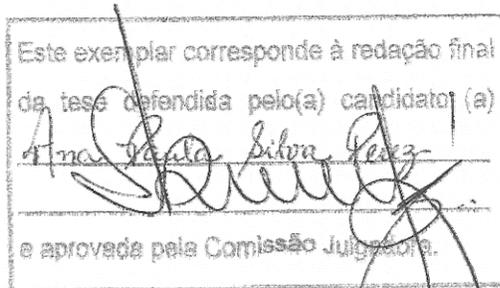




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ana Paula Silva Perez

“DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA MASCULINA E  
FEMININA DO GERBILO DA MONGÓLIA SUBMETIDO À  
EXPOSIÇÃO NO PERÍODO EMBRIOFETAL E  
PÓS-NATAL DE ETINILESTRADIOL”



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

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

Campinas, 2010

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

<b>P415d</b>	<p>Perez, Ana Paula da Silva Desenvolvimento da próstata masculina e feminina do gerbilo da Mongólia submetido à exposição no período embriofetal e pós-natal de etinilestradiol / Ana Paula da Silva Perez. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Sebastião Roberto Taboga. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Gerbilo da Mongólia - Desenvolvimento. 2. Etinilestradiol. 3. Próstata. 4. Próstata feminina. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Development of male and female prostate of the Mongolian gerbil submitted to the exposure embryofetal period and postnatal ethinylestradiol.

**Palavras-chave em inglês:** Mongolian gerbil - Development; Ethinyl Estradiol; Prostate; Female prostate; Gerbil.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

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

**Banca examinadora:** Sebastião Roberto Taboga, Wellerson Rodrigo Scarano, Wagner José Favaro.

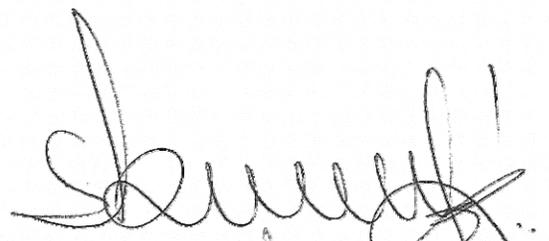
**Data da defesa:** 19/03/2010.

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

Campinas, 19 de março de 2010.

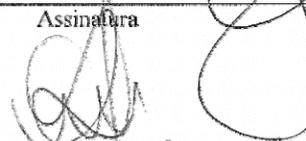
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



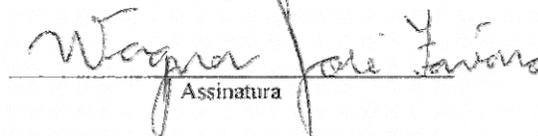
Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



Assinatura

Prof. Dr. Wagner José Favaro



Assinatura

Profa. Dra Renée Laufer Amorim

---

Assinatura

Prof. Dr. Classius de Oliveira

---

Assinatura

## *Agradecimento*

Á Deus por sempre ter guiado os meus caminhos e iluminado cada momento da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela grande oportunidade que me ofereceu, pelos conhecimentos e pela confiança no meu trabalho.

A minha co-orientadora e amiga Profa. Dra Fernanda Cristina Alcântara dos Santos pela paciência, pela disponibilidade em me ajudar e, principalmente pelo carinho, amizade e atenção.

Ao técnico de laboratório Luiz Roberto Falleiros Junior que com sua dedicação e trabalho sempre esteve disponível a ajudar. Além de que com a sua alegria e bom humor torna o ambiente de trabalho um local mais descontraído e agradável.

Aos Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Prof. Dr. Wagner José Favaro, a Profa Dra. Renne Laufer Amorim e ao Prof. Dr. Classius de Oliveira por terem feito parte da minha pré-banca e banca com correções e sugestões que enriqueceram o trabalho e, principalmente pela disponibilidade e atenção.

A secretaria do PPG em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp Liliam Panagio que sempre realizou o seu trabalho com muita competência, dedicação, paciência e auxílio durante todo o meu mestrado.

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

A bolsa da FAPESP e a bolsa CAPES/PROEX pelo financiamento durante todo o meu mestrado e confiança.

## *Agradecimento em especial*

Aos meus pais Paulo e Zenilda que sempre foram e serão a minha vida, inspiração e meu alicerce. Pois sem o apoio, o amor, o aprendizado que vocês me ofereceram eu não seria o que sou hoje.

A minha irmã Natália que também sempre acompanhou todos os meus passos e que nunca me deixou desanimar, pelo contrário sempre me deu força e entusiasmo.

Em especial uma homenagem ao meu pai que por destino da vida nos deixou, porém sei que onde estiver está acompanhando cada passo da minha vida.

Pai

Você foi a coragem em pessoa.  
Você foi o meu poder crescer.  
Você foi a minha cabeça.

Foram os meus conselhos.  
Você foi aquele que me defendeu,  
Que me salvou dentro de uma tempestade.  
Me tirou de um incêndio de mentiras.  
Me mostrou as verdades,  
Tentou sempre ser justo.

Quis apenas a minha completa felicidade.  
Gostou de mostrar a luz;  
A luz da vitória.

Disse-me as oportunidades que o mundo dá.  
Adorou quando eu fiz  
Algo que lhe agradava.

Qualquer gesto foi questão de se orgulhar.  
Você foi e sempre será o meu pai;  
O pai que pedi a Deus...  
Que soube me entender  
Compreendeu meus sonhos,  
E me ajudou a torná-los Realidade.  
Sempre soube que  
Eu te amava e ainda te amo

A minha tia Valéria, tio Elias, aos meus primos Rafael e Marina e a minha tia do coração Marisa que me acolheram com muita atenção, carinho e sempre estavam disponíveis em me ajudar quando precisei ir para Campinas.

A minha querida avó Amélia, minhas tias Inês, Leila, Nilce, Valnirdes e as minhas primas Carol, Cristiane e Ludmila que sempre me apoiaram em todos os sentidos e, principalmente pelo amor e carinho.

Aos amigos que a faculdade me deu: Ana Luiza, Adriana, Camila Ive, Camila Vieira, Liliam, Patrícia, Felipe Cavassan, Felipe Nogueira, Fernanda, Gustavo, Getúlio e Leandro que juntos vivemos os melhores anos de nossas vidas e que sempre estiveram ao meu lado nas alegrias (que foram muitas) e, principalmente nos obstáculos da vida.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET): Ana Luiza, André, Ângelo, Bruna Guido, Bruna, Camila, Diego, Heloísa, Haruo, Leandro, Maria Isabel, Mariana, Patrícia, Pablo, Tábata, Tatiana, Tadeu, Vivian e ao tutor Prof. Dr. Classius de Oliveira um grupo que fiz parte durante a faculdade e que me ensinou a importância do trabalho em equipe, enfatizando sempre a união e o companheirismo. Esses ensinamentos e outros que levarei por toda a minha vida.

Aos amigos de longa data: Aline, Cássia, Milena, Roberta, Thiago, Matheus e Cristiano que sempre estiveram ao meu lado em cada conquista almejada e também em momentos difíceis.

Aos meus companheiros e amigos de Laboratório: Bianca, Cíntia, Daniele, Flávia, Lívia, Mãe, Marina, Manoel, Ricardo, Sabrina, Samanta, Sérgio e Silvana que me acompanharam e ajudaram a construir esse trabalho e principalmente pelo companheirismo e amizade. Um bom trabalho nunca é feito sozinho.

*“Posso tudo posso naquele que me fortalece  
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir  
Quero, tudo quero sem medo entregar os meus projetos  
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar”  
(Celina Borges)*

## SUMÁRIO

RESUMO _____	09
ABSTRACT _____	11
INTRODUÇÃO _____	13
Desenvolvimento embriológico da próstata _____	13
Influência dos estrógenos sobre o desenvolvimento prostático _____	17
Características morfofuncionais da próstata _____	20
OBJETIVO _____	22
ARTIGO _____	23
CONCLUSÕES GERAIS _____	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	60
ANEXO _____	67

## RESUMO

Nos machos, a morfogênese prostática é um evento comandado por andrógenos, que agem diretamente via fatores parácrinos secretados pelo mesênquima. Nas fêmeas, o desenvolvimento embriológico da próstata parece ocorrer em níveis baixos de hormônios esteróides, porém a presença desses hormônios no organismo adulto induz a diferenciação e atividade secretória das células prostáticas. A exposição precoce a estrógeno no período de desenvolvimento embrionário e neonatal tem sido relacionada a distúrbios permanentes na morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor de ambos os sexos. Estudos epidemiológicos indicam que homens expostos a componentes estrogênicos durante o desenvolvimento intra-uterino apresentam maior probabilidade de serem inférteis e de desenvolverem câncer de testículo e próstata, enquanto as mulheres tornam-se mais susceptíveis a desenvolver câncer de mama, útero e vagina. Porém, como a exposição precoce a hormônios esteróides é capaz de alterar permanentemente vários órgãos reprodutivos, torna-se questionável se esses agentes também podem interferir com a estrutura e fisiologia da próstata feminina. Com base nesses relatos, o objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento da próstata ventral masculina e da próstata feminina de gerbilos adultos que foram expostos ao estrógeno sintético, etinilestradiol durante o desenvolvimento pré-natal, além de analisar a ação pós-natal de andrógenos exógenos sobre ambas as glândulas que foram submetidas à estrogenização do desenvolvimento. Para isso, foram realizadas as análises sorológicas para a quantificação dos hormônios esteróides e as próstatas de gerbilos machos e fêmeas adultos foram submetidas às análises morfológicas, morfométrico-estereológica e imunocitoquímica. Os resultados mostraram que a exposição intra-uterina ao etinilestradiol elevou os níveis séricos de estradiol em ambos os sexos durante a vida adulta, promovendo assim

alterações na próstata ventral masculina como neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) e irregularidades no epitélio prostático feminino, além de observar o aumento das fibras reticulares e colágenas em ambas as glândulas. A análise imunocitoquímica revelou aumento da imunorreatividade de  $\alpha$ -actina na camada muscular que envolve regiões de lesões prostáticas, e o aumento da imunorreatividade de receptores andrógenos (AR) nas próstatas de ambos os sexos. Os animais que sofreram estrogenização durante o desenvolvimento e mediante aplicação de testosterona na vida pós-natal tiveram os níveis de estradiol normalizado, ainda assim apresentaram lesões prostáticas. Várias dessas alterações são mediadas pelo ER $\alpha$  que foi constatado pela alta imunorreatividade nas próstatas tratadas de ambos os sexos. Com os dados percebeu-se que o tratamento realizado durante o período pré-natal com etinilestradiol promoveu alterações na próstata ventral masculina e na próstata feminina de gerbilos adultos. Porém essas alterações foram mais efetivas na próstata ventral masculina, estando estas associadas aos níveis anormais de estradiol observados nos machos adultos.

## **ABSTRACT**

In males, prostatic morphogenesis is an event controlled by androgens, which act directly via paracrine factors secreted by the mesenchyme. In females, the embryological development of the prostate appears to occur in environment low levels of steroid hormones, but the presence of these hormones in the adult life induces differentiation and secretory activity of prostatic cells. The early exposure to estrogen during the embryonic and neonatal development has been related to disturbances in the permanent morphophysiology of the reproductive system of both sexes. Epidemiological studies indicate that men exposed to estrogenic components during the pre natal development have a higher probability to be infertile and develop testicular and prostate cancer, while women become more susceptible in developing breast, uterus and vagina cancer. However, as early exposure to steroid hormones can permanently alter various reproductive organs, it is questionable whether these agents can also interfere with the structure and physiology of the female prostate. Based on these reports, the aim of this study was to verify the behavior of gerbil ventral male and female prostates which were exposed to synthetic estrogen ethinylestradiol (EE) during embryonic development, as well as analyze the postnatal action of exogenous androgens on both glands that were submitted to estrogenization. For this were carried out serologic analysis for the measure of steroid hormones and prostate of male and female gerbils adults were subjected to analysis to morphological, morphometric-stereological and immunocytochemical analysis. The results showed that EE intrauterine exposure increased the estradiol serum levels in both sexes, thus promoting alterations in the male prostate such as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and irregularities in the female prostatic epithelium. Additionally, it was observed an increase of reticular fibers and collagen in both glands.

