio prostático (Ellem e Risbridger, 2009). A imunohistoquímica mostrou uma forte reatividade ao ER- α em regiões da próstata acometidas por neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP), principalmente nos machos do grupo TGA. Estes resultados reforçam o papel do ER- α na promoção de proliferação, inflamação e indução de lesões pré-malignas.

A imunohistoquímica para p63 mostrou um padrão diferenciado de marcação nas próstatas dos machos do grupo TGA, caracterizada pela perda da camada de células basais em regiões com neoplasias. Já nas próstatas das fêmeas do grupo TGA foi possível observar regiões com acúmulos de células basais próximos à regiões com focos inflamatórios. Segundo Grisanzio e Signoretti (2008), em neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs) de alto grau ocorre a perda progressiva da camada de células basais, levando a uma expressão desigual da p63 nestes tipos de lesões. A utilização da p63 tem sido uma importante ferramenta no diagnóstico do câncer prostático, tendo em vista que ela tem um papel na regulação da diferenciação, desenvolvimento, proliferação e apoptose da célula epitelial prostática. No entanto, o papel da p63 na tumorigênese ainda não é bem entendido, sendo necessários novos estudos para se entender os mecanismos de regulação desta proteína (Grisanzio e Signoretti, 2008).

Além do p63, o marcador PCNA também é muito utilizado para se estudar os padrões de proliferação celular em pesquisas com intervenções terapêuticas (Shapell et al., 2004). Com o auxílio deste marcador foi possível notar um expressivo aumento de células em proliferação em regiões da próstata acometidas por neoplasias, tanto das fêmeas quanto dos machos TGA. Nos outros grupos experimentais, de forma diferente, a reação positiva ao PCNA mostrou poucas células em proliferação ao longo da glândula prostática.

Com base nos resultados, nós acreditamos que situações anormais durante a organogênese, como exposição aos EDCs e a hormônios exógenos, síndrome do ovário policístico e hiperandrogenismo podem causar alterações epigenéticas no padrão de desenvolvimento da próstata, favorecendo o surgimento de lesões neoplásicas pré-malignas durante a vida adulta.

Tendo em vista a utilização da testosterona exógena como modelo de disruptor endócrino, pode-se concluir que a ação dos químicos de disrupção endócrina (EDCs) é dose-dependente da concentração, como já citado em outros trabalhos com andrógenos (Wolf et al., 2002; Hotchkiss et al., 2007b). Este fato pôde ser observado ao longo do experimento, no qual as alterações mais significativas, em decorrência da exposição androgênica intra-uterina, foram mais evidentes nos animais do grupo TGA. Além disso, este estudo mostrou que as fêmeas, principalmente as do grupo TGA, foram as mais afetadas em relação às alterações fenotípicas da próstata, já que os andrógenos tem um efeito masculinizante durante o desenvolvimento do sistema reprodutor destes animais.

Este efeito diferencial de resposta à exposição androgênica intra-uterina pelas fêmeas aponta para uma maior atenção em se monitorar a glândula prostática no organismo feminino. Segundo Santos e Taboga (2006), fêmeas do gerbilo apresentam uma glândula prostática em uma

freqüência (80%) muito semelhante à encontrada em mulheres (Zaviačič, 1999), fato que credencia estas fêmeas como um excelente modelo para se estudar a próstata. Somadas a estas peculiaridades, vale ressaltar que o ambiente hormonal encontrado no organismo feminino simula, de certa forma, o que ocorre em homens durante a senescência, quando a razão testosterona/estrógeno cai bruscamente. Este período de desbalanço hormonal masculino coincide com a fase em que surgem, com mais freqüência, as lesões prostáticas como hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata.

É crescente a preocupação com a exposição aos EDCs, já que a utilização destas substâncias em decorrência do desenvolvimento das sociedades tem se tornado inevitável. Dentre estas substâncias, os seres humanos estão expostos à uma enorme variedade destes agentes químicos, tanto os de ação estrogênica (Söder, 2005; Timms, 2005; Prins et al., 2008) como os de ação androgênica (Hotchkiss et al., 2007a). O acetato de trembolona, por exemplo, é um andrógeno sintético muito utilizado para promover o rápido crescimento do gado, visando uma maior produção de carne, além, também, de ser utilizado nas fábricas de papéis, sendo responsável pela poluição de rios efluentes destes locais (Hotchkiss et al., 2007a). Além da exposição aos EDCs, existem outros fatores de risco que podem afetar o desenvolvimento da próstata, como a síndrome do ovário policístico (Abbott et al., 2005), o hiperandrogenismo e mesmo a exposição indiscriminada aos esteróides por atletas e por mulheres que buscam a reposição hormonal.

Todos estes aspectos são de grande preocupação, levando em conta que desenvolvimento do sistema reprodutor depende de eventos que são muito bem regulados durante a embriogênese, de tal forma que sensíveis interferências são suficientes para causar danos permanentes que serão carregados pelo organismo ao longo da vida.

Pesquisas recentes tem reforçado ainda mais a importância do período embrionário com um momento crítico para o correto desenvolvimento da glândula prostática, de tal forma que as respostas em relação à origem do câncer prostático, durante a embriogênese, podem estar nos programas celulares ativados pela sinalização do AR (Schaeffer et al., 2008). Sabe-se que o AR regula a expressão de mais de 100 genes da próstata normal e também em linhagens de células prostáticas cancerosas (Black e Paschal, 2004). O programa de desenvolvimento inicial da próstata (embriogênese) é muito semelhante ao programa que controla o câncer prostático humano, envolvido na regulação de genes relacionados com a via para a fosfatase, via do Wnt, além de regular outros processos como angiogênese, apoptose, migração e proliferação celular (Schaeffer et al., 2008).

Tendo em vista que a base do câncer prostático é pouco conhecida, os estudos com EDCs de ação androgênica podem contribuir no entendimento dos mecanismos de regulação da via do AR, permitindo entender como este receptor nuclear, essencial durante a organogênese prostática, se comporta em ambientes hormonais alterados e o que isso pode acarretar na saúde da glândula prostática.

Agradecimentos

Este trabalho teve auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Proc. nº 2007/06862-3) e da CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Procs. nº. 301111/05-7 e 300163/2008-8).

Referências

- Abbott DHA, BarnettDK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? Hum Reprod Update 2005, 11(4):357-374.
- Alonso-Magdalena P, Brossner C, Reiner A, Cheng G, Sugiyama N, Warner M, Gustafsson JA. A role for epithelial-mesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 106(8):2859-2863.
- Bigby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller T, Vom Saal FS. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. Environ Health Perspect 1999, 107:613-618.
- Black BE, Paschal BM. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. Trends Endocrinol Metab 2004, 15(9):411-417.
- Corradi LS, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. Int J Exp Pathol 2009, 9(1):79-94.
- Ellem SJ, Risbridger GP. The dual. Opposing roles of estrogen in the prostate. Ann N Y Acad Sci 2009, 1155:174-186.
- Fiala JC. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. J Microsc 2005, 218(Pt1):52-61.
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). Biol of Reprod 2008, 79:1084-1091.