Immunocytochemical analysis revealed increased immunoreactivity of  $\alpha$ -actin in the muscle layer surrounding regions of prostatic lesions, and increased immunoreactivity of androgen receptor (AR) in both male and female prostates. The animals that suffered development estrogenization and with the application of testosterone in postnatal life had estradiol levels normalized, still presented prostatic lesions. In addition, in these animals it was verified an increase in the immunoreactivity of estrogenic receptors ( $ER\alpha$ ). Several of these alterations are mediated by  $ER\alpha$  was verified by high immunoreactivity in prostates treated in both sexes. With the data we noticed that the treatment performed during the prenatal period with ethinyl estradiol promoted alterations in male ventral prostate and female prostate of adult gerbils. But these changes were most effective in the male ventral prostate, these being associated with abnormal levels of estradiol observed in adult males.

### *Desenvolvimento embriológico da próstata*

A próstata desenvolve-se a partir do seio urogenital (UGS), que é um tubo endodérmico derivado do intestino primitivo posterior e que termina na cloaca (Timms et al, 1994).

O UGS é composto por uma camada epitelial (UGE) derivada da endoderme, que é circundada por uma camada mesenquimal (UGM) originada da mesoderme. Esta estrutura é encontrada na base da vesícula urinária em desenvolvimento e surge nos machos e nas fêmeas após 13 dias de concepção nos camundongos e ratos, e após 7 semanas de gestação em humanos. A parte pélvica do UGS é morfologicamente indistinguível em machos e fêmeas até o 17º-18º dia de gestação em ratos e camundongos, e até a 10º-12º semanas em humanos. A partir desse período, inicia-se a morfogênese prostática, um processo que é iniciado e dependente de andrógenos (Marker et al., 2003).

Em machos, o evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos do epitélio do seio urogenital (UGE) em direção ao mesênquima circundante do seio urogenital (UGM). Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento. Entretanto, no período neonatal, conforme esses cordões crescem invadindo o UGM, eles começam a bifurcar-se em ramos laterais, originando três lobos prostáticos distintos: o lobo ventral, o lobo dorsolateral e a glândula coaguladora ou lobo anterior (Marker et al., 2003). Simultaneamente ao processo de morfogênese de ramificação ductal, ocorre a canalização ductal (formação do lúmen) e a citodiferenciação epitelial e estromal (Wang et al., 2001; Vilamaior et al., 2006).

Sendo a morfogênese prostática dependente de hormônios esteróides, os andrógenos são necessários para o desenvolvimento prostático embrionário e neonatal e, posteriormente, para iniciar a atividade secretória prostática na puberdade (Isaacs et al., 1994). No entanto, a ação androgênica não é exercida diretamente sobre as células epiteliais no início da morfogênese prostática. Sob a influência de andrógenos, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática. Assim, com a diferenciação das células epiteliais, os níveis de receptores androgênicos (AR) aumentam e a expressão de receptores estrogênicos epiteliais (ER $\beta$ ) e estromais (ER $\alpha$ ) é induzida. No desenvolvimento normal, os ER $\alpha$  também atuam de maneira parácrina estimulando a proliferação epitelial, enquanto os ER $\beta$  juntamente com o AR estão relacionados com a diferenciação e atividade funcional da próstata (Omoto et al., 2005).

A ação de andrógenos sobre as células mesenquimais resulta em fatores parácrinos específicos que atuam sobre as células epiteliais induzindo a sua proliferação (Thomson et al., 2001). Por outro lado, também existe uma sinalização parácrina do epitélio para o mesênquima. Esta sinalização regula a diferenciação do mesênquima que circunda os brotos em formação em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward et al., 1996). Assim, durante a morfogênese prostática, o AR é necessário no mesênquima e não no epitélio, sendo que sua expressão precede o surgimento dos brotos prostáticos. Nas células epiteliais, a função do AR está relacionada com a regulação de proteínas secretórias e, talvez, à diferenciação celular. Ademais o AR é o maior regulador de fator de transcrição no desenvolvimento normal da próstata e no crescimento do câncer de próstata dependente de andrógeno. (Donjacour e Cunha, 1993; Feldman e Feldman 2001).

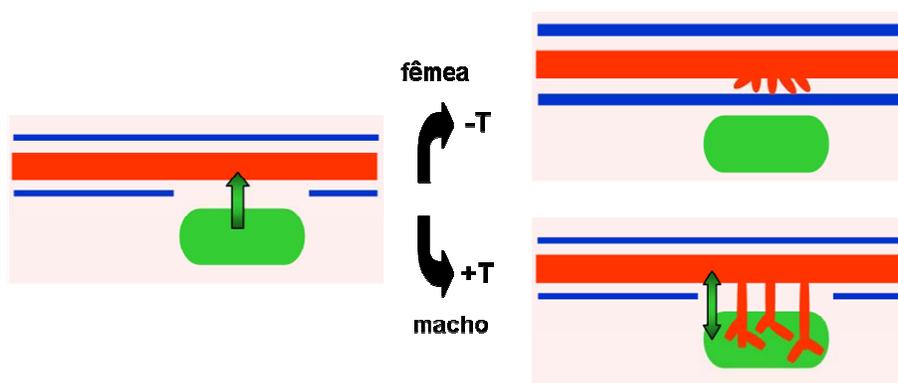
Dentre os fatores parácrinos que atuam sobre a morfogênese prostática, pode-se citar os fatores de transcrição da família homeobox NKx3.1, Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13, os fatores da família FGF (FGF-7 e -10) (Huang et al., 2004), a glicoproteína Sonic hedgehog (Shh), o receptor para Shh, patched (ptc), os fatores de transcrição da família Gli e BMP-4 (Pu et al., 2004).

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

A diferenciação de parte do mesênquima do UGS em músculo liso é crucial para a morfogênese prostática em machos e fêmeas, pois é este evento que regula a sinalização parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002).

Durante a diferenciação do mesênquima, os andrógenos regulam a espessura e a continuidade da camada de músculo liso formada, de modo que a ausência de andrógenos em embriões femininos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua. Esta camada separa o VMP do epitélio uretral, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP. Desse modo, a espessa camada de músculo liso impede a interação do VMP com os brotos prostáticos em formação, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002). Em machos, na presença de andrógenos, a formação do músculo liso é inibida ou atrasada, e os brotos prostáticos emergem da uretra e podem penetrar no VMP. Assim, a interação parácrina epitélio-mesênquima

é estabelecida, ocasionando a ramificação e expansão da próstata ventral. O modelo ilustrativo da indução prostática em machos e fêmeas pode ser observado na figura 1.



**Figura 1.** Indução da próstata ventral em embriões femininos e masculinos de ratos. Do lado esquerdo observa-se o VMP (verde) durante os estágios iniciais de indução prostática (17-18 dias de gestação). A camada de músculo liso (azul) é descontínua e permite a sinalização entre o VMP e o epitélio uretral (vermelho). Do lado direito está representada a morfogênese prostática em machos e fêmeas (a partir de 21,5 dias de gestação). Em fêmeas, a ausência de testosterona (T) permite que o músculo liso forme uma camada espessa e contínua, impedindo a sinalização parácrina entre os brotos prostáticos em crescimento (vermelho) e o VMP. Em machos, a T induz a formação de uma camada muscular delgada e descontínua que permite a interação epitélio-mesenquimal. Os brotos que emergem do epitélio uretral invadem o VMP. Neonatalmente, esses brotos sofrem bifurcações laterais dentro do VMP, originando a próstata ventral (Santos e Taboga 2006).

A formação de brotos prostáticos é um processo constitutivo de machos e fêmeas, porém a ramificação e expansão desses brotos são reguladas por andrógenos. Em fêmeas, o isolamento entre o VMP e o epitélio uretral, que é provocado pela camada de músculo liso, impede a formação de uma glândula prostática desenvolvida e lobulada. Desse modo, o reduzido tecido prostático observado em fêmeas de várias espécies é originário do UGS que não sofreu estímulo androgênico. No entanto, embora a próstata feminina adulta seja menor que a masculina (cerca de 15% a 25% do tamanho da próstata ventral masculina), ela apresenta um epitélio secretor diferenciado e funcional (Zaviačić et al., 2000a; Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004). Como

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

Em algumas espécies, a frequência de desenvolvimento de uma glândula prostática funcional em fêmeas é muito elevada. Na espécie humana, cerca de 90% das mulheres desenvolvem um tecido prostático maduro e ativo nos processos de secreção (Zaviačič et al., 2000b). Em roedores, a ocorrência de próstata em fêmeas é variável de espécie para espécie (Mahoney e Witschi, 1947). Em ratos Wistar a frequência de próstata feminina pode variar de 1% a 98% de acordo com a linhagem utilizada (Manhoney, 1940). Em gerbilos, o desenvolvimento de próstata é muito frequente (89%), se assemelhando ao que ocorre na espécie humana (Santos e Taboga, 2006).

### ***Influência dos estrógenos sobre o desenvolvimento prostático***

Embora o desenvolvimento prostático seja dirigido por andrógenos, os estrógenos também podem influenciar a morfogênese prostática. A exposição inapropriada a estrógenos durante o período embrionário e neonatal causa distúrbios permanentes no desenvolvimento prostático, sendo esse processo referido como “estrogenização do desenvolvimento” ou *imprint* (Huang et al., 2004).

Estudos com roedores têm demonstrado que a exposição a estrógenos durante as duas primeiras semanas de desenvolvimento embrionário modifica o brotamento, ramificação e diferenciação prostática masculina, de modo que a natureza dessas alterações é dependente da dose de hormônio empregada (Prins et al., 2001).

Doses altas de estrógeno causam distúrbios permanentes na próstata, que incluem redução do crescimento, defeitos na diferenciação das células epiteliais, alteração da função secretora e reduzida resposta a andrógenos na vida adulta (Risbridger et al., 2005). Inversamente, doses baixas de estrógenos têm sido associadas ao aumento do tamanho e atividade secretória da glândula prostática no indivíduo adulto, e ao surgimento de doenças prostáticas em indivíduos senis (Omoto et al., 2005; Timms et al., 2005).

Os efeitos causados por ambas as doses de estrógenos parecem ser mediados pelo ER $\alpha$ , uma vez que camundongos deficientes na produção desse receptor não apresentam alterações de desenvolvimento quando expostos aos estrógenos (Omoto et al., 2005).

Durante o desenvolvimento prostático normal, o AR é o receptor dominante tanto no epitélio quanto no estroma, enquanto a expressão de ER $\alpha$  é baixa nas células estromais próximas aos ductos prostáticos em expansão. Com a exposição a altas doses de estrógenos, a expressão de ER $\alpha$  aumenta, fazendo com que a morfogênese prostática torne-se um processo dirigido por estrógenos. Esse evento causa interrupções na expressão coordenada de genes críticos para o desenvolvimento prostático, entre eles, Hox13, NKx3.1, Shh, FGF-10 e BMP-4, ocasionando uma supressão no brotamento e ramificação prostática (Huang et al., 2004). Por outro lado, estudos com camundongos demonstram que, a baixas doses, os estrógenos não só interagem com o ER $\alpha$ , mas também atuam como agonistas do AR, aumentando sua expressão e atividade, fato que ocasiona o maior desenvolvimento prostático (Gupta, 2000; Omoto et al., 2005).

Atualmente, vários estudos envolvendo a estrogenização intra-embriônica e neonatal de roedores foram desenvolvidos com a finalidade de avaliar o impacto que esse hormônio pode causar sobre os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de ratos e camundongos (Gupta, 2000; Pu et al., 2004; Markey et al., 2005; Timms et al., 2005). O foco de interesse desses experimentos

advém do fato que nas últimas décadas milhões de mulheres têm exposto seus filhos a estrógenos sintéticos durante a gestação (Thayer et al., 2001; Schrager e Potter, 2004). Dentre esses compostos sintéticos que apresentam atividade estrogênica pode-se citar o bisfenol A (BPA), o dietilestilbestrol (DES) e o 17 $\alpha$  etinilestradiol (EE).