- Grisanzio C, Signoretti S. p63 in prostate biology and pathology. J Cell Biochem 2008; 103:1354-1368.
- Hotchkiss AK, Furr J, Makynen EA, Ankley GT, Gray Jr LE. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats. Toxicol Lett 2007a, 174:31-41.
- Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenberg JG, Gray Jr LE. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. Toxicol Sci 2007b, 96(2):335-345.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. J Anat 1981; 3:357-370.
- Lue Y, Hikim APS, Wang C, Im M, Leung A, Swerdloff RS. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the “two-hit” approach to male contraceptive development. Endocrinology 2000, 141(4):1414-1424.
- McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. Differentiation 2008, 76:660-670
- Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. J Intern Med 2008, 264(2):128-142.
- Nishino N, Totsukawa K. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Exp Anim 1996; 45:283-288.
- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol a alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008; 102:134-138.

- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Biol Reprod 2006, 75:370-379.
- Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. Anim Reprod 2006, 3(1):3-18.
- Shaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, Simons B, Blackman A, Yu W, Parmigiani G, Berman DM. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. Oncogene 2008, 27:7180-7191.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. Cancer Res 2004 64:2270-2305.
- Singh J, Handelsman DJ. Imprinting by neonatal sex steroids on the structure and function of the mature mouse prostate. Biol Reprod 1999, 61:200-208.
- Söder O. Perinatal imprinting by estrogen and adult prostate disease. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102(5):1269-1270.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. Development 2002, 129:1905-1912.
- Thomson AA. Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. Differentiation 2008, 76:587-598.

- Timms BG, Kembra LH, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(19):7014-7019.
- Toppari J. Environmental endocrine disrupters. *Sex Dev* 2008, 2:260-267.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12 1978; 131-155.
- Welsh M, Sharpe RM, Walker M, Smith LB, Saunders PTK. New insights into the role of androgens in Wolffian ducts stabilization in male and female rodents. *Endocrinology* 2009, 150(5):2472-2480.
- Wolf CJ, Hotchkiss AK, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray Jr LE. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol Sci* 2002, 65:71-86.
- Zaviačič M. The Female Prostate: From vestigial Skene's paraurethral glands and ducts to woman's functional prostate. 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press; 1999: 171p.

Legendas

Figura 1. Fotomicrografias do tecido prostático de machos (Fig. 1a - e) e fêmeas (Fig. 1f - j) em todos os grupos experimentais analisados corados pela técnica de HE mostrando as alterações morfológicas. Ep (epitélio); S (estroma); L (lúmen); NIP (neoplasia intraepitelial prostática); asterisco (focos inflamatórios); setas (metaplasia epitelial escamosa).

Figura 2. Coloração pela reticulina de Gomori e reação imunohistoquímica para α -actina mostrando as alterações estromais nas próstatas de machos e fêmeas dos grupos C e TGA. (Fig. 2a, e) mostram um padrão regular da disposição das fibras reticulares na próstata dos machos e das fêmeas do grupo C, enquanto que no grupo TGA é possível notar a presença de regiões com intensa remodelação destes elementos fibrilares (Fig. 2e, f). Pela técnica de α -actina foi possível observar um padrão normal da organização da camada de musculatura lisa nos animais do grupo C (Fig. 2, c, g) e um padrão alterado com áreas de descontinuidade desta camada nos animais do grupo TGA (Fig. 2d, h). Setas (fibras reticulares); ponta de seta (regiões de remodelação estromal); NIP (neoplasia intraepitelial prostática); CML (camada de musculatura lisa); setas largas (áreas de descontinuidade da camada de musculatura lisa).

Figura 3. Reconstrução tridimensional das próstatas dos machos e fêmeas dos grupos C e TGA. (Fig. 3a, b) mostra um padrão típico de localização dos ácinos do lobo ventral da glândula prostática de machos. Nas fêmeas do grupo C (Fig. 3c) foi possível observar um padrão típico de localização para-uretral da próstata, ao passo que nas fêmeas do grupo TGA foi observado um padrão atípico de localização de estruturas acinares ao redor da vagina (Fig. 3d). Estruturas em

Vermelho (ácinos prostáticos); amarelo (uretra); azul (luz da uretra); cinza (vagina); Ca (caudal); Cr (cranial).

Figura 4. Reação imunohistoquímica para receptor androgênico (AR). (Fig. 4a - e) mostra um padrão de marcação nuclear para este receptor nas células epiteliais secretoras e estromais das glândulas de todos os grupos de machos analisados. Nas fêmeas, diferente do observado nos machos, pode-se notar uma predominância de marcação citoplasmática nas células epiteliais de todos os grupos estudados (Fig. 4f - j). Setas (fibroblastos e células musculares lisas com marcação positiva para AR).

Figura 5. Imunohistoquímica para receptor de estrógeno alfa, mostrando o padrão de marcação deste receptor tanto no compartimento epitelial quanto estromal da próstata dos machos (Fig. 5a - e) e fêmeas (Fig. 5f - j) em todos os grupos analisados. Setas (células estromais prostáticas com marcação positiva); NIP (neoplasia intraepitelial prostática).

Figura 6. Imunohistoquímica para p63 permitindo a observação do padrão de disposição das células basais no epitélio da próstata dos machos (Fig. 6a - e) e fêmeas (Fig. 6f - j) de todos os grupos analisados. Setas (células basais do epitélio prostático); cabeças de setas (células neoplásicas com marcação positiva para p63); NIP (neoplasia intraepitelial prostática); setas largas (aglomerados de células basais adjacentes à regiões de intensa inflamação).

Figura 7. Imunohistoquímica para PCNA permitindo a observação de células em proliferação nos compartimentos epitelial e estromal da próstata dos machos (Fig. 7a - e) e fêmeas (Fig. 7f - j)

de todos os grupos analisados. Destaque para o aumento da taxa proliferativa em regiões da próstata com lesões neoplásicas intraepiteliais tanto nos machos (Fig. 7e) quanto nas fêmeas (Fig. 7j). Setas (células em proliferação); NIP (neoplasia intraepitelial prostática).

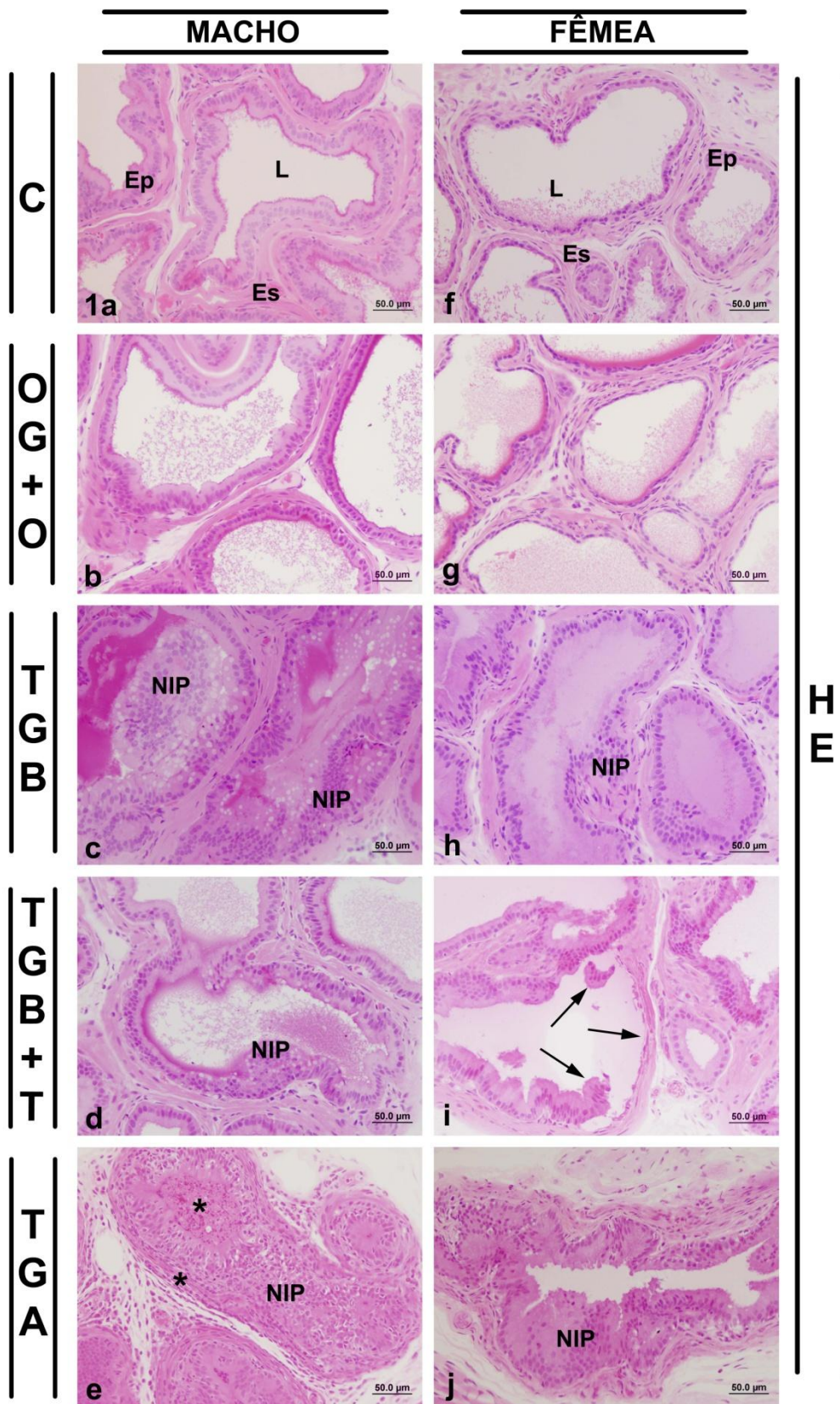
TABELA I. Dados biométricos e de dosagem hormonal sérica dos machos e fêmeas de todos os grupos experimentais. (média $\pm$ erro padrão).

Parâmetros	Sexo	GRUPOS				
		C	OG + O	TGB	TGB + T	TGA
Dados Biométricos						
Peso corporal (g)	♂	63,6 ± 1,72	66,8 ± 1,01	68,0 ± 3,10	56,8 ± 2,41	62,8 ± 4,88
	♀	59,7 ± 3,29	57,2 ± 3,66	53,2 ± 5,04	55,6 ± 2,78	53,2 ± 2,41
Peso do complexo prostático (g)	♂	0,26 ± 0,152 ^a	0,19 ± 0,005 ^b	0,17 ± 0,179 ^b	0,13 ± 0,010 ^b	0,13 ± 0,021 ^b
	♀	0,007 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,002	0,013 ± 0,002	---
Peso relativo [†]	♂	0,004 ± 0,0002 ^a	0,003 ± 0,0001 ^b	0,002 ± 0,0002 ^{b,c}	0,002 ± 0,0001 ^{b,c}	0,002 ± 0,0002 ^c
	♀	0,0001 ± 0,00001	0,0002 ± 0,00001	0,0002 ± 0,00006	0,0002 ± 0,00005	---
Peso da adrenal (g)	♂	0,025 ± 0,001	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,028 ± 0,003
	♀	0,026 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,024 ± 0,004	0,025 ± 0,002	0,024 ± 0,001
Peso testicular (g)	♂	1,002 ± 0,042 ^a	0,908 ± 0,015 ^a	0,934 ± 0,038 ^a	0,533 ± 0,073 ^b	0,886 ± 0,085 ^a
Peso ovariano (g)	♀	0,017 ± 0,002 ^a	0,012 ± 0,001 ^{a,c}	0,025 ± 0,001 ^b	0,009 ± 0,001 ^c	0,012 ± 0,001 ^{a,c}
DAG (mm) ^{††}	♂	1,76 ± 0,13 ^a	1,71 ± 0,13 ^a	2,25 ± 0,23 ^a	1,99 ± 0,12 ^a	3,74 ± 0,42 ^b
Níveis Hormonais Séricos						
Testosterona (ng/ml)	♂	1,04 ± 0,15 ^a	0,49 ± 0,05 ^a	0,51 ± 0,23 ^a	4,77 ± 0,48 ^b	0,31 ± 0,06 ^a
	♀	0,08 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,42 ± 0,08 ^a	4,23 ± 1,51 ^b	0,09 ± 0,02 ^a
Estradiol (pg/ml)	♂	15,78 ± 2,29	20,73 ± 0,58	15,03 ± 4,37	19,53 ± 4,13	16,30 ± 2,42
	♀	17,13 ± 3,22 ^a	25,90 ± 4,06 ^{a,c}	65,20 ± 19,05 ^{b,c}	22,21 ± 11,02 ^a	21,00 ± 2,90 ^a
Progesterona (ng/ml)	♂	0,45 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,70 ± 0,34	0,50 ± 0,06	1,75 ± 1,39
	♀	2,50 ± 0,74	6,78 ± 5,11	17,96 ± 8,78	2,26 ± 0,83	1,40 ± 1,02

Letras sobrescritas (a, b, c) representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre os grupos. Grupos experimentais cujos valores possuam letras sobrescritas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas um em relação ao outro.

[†]O peso relativo corresponde à razão entre o peso do complexo prostático e o peso corporal.

^{††}DGA (distância anogenital).