O EE é um estrógeno sintético que faz parte da composição da maioria dos anticoncepcionais utilizados na atualidade e que apresenta uma ação muito semelhante ao DES. Nos EUA e na Europa, é estimado que 2% a 5% das 60 milhões de mulheres que tomam contraceptivos orais engravidam acidentalmente e, desconhecendo a gravidez, continuam o uso dos mesmos até o terceiro ou quarto mês de gestação. Esta alta incidência de fertilização ocorre devido a erros na administração da pílula (principalmente por esquecimento) ou, em poucos casos, a variações individuais na sensibilidade aos hormônios contraceptivos. Como a exposição intra-uterina a esse hormônio ocorre no período crítico para o desenvolvimento dos órgãos sexuais, várias anormalidades do desenvolvimento ocorrem neste período, sobretudo nos órgãos que apresentam morfogênese dependente de hormônios esteróides (Thayer et al., 2001; Timms et al., 2005).

A exposição a baixas doses de EE durante o desenvolvimento intra-uterino em camundongos machos promove um crescimento prostático anormal durante o período neonatal (Timms et al., 2005). Além disso, quando as próstatas desses animais que foram expostos ao EE no útero foram analisadas na vida adulta, pode-se constatar um grande desenvolvimento glandular e uma alta expressão de AR (Thayer et al., 2001). Estes trabalhos demonstram os efeitos que o EE causa sobre a próstata de camundongos machos recém-nascidos e adultos é equivalente às alterações glandulares causadas pelo BPA e pelo DES.

A formação embriológica da próstata feminina humana e de roedores ocorre em um ambiente com baixos níveis de hormônios esteróides, porém a secreção desses hormônios pelos ovários e pela glândula adrenal promove a diferenciação e atividade secretória da glândula na vida adulta (Santos et al., 2006). Portanto, é essencial que se avalie os efeitos que a exposição materna a estrógenos sintéticos podem provocar na morfogênese prostática, uma vez que tem sido crescentes os relatos de desordens prostáticas na mulher, tais como hiperplasia benigna e adenocarcinoma (Sloboda et al., 1998; Islam et al., 2001; Sharifi-Aghdas and Ghaderian, 2004; Kato et al., 2005).

#### ***Características morfofuncionais da próstata***

A próstata é uma glândula sexual acessória cuja secreção apresenta fundamental importância no processo reprodutivo (Price, 1963; Marker et al., 2003). Esta glândula não é exclusiva do organismo masculino, sendo encontrada em fêmeas de diversos mamíferos, incluindo humanos (Zaviačič, 1999; Zaviačič et al., 2000a) e roedores (Mahoney e Witschi, 1947; Gross e Didio, 1987; Flamini et al., 2002; Custodio et al., 2004; Santos et al., 2006).

Na maioria dos roedores machos, a próstata se divide em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal, de acordo com a localização ao redor da uretra prostática, e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior, localizadas na face côncava das vesículas seminais (Sugimura et al., 1986; Aumuller e Seitz, 1990). Em gerbilos adultos (Campos et al., 2006), a próstata apresenta alvéolos com epitélio prismático simples e altamente secretório imersos em um estroma com tecido conjuntivo vascularizado, poucas fibras colágenas e elásticas e células musculares lisas bem compactadas dispostas ao redor dos alvéolos, características muito semelhantes às encontradas na próstata masculina humana.

Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm relatado a ocorrência de uma glândula prostática bem desenvolvida em várias espécies de fêmeas de roedores, como *Praomys natalensis* (Smith et al., 1978; Gross and Didio, 1987), *Rattus norvegicus* (Shehata, 1980), *Lagostomus maximus maximus* (Flamini et al., 2002), *Meriones libycus* (Shehata, 1974; 1975) e *Meriones unguiculatus* (Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004). Estes trabalhos demonstraram a existência de grande semelhança entre a próstata feminina de roedores e humanos (Zaviačič, 1999). Além disso, as características morfológicas apresentadas por estas pesquisas indicam que a próstata feminina dessas espécies é similar à próstata ventral masculina, e que suas células epiteliais exibem um fenótipo de células funcionalmente ativas.

A próstata de fêmeas adultas de gerbilos apresenta grande similaridade morfofuncional com a próstata feminina humana, apresentando localização parauretral, sendo constituída por um pequeno conjunto de ductos e alvéolos circundados por um estroma bem desenvolvido (Santos et al., 2003). A porção alveolar é revestida por células secretoras altamente sintéticas, que produzem abundante secreção rica em fosfatase ácida (Custódio et al., 2004) e que expressam o antígeno específico da próstata (PSA) (Santos et al., 2006).

Os fatores que promovem a atividade da próstata feminina do gerbilo adulto têm sido muito estudados em diversas pesquisas atuais (Custódio et al., 2004; Santos et al., 2006; 2007). Os resultados obtidos com esses estudos demonstram que a fisiologia da próstata feminina é regulada por andrógenos e estrógenos, e que desequilíbrios hormonais decorrentes do envelhecimento ou de manipulações hormonais intra-uterinas e/ou pós-natais podem levar à instalação de desordens prostáticas (Santos e Taboga, 2006).

## **OBJETIVO**

---

O presente estudo teve como objetivo:

Avaliar os efeitos da exposição estrogênica sobre os aspectos morfológicos, morfométrico estereológicos e imunocitoquímicos da próstata de gerbilos machos e fêmeas adultos expostos no período gestacional e analisar o efeito da suplementação androgênica pós-natal nesses animais.

**Exposição ao etinilestradiol durante o desenvolvimento pré-natal e a suplementação de andrógenos na vida pós-natal causam alterações morfofisiológicas na próstata de machos e fêmeas de gerbilos adultos.**

Artigo submetido à revista International Journal of Experimental Pathology

**Exposição ao etinilestradiol durante o desenvolvimento pré-natal e a suplementação de andrógenos na vida pós-natal causam alterações morfofisiológicas na próstata de machos e fêmeas de gerbilos adultos.**

*Ana Paula Silva Perez<sup>1</sup>; Manoel Francisco Biancardi<sup>1</sup>; Rejane Maira Góes<sup>3</sup>; Fernanda Alcântara dos Santos<sup>2</sup>; Sebastião Roberto Taboga<sup>3\*</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Celular – Instituto de Biologia– UNICAMP– Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia– UFG – Goiânia, GO, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Financiado por:**

Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo–FAPESP (Procs. No. 07/06234-2)

**\*Correspondência para:**

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

Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP

Rua Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth,

São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15054-000

Tel: +55-17-322122386; Fax: +55-17-32212390

## Resumo

Esteróides desempenham significativas funções na próstata e são cruciais para o desenvolvimento e crescimento normal da glândula. Entretanto a exposição a estrógenos exógenos no período embrionário e neonatal tem sido relacionada a distúrbios permanentes na morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor de ambos os sexos. O objetivo do presente estudo foi analisar aspectos morfológicos e imunocitoquímicos da próstata ventral masculina e da próstata feminina de gerbilos adultos expostos a agentes estrogênicos (EE - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, Sigma) durante a fase intra-uterina e também verificar o efeito da exposição androgênica pós-natal sobre as glândulas submetidas a estrogenização durante o desenvolvimento. Por meio de análise sorológica pode-se observar o aumento dos níveis de estradiol nos machos e nas fêmeas adultos expostos ao etinilestradiol durante o desenvolvimento. Esses altos níveis estão relacionados com as alterações verificadas nas próstatas de ambos os sexos na fase adulta, como o aumento da altura epitelial prostática feminina e da espessura da camada muscular em ambas as glândulas. Além disso, observou-se na próstata masculina a presença de neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP). Nas próstatas de ambos os sexos constatou-se o aumento de fibras reticulares e colágenas. Por meio da imunocitoquímica verificou-se o aumento da imunorreatividade de  $\alpha$ -actina de músculo liso em regiões lesionadas e a ausência nos brotos epiteliais prostáticos. Os machos e as fêmeas expostos ao etinilestradiol durante o desenvolvimento e à testosterona durante a vida adulta tiveram os níveis de estradiol normalizados, porém as lesões prostáticas se mantiveram. Várias dessas alterações são mediadas pelo ER $\alpha$  que foi constatado pela alta imunorreatividade nas próstatas tratadas de ambos os sexos. Com os dados percebeu-se que o tratamento intra-uterino com etinilestradiol foi mais

efetivo na próstata ventral masculina, estando estas modificações associadas aos níveis alterados de estradiol observados nos machos adultos.

**Palavra-chave:** período pré-natal, etinilestradiol, próstata masculina, próstata feminina, gerbilo.

## Introdução

O desenvolvimento prostático está sob regulação hormonal, sendo mediado primariamente por andrógenos que coordenam o crescimento e a diferenciação dessa glândula. Entretanto, o desenvolvimento prostático é sensível a outras proteínas e hormônios esteróides, incluindo o estrógeno (Lasnitzki et al., 1980).

O estrógeno está presente em homens e mulheres, na qual os níveis desse hormônio são significativamente maiores na idade reprodutiva. Esse hormônio é produzido principalmente nos ovários e no córtex da adrenal (Ruggiero e Likis, 2002). Entretanto a exposição a estrógeno exógeno no período embrionário e também durante o desenvolvimento neonatal tem sido associada a distúrbios permanentes na morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor de ambos os sexos (Cooper et al, 1997).

Em roedores machos observou-se que a alteração dos níveis perinatais de estrógeno endógeno (produção local excessiva ou materna) ou exógeno (estrógeno ambiental) promoveu distúrbios no crescimento prostático e predisposições a lesões cancerosas, um processo denominado “estrogenização do desenvolvimento” ou “*imprint* estrogênico” (Santti et al., 1994; Huang et al., 2004).

O uso de químicos que apresentam atividades estrogênicas tem aumentado significativamente no consumo cotidiano das pessoas. Dentre esses se destacam produtos domésticos como pesticidas, componentes de plásticos, detergentes, e anticoncepcionais (Price et al 1985; Korach et al 1993). Como exemplo de estrógeno sintético tem-se o etinilestradiol que é componente das pílulas anticoncepcionais. Segundo estudos algumas mulheres continuam fazendo o uso do contraceptivo oral até que a gravidez inesperada ou não planejada seja descoberta (Dickey et al, 1998; Li et al, 1995). Então estudos com roedores machos mostram que

a exposição ao etinilestradiol durante a fase intra-uterina causa malformações na uretra e alterações na diferenciação e crescimento da próstata (Timms et al 2005).

Entretanto poucos estudos revelam as alterações na próstata de machos e fêmeas adultos que foram expostos a agentes estrogênicos sintéticos durante o desenvolvimento embrionário. O objetivo do presente estudo foi investigar os aspectos morfológicos, morfométricos e imunocitoquímicos da próstata ventral masculina e da próstata feminina de gerbilos adultos que foram expostos ao etinilestradiol durante a fase intra-uterina, e também verificar os efeitos androgênicos nessas glândulas que foram expostas a “estrogenização” durante o desenvolvimento.

## **Material e Métodos**

### *Animais e Delineamento Experimental*

Quinze fêmeas de gerbilo virgens adultas (90 a 120 dias de idade) foram mantidas com um macho da mesma idade por quatro horas. O acasalamento foi observado pela presença do tampão vaginal e confirmado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (dia 0 de gestação). Após o acasalamento, estas fêmeas foram divididas em três grupos principais de cinco animais. Todos os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP), em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*” (Purina<sup>®</sup>).

No primeiro grupo experimental (EE), as fêmeas grávidas receberam por meio de gavagem, 10µg/kg/dia de etinil estradiol<sup>1</sup> (EE - 17α-ethinylestradiol, Sigma) diluído em 100 µl de óleo de milho, segundo modificação do método de Thayer (2001) do 17º ao 19º dia de gestação, período no qual se inicia a morfogênese prostática (Markey et al, 2003). O segundo grupo, sendo o grupo controle, as fêmeas grávidas receberam apenas o veículo no mesmo volume do grupo tratado. No terceiro grupo (EE/T), as fêmeas grávidas foram expostas ao EE segundo a mesma metodologia adotada no primeiro grupo experimental. Ao completarem 105 dias de idade, os filhotes machos e fêmeas da ninhada do terceiro grupo experimental receberam doses subcutâneas de 1mg/Kg de cipionato de testosterona (T- Deposteron – Sigma) em 100 µl de óleo de milho, a cada 48 horas, durante 14 dias.