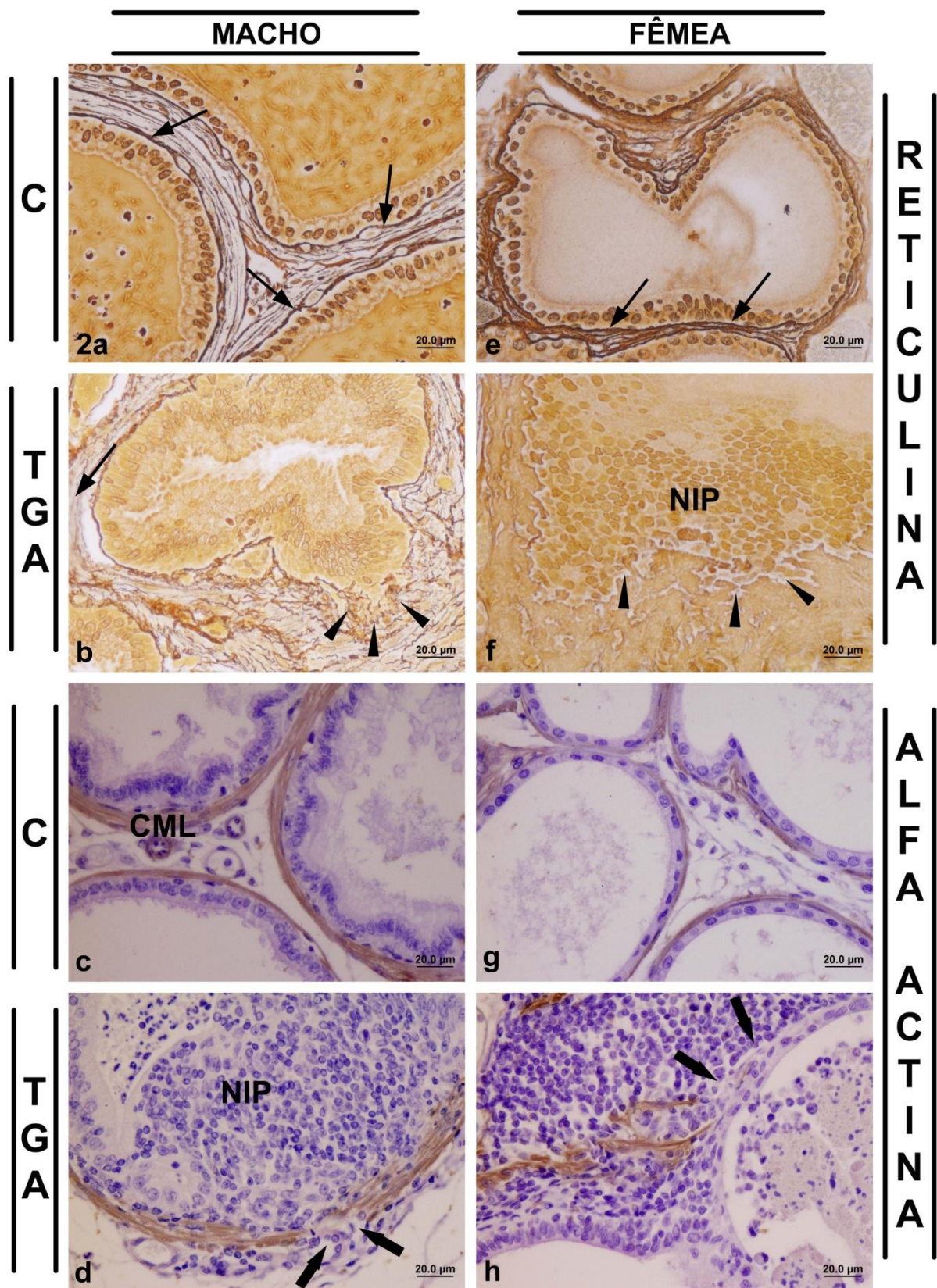
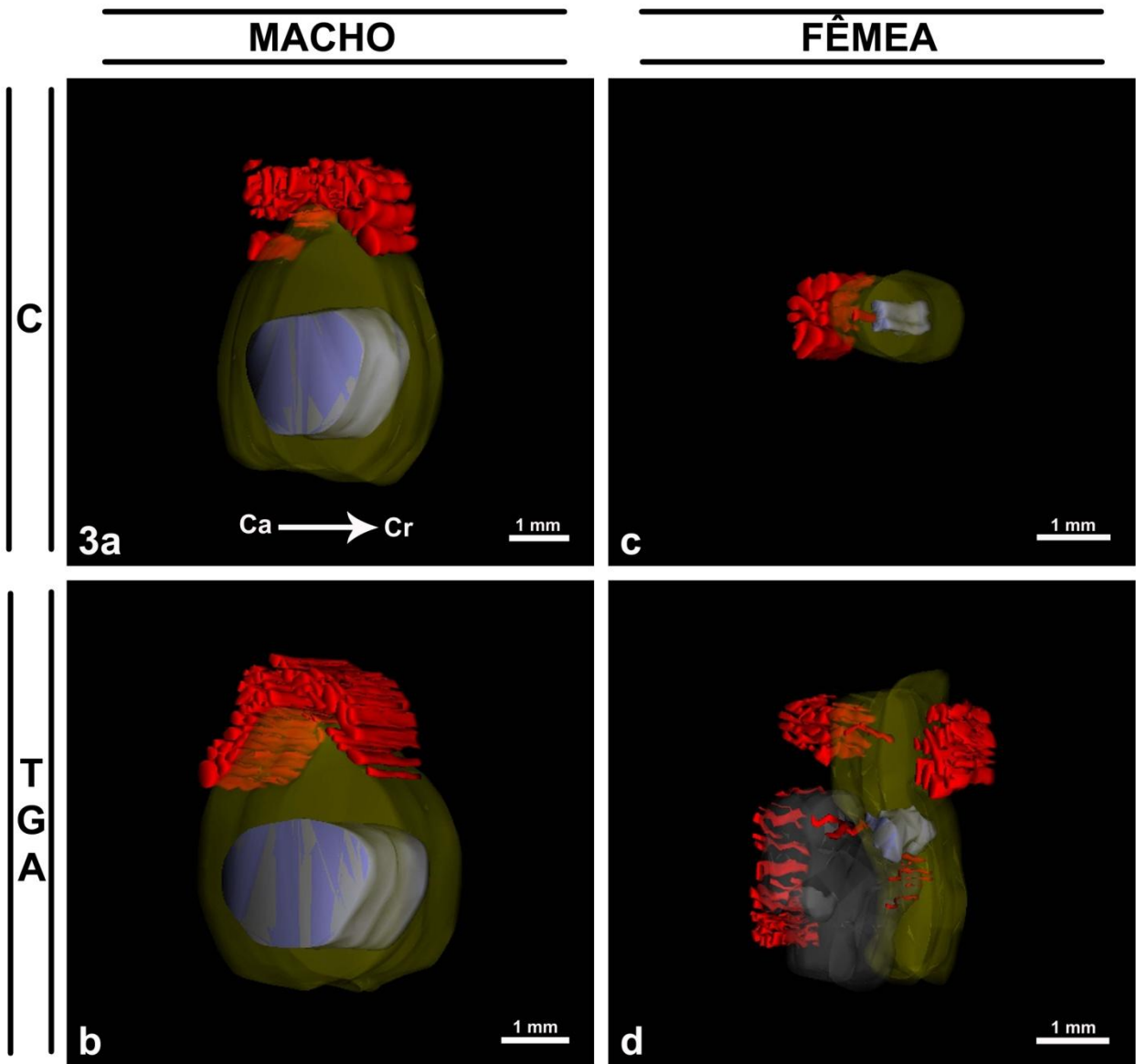


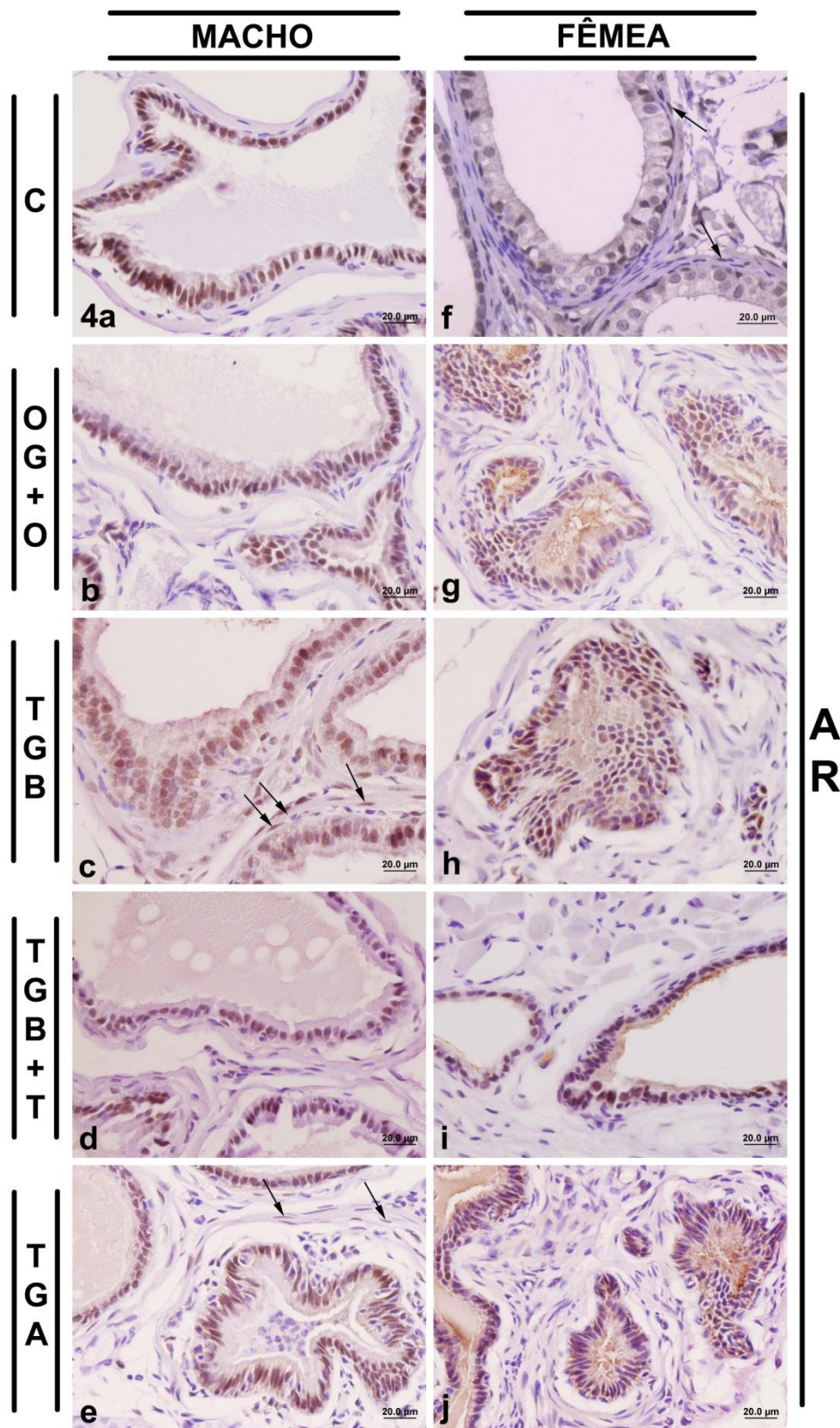
TABELA II. Dados estereológicos e morfométricos dos grupos experimentais (média $\pm$ erro padrão).

Parâmetros	Sexo	GRUPOS				
		C	OG + O	TGB	TGB + T	TGA
<i>Estereologia</i>						
Epitélio (%)	♂	24,20 ± 1,80 ^a	24,15 ± 1,94 ^a	29,10 ± 1,65 ^{a,b}	35,79 ± 1,90 ^b	32,41 ± 1,57 ^b
	♀	26,17 ± 1,31 ^a	19,10 ± 1,19 ^b	31,10 ± 1,38 ^a	29,89 ± 1,84 ^a	28,92 ± 1,06 ^a
Lúmen (%)	♂	49,97 ± 3,92 ^a	52,17 ± 3,13 ^a	44,53 ± 2,99 ^{a,b}	33,17 ± 2,73 ^b	34,66 ± 2,96 ^b
	♀	37,07 ± 2,16 ^a	43,92 ± 2,76 ^a	38,64 ± 2,35 ^a	38,43 ± 2,93 ^a	21,02 ± 1,68 ^b
Estroma (%)	♂	25,82 ± 2,65 ^a	23,66 ± 1,49 ^b	26,35 ± 1,90 ^a	31,02 ± 1,53 ^a	32,92 ± 1,92 ^a
	♀	36,74 ± 1,66 ^a	36,97 ± 2,11 ^a	30,25 ± 2,11 ^a	31,66 ± 1,88 ^a	50,05 ± 1,99 ^b
<i>Morfometria</i> [†]						
Altura epitelial	♂	14,78 ± 0,29 ^a	15,48 ± 0,38 ^{a,b}	16,39 ± 0,37 ^{b,d}	20,20 ± 0,49 ^c	16,18 ± 0,32 ^{a,d}
	♀	11,48 ± 0,25 ^a	13,21 ± 0,33 ^a	20,40 ± 0,48 ^b	20,91 ± 0,65 ^b	19,35 ± 0,45 ^b
Espessura da camada de músculo liso	♂	10,36 ± 0,22 ^a	10,66 ± 0,22 ^a	11,66 ± 0,25 ^b	11,69 ± 0,23 ^b	10,61 ± 0,20 ^a
	♀	8,36 ± 0,17 ^a	10,24 ± 0,26 ^b	12,61 ± 0,31 ^{c,e}	13,61 ± 0,35 ^{d,e}	12,25 ± 0,25 ^c