Após o nascimento, as ninhadas dos três grupos experimentais foram separadas em subgrupos com 10 machos e 10 fêmeas, resultando num total de seis subgrupos (cada subgrupo continha filhotes de casais diferentes). As fêmeas da ninhada do grupo controle e as do grupo EE quando adultas (120 dias) foram cicladas antes de terem as suas próstatas analisadas. Isto ocorreu para que as fêmeas dos dois grupos fossem sacrificadas na fase proestro, sendo esta a primeira fase do ciclo estral. Para que não houvesse discrepâncias durante as análises dos resultados, devido às divergências morfológicas e morfométricas da próstata feminina do gerbilo nas diferentes fases do ciclo estral (Fochi et al., 2008).

Após o nascimento, os filhotes experimentais foram submetidos à mensuração da distância anogenital no 2º dia de vida pós-natal (período neonatal), por meio de um paquímetro King Tools Digital Caliper (0-300 mm).

---

<sup>1</sup>Dose equivalente ao conteúdo de EE presente nas pílulas anticoncepcionais ingeridas diariamente por mulheres de até 80 kg.

Ao fim de cada tratamento, os animais de todos os grupos experimentais quando completaram 120 dias de vida foram anestesiados por inalação de CO<sub>2</sub>, pesados e, em seguida, decapitados para a coleta de sangue, após ruptura dos vasos cervicais, visando às análises hormonais. As próstatas masculinas e femininas foram retiradas, sendo esta última removida juntamente com a uretra (UJP). Os ovários, testículos e adrenais também foram coletados e pesados.

#### *Dosagem hormonal sérica*

Os níveis séricos de estradiol e testosterona foram determinados por meio de métodos imunométricos. Dez amostras de sangue de cada subgrupo experimental tiveram seu soro separado por centrifugação (3.000 rpm) e armazenadas a -20°C para posterior dosagem hormonal. As medições foram realizadas em um analisador quimioluminescente ultra-sensível automático Vitros ECI (Johnson & Johnson Orthoclinical Diagnostics, Divisão, Rochester, NY). A sensibilidade foi 0,1-3,814pg/ml de estradiol, 0,1-150 ng/ml, testosterona. As variações intra-ensaio para estradiol e testosterona respectivos foram de 1,1% e 1%, enquanto as variações de testes foram de 1,5% e 2,1%.

#### *Histoquímica*

A próstata ventral masculina e a próstata feminina juntamente com a uretra (PJU) foram fixadas por 48h em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5%). Após a fixação, os tecidos foram desidratados em séries graduadas de etanol e, então incluídas em resina de metacrilato de glicol (Historesin embedding kit; Leica, Nussloch, Germany), e seccionados a 3µm com um micrótomo rotativo automático (RM2155; Leica). Os cortes foram corados em Hematoxilina-Eosina (H&E) para análises morfológicas gerais, em Reticulina de

Gömori (Gömöri 1937) para análise das fibras reticulares e do colágeno e realizou-se a reação de Feulgen (Mello e Vidal 1980) para estudo nuclear. As análises histológicas foram feitas com um microscópio fotônico (Zeiss-Jenaval (Jena, Germany) ou Olympus BX60) (Hamburg, Germany), e as imagens foram digitalizadas, utilizando-se o software Image - Pro® Plus versão 4.5 para Windows (Media Cybernetics).

#### *Análise Morfométrica e Estereológica*

Campos aleatórios da próstata ventral masculina e da próstata feminina de cada subgrupo coradas com Hematoxilina - Eosina foram analisados por meio do Image -Pro® Plus versão 4.5 para Windows. As medidas estereológicas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 e 10 linhas de teste proposto por Weibel (1963) para comparar a proporção relativa (volume relativo) de cada componente do tecido prostático (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) como descrito por Huttunen e colaboradores (1981) para tecido prostático. Para isso foram capturados 30 campos microscópicos aleatórios de cada subgrupo experimental. Em resumo, os valores relativos foram determinados por contagem dos pontos coincidentes da grade de teste e dividindo-os pelo número total de pontos. A análise morfométrica foi realizada para determinar a altura do epitélio e da camada muscular, além da área ( $\mu\text{m}^2$ ) e do perímetro nuclear ( $\mu\text{m}$ ) das células secretoras epiteliais. Para esta análise utilizou-se 200 medidas para cada subgrupo.

### *Imunocitoquímica*

Próstatas masculinas e femininas dos subgrupos foram fixadas em paraformol tamponado a 4% ou metacarn (na proporção 1:3:6 respectivamente de ácido acético, clorofórmio e metanol) e seccionadas a 5µm foram sujeitas a imunocitoquímica para a detecção de receptores andrógenos (AR), receptores de estrógeno (ER $\alpha$ ) e de alfa-actina de músculo liso. Anticorpos primários para AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology), ER $\alpha$  (rabbit polyclonal IgG, MC-20, Santa Cruz Biotechnology) e alfa-actina de músculo liso (mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology) utilizados em uma diluição de 1:100. Peroxidase (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA) e 3,3'-diaminobenzina (DAB) foram utilizadas como conjugado para anticorpo específico e substrato peroxidase, respectivamente. A contra-coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris.

### *Análise Estatística*

Os dados obtidos foram analisados no software Statistica 6.0 (StarSoft Inc., Tulsa, OK). Os resultados quantitativos, expressos como média  $\pm$  desvio padrão foram comprovados por meio de testes de hipóteses como a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas com  $P \leq 0.05$ , considerando-se a significância estatística.

## **Resultados**

### *Análise Biométrica*

Por meio da análise biométrica, mostrada na tabela 1 não se observou diferença estatística na distância da medida anogenital dos grupos experimentais de machos e fêmeas neonatais.

Os grupos experimentais dos machos adultos não apresentaram diferenças significativas no peso corpóreo, na próstata ventral e no peso relativo da próstata ventral. Entretanto, relatou-se uma diminuição do peso corpóreo das fêmeas adultas do grupo EE comparado aos grupos controle e EE/T. Ademais, verificou-se um aumento no peso da PJU no grupo EE/T comparado aos grupos controle e EE. Os dados apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1).

Nos machos, notou-se uma diminuição significativa no peso do testículo do grupo EE/T comparado aos grupos controle e EE. O peso da adrenal aumentou no grupo EE em relação aos grupos controle e EE/T. Nas fêmeas, não houve diferença estatisticamente significativa do peso dos ovários entre os grupos experimentais. Enquanto isso, no peso da adrenal verificou-se um aumento no grupo EE/T comparado aos grupos controle e EE. Todos os dados apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo observados na Tabela 1.

### *Análise Sorológica*

Os níveis séricos de estradiol e testosterona dos grupos experimentais de machos e fêmeas são mostrados na Tabela 2. A concentração de estradiol no grupo EE dos machos apresentou-se maior comparado aos grupos controle e EE/T. O aumento de estradiol também foi observado no grupo EE das fêmeas comparado aos grupos controle e EE/T. Com relação aos níveis de

testosterona observou-se uma elevação no grupo EE/T dos machos e das fêmeas comparando-se aos seus respectivos grupos controle e EE. As diferenças foram estatisticamente significativas.

#### *Análises morfométrica, cariométrica e estereológica*

Por meio de análise morfométrica (Tabela 2) verificou-se um aumento na altura do epitélio prostático dos machos no grupo EE/T com relação aos grupos controle e EE. Nas fêmeas notou-se um aumento na altura epitelial do grupo EE comparado ao grupo controle, e também um aumento no grupo EE/T com relação ao grupo controle e EE. Em adicional, nos grupos dos machos e fêmeas observou-se aumento da espessura da camada muscular no grupo EE de ambos os sexos comparados aos seus respectivos controle, e também aumento do mesmo nos grupos EE/T dos dois sexos, comparando-se aos seus respectivos grupos controle e EE, sendo todos os dados estatisticamente significativos.

A análise cariométrica das células secretoras mostrou alterações nucleares entre os grupos experimentais de machos e fêmeas (Tabela 2). No grupo EE dos machos, a área nuclear diminuiu significativamente comparada ao controle, e no grupo EE/T também diminuiu, mas comparando-se aos grupos controle e EE. Entretanto na próstata feminina notou-se um aumento na área nuclear dos grupos EE e EE/T comparado ao controle. Com relação ao perímetro nuclear observou-se uma diminuição no grupo EE/T comparado ao controle. Por outro lado nas fêmeas a mesma medida apresentou-se maior no grupo EE comparado ao controle, e um aumento no grupo EE/T comparando-se aos grupos controle e EE, sendo.

A estereologia, representada pelos volumes relativos dos compartimentos prostáticos dos grupos de machos e fêmeas, também foi apresentados na Tabela 2. No compartimento epitelial

prostático dos machos não se observou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Por outro lado, o lúmen apresentou-se menor nos grupos EE e EE/T dos machos comparados ao grupo controle. Com relação ao compartimento estromal verificou-se que no grupo EE/T dos machos aumentou significativamente a proporção do estroma muscular comparado aos grupos controle e EE. Porém não se relatou diferenças significativas no estroma não- muscular entre os grupos experimentais dos machos.

Nas fêmeas a proporção do compartimento epitelial foi maior estatisticamente no grupo EE/T comparado aos grupos controle e EE. Entretanto o lúmen apresentou-se maior no grupo EE comparado aos grupos controle e EE/T. O volume do estroma muscular aumentou no grupo EE comparado aos grupos controle e EE/T, e neste grupo houve um aumento comparado apenas ao controle. No volume do estroma não-muscular da próstata feminina verificou-se uma diminuição nos grupos EE e EE/T comparada ao grupo controle. Todos os dados apresentam diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2).

### *Aspectos morfológicos*

O aspecto morfológico da próstata ventral masculina e da próstata feminina de gerbilo adultos nos diferentes grupos experimentais estão demonstrados nas Fig. 1 e 2. As próstatas masculina e a feminina apresentaram epitélios simples cúbicos envolvidos por um estroma fibromuscular (Fig. 1a-d).

Com a análise morfológica pode-se observar no grupo EE dos machos vários focos de lesões glandulares, caracterizadas como neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) com núcleos atípicos (seta tracejada e seta larga) (Fig. 1e-f). A próstata das fêmeas do grupo EE apresentou hiperplasia epitelial com aparente aumento das células epiteliais (seta (Fig. 1g-h).

No grupo EE/T dos machos verificou-se um epitélio mais desenvolvido comparado aos grupos controle e EE. A presença de neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP) e epitélio secretor com diferenciação mucinosa (Fig. 1i-j). O grupo EE/T das fêmeas apresentou também um epitélio mais desenvolvido do que o grupo controle e EE. Além disso, relatou-se a presença de neoplasia intra-epitelial (NIP) e a membrana basal apresentou aspecto sinuoso (Fig. 1l-n).

Nas Figuras 2a-d, observam-se os componentes da matriz extracelular da próstata ventral masculina e a próstata feminina, evidenciando-se as fibras reticulares envolvendo a membrana basal da próstata ventral masculina e próstata feminina, e a concentração de fibras colágenas no estroma subepitelial de ambas as glândulas.

Nos grupos tratados, verificou-se um aparente aspecto irregular nas fibras reticulares do grupo EE dos machos comparada ao grupo controle (Fig. 2e). As fêmeas do grupo EE apresentaram abundância de fibras colágenas, principalmente em regiões com lesões (Fig. 2f-g).

Com relação ao grupo EE/T notou-se uma aparente diminuição das fibras reticulares que envolvem principalmente regiões com brotamento epiteliais, característica encontrada em machos e fêmeas (Fig. 2h e j). Além disso, nesse mesmo grupo das fêmeas notou-se o aumento das fibras reticulares e colágenas comparada ao grupo controle (Fig. 2i).

### *Imunocitoquímica*

#### *alfa-actina de músculo liso*

Análise imunocitoquímica mostra a expressão da alfa-actina na camada muscular lisa que envolve todo o epitélio da próstata ventral masculina e da próstata feminina dos grupos controle (Fig. 3a-b). Entretanto nos grupos EE e EE/T tanto de macho quanto de fêmea verificou-se que

alfa-actina não se expressa em regiões onde ocorre a formação de brotos epiteliais e proliferações das células epiteliais (Fig. 3c, d, e, g). No grupo EE/T de ambos os sexos notou-se também uma maior expressão de  $\alpha$ -actina nas regiões com lesões epiteliais (Fig. 3f, h).