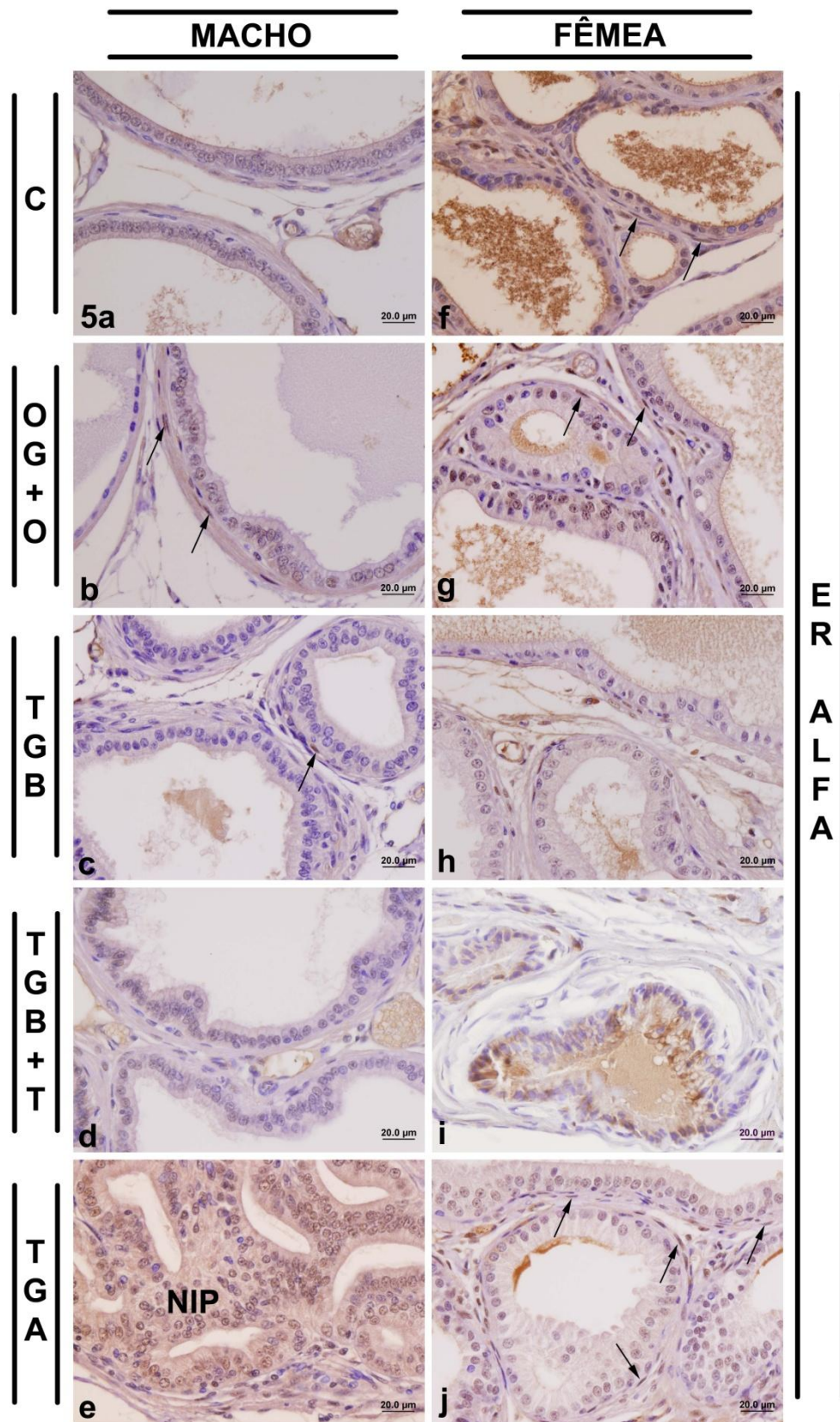
Letras sobrescritas (a, b, c, d, e) representam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre os grupos. Grupos experimentais cujos valores possuam letras sobrescritas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas um em relação ao outro.

[†]n = 200 medida em cinco animais por grupo.

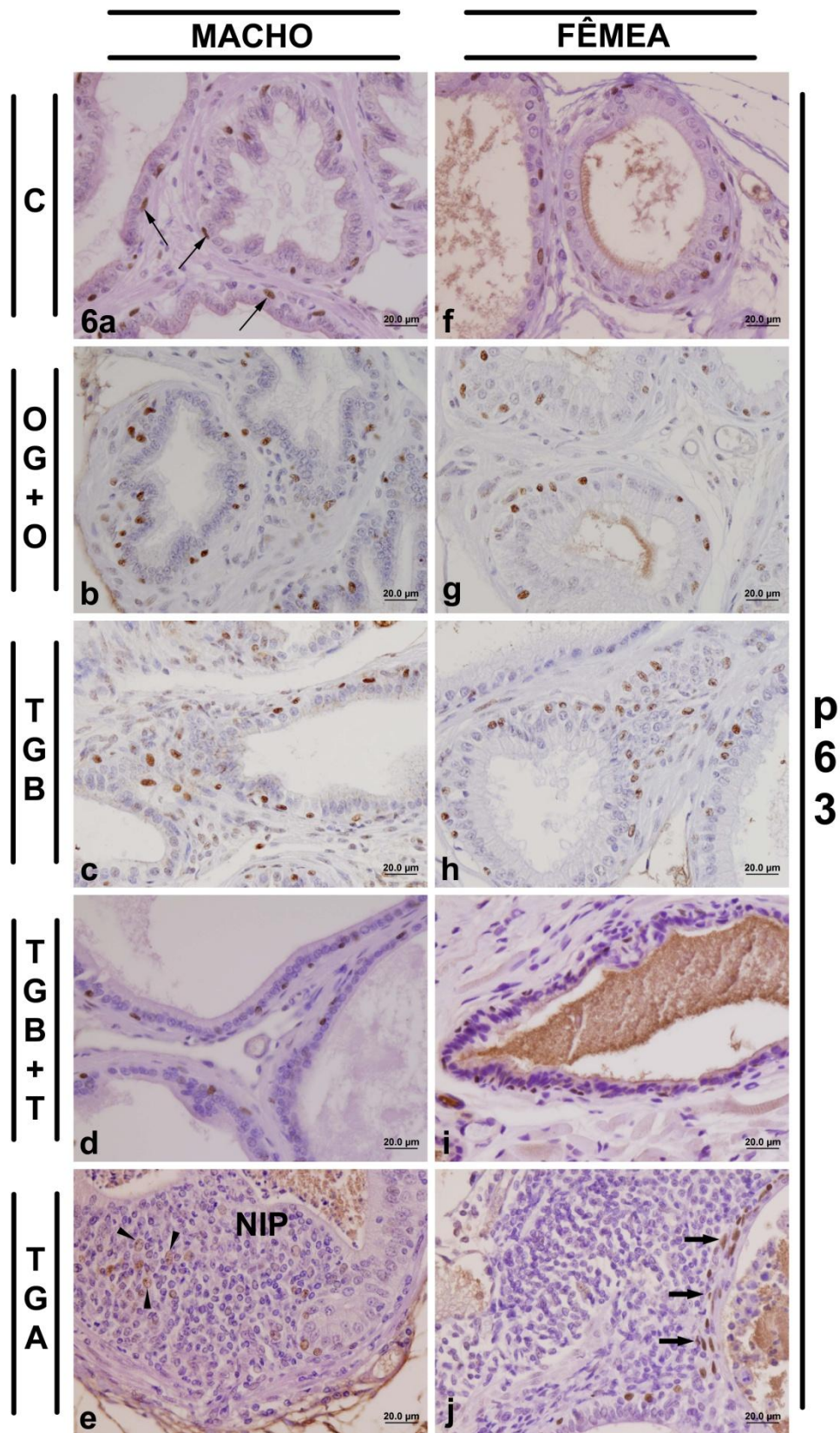




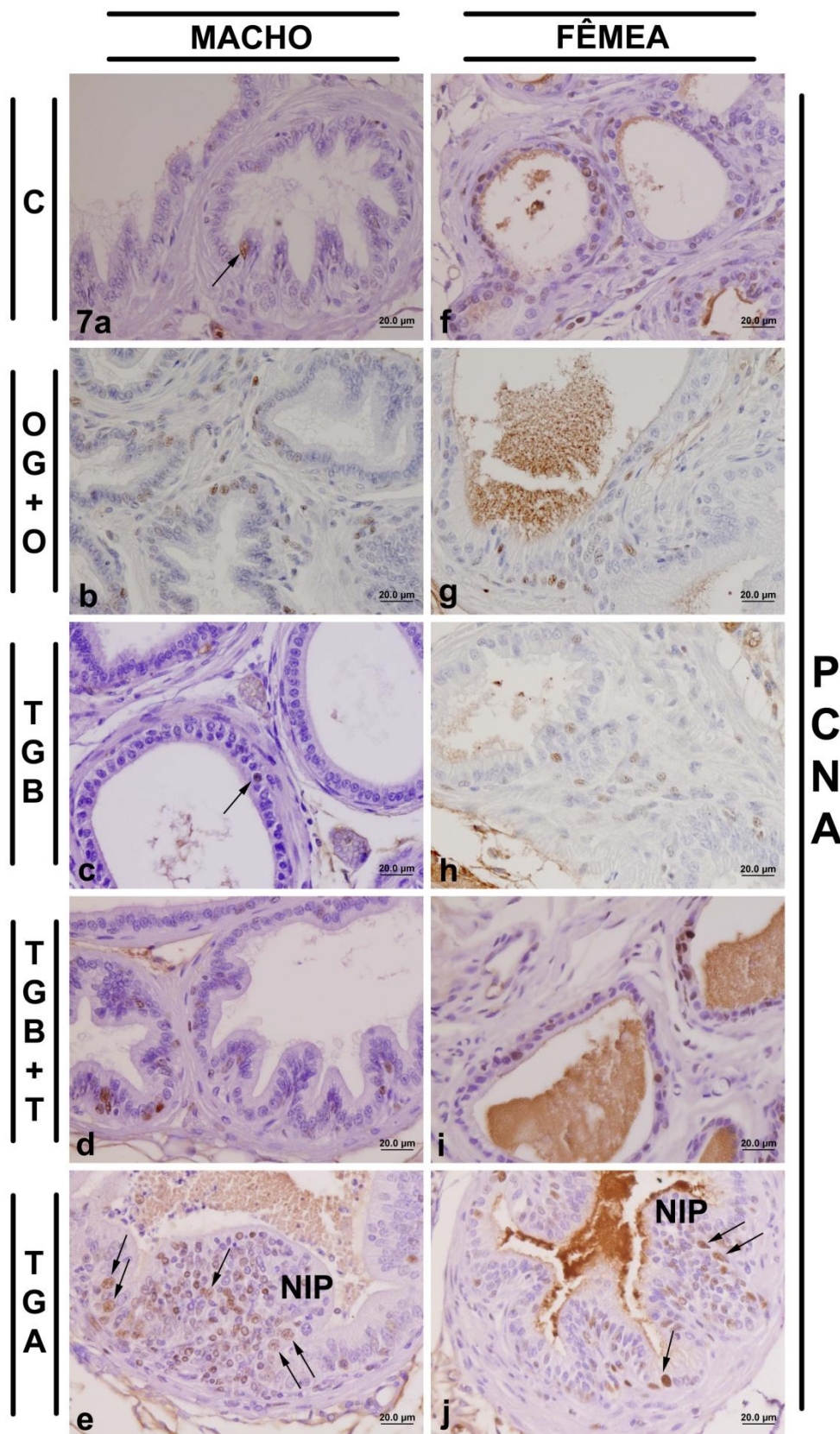
AR



E
R
A
L
F
A



p 63



1. As fêmeas normais de ratos Wistar possuem, em baixa frequência, uma glândula prostática subdesenvolvida, muito semelhante à próstata ventral de machos jovens. No entanto, estas glândulas são responsivas ao tratamento androgênico, assumindo características morfofisiológicas similares a próstata ventral de ratos machos adultos.
2. A exposição androgênica a partir do sétimo dia de tratamento foi suficiente para dirigir o rápido desenvolvimento da próstata em fêmeas de ratos, podendo-se observar um significativo aumento no lúmen dos ácinos, na altura da célula epitelial secretora e nas organelas da via biossintética secretora, principalmente, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso.
3. Machos e fêmeas de gerbilos adultos expostos aos andrógenos durante a gestação apresentaram, na vida adulta, lesões como neoplasias intra-epiteliais prostáticas e metaplasia escamosa, além de focos de infiltrados inflamatórios no estroma e no epitélio prostático.
4. Os efeitos da exposição aos andrógenos durante a vida intra-uterina são dose-dependentes. Os gerbilos machos e fêmeas tratados com uma dose alta de cipionato de testosterona foram os mais afetados pela exposição aos andrógenos durante a gestação, desenvolvendo diversas lesões durante a vida adulta.

5. As fêmeas que receberam alta dosagem de cipionato de testosterona durante o desenvolvimento foram as mais afetadas. Todos estes animais apresentaram malformações como ausência de abertura vaginal, teratomas, aumento da distância anogenital, além de vários focos com lesões neoplásicas intra-epiteliais prostáticas.

6. Foi possível observar que os andrógenos exerceram um efeito mais nocivo sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor das fêmeas de gerbilo. Isto sugere que as fêmeas são mais sensíveis à ação dos disruptores endócrinos com ação androgênica do que os machos.

7. Este estudo demonstra que a exposição intrauterina a desreguladores endócrinos androgênicos induz ao desenvolvimento de lesões prostáticas já no início da vida adulta de machos e fêmeas de gerbilos. Estes resultados são de grande interesse clínico, visto que estas lesões primárias podem ser precursoras de lesões malignas durante o envelhecimento.

8. Esta pesquisa envolvendo dois modelos experimentais distintos, com exposição androgênica em diferentes fases da vida dos animais, demonstrou que a testosterona tem um papel mais efetivo na determinação da morfofisiologia prostática durante o desenvolvimento do que na fase adulta.