#### *Imunorreação do AR e ER $\alpha$*

Nos grupos controle, a imunorreatividade do AR foi maior nas células epiteliais da próstata ventral masculina comparada a imunorreação na próstata feminina. Além disso, observou-se a imunorreação deste receptor no compartimento estromal de ambos os sexos (Fig. 4a-b). Nos grupos EE e EE/T de machos e fêmeas verificou-se um aumento da imunorreatividade do AR comparado com seus respectivos grupos controle (Fig. 4c-f).

A imunocitoquímica mostra que os ER $\alpha$ s apresentam uma maior imunorreatividade nas células estromais da fêmea comparando-se com o macho (Fig. 5a-c). No grupo EE/T dos machos observou-se imunorreação citoplasmática do ER $\alpha$  (Fig. 5g-h) Enquanto que neste mesmo grupo das fêmeas verificou-se uma maior imunorreatividade de ER $\alpha$  nas células estromais e a imunorreação desse receptor nas células epiteliais (Fig. 5i-j).

#### **Discussão**

Os resultados apresentados nesse estudo indicam que a exposição ao estrógeno sintético como o EE durante a fase intra-uterina altera a morfofisiologia da próstata ventral masculina e da próstata feminina de gerbilos na fase adulta.

A próstata masculina do gerbilo apresenta quatro pares de lobos, sendo estes o ventral, dorsal, dorso-lateral e coaguladora, sendo os três primeiros os mais estudados (Rochel et al.,

2007). Durante o experimento foi analisado apenas o lobo ventral por este ser morfológicamente similar a próstata masculina humana e a próstata feminina de gerbilos, sendo esta comparação utilizada em vários estudos (Custódio et al., 2004; Santos et al., 2003).

Com a análise sorológica pode-se observar que os machos e as fêmeas que receberam EE durante a vida intra-uterina tiveram os níveis de estradiol aumentados na fase adulta. Enquanto que os níveis de testosterona mantiveram-se inalterados. Os altos níveis de estradiol em ambos os sexos estão relacionados com a exposição ao EE durante o desenvolvimento embrionário. O EE é um composto genericamente denominado xenoestrógeno que está associado a efeitos reprodutivos adversos e ao desenvolvimento geral dos animais por imitar a ação de hormônios estrogênicos (Davis et al., 1993; Welshons et al., 2003).

O EE é um disruptor endócrino que altera permanentemente (*imprint*) a fisiologia do sistema endócrino. Ademais, sugere-se que esse composto, assim como outros estrógenos sintéticos, promove alterações nos padrões de metilação do DNA em múltiplos genes de sinalização celular da próstata (Ho et al, 2006; Timms et al, 2005; Prins et al, 2008).

Os níveis alterados de estradiol podem estar associados com as alterações como o aumento do peso da glândula adrenal nos machos. Nas fêmeas, estas alterações hormonais promoveram a diminuição do peso corpóreo. A manutenção dos altos níveis de estrógeno nessa fase está relacionada com a ativação no catabolismo de estrógeno e também pela conversão da testosterona em estrógeno pela ação da aromatase (Santos et al, 2006).

O *imprint* hormonal estrogênico da próstata masculina está relacionado com alterações na regulação dos processos do crescimento prostático (McPherson et al, 2008). Dados morfométricos revelaram que a exposição ao EE durante o desenvolvimento promoveu modificações na fase adulta como o aumento da espessura da camada muscular lisa da próstata

ventral masculina, além de aumentar a altura do epitélio prostático feminino e da espessura da camada muscular lisa, sendo este também mostrado nos dados estereológicos, assim como a diminuição do volume do estroma não-muscular. Os altos níveis de estrógeno também reduziram o volume do lúmen prostático masculino e aumentou o lúmen prostático feminino.

Dados da cariometria mostraram que o estrógeno influenciou de maneira diferente no tamanho dos núcleos das células secretoras do epitélio prostático de ambos os sexos. Nos machos, a área nuclear diminuiu, estando relacionada com o fenótipo dos núcleos atípicos encontrados em regiões com NIP (neoplasias intra-epiteliais prostáticas). Agora nas fêmeas tratadas com EE a área nuclear aumentou.

Alguns estudos mostram que a estrogenização neonatal em roedores causa na vida tardia da próstata masculina processos patológicos, incluindo inflamação e lesões pré-malignas (Coffey, 2001; Prins et al 2001a, 2007). O presente estudo mostra que a exposição ao EE durante o desenvolvimento causou lesões na próstata masculina adulta como neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP). Já na próstata feminina adulta constatou-se a presença de alterações não neoplásicas como a hiperplasia epitelial. Ainda morfológicamente, observou-se que houve um evidente aumento nas fibras reticulares e colágenas de ambas as próstatas.

O mecanismo pelo qual os químicos estrogênicos como o EE modulam o desenvolvimento dependente de andrógeno é desconhecido. Segundo Vom Saal e colaboradores (1997) baixas doses de estradiol aumentam a função androgênica, estimulando a atividade dos receptores de andrógenos. Os resultados do presente estudo relataram um aumento de expressão do AR na próstata masculina exposta ao EE. A atividade de ligação do AR é permanentemente alterada por estrógenos sintéticos. Possivelmente porque esses compostos aumentam a síntese da

proteína AR. Outra possibilidade seria o aumento do recrutamento de coativadores de AR, resultando assim na elevação da ligação do AR (Gupta, 2000).

Os grupos de machos e fêmeas que foram submetidos à estrogenização do desenvolvimento, e posteriormente tratados com testosterona na vida pós-natal tiveram os níveis de estradiol normalizados. Por outro lado os níveis de testosterona aumentaram em ambos os sexos. Com isso, o peso dos testículos diminuiu e o peso da PJU e da glândula adrenal das fêmeas aumentaram. Esses dados são um indício de que na linha do tempo do experimento, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal foi afetado (Santos et al., 2006).

Apesar dos níveis de estradiol se normalizar devido à suplementação de testosterona. De acordo com os dados, as características morfológicas e imunocitoquímicas das próstatas masculina e feminina mantiveram-se alteradas. Primeiramente observou-se por meio de dados morfométricos o aumento da altura do epitélio e a espessura da camada muscular lisa das próstatas de ambos os sexos. Os dados estereológicos revelaram uma diminuição no volume do lúmen prostático masculino, além de comprovar o aumento da camada muscular lisa em ambos os sexos.

A combinação de andrógeno e estrógeno induz a lesões malignas e aumenta a expressão de aromatase que pode servir para promover o desenvolvimento e/ou à progressão do câncer de próstata em machos (Ellem et al., 2009). Os dados morfológicos revelam que os machos e as fêmeas expostos ao EE e a testosterona apresentaram neoplasias intra-epiteliais prostáticas (NIP) Ademais a próstata das fêmeas apresentaram um epitélio altamente desenvolvido.

Em condições normais o epitélio e a camada de músculo liso da próstata adulta apresentam um crescimento quiescente. Esse estado é mantido pela interação homeostática recíproca entre o epitélio e a camada muscular (Cunha et al., 2002). Porém na presença de

processos patológicos como a carcinogênese ocorre uma perturbação nessa interação entre o epitélio e o músculo, no qual o epitélio não sinaliza adequadamente o músculo liso, e este por sua vez começa a se desdiferenciar, aumentando o fenótipo fibroblástico e redução do músculo liso em regiões com adenocarcinomas prostáticos avançados (Hayward et al., 1997; Wong et al., 2002; Arnold et al., 2002). Esse fenótipo foi evidenciado através do aumento da marcação de  $\alpha$ -actina no músculo liso que envolve as próstatas de machos e fêmeas que foram tratados com EE e testosterona. Além disso, como resultado observou-se a ausência da marcação da  $\alpha$ -actina em graves lesões na próstata dos machos que receberam a combinação de tratamentos e em brotos de ambas as glândulas expostas apenas ao estrógeno.

Em alguns roedores machos adultos o ER $\alpha$  não é expresso no epitélio da próstata ventral, sendo detectado apenas no estroma. Entretanto o *imprint* hormonal alterou essa expressão e, assim, o ER $\alpha$  foi expresso tanto no epitélio quanto no estroma. O ER $\alpha$  medeia a proliferação celular e quando o estroma ou o epitélio são expostos a estrógeno sintético podem permanentemente modificar a razão entre as células epiteliais e estromais (Prins et al., 2001b; Omoto et al., 2005). Nos machos e nas fêmeas que foram expostos ao EE e testosterona notou-se um aumento da imunorreatividade do ER $\alpha$  no estroma e no epitélio prostático. As NIP observadas na próstata dos machos que receberam essa combinação de tratamentos podem ser caracterizadas pela elevação da expressão de ER $\alpha$  dentro das lesões (Ellem et al., 2009).

Por fim pode-se dizer que a exposição ao EE durante o desenvolvimento pré-natal aumentou os níveis de estradiol nos machos e nas fêmeas adultos. Esse aumento está relacionado com as alterações observadas na próstata de ambos os sexos. Entretanto a próstata ventral masculina foi mais sensível e lesionada do que a próstata feminina. Em adicional, a exposição ao estrógeno sintético aumentou a imunorreatividade de AR nas próstatas de ambos os sexos. Assim

pode-se dizer que o estrógeno possivelmente interfere mais no desenvolvimento da próstata ventral masculina do que na próstata feminina. A combinação de estrógeno e testosterona normalizou os níveis de estradiol, porém as próstatas continuaram lesionadas e apresentando alterações morfológicas. Apesar dos níveis de estradiol se normalizar, possivelmente a ação do *imprint* estrogênico permanece em ambas as glândulas.

### **Agradecimentos**

O autor agradece ao Sr. Luiz Roberto Falleiros Junior pela assistência técnica, assim como todos os outros pesquisadores do Laboratório de Microscopia e Microanálise. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Procs. No. 07/06234-2) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (SRT Procs. No. 300163/08-8).

### **Referências**

Arnold JT, Isaacs JT. 2002. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault, *Endocr. Relat. Cancer* 9: 61–73.

Coffey DS. 2001. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57:31–38.

Cooper RL & Karlock RJ. 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: A weight-of-evidence overview. *J Endocrinol* 152:159-166.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 60: 473–485.

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.

Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H 1993 Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 101:372–377

Dickey RP. 1998. Managing Contraceptive Pill Patients (EMIS Publishers, Durant, OK).

Ellem SJ, Risbridger GP. 2009. The Dual, opposing roles of estrogens in the prostate. *Steroid Enzymes and Cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1155: 174-186.

Feldman, B.J., Feldman, D., 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev.* 1, 34–45.

Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod.* 79(4): 674-85.

Gömöri G. 1937. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. *Am J Pathol.* 13: 993–1002.

- Gupta C. 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med.* 224:61-68.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. 1997. Stromal–epithelial interactions in normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 (Suppl.2): 18–26.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte J, Prins GS. 2006. Developmental exposure estradiol and bisphenol A (BPA) increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant (PDE4D4) in the rat prostate. *Cancer Res.* 66: 5624–5632.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 2004. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl.* 25: 330-337.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat.* 132: 357-370.
- Korach KS. 1993. Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology* 132: 2279-2286.
- Lasnitzki I and Mizuno T. 1980 Antagonistic effects of cyproterone acetate and oestradiol on the development of the fetal rat prostate gland induced by androgens in organ culture. *Prostate* 1:147–156.
- Li D, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS. 1995. Oral contraceptive use after conception in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Teratology* 51:30-36.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253:165-174

- McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. 2008. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 76:660-670.
- Mello MLS, Vidal BC. 1980. Práticas de biologia celular. *Edgard Blücher-Funcamp, Campinas* 71p.
- Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. 2005. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5):1484-1489.
- Price KR, Fenwick GR 1985. Naturally occurring estrogens in foods: A review. *Food Addit Contam 2*: 73-106
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. 2001a. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev.* 13: 241-252.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS. 2001b. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: Studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res.* 61: 6089–6097.
- Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* 23:374–382.
- Prins GS and Korach KS. 2008 The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 73 233–244.
- 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. *The Anatomical Record.* 290: 1233-1247.

Ruggiero RJ, Likis FE. 2002. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Women's Health*;47:130–138.

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, 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.

Santti R, Newbold RR, Makela S, et al. 1994 Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate* 24:67–78.

Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL, Buchanan DL, Cooke PS, Preziosi D, Welshons WV, Haseman J, vom Saal FS. 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol. *Human Reproduction* 16(5):988-996.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS* 102(19):7014-7019.

Vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjan VK, Parmigiani S, Welshons WS. 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to

low of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2056-2061

Weibel ER. 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation* 12:131-155.

Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Curran EM, vom Saal FS 2003 Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 8:994–1006

Wong YC, Tam NN. 2002. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation* 70: 633–645.

## Legendas das Figuras

**Figura 1.** Análise morfológica dos grupos experimentais da próstata ventral masculina e da próstata feminina. Coloração: H&E. **1(a-d)** Enfoque para o lúmen amplo (L), epitélio simples cúbico (Ep) e o estroma muscular (EM). **1(e-f)** Presença de neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) com núcleos atípicos (seta larga e seta tracejada). **1(g)** Epitélio alterado (seta tracejada). **1(h)** Hiperplasia epitelial com aparente aumento das células epiteliais (seta). **1(i)** Enfoque para neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) envolvida pelo estroma muscular. **1(j)** Epitélio secretor com diferenciação mucinosa (seta tracejada). **1(l)** Presença de neoplasia intra-epitelial (NIP) com núcleos atípicos. **1(m)** Detalhe para a membrana basal com aspecto sinuoso (pontas de setas). **1(n)** Evidência do epitélio desenvolvido (seta).

**Figura 2.** Secções histológicas dos grupos experimentais de machos e fêmeas coradas por Reticulina de Gömöri. **2(a-d)** Controle machos. Lúmen (L). Detalhe para as fibras reticulares (seta), envolvendo o epitélio (Ep). Fibras colágenas (\*). Enfoque para as fibras colágenas no estroma subepitelial (seta tracejada). **2(e)** Lúmen(L). Aspecto irregular das fibras reticulares (seta larga). **2(f,g)** Fibras colágenas em regiões lesionadas (setas). Detalhe dessas fibras (seta branca). **2(h)** Presença de poucas fibras reticulares nas regiões com brotamento epitelial (setas). **2(i)** Alteração na quantidade de fibras reticulares (seta larga) e colágenas (seta). **2(j)** Evidência da redução na marcação das fibras reticulares em regiões de brotos epiteliais (seta tracejada).

**Figura 3.** Reação de Imunocitoquímica alfa-actina de músculo liso. Contra coloração: Hematoxilina de Harris. **3(a,b)** Lúmen (L). Marcação para alfa-actina no músculo liso que

envolve o epitélio (Ep) prostático ventral (setas e setas tracejadas). **3(c)** EE- machos. Pouca marcação de alfa-actina em regiões com brotamento epitelial (setas). **3(d)** Evidência de baixa imunorreatividade de alfa-actina nos brotos epiteliais (seta larga). **3(e)** Detalhe para a ausência de imunorreação de alfa-actina (setas largas) em locais com altos graus de brotamento epiteliais (\*). **3(f)** Aumento da imunorreatividade em regiões com lesões epiteliais (seta). **3(g)** Ausência da imunorreatividade (seta tracejada) em regiões com brotos epiteliais (\*). **3(h)** Enfoque para a alta imunorreação de alfa-actina em locais com alterações epiteliais (seta).

**Figura 4.** Reação de imunocitoquímica para AR contra corado com hematoxilina de Harris. **4(a)** Imunorreação do AR nas células epiteliais (setas) e estromais (ponta de seta). **4(b)** Baixa imunorreatividade de AR nas células epiteliais (ponta de seta). Marcação no compartimento estromal (setas tracejadas). **4(c,d)** Detalhe para o aumento da imunorreatividade de AR no epitélio da próstata ventral masculina (seta). Imunorreação do AR na próstata feminina (setas tracejadas). **4(e,f)** Evidência de alta imunorreatividade de AR nas células epiteliais da próstata ventral masculina (seta larga) e da próstata feminina (setas).

**Figura 5.** Secções histológicas submetidas a imunocitoquímica para ER $\alpha$ . Contra coloração: Hematoxilina de Harris. **5(a)** Marcação do ER $\alpha$  nas células estromais da próstata ventral (setas). **5(b,c)** Marcação do ER $\alpha$  no compartimento estromal (pontas de seta). **5(d,e):** EE - machos. **5(f):** EE - fêmeas. **5(g,h)** Detalhe para a marcação do ER $\alpha$  no citoplasma (seta). **5(i)** Aumento do ER $\alpha$  nas células estromais (seta larga). **5(j)** Evidência de marcação do ER $\alpha$  nas células epiteliais (seta tracejada).

Tabela 1. Biometria dos grupos experimentais de machos e fêmeas

	Grupo Experimental		
	Macho		
	C	EE	EE/T
<b>Biometria n=10</b>			
Peso Corpóreo (g)	62.50 ± 6.12	68.00 ± 5.65	63.75 ± 6.80
Peso da próstata ventral (g)	0.013 ± 0.007	0.012 ± 0.004	0.013 ± 0.005
Peso relativo da próstata ventral *	0.0025 ± 0.0006	0.0022 ± 0.0003	0.0025 ± 0.0008
Testículo (g)	0.90 ± 0.12	1.037 <sup>a</sup> ± 0.11	0.81 <sup>b</sup> ± 0.16
Adrenal (g)	0.033 <sup>a</sup> ± 0.008	0.047 <sup>b</sup> ± 0.005	0.040 ± 0.005
<b>Fêmea</b>			
	C	EE	EE/T
Peso Corpóreo (g)	58.4 <sup>a</sup> ± 4.98	50.66 <sup>b</sup> ± 3.08	59.60 <sup>a</sup> ± 2.20
Peso PJU (g)	0.065 ± 0.019	0.046 <sup>a</sup> ± 0.015	0.086 <sup>b</sup> ± 0.021
Peso relativo da PJU *	0.0011 ± 0.0003	0.0009 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0004
Ovário (g)	0.022 ± 0.011	0.023 ± 0.008	0.024 ± 0.005
Adrenal (g)	0.037 <sup>a</sup> ± 0.0036	0.033 <sup>a</sup> ± 0.007	0.05 <sup>b</sup> ± 0.008

\*O peso relativo da próstata e o peso relativo do PJU correspondem respectivamente a razão entre o peso da próstata e o peso corpóreo dos machos e a razão entre o peso da PJU e o peso corpóreo das fêmeas.

Valores expressos em média e desvio padrão

<sup>a,b,c</sup> Letras sobrescritas indicam as diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $P \leq 0,05$ ).

C, Controle; EE, tratados com etinilestradiol; EE/T, animais tratados com etinilestradiol e testosterona

Tabela 2. Descrição estatística da sorologia, morfometria, cariometria das células secretoras e estereologia e dos grupos experimentais de machos e fêmeas.

Parâmetros	Grupos Experimentais					
	Macho			Fêmea		
	C	EE	EE/T	C	EE	EE/T
<b>Sorologia n=10</b>						
Estradiol (pg/ml) *	16.73 <sup>a</sup> ± 1.33	34.35 <sup>b</sup> ± 13.53	20.86 <sup>a</sup> ± 1.82	23.02 <sup>a</sup> ± 5.58	38.24 <sup>b</sup> ± 9.71	29.66 <sup>a±</sup> 5.91
Testosterona (ng/ml) *	0.74 <sup>a</sup> ± 0.36	0.91 <sup>a</sup> ± 0.33	2.33 <sup>b</sup> ± 0.93	0.46 <sup>a</sup> ± 0.19	0.16 <sup>a</sup> ± 0.04	2.83 <sup>b</sup> ± 1.13
<b>Morfometria (µm) n=5</b>						
Altura Epitelial *	22.80 <sup>a</sup> ± 4.64	23.20 <sup>a</sup> ± 7.39	31.40 <sup>b</sup> ± 10.70	12.90 <sup>a</sup> ± 4.02	20.40 <sup>b</sup> ± 8.85	36.12 <sup>c</sup> ± 10.61
Espessura do SML *	15.13 <sup>a</sup> ± 4.35	17.01 <sup>b</sup> ± 6.42	19.01 <sup>c</sup> ± 7.15	7.05 <sup>a</sup> ± 2.85	16.40 <sup>b</sup> ± 5.22	23.40 <sup>c</sup> ± 7.31
<b>Cariometria das células secretoras n=5</b>						
Área nuclear (µm <sup>2</sup> )*	32.19 <sup>a</sup> ± 8.48	27.62 <sup>b</sup> ± 10.04	25.23 <sup>c</sup> ± 8.55	14.44 <sup>a</sup> ± 3.68	28.90 <sup>b</sup> ± 7.18	28.40 <sup>b</sup> ± 8.77
Perímetro nuclear (µm) *	25.97 <sup>a</sup> ± 5.71	24.70 <sup>a</sup> ± 6.54	23.64 <sup>b</sup> ± 5.50	15.12 <sup>a</sup> ± 2.07	23.44 <sup>b</sup> ± 3.71	24.54 <sup>c</sup> ± 5.50
<b>Estereologia (%) n=5; 130 campos/grupo</b>						
Epitélio *	38.35 ± 10.44	38.25 ± 13.31	39.31 ± 9.21	38.97 <sup>a</sup> ± 8.70	35.78 <sup>a</sup> ± 11.32	49.10 <sup>b</sup> ± 10.40
Lúmen *	42.93 <sup>a</sup> ± 14.91	26.70 <sup>b</sup> ± 15.04	21.31 <sup>b</sup> ± 14.30	16.28 <sup>a</sup> ± 8.33	26.36 <sup>b</sup> ± 12.04	21.56 <sup>a</sup> ± 11.90
Estroma muscular *	19.84 <sup>a</sup> ± 6.73	17.74 <sup>a</sup> ± 5.02	23.18 <sup>b</sup> ± 11.10	17.70 <sup>a</sup> ± 6.10	37.85 <sup>b</sup> ± 12.63	28.40 <sup>c</sup> ± 11.08
Estroma não-muscular *	19.30 ± 9.81	17.30 ± 11.17	17.84 ± 11.14	27.05 <sup>a</sup> ± 10.86	11.97 <sup>b</sup> ± 5.02	14.64 <sup>b</sup> ± 9.71

Valores expressos em média ± desvio padrão

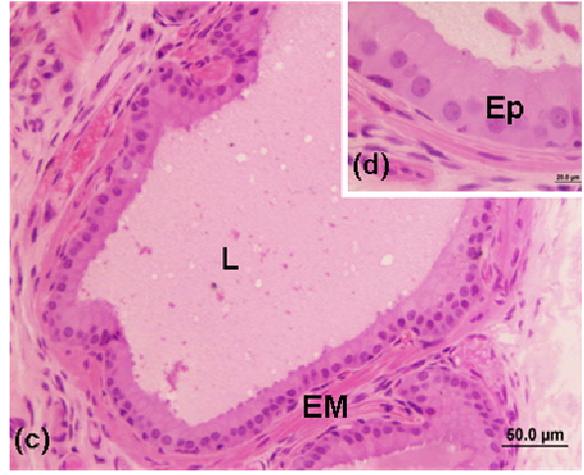
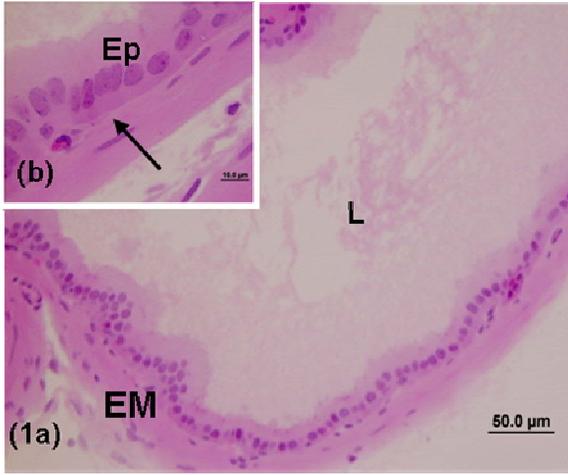
\*a,b,c Letras sobrescritas indicam as diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $P \leq 0,05$ ).

C, Controle; EE, tratados com etini lestradiol; EE/T, animais tratados com etinil estradiol e testosterona

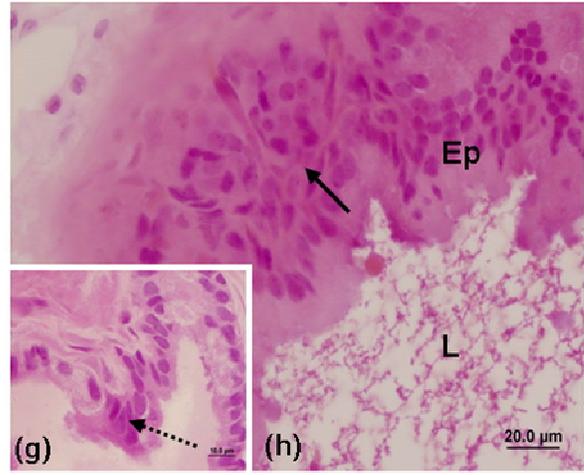
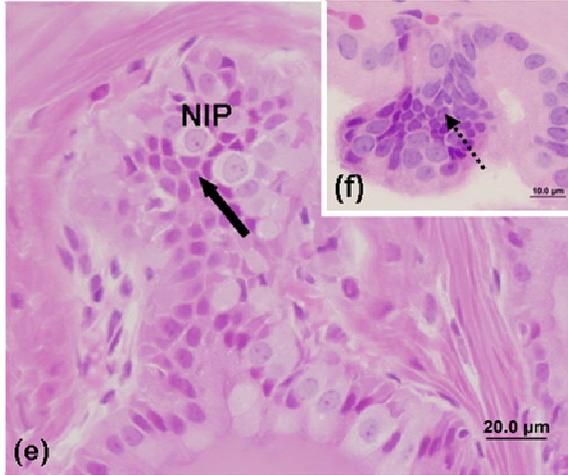
**Macho**

**Fêmea**

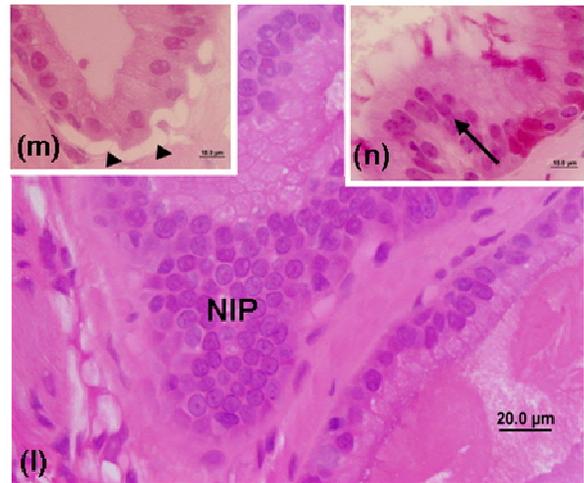
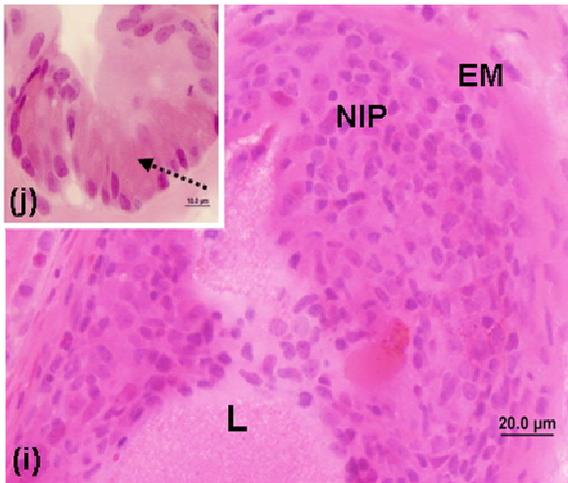
**Controle**

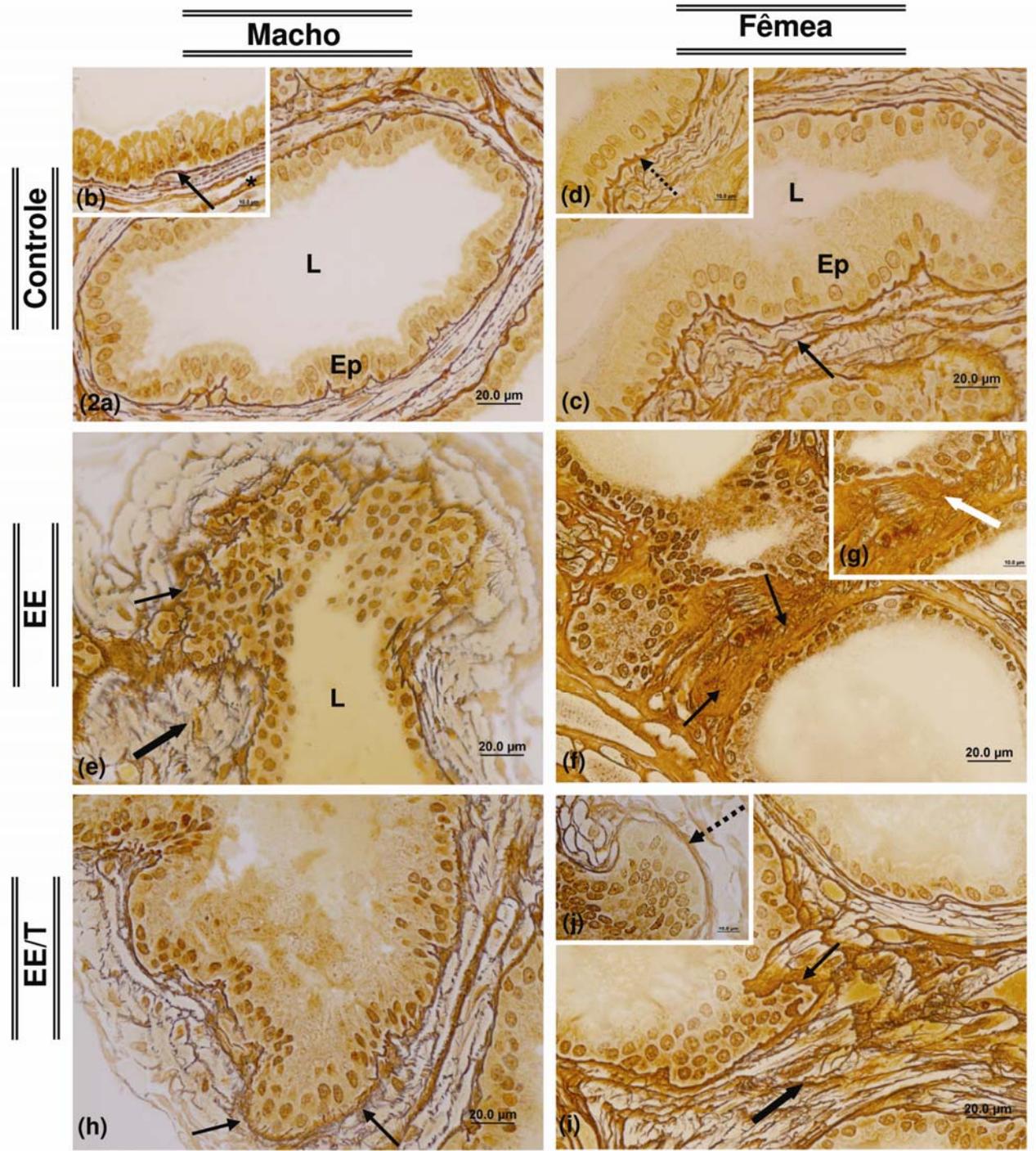


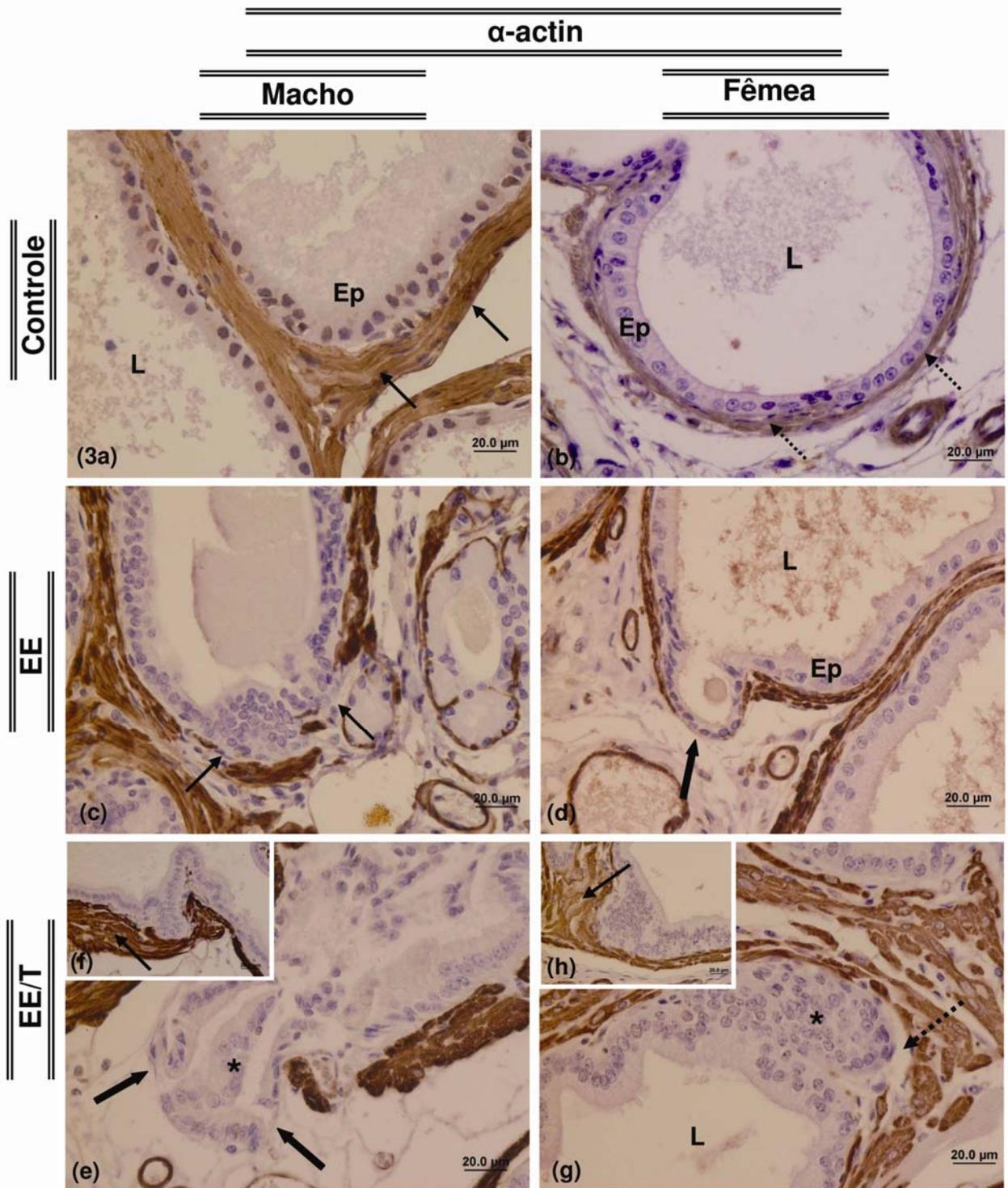
**EE**

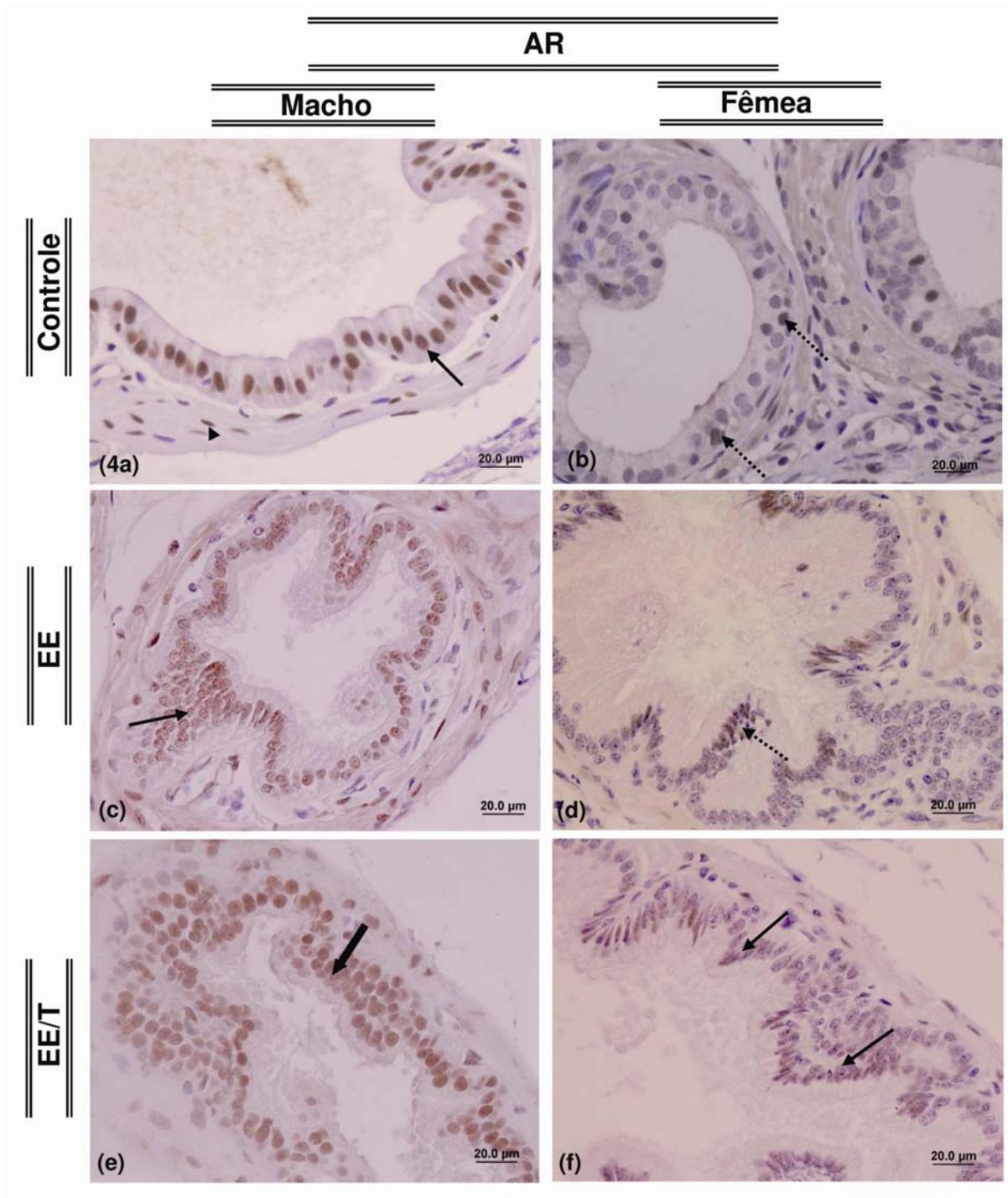


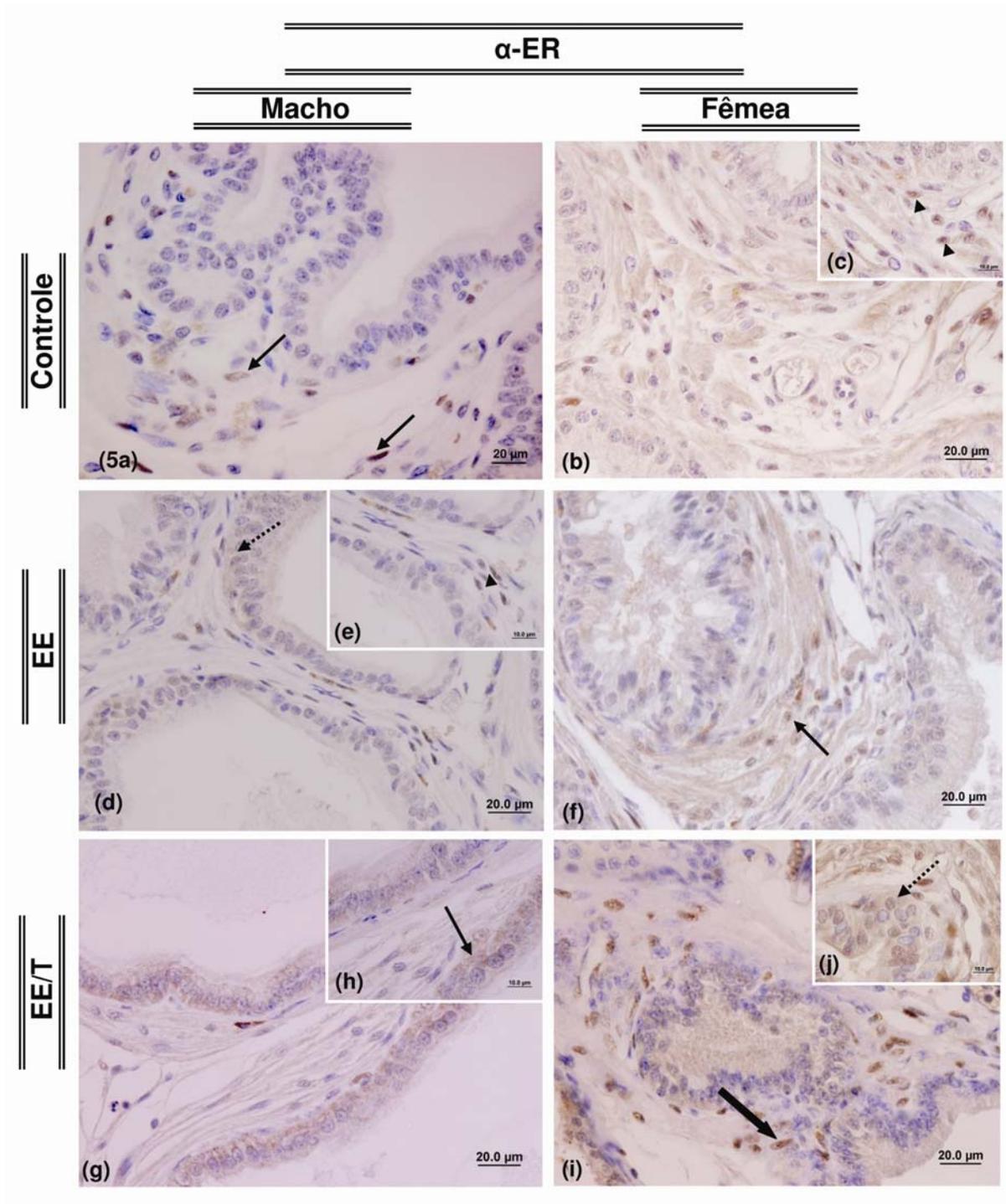
**EE/T**











## CONCLUSÕES GERAIS

---

A ação do *imprint* estrogênico revelou que o estrógeno altera morfofisiologicamente tanto a próstata ventral masculina quanto a próstata feminina na fase adulta, porém os dados revelaram que a próstata ventral masculina é a mais afetada. Assim, o estrógeno parece ser mais nocivo em causar alterações prostáticas permanentes durante o desenvolvimento dos machos. Além disso, relatou-se também que a ação combinada entre o estrógeno e a testosterona é mais acentuada em promover alterações em ambas as glândulas, pois apesar dos níveis de estradiol terem se normalizado com a ação da testosterona, a ação do *imprint* estrogênico foi permanente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Aumuller G and Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. *International Rev Citol*, 121:127-131.

Behmer AO, Tolosa EMC, Neto AGF. 1976. Manual de práticas para histologia normal e patológica. *EDART-EDUSP*, SP.329p.

Campos SGP, Zanetoni C, Góes R, Taboga SR. 2006. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec* 288A: 723-733.

Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. 2004. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biology International*, 28:335-344.

Donjacour AA, Cunha GR. 1993. Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology*, 131:2342-2350.

Feldman, B.J., Feldman, D., 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev.* 1, 34–45.

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.

Gross SA and Didio LJA. 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J. Submicroscop Cytol*, 19 (1): 77-84.

Gupta C. 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *P.S.E.B.M.*, 224:61-68.

Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat*, 155:81-93.

Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 2004. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*, 25: 330-337.

Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ, 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anatomy*, 3:357-370

Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. 1994. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Seminars in Cancer Biology*, 5:391-400.

Islam AHMM, Kato H, Hayama M, Kobayashi S, Ota H, Nishizawa O. 2001. Adenocarcinoma of female paraurethral duct showing neuroendocrine differentiation. *Urology*, 58(6):1058iv-vi.

Mahoney JJ. 1940. The embryology and postnatal development of the prostate gland in the female rat. *Anat Rec*, 375-395.

Mahoney JJ and Witschi E, 1947. Genetics on the female prostate in rats. *Genetics*, 32: 369-378.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253:165-174.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. 2005. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod*, 72(6):1344-1351.

Mello MLS, Vidal BC. 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher-Funcamp, Campinas, 71p.

Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. 2005. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl acad Sci USA*, 102(5):1484-1489.

Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. 2001. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*, 13:241-252.

Pu Y, Huang L, Prins GS. 2004. Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol*, 273:257-275.

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*, 3:3-18.

Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2007. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624.

Shapiro E, Huang H, McFadden DE, Masch RJ, NG E, Lepor H, Wu XR. 2004. The prostatic utricle is not a Müllerian duct remnant: immunohistochemical evidence for a distinct urogenital sinus origin. *J Urol*, 172:1753-1756.

Sharifi-Aghdas F, Ghaderian N. 2004. Female paraurethral cysts: experience of 25 cases. *BJU International*, 93:353-356.

Shehata R. 1974. Urethral glands in the wall of the female urethra of rats, mice and closely related rodents. *Acta Anat*, 90:381-387.

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.

Sloboda J, Zaviačič M, Jakubovský J, Hammar E, Johnsen J. 1998. Metastasizing adenocarcinoma of the female prostate (Skene's paraurethral glands). Histological and immunohistochemical prostate markers studies and first ultrastructural observation. *Pathol Res Pract*, 194:129-136.

Smith AF, Landon GV, Ghanadian R, Chisholm GD. 1978. The ultrastructure of the male and female prostate of *Pracomys (Mastomys) natalensis*. *Cell Tiss Res*, 190:539-552.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod*, 34:973-983.

Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL, Buchanan DL, Cooke PS, Preziosi D, Welshons WV, Haseman J, vom Saal FS. 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 $\alpha$ -ethinyl oestradiol. *Human Reproduction*, 16(5):988-996.

Thomson AA. 2001. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121:187-195.

Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, 129:1905-1912.

Timms BG, Mohs TJ, Didio JA. 1994. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol* 151:1427–1432.

Timms BG, Petersen SL, Vom Saal FS. 1999. Prostate gland growth during development is stimulated in both male and female rat fetuses by intrauterine proximity to female fetuses. *J Urology*, 161:1694-1701.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS*, 102(19):7014-7019.

Vilamaior PL, Taboga SR, Carvalho HF. 2006. Postnatal Growth of the Ventral Prostate in Wistar Rats: A Stereological and Morphometrical Study. *The Anatomical Record Part*, 288: 885-892

Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68:270-279.

Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, 12:131-155.

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

Zaviačič M, Jakubovská V, Belošovič J, Breza J. 2000a. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embriol (Berl)*, 201(1):51-61.

Zaviačič M, Zajíčková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviačič T, Holomán K, Breza J. 2000b. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *Journal of Histotechnology*, 23(1):61-69.





## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Experimental Pathology*.

Manuscript ID: IJEP-2010-02-1019

Title: Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with androgens cause morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils

Authors: Perez, Ana  
Biancardi, Manoel  
Góes, Rejane  
Santos, Fernanda  
Taboga, Sebastião

Date Submitted: 09-Feb-2010



Print



Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.  
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)