- Behmer AO, Tolosa EMC, Neto AGF. 1976. Manual de práticas para histologia normal e patológica. EDART-EDUSP, SP.329p.
- Biancardi MF, Perez APS, Falleiros-Jr LR, Santos FCA, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga sr. 2009. Androgenic imprint on gerbil prostate during embryonic phase: an association with appearance of prostatic lesions in adult life. **Anais do XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, Belo Horizonte – MG.
- Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller T, Vom Saal FS. 1999. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. **Environ Health Perspect**, 107:613-618.
- Black BE, Paschal BM. 2004. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. **Trends Endocrinol Metab**, 15(9):411-417.
- Brambell FWR, Davis DHS. 1940. The normal occurrence structure and homology of prostate glands in adult female *Mastomys erythroleucus* temm. **J Anat**, 75:64-75.
- Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G.; David-Ferreira, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technol**, 51:7-11.
- Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. 2004. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. **Cell Biol Int**, 28:335-344.

- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. 2002. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. **Annals Anat**, 184:341-345.
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). **Biol of Reprod**, 79:1084-1091.
- Gross SA, Didio LJA. 1987 Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. **J Submicros Cytol**, 19(1):77-84.
- Hotchkiss AK, Furr J, Makynen EA, Ankley GT, Gray Jr LE. 2007a. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats. **Toxicol Lett**, 174:31-41.
- Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenberg JG, Gray Jr LE. 2007b. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. **Toxicol Sci**, 96(2):335-345.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ, 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **J Anat**, 3:357-370.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **J Anat**, 3:357-370.
- Kirby RS, Christmas TJ, Brawer, M. Prostate Cancer. 1 ed. London, England: Mosby, 1996:170 p.

- Orlando EF, Kolok AS, Binzcik GA, Gates JL, Horton MK, Lambright CS, Gray Jr LE, Soto AM, Guillette Jr LJ. 2004. Endocrine-disrupting effects of castle feedlot effluent on an sentinel species, the Fathead minnow. **Environ Health Perspect**, 112(3):353-358.
- Perez APS, Biancardi MF, Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Taboga SR. 2009. Effects of etinylestradiol intrauterine exposure on the male and female gerbil prostate (*Meriones unguiculatus*). **Anais do XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, Belo Horizonte – MG.
- Prins GS, Putz O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, 76:641-659.
- Prins GS, Tang WL, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal Exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 102:134-138.
- Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Tissue & Cell**, 35:447-457.
- Santos FCA, Corradi LS, Leite RP, Góes RM, Taboga SR. 2004. A modified method for the selective staining of elastic system fibers in methacrylate tissue sections. **Braz. J. morphol. Sci.**, 21(3):135-138.
- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Biol Reprod**, 75:370-379.

- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Anim Reprod**, 3(1):3-18.
- Shaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, Simons B, Blackman A, Yu W, Parmigiani G, Berman DM. 2008. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. **Oncogene**, 27:7180-7191.
- Shehata R. 1972. Female prostate in the house rat *Rattus rattus*. **Acta anat**, 83(3):426-34.
- Shehata R. 1975. Female prostate in *Arvicantihis niloticus* and *Meriones lybicus*. **Acta Anat**, 92:513-523.
- Shehata R. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. 1980 **Acta Anat**, 107:286-288.
- Singh J, Handelsman DJ. 1999. Imprinting by neonatal sex steroids on the structure and function of the mature mouse prostate. **Biol Reprod**, 61:200-208.
- Soder O. 2005. Perinatal imprinting by estrogen and adult prostate disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102:1269-1270.
- Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. 2003. Mouse urogenital development: a practical approach. **Differentiation**, 71:402-413.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. **Development**, 129:1905-1912.
- Thomson AA. Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. *Differentiation* 2008, 76:587-598.
- Toppari J. 2008. Environmental endocrine disrupters. **Sex Dev**, 2:260-267.
- Venable J.H.; Coggeshall, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **J Cell Biol**, 25:407-408.

- Vilamaior PSL, Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Biancardi MF, Fochi RA, Taboga SR. 2005. Comparative histology of gerbil and rat female prostate: morphological evidences of different functional state during distinct phases of post-natal development. **Braz. J Morphol Sci**, Suppl 3:28.
- Vom Saal FS, Bronson FH. 1980. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. **Science**, 208:597-599.
- Watson, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **J Biophys Biochem Cytol**, 4:475-478.
- Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**, 12:131-155.
- Wilhelm D, Koopman P. 2006 The makings of maleness towards an integrated view of male sexual development. **Nat Genet**, 7:620-631.
- Wimpissinger F, Stifter K, Grin W, Stackl W. 2007. The female prostate revisited: perineal ultrasound and biochemical studies of female ejaculate. **J Sex Med**, 4:1388-1393.
- Wimpissinger F, Tscherney R, Stackl W. 2009. Magnetic resonance imaging of female prostate pathology. **J Sex Med**, 6:1704-1711.
- Wolf CJ, Hotchkiss AK, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray Jr LE. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. **Toxicol Sci**, 65:71-86.
- Yarak S, Bagatin E, Hassun KM, Parada MOAB, Filho ST. 2005. Hyperandrogenism and skin: polycystic ovary syndrome and peripheral insulin resistance. **An Bras Dermatol**, 80(4):395-410.

- Zaviačič M. 1999. The Female Prostate: From vestigial Skene's paraurethral glands and ducts to woman's functional prostate. 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press, 171p.
- McNeal JE. 1983. The prostate gland: morphology and pathology biology. **Monogr Urol**, 4:3-33.
- Timms BG. 2008. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**, 76:565-577.
- Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PSL, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Annat Rec**, 290:1233-1247.

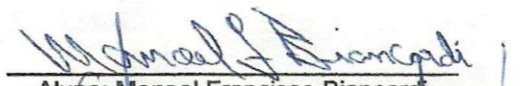
DECLARAÇÃO

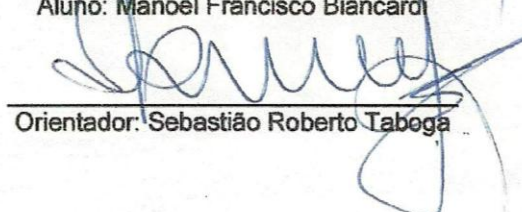
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "**Ação androgênica intra-uterina e pós-natal sobre a próstata de roedores**":

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

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), sob Protocolo(s) nº 05/08-CEEA.

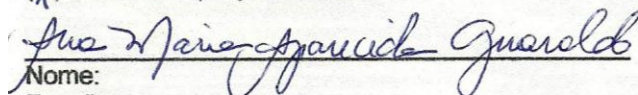
** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização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


Aluno: Manoel Francisco Biancardi


Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

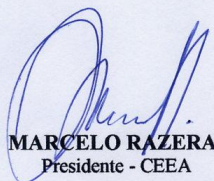
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP

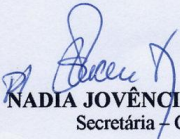
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **05/08-CEEA**, sobre "Desenvolvimento da próstata masculina e feminina do gerbilo da Mongólia sob efeito da exposição intra-uterina e pós-natal de testosterona", sob a responsabilidade de **SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), nesta data.

Botucatu, 23 de janeiro de 2008.



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



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA