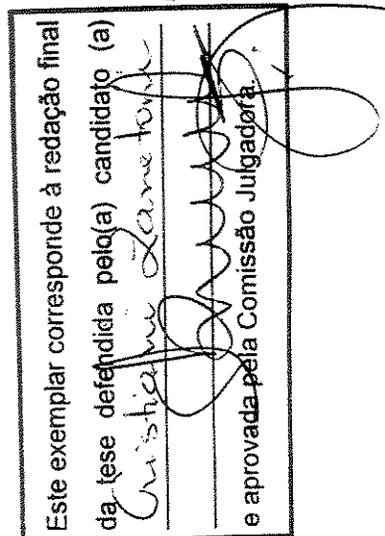




Cristiani Zanetoni

ALTERAÇÕES NA PRÓSTATA RELACIONADAS COM O ENVELHECIMENTO DO ESQUILO DA MONGÓLIA (*Meriones unguiculatus*): ASPECTOS ESTRUTURAIS, HISTOQUÍMICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS



Tese 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

UNIDADE B0
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Z16a
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49474
PROC 16.83710 a
C _____ D x
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00168406-B

BIB ID 242783

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

Z16a **Zanetoni, Cristiani**
Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*): aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais/Cristiani Zanetoni. – Campinas, SP:[s.n.], 2002

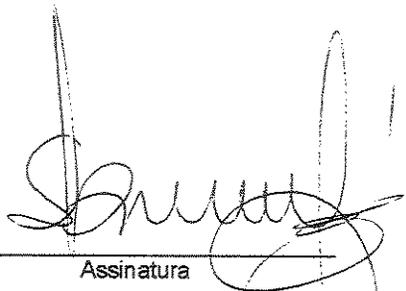
Orientador: Sebastião Roberto Taboga
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Esquilo da Mongólia. 2. Próstata. 3. Alterações morfológicas.
I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 25/01/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino



Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura

177.12260

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela orientação, estímulo e oportunidades, além de sua amizade.

Aos Profs. Drs. Hernandes Faustino Carvalho, Sérgio Luis Felisbino e Valéria H. C. Quitete pelas sugestões na análise prévia da tese.

Aos Docentes do Departamento de Biologia Celular pelos seus ensinamentos, que enriqueceram a minha formação profissional.

À secretária Lílíam Panagio (Departamento de Biologia Celular – UNICAMP) pelo apoio e atenção.

Aos técnicos de laboratório, Rosana Silistino de Souza (Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP) e Domingos Zancheta Netto (Laboratório de Histotecnologia da FAMERP/S.J.R.P.) pelo auxílio na execução dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo importante apoio financeiro.

Às amigas Silvana, Tatiana e Júnia por toda ajuda, durante a minha estadia em Campinas.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Wellerson, Renato, Ana Maria, Fernanda, Lara e Silvana, que estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma na elaboração deste trabalho.

Em especial, agradeço:

Aos meus pais, Sérgio e Dirce, aos meus irmãos, Alessandra e Sérgio Jr., por tanto amor e inestimável apoio em todos os momentos...

Ao meu marido, Denilso, por me fazer uma pessoa melhor e tornar os sonhos de amanhã uma promessa de todo o amor que continuaremos a encontrar um no outro...

A Deus pela vida.

*Aos meus pais, Sérgio e Dirce, aos meus irmãos, Alessandra e Sérgio Jr.
e ao meu querido marido, Denilso,
que muito amo e aos quais muito devo.*

Índice

I. Resumo.....	08
II. Abstract.....	11
III. Introdução.....	13
IV. Objetivo.....	20
V. Artigos.....	22
Artigo 1.....	24
Artigo 2.....	38
VI. Conclusões gerais.....	56
VII. Referências.....	58

I. Resumo

A próstata é uma volumosa glândula anexa do sistema reprodutor masculino de mamíferos. O produto da secreção prostática atinge a luz da uretra, auxiliando a movimentação dos espermatozoides. Esse órgão tem despertado grandes interesses nas áreas biológica e médica devido aos inúmeros problemas que podem ocorrer principalmente durante o processo de envelhecimento. Além disso, a glândula prostática é um excelente modelo para estudo das relações epitélio-estroma, pois a sua manutenção depende sobremaneira desta interação. O objetivo do presente estudo foi caracterizar histológica, histoquímica e ultra-estruturalmente os componentes epitelial e estromal da próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus* adulto e velho, na tentativa de estabelecer um novo modelo experimental diferente dos roedores classicamente utilizados. Este animal parece ser um bom modelo, pois sua próstata, diferentemente da dos outros roedores, apresenta-se anatomicamente mais compacta, assemelhando-se à próstata humana. Para o presente estudo foram utilizadas próstatas de gerbilos adultos (90 dias) e velhos (12 meses), que foram fixadas e incluídas para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Foram feitos testes histoquímicos para fibras colágenas (Tricrômico de Masson, Picrossírius Hematoxilina), fibras elásticas (Resorcina Fucsina de Weigert) e fibras reticulares (Reticulina de Gömöri), além das colorações usuais pela Hematoxilina-eosina e pelo Azul de Toluidina. Na microscopia eletrônica de transmissão foram feitos os procedimentos rotineiros para a caracterização ultra-estrutural de elementos do epitélio e do estroma prostático. Os resultados demonstraram que a próstata, no animal adulto, apresentou ácinos glandulares com epitélio prismático simples e ativos na produção de secreção. Entre as porções glandulares, foi encontrado estroma conjuntivo vascularizado, com fibras colagênicas e elásticas, além de abundantes células musculares lisas dispostas ao redor dos ácinos. A histoquímica também revelou a presença de relativa pobreza em fibras de colágeno entremeadas à musculatura lisa, estroma rico em fibras reticulares e poucas fibras do sistema elástico. Por outro lado, nos animais velhos, foi observada hiperplasia estromal, devido ao aumento na quantidade de células musculares lisas, além de frequentes alterações neoplásicas. A histoquímica deixou clara a ocorrência de aumento na quantidade dos elementos da matriz estromal, como o colágeno, as fibras reticulares e as fibras do sistema elástico. A caracterização deste sistema permitiu demonstrar que apresenta semelhanças com a próstata humana, fazendo deste modelo um instrumento que

se aproxima do humano e servirá para a averiguação de elementos importantes da biologia prostática.

II. Abstract

The prostate is a voluminous gland annexed to the male reproductive system of mammals. The product of the prostatic secretion reaches the urethra exit, helping the movement of the spermatozoa. This organ has developed a great interest in the medical and biological areas, because of the many problems that can occur, specially during the aging process. Besides this, the prostatic gland is an excellent model for the study of the epithelium-stroma relationship, since its maintenance depends greatly on this interaction. The objective of the present study is to characterize histologically, histochemically and ultrastructurally the epithelial and stromal compartments of the prostate of the adult and old gerbil *Meriones unguiculatus*, in an attempt to establish a new experimental model, different from the rodents classically adopted. This animal seems to be a good model because its prostate, differently from other rodents' ones, is anatomically more compact, similar to the human prostate. For the present work prostates of adult gerbils (90 days) and old gerbils (12 months) were used, which were fixed and embedded for light microscopy and transmission electron microscopy. Histochemical tests were carried out for collagen fibers (Masson's Trichrome, Picrosirius Hematoxylin), elastic fibers (Weigert's Resorcin Fuchsin) and reticular fibers (Gömöri's Reticulin), as well as the usual staining methods with Hematoxylin-eosin and Toluidine blue. At the transmission electron microscopy the routine procedures were followed for the ultrastructural characterization of epithelium and prostatic stroma elements. The results showed that the prostate, in adult animals, presents glandular acini with simple prismatic epithelium which are active in the production of secretion. Among the glandular portions, there is a connective stroma vascularized, with collagen and elastic fibers, together with abundant smooth muscle cells, which were found disposed around the acini. The histochemistry also revealed the presence of a relative poverty in collagen fibers interspersed with the smooth muscles, a stroma rich in reticular fibers and few fibers of the elastic system. On the other hand, in old animals, stromal hyperplasia was observed, because of the raise in the quantity of smooth muscle cells, as well as frequent neoplasm alterations. The histochemistry clearly showed the occurrence of a raise in the quantity of the stromal matrix elements, such as the collagen, the reticular fibers and the elastic system fibers. The characterization of this system allowed it to show its similarities to the human prostate, making out of this model an instrument that is close to the human and will serve to the investigation of important elements of the prostatic biology.

III. Introdução

Os gerbilos, também conhecidos como esquilos da Mongólia ou “clawed jirds”, são roedores murídeos da subfamília Gerbillinae provenientes das regiões áridas da China e da Mongólia (SCHWENTKER, 1963). Introduzidos nas Américas como nova proposta de animal experimental nos anos cinquenta por Victor Schwentker, os gerbilos, durante muito tempo, ficaram limitados ao Estados Unidos como animais de excelência para a pesquisa biomédica (ROBINSON, 1974). Nas últimas décadas, vêm sendo gradativamente introduzidos nos biotérios das universidades brasileiras e têm assumido importante papel nos experimentos biológicos e biomédicos juntamente com outras espécies clássicas como *Rattus rattus norvegicus* (rato), *Mus musculus* (camundongo) e *Calomys callosus* (hamster).

De anatomia similar às do rato e do camundongo, os gerbilos adultos de ambos os sexos variam entre 11,5 e 14,5 cm de comprimento corpóreo. Os machos pesam em torno de 100 gramas enquanto as fêmeas pesam cerca de 85 gramas (KRAMER, 1964).

A grande vantagem destes animais, para estudos experimentais, reside no fato deles serem consideravelmente menores que os ratos, mas especialmente maiores que os camundongos e hamsters (WILLIAMS, 1974). Estes animais têm sido amplamente utilizados para estudos de natureza didático-científica principalmente pelo fato de terem comportamento extremamente dócil em cativeiro. Outra característica importante a ser considerada é que apresentam comportamento de micção infrequente e, por serem de origem desértica, consomem pouca quantidade de líquido, o que agiliza muito a limpeza das gaiolas no processo de manutenção desses animais em cativeiro, promovendo grande asseio nas salas de manutenção dos animais nos biotérios.

Na pesquisa científica, cada vez é maior a utilização dos gerbilos na experimentação biomédica, principalmente nas áreas da imunologia (NAWA *et al.*, 1994; JEFFERS, *et al.*, 1984), fisiologia (MÜLLER, *et al.*, 1979; NOLAN, *et al.*, 1990) e crescentemente na área de morfologia (AOKI KOMORI *et al.*, 1994; REDECKER, 1987 e 1991; ISHIKAWA *et al.*, 1977 e JONES *et al.*, 1977).

Da morfologia do aparelho reprodutor, com ênfase no complexo glandular que envolve a próstata e vesículas seminais, poucos dados têm aparecido na literatura. Estudos de GROSS e DIDIO (1987) enfocam a morfologia e a ultra-estrutura de uma espécie muito próxima – *Praomys natalensis*. Estes autores referem-se principalmente ao compartimento epitelial da glândula prostática. Outra espécie selecionada para estudos morfológicos do trato reprodutor,

que filogeneticamente também se aproxima da espécie *Meriones unguiculatus*, é a espécie *Acomys*, investigada no trabalho de PEITZ e colaboradores (1979).

No aparelho reprodutor masculino de *Meriones unguiculatus*, pode ser destacado, anatomicamente, um par de testículos, dos quais partem redes testiculares que prendem-se, cada uma, a um epidídimo amplamente convoluto. Estas estruturas estão envoltas por uma cápsula conjuntiva bastante resistente. Entretanto, estes dados anatômicos são bastante rudimentares e estão descritos em um manual para-didático de autoria de Wesley M. Williams (WILLIAMS, 1974).

A glândula prostática está constituída de dois lobos amarelados, imediatamente ventrais à bexiga urinária, exatamente no ponto em que a uretra recebe dois ductos espermáticos. Estes lobos estão ligados na junção da bexiga com as vesículas seminais (WILLIAMS, 1974).

A próstata do gerbilo desperta interesse biológico e biomédico pela sua morfologia bastante semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e fusão dos seus lobos.

Este tipo de conformação anatômica não está presente no rato e no camundongo, onde os lobos são bem distintos (PRICE, 1963).

Considerações sobre a próstata

Todos os mamíferos machos adultos possuem pelo menos um par de glândulas acessórias ao seu trato reprodutor. Estas glândulas são nomeadas de acordo com a sua estrutura, posicionamento anatômico e função (PRICE, 1963).

Dentre tais glândulas, as de maior importância morfo-funcional para estudos comparados são a próstata e a vesícula seminal. Os estudos entre os grupos como o dos roedores, felinos, equinos e primatas foram iniciados nas décadas de 50-60, na tentativa de se estabelecer comparações e correlações entre animais de laboratório e o homem. Neste sentido, ressalta-se o trabalho de PRICE (1963), onde é apresentada uma revisão minuciosa sobre a estrutura anatômica da próstata desde os monotremos até o homem, sendo estabelecidas homologias e analogias entre os componentes glandulares dos diversos grupos.

Outro trabalho comparado que visa estabelecer homologias entre animais de laboratório e o homem é o de KARR e colaboradores (1995). Os autores procuram estabelecer comparações entre dados de composição bioquímica dos antígenos prostáticos específicos (PSA) de diversas espécies de roedores, primatas e outros mamíferos de interesse veterinário como porco e touro. Os autores concluíram serem os roedores bons modelos para comparações experimentais e extrapolação de dados para a espécie humana.

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta, com a atividade secretora principalmente ligada à sua porção alveolar. Entretanto, os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (REESE *et al.*, 1986). Entremendo as porções glandulares existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com esparsas fibras conjuntivas (CARVALHO *et al.*, 1996) e células musculares lisas que têm papel contrátil durante a ejaculação (ROSS *et al.*, 1993). Neste tecido estromal, também estão presentes nervos e terminações nervosas. Envolvendo este órgão há uma fina cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas ao órgão nos diversos mamíferos já estudados.

Os componentes glandulares de natureza epitelial e os não glandulares de natureza estromal assumem características comuns nos diferentes animais independentemente do aspecto macroscópico da glândula. Daí a grande correlação na homologia morfo-funcional (PRICE, 1963 e KARR *et al.*, 1995).

Segundo PRICE (1963), a próstata do rato é composta por um par de lobos ventrais posicionados no istmo da bexiga e um grupo de ácinos dorsolaterais e seus ductos. No rato, as glândulas coaguladoras ou próstata anterior e vesículas seminais circundam dorsolateralmente a uretra na base da bexiga, formando um anexo anatômico separado.

Em termos de homologia com as porções da próstata humana, nota-se que a próstata anterior do rato corresponde ao lobo mediano da próstata humana e a próstata dorsal do rato à porção dorsal ou lobo posterior da próstata humana. As vesículas seminais são equivalentes, estrutural e funcionalmente, em ambas as espécies (SLAYTER *et al.*, 1994).

Partindo destas homologias morfo-funcionais pode-se, então, buscar situações experimentais, onde a análise das respostas do epitélio ou até mesmo dos componentes do estroma são avaliadas. Assim, existe na literatura trabalhos relacionados à ação de agentes químicos (carcinógenos), na próstata, como os trabalhos de POLLARD e LUCKERT (1987) e ação de agentes endógenos (hormonais) como nos trabalhos desenvolvidos por CARVALHO

e colaboradores (1996, 1997). Desta forma, extrapolam-se os resultados para a espécie humana.

É sabido que, durante a senescência do indivíduo, muitas alterações histológicas ocorrem na próstata, em resposta às descompensações hormonais comuns ao envelhecimento (ROSAI, 1996).

No homem, as principais alterações estão relacionadas com patologias severas que levam à retenção urinária, as conhecidas hiperplasias benignas (DROLLER, 1997). Além disto, podem desenvolver, na próstata do idoso, lesões malignas como adenocarcinomas, para as quais parece existir uma pré-disposição genética para o estabelecimento destas lesões (HAYWARD *et al.*, 1997).

HORSFALL e colaboradores (1994) fizeram um estudo das principais alterações nos componentes fibrosos do estroma prostático em cobaio, detectando um aumento da atividade sintética das fibras musculares lisas do estroma, que caracterizava as modificações fenotípicas nestas células. Entretanto, muitas questões estão por serem desvendadas, pois em cobaio, uma heterogeneidade histológica no estroma e no epitélio foi descrita. Assim, parece interessante a tentativa de se estabelecer novos modelos para o estudo dos efeitos do envelhecimento sobre a próstata.

Interações estroma-epitélio na próstata

Durante o desenvolvimento da próstata, os complexos processos morfogenéticos parecem exigir uma mediação ativa das células estromais, enquanto a manutenção da diferenciação do tecido epitelial adulto parece ser regulada, em grande parte, pela matriz extracelular (CUNHA *et al.*, 1985).

NEMETH e LEE (1996) e SUGIMURA e colaboradores (1986) sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais.

Os eventos morfogenéticos em órgãos reprodutores adultos, onde os elementos parenquimais e estromais podem ser experimentalmente eliminados e posteriormente regenerados a partir de precursores rudimentares, são muito semelhantes aos primeiros eventos do desenvolvimento que ocorrem no período perinatal (CUNHA *et al.*, 1985). As

interações a curtas distâncias (parácrinas) entre epitélio e estroma, mais especificamente entre o epitélio e a musculatura lisa ao seu redor, são de importância fundamental durante a morfogênese no embrião e estão claramente envolvidas na homeostase do órgão adulto (CUNHA *et al.*, 1985; HAYWARD *et al.*, 1997). Durante os processos de carcinogênese da próstata, estas interações seriam perturbadas, causando prejuízos para o epitélio e a musculatura lisa e resultando em progressão para um estado anaplásico (HAYWARD *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos recentes, como os apresentados nos parágrafos seguintes, têm mostrado as alterações do estroma em diferentes condições, como privação de andrógenos e em processos tumorais.

CARVALHO e LINE (1996) demonstraram, em ratos, que dentre as modificações ocorridas na próstata após a castração, pode-se observar um acúmulo de membrana basal, altamente pregueada abaixo do epitélio glandular regredido. Nestas condições, a membrana basal, embora modificada estruturalmente, ainda apresentava heparan sulfato, colágeno do tipo IV e laminina associados.

O sistema elástico do estroma prostático também apresenta-se modificado sob privação de andrógenos. Após a castração, observa-se um aumento relativo do número e da espessura das fibras do sistema elástico, sugerindo que estas modificações estejam relacionadas com a contração do tecido e a manutenção da estrutura de outros componentes da matriz extracelular durante o processo de involução (CARVALHO *et al.*, 1997b).

Outro componente identificado no estroma da próstata ventral de ratos e próstata humana é o colágeno do tipo VI, que distribui-se igualmente pelo estroma, mas está associado principalmente à lâmina basal, às fibrilas colágenas e ao redor das células estromais. As microfibrilas de colágeno do tipo VI formam, juntamente com as microfibrilas do sistema elástico, uma malha ampla e flexível. Admite-se que as microfibrilas tenham um papel estrutural que garante a integridade do tecido sob deformação, pela contração das células musculares lisas, durante o funcionamento normal do órgão, e ainda que influenciem o comportamento celular das células estromais (CARVALHO *et al.*, 1997a).

Tendo-se em vista o crescente reconhecimento da importância das relações entre epitélio e estroma, torna-se necessário o conhecimento, cada vez maior, dos componentes celulares e macromoleculares do epitélio e do estroma prostático, numa tentativa de entender

as inter-relações e possíveis interações entre estes dois compartimentos na próstata e como estes compartimentos se comportam durante o climatério.

IV. Objetivo

O presente estudo tem por objetivo caracterizar histológica, histoquímica e ultra-estruturalmente a próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus* (Muridae, Gerbillinae) com ênfase aos compartimentos epitelial e estromal, nos animais adultos e velhos, tentando estabelecer um novo modelo experimental para os estudos da biologia prostática.

V. Artigos

Artigo 1: HISTOLOGIA, HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA DA PRÓSTATA DO ESQUILO DA MONGÓLIA, *Meriones unguiculatus*.

Será feita a versão para a língua inglesa e submetido para a revista The Prostate.

Artigo 2: ALTERAÇÕES ESPONTÂNEAS NA PRÓSTATA DO GERILO VELHO (*Meriones unguiculatus*): HISTOLOGIA, HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA.

Será feita a versão para a língua inglesa e submetido para a revista Histology and Histopathology.

HISTOLOGIA, HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA DA PRÓSTATA DO ESQUILO DA MONGÓLIA, *Meriones unguiculatus*

Cristiani Zanetoni ¹ e Sebastião Roberto Taboga ²

¹ Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP, CP6109 – 13084-971 – Campinas, SP, Brasil

² Departamento de Biologia – IBILCE /UNESP, 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brasil

Título resumido: Morfologia da Próstata do Gerbilo

Palavras chave: gerbilo; próstata; histoquímica; ultra-estrutura; morfologia.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo no. 99/04496-1).

Endereço para correspondência:

Dept. de Biologia

Rua Cristovão Colombo, 2265

Jardim Nazareth – São José do Rio Preto, SP, Brasil

CEP: 15054-000

Resumo

A próstata é uma glândula anexa do sistema reprodutor masculino que tem despertado grandes interesses nas áreas biológica e médica, devido aos problemas que podem ocorrer principalmente durante o processo de envelhecimento. O presente estudo caracterizou histológica, histoquímica e ultra-estruturalmente os componentes epitelial e estromal da próstata do gerbilo adulto *Meriones unguiculatus*, na tentativa de estabelecer um novo modelo experimental, diferente dos roedores classicamente utilizados. Para o presente trabalho foram utilizadas próstatas de gerbilos adultos (90 dias), fixadas e incluídas para microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os resultados demonstraram que a próstata apresentou ácinos glandulares com epitélio prismático simples e ativos na produção de secreção. Entre as porções glandulares, foi encontrado estroma conjuntivo vascularizado, com fibras colagênicas e elásticas, além de abundantes células musculares lisas dispostas ao redor dos ácinos. A análise ultra-estrutural mostrou que o epitélio prostático apresentou heterogeneidade entre os seus tipos celulares. Além disso, foi observado a disposição entremeada das células musculares lisas às camadas de fibrilas de colágeno. O presente trabalho relata dados histológicos, histoquímicos e ultra-estruturais da próstata do gerbilo adulto, propondo a introdução de um novo modelo experimental para o estudo e entendimento da biologia prostática. Este roedor parece ser um bom modelo de pesquisa, uma vez que sua próstata apresentou semelhanças com a próstata humana, além de serem animais de fácil manutenção em cativeiro.

Introdução

Os gerbilos ou esquilos da Mongólia são roedores murídeos, pertencentes à subfamília Gerbillinae e provenientes das regiões da China e da Mongólia (SCHWENTKER, 1963).

A glândula prostática desses animais é constituída de dois lobos amarelados, imediatamente ventrais à bexiga urinária, exatamente no ponto em que a uretra recebe dois ductos espermáticos. Esses lobos estão relacionados, na junção da bexiga, com as vesículas seminais (WILLIAMS, 1974).

A próstata é alvo do desenvolvimento de sérias lesões no homem, tanto na fase adulta quanto na sua senescência, por isso estudos nesse órgão têm despertado especial interesse para as ciências biológica e médica. Contudo, pesquisas com material humano esbarram em limitações éticas, justificando a importância de se estabelecer novos modelos experimentais, para assim facilitar sobremaneira a interpretação e possibilitar a extrapolação dos resultados à espécie humana.

O gerbilo parece ser um bom modelo de estudo, pois sua próstata apresenta-se anatomicamente bastante semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e fusão de seus lobos. Por outro lado, esse tipo de conformação anatômica não está presente no rato e no camundongo, nos quais os lobos são bem distintos (PRICE, 1963). Outra vantagem de se estudar esses animais reside no fato de serem consideravelmente menores que os ratos, mas maiores que os camundongos e hamsters (WILLIAMS, 1974). Além disso, são animais com comportamento extremamente dócil em cativeiro e também com comportamento de micção infrequente, o que agiliza muito a limpeza das gaiolas no processo de manutenção desses roedores nos biotérios.

O presente estudo caracterizou histológica, histoquímica e ultra-estruturalmente a próstata do gerbilo adulto, propondo a introdução de um novo modelo experimental para os estudos da biologia prostática.

Material e Métodos

Animais

Para a realização das análises, foram utilizados 15 gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos com 90 dias, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu (SP).

Microscopia de luz

As próstatas removidas foram fixadas por imersão em Karnovsky modificado (solução de paraformaldeído a 2% e de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sørensen pH 7,2 - 0,1M) (GLAUERT, 1975), lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em óleo de cedro, incluídas em Paraplast e seccionadas a 5 µm em micrótomo rotativo manual.

Parte do material fixado em Karnovsky modificado (GLAUERT, 1975), foi incluído em historresina Leica-historesin embedding kit e seccionado a 2µm em micrótomo rotativo manual. Esse material processado para historresina foi corado pela Hematoxilina-eosina. Além desta coloração, os cortes histológicos foram corados pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH4,0 (MELLO e VIDAL, 1980).

Os cortes histológicos de próstatas obtidos a partir de inclusão em Paraplast foram corados, segundo BEHMER e colaboradores (1976), pelo Tricrômico de Masson e pela Reticulina de Gömöri. Outras colorações feitas foram pelo método do Picrossírius Hematoxilina (JUNQUEIRA *et al.*, 1979) e pela Resorcina Fucsina de Weigert, com oxidação prévia pelo ácido peracético (GOLDFISCHER *et al.*, 1983).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de próstata foram fixados com glutaraldeído 3% em tampão Millonig pH 7,3 acrescido de ácido tânico a 0,25%, durante 15 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão Millonig pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavados

brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976).

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 50-70 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático, com navalha de diamante. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2%, por 2 minutos (VENABLE e COGGESHALL, 1965, modificado). As telas foram observadas em microscópio eletrônico Zeiss – EM 910.

Resultados

Análise estrutural e histoquímica

A glândula prostática apresentou ácinos com epitélio prismático simples (Figuras 1-5) e ativos na produção de secreção, tendo sido observada claramente a área desenvolvida do complexo de Golgi (Figuras 3 e 5). As células epiteliais da glândula manifestaram acentuada basofilia citoplasmática e a área do Golgi comportou-se de maneira cromófoba (Figura 5). Extrusões dos grânulos de secreção estavam presentes no ápice das células do epitélio glandular, caracterizando a secreção do tipo apócrina (Figuras 3 e 4).

Entre as porções glandulares, foi encontrado estroma conjuntivo vascularizado e com muitas células musculares lisas dispostas ao redor dos ácinos (Figuras 3, 4, 6 e 7).

Entremeando essa musculatura, foi observado relativa pobreza em fibras de colágeno, que se encontraram em maior concentração na base do epitélio prostático (Figuras 6 e 7).

As fibras reticulares estavam ricamente presentes no estroma, principalmente na base do epitélio, junto da membrana basal (Figura 8). Por outro lado, foi encontrado poucas fibras do sistema elástico entremeando as células musculares lisas (Figura 9).

Análise ultra-estrutural

A ultra-estrutura mostrou que o epitélio prostático do animal adulto apresentou heterogeneidade entre os tipos celulares epiteliais (Figuras 10 e 11). Foi observado dois tipos de células secretoras, uma pouco elétron-densa e outra mais elétron-densa (Figura 11), ambas com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. No entanto, a célula escura manifestou maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de vesículas. Foi encontrado também um tipo de célula não secretora, raramente observada, que localizava-se na porção basal do epitélio, a célula basal. Além disso, muitas fibrilas de colágeno foram observadas em contato com a delgada lâmina basal (Figuras 10 e 11).

Na figura 12, observa-se a disposição entremeada das células musculares lisas às camadas de fibrilas de colágeno.

A figura 13 mostra, entre as células musculares lisas, fibras do sistema elástico associadas às fibrilas de colágeno. Em outro detalhe do compartimento estromal da próstata, foi possível observar claramente a presença de típicas fibras elásticas, em meio às fibrilas de colágeno (Figura 14).

Discussão

Este estudo demonstrou que a próstata do gerbilo adulto apresentou ácinos com um epitélio prismático simples, no qual foi observado ultra-estruturalmente dois tipos de células secretoras, um tipo de célula clara e outra escura, ambas com organelas de síntese como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos. Na célula escura, foi encontrado maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de vesículas. As células basais, também observadas neste trabalho, foram descritas por ZAVIACIC (1999) como células tronco que mantêm a população celular do epitélio prostático. Em relação à heterogeneidade das células epiteliais, os resultados deste trabalho podem ser comparados aos descritos para o epitélio da próstata humana, pois células secretoras e que se comportam diferentemente à microscopia eletrônica também foram observadas por ZAVIACIC (1999). Entre as porções glandulares foi encontrado estroma conjuntivo vascularizado e com abundante musculatura lisa disposta ao redor dos ácinos glandulares. Relativa pobreza em

fibras de colágeno e fibras do sistema elástico foi observada entremeando à musculatura lisa, embora as fibras de colágeno tenham sido encontradas em maior concentração na base do epitélio prostático. Já as fibras reticulares estavam ricamente presentes no estroma e na base do epitélio da glândula.

Esses dados, quando comparados com os de outros roedores de laboratório, mostram que a disposição das células musculares lisas ao redor dos ácinos, na próstata do gerbilo, acaba por restringir e confirmar os elementos da matriz extracelular em uma área restrita do estroma. Dados obtidos por CARVALHO e colaboradores (1996 e 1997) mostraram que, em rato, o estroma apresenta fibras finas e pouco agregadas, além das células musculares lisas serem esparsas.

Segundo PEITZ e colaboradores (1979), o camundongo da espécie *Acomys cahirinus*, assim como os ratos, apresenta, no epitélio da próstata ventral, células colunares altas com núcleo basal e forte basofilia citoplasmática mais próxima ao núcleo do que na região apical da célula. Por outro lado, as células epiteliais da próstata do gerbilo, quando coradas também pela Hematoxilina-eosina, manifestaram acidofilia citoplasmática e foi observado claramente a área desenvolvida do complexo de Golgi, uma vez que esta região mostrou-se desprovida de coloração.

No gerbilo pertencente à espécie *Praomys natalensis*, a cápsula que circunda os ácinos prostáticos é composta de células musculares lisas e fibroblastos, os quais se arranjam em camadas (GROSS e DIDIO, 1987). O termo cápsula empregado por estes autores refere-se ao estroma prostático, tecido muscular e conjuntivo, encontrado entre os ácinos da próstata dos ratos, dos camundongos, da espécie humana e do gerbilo *Meriones unguiculatus* mostrado nos resultados deste estudo. Entretanto, este trabalho, adotou a terminologia “cápsula” para o tecido fibroelástico envolvente da glândula prostática. Em *Meriones unguiculatus*, as células musculares lisas circundam os ácinos à semelhança do descrito para *Praomys natalensis*.

Na próstata do gerbilo, o epitélio glandular prismático simples e a heterogeneidade das células desse epitélio, vista à microscopia eletrônica, são características semelhantes à próstata humana. Além disso, são animais que apresentam anatomicamente seus lobos prostáticos fusionados, também à semelhança da glândula prostática humana; são roedores com tamanho menor que o dos ratos, mas maior do que o dos camundongos e hamsters; além de serem animais de fácil manutenção em cativeiro. Assim sendo, a caracterização

histológica, histoquímica e ultra-estrutural da próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus* sugere a introdução deste novo modelo experimental para o estudo de elementos importantes da biologia prostática.

Referências

- BEHMER, O.A; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. 1976. *Manual de práticas para histologia normal e patológica*. EDART-EDUSP, SP.329p.
- CARVALHO, H.F. & LINE, S.R.P. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, 20: 809-819.
- CARVALHO, H.F.; TABOGA, S, R. & VILAMAIOR, P.S.L. (1997a). Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue Cell*, 29: 163-170.
- CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L. & TABOGA, S, R. (1997b) Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*, 32: 27-34.
- 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.
- GLAUERT, A. M. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical methods in electron microscopy*. In: A. M. Glauert ed. N. Holland Publishing Company, NY, v.3., p. 1-207.
- GOLDFICHER, S.; COLTOFF-SCHILLER, B.; SCHWARTZ E. & BLUMENFELD, O.O. 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J. Histochem. Cytochem.*, 31: 382-390
- GROSS, S.A. & DIDIO, L.J.A. 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol.*, 19 (1): 77-84.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G. & BRENTANI, R. 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.*, 11: 447-455.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher-Funcamp, Campinas, 71p.

- PEITZ, B.; FOREMAN, D. & SCHIMITT, M. 1979 The reproductive tract of the male spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and coagulation studies with other species. *J. Reprod. Fert.*, 57: 183-188.
- PRICE, D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat. Can. Inst. Monogr.*, 12: 1-27.
- SCHWENTKER, V. 1963. The Gerbil. A new laboratory animal. *Veterinarian*, 6 (4): 5-9
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-408.
- WATSON, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 475-478.
- WILLIAMS, W.M. 1974. *The Anatomy of the Mongolian Gerbil*. Tumblebrook Fram, Inc., USA. 107p.
- ZAVIACIC, M. 1999. *The human female prostate*. Slovack Academic Press, Bratislava, 171p.

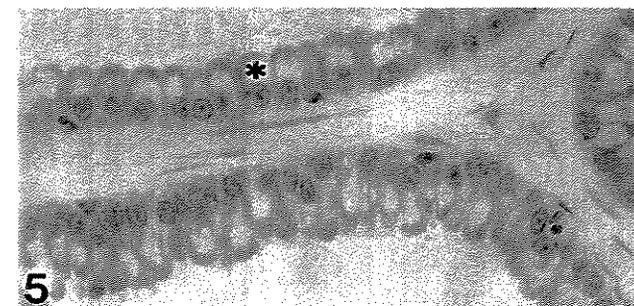
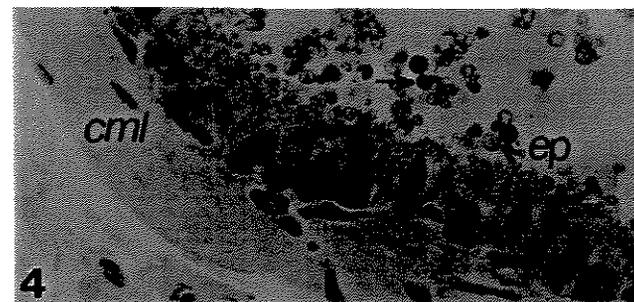
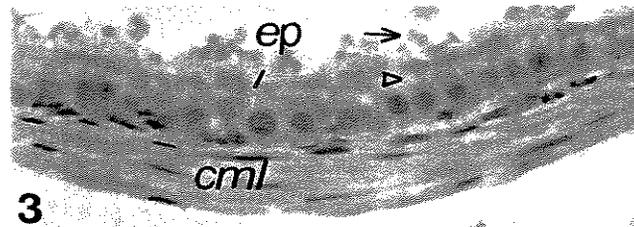
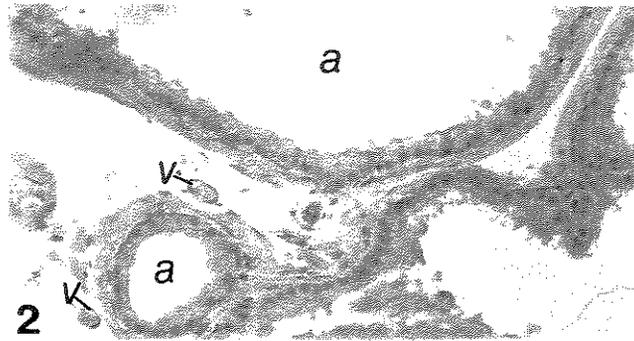
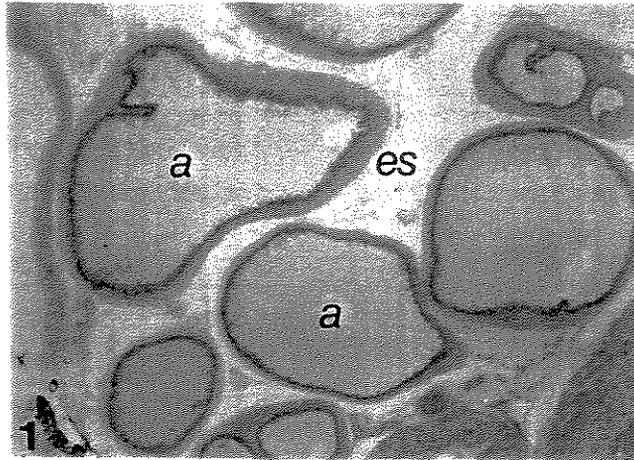
Legendas das Figuras

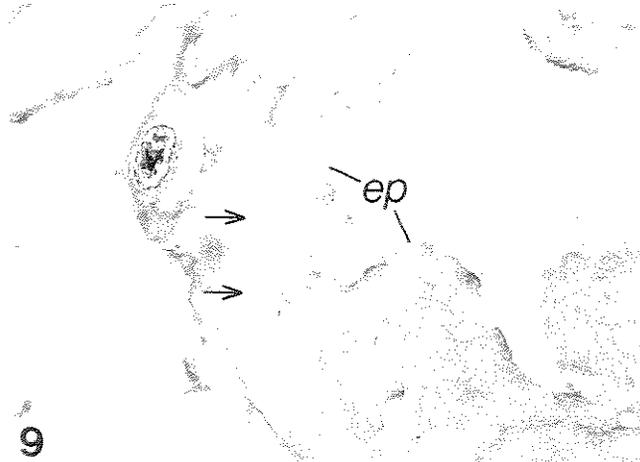
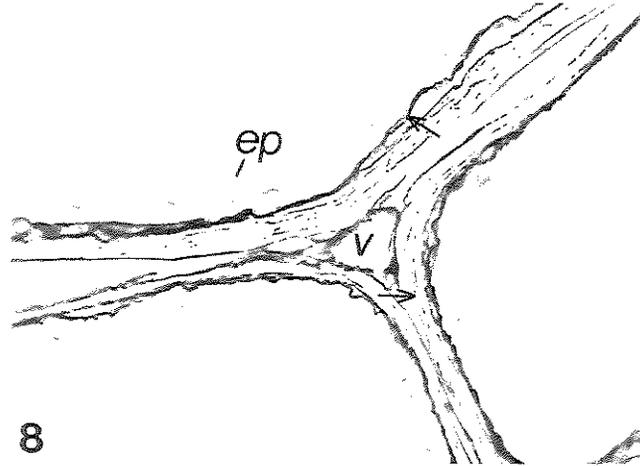
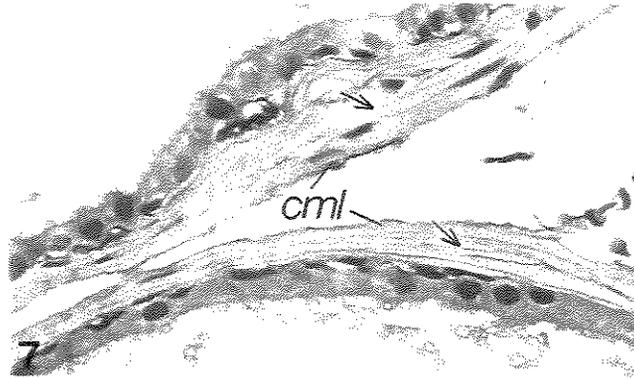
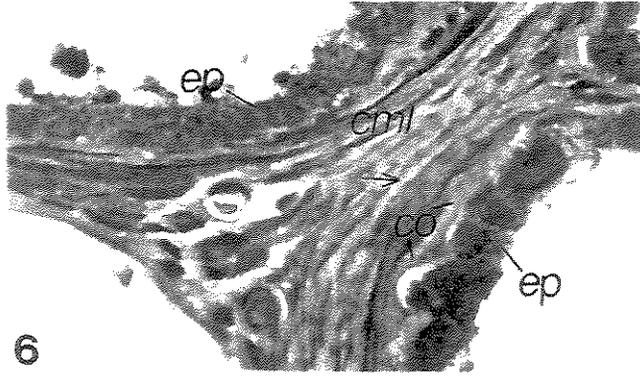
Figuras 1-5. Cortes histológicos de próstatas processados para historresina, corados pela Hematoxilina-eosina (Figuras 1-4) e pelo Azul de Toluidina (Figura 5). **Figura 1.** Visão geral da próstata, mostrando os ácinos glandulares (a) circundados pelo estroma prostático (es). Aumento: 75x. **Figura 2.** Ocorrência de vasos sanguíneos (v), no estroma da glândula. Ácinos glandulares (a). Aumento: 234x. **Figuras 3 e 4.** Ácino glandular com epitélio prismático simples (ep), altamente secretório, com a área do Golgi desenvolvida (cabeça de seta). Observar a superfície das células epiteliais com a extrusão dos grânulos de secreção acumulada no ápice celular (seta), indicativo de secreção apócrina. Presença de abundantes células musculares lisas ao redor dos ácinos (cml). Figura 3, aumento: 600x. Figura 4, aumento: 750x. **Figura 5.** No epitélio glandular, as células apresentam basofilia citoplasmática acentuada e a área do Golgi é cromófoba (*). Aumento: 600x.

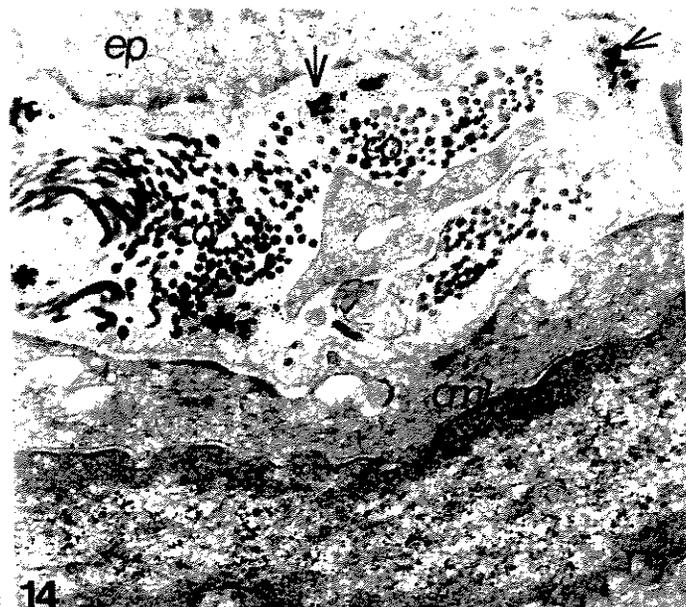
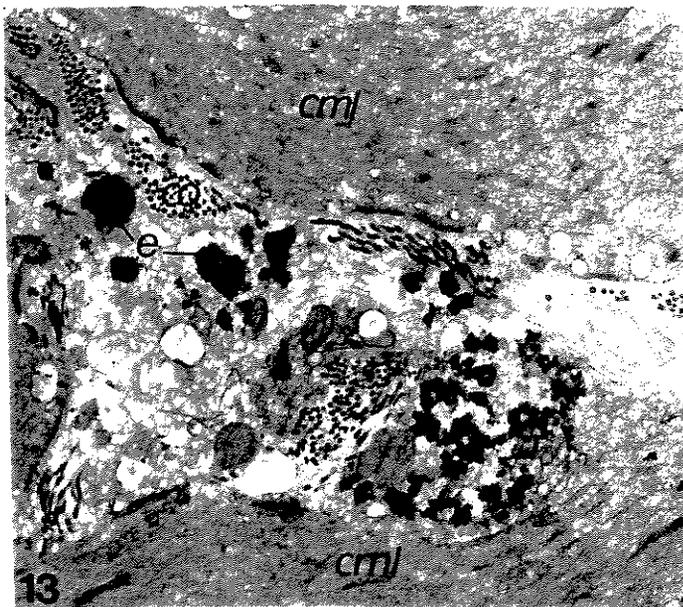
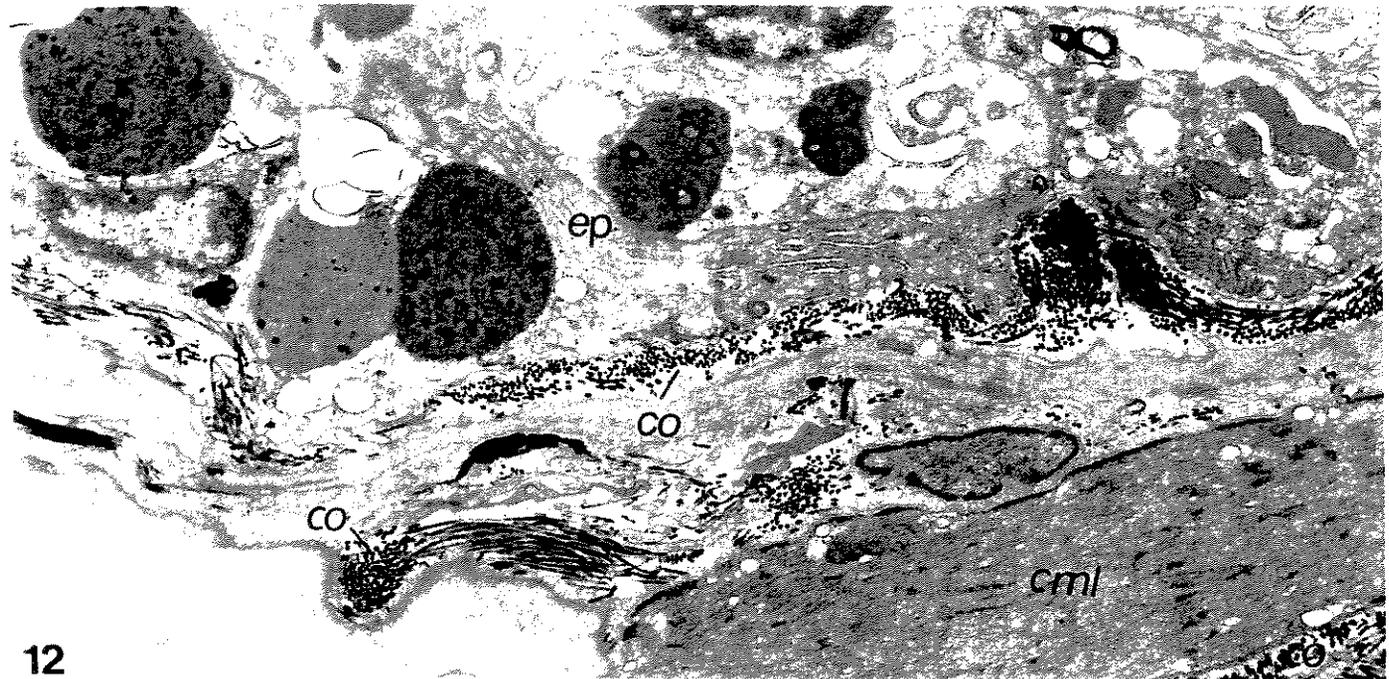
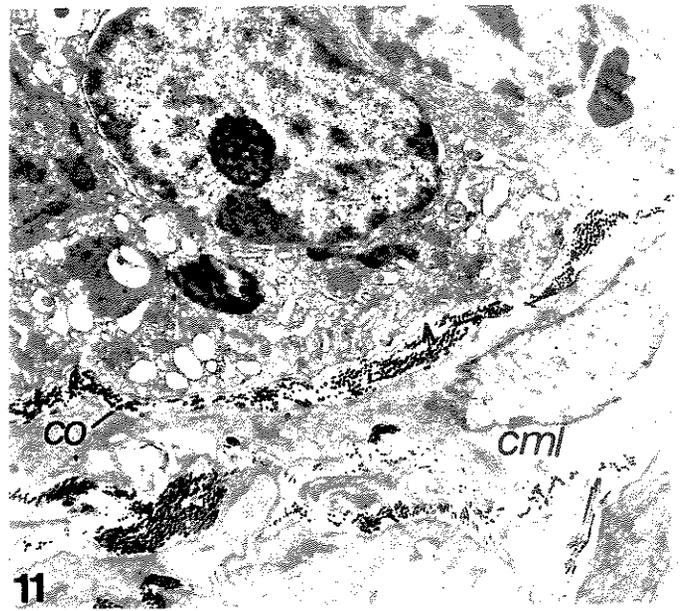
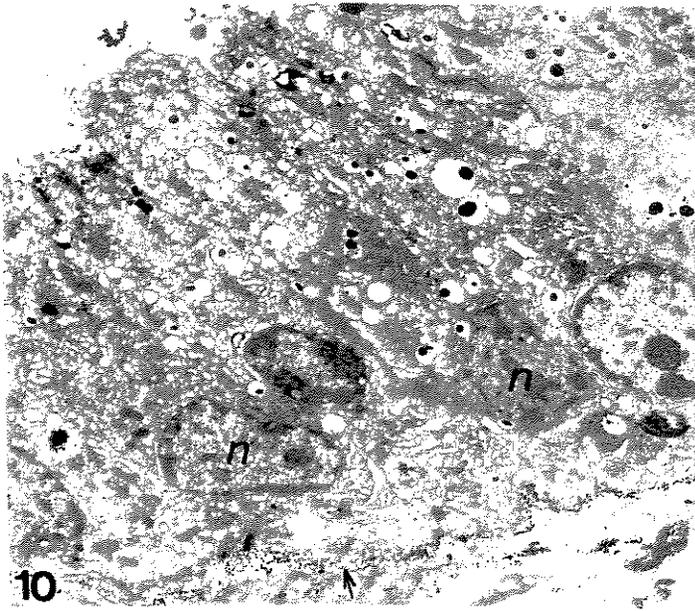
Figuras 6-9. Cortes histológicos de próstatas obtidos a partir de inclusão em parafina e corados pelas técnicas histoquímicas do Tricrômico de Masson (Figura 6), do Picrossírius Hematoxilina (Figura 7), da Reticulina de Gömöri (Figura 8) e pelo método da Resorcina Fucsina de Weigert (Figura 9). **Figura 6.** Detalhe da abundância de células musculares lisas (cml) dispostas ao redor dos ácinos glandulares. Entremeando essa musculatura, encontra-se relativa pobreza em fibras de colágeno, que se mostram pouco marcadas pela técnica em azul (seta). As fibras de colágeno (co) estão em maior concentração na base do epitélio glandular (ep). Aumento: 937x. **Figura 7.** Detalhe de uma porção da glândula, mostrando relativa pobreza em fibras de colágeno (setas), que se entremeam às células musculares lisas (cml). Observar a riqueza dessa musculatura lisa disposta ao redor do ácino prostático. Aumento: 750x. **Figura 8.** No detalhe, observa-se a abundância de fibras reticulares no estroma e na base do epitélio (setas). Vaso sanguíneo (v); Epitélio (ep). Aumento: 750x. **Figura 9.** Notar a presença de poucas fibras do sistema elástico, entremeadas às células musculares lisas (setas). Vaso sanguíneo (v); Epitélio (ep). Aumento: 600x.

Figuras 10-14. Cortes ultra-finos de próstatas observados à microscopia eletrônica de transmissão. **Figura 10.** Visão geral do epitélio, mostrando heterogeneidade entre os tipos

celulares epiteliais e uma camada de fibrilas de colágeno em contato com a lâmina basal (seta). Núcleo da célula epitelial (n). Aumento: 4312x. **Figura 11.** Detalhe da base do epitélio, mostrando dois tipos de células secretoras, célula pouco elétron-densa e célula mais elétron-densa. A lâmina basal é fina (seta) e as fibrilas de colágeno estão em contato com esta região (co). Célula muscular lisa (cml). Aumento: 8400x. **Figura 12.** Observar a célula muscular lisa (cml) na base do epitélio (ep), com disposição entremeadada às camadas de fibrilas de colágeno (co). Aumento: 12544x. **Figura 13.** Aspecto ultra-estrutural da porção estromal da próstata, mostrando fibras do sistema elástico (e) associadas às fibrilas de colágeno (co). Célula muscular lisa (cml). Aumento: 19395x. **Figura 14.** Detalhe de uma região do estroma prostático, revelando a presença de típicas fibras elaunínicas (setas), em meio às fibrilas de colágeno (co). Célula muscular lisa (cml); Epitélio (ep). Aumento: 26720x.







ALTERAÇÕES ESPONTÂNEAS NA PRÓSTATA DO GERBILO VELHO (*Meriones unguiculatus*): HISTOLOGIA, HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA

Cristiani Zanetoni ¹ e Sebastião Roberto Taboga ²

¹ Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP, CP6109 – 13084-971 – Campinas, SP. Brasil

² Departamento de Biologia – IBILCE /UNESP, 15054-000 – São José do Rio Preto, SP. Brasil

Título resumido: Alterações Morfológicas na Próstata do Gerbilo Velho

Palavras chave: gerbilo; próstata; neoplasia intra-epitelial; alteração adenocarcinomatosa.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo no. 99/04496-1).

Endereço para correspondência:

Dept. de Biologia
Rua Cristovão Colombo, 2265
Jardim Nazareth – São José do Rio Preto, SP, Brasil
CEP: 15054-000

Resumo

O estudo da glândula prostática desperta muito interesse nas áreas biológica e médica, pois a próstata é um órgão alvo de sérias doenças comuns ao envelhecimento do indivíduo, devido ao desbalanço hormonal próprio do climatério. Nesse sentido, o presente trabalho caracterizou a histologia, a histoquímica e a ultra-estrutura de algumas alterações prostáticas espontâneas, ocorridas no gerbilo velho. Para este estudo foram utilizadas próstatas de gerbilos velhos (idade de 12 meses), que foram fixadas e incluídas para microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os resultados revelaram que a próstata sofreu alterações neoplásicas intra-epiteliais, alterações adenocarcinomasas não invasivas e também hiperplasia estromal. Os testes histoquímicos revelaram aumento na quantidade de camadas das células musculares lisas, das fibras colagênicas e elásticas. Através da comparação destas lesões com as descritas na literatura, é possível assumir que lesões prostáticas de natureza pré-maligna e maligna podem estar se desenvolvendo espontaneamente no gerbilo velho. Isto nos leva a sugerir que o gerbilo pode ser um bom modelo para os estudos de neoplasias na próstata.

Introdução

Os gerbilos, roedores pertencentes à subfamília Gerbillinae, foram introduzidos nas Américas como nova proposta de animal experimental na década de cinquenta por Victor Schwentker. A partir disso, foram feitas várias investigações biológicas e médicas, utilizando-se esses animais como modelos de estudo (WILLIAMS, 1974; RINGLER *et al.*, 1972; BENITZ e KRAMER, 1965; VINCENT e ASH, 1978; VINCENT *et al.*, 1979).

RINGLER e colaboradores (1972) relataram ocorrência de neoplasmas espontâneos em gerbilos velhos com idade acima de dois anos. Alguns desses neoplasmas incluíram sarcoma osteogênico, neurofibroma subcutâneo, fibrosarcomas subcutâneos, leiomioma ovariano, adenocarcinoma uterino e outros. BENITZ e KRAMER (1965) encontraram no gerbilo velho *Meriones unguiculatus*, com menos de dois anos de idade, tumores espontâneos no fígado, testículo, ovário, próstata e outros. Observações adicionais sobre os neoplasmas espontâneos, no gerbilo velho *Meriones unguiculatus*, foram feitas por VINCENT e ASH (1978), que mostraram os primeiros casos, por exemplo, de adenocarcinoma cecal e teratoma testicular nesses animais.

Uma revisão feita por VINCENT e colaboradores (1979) discutiu o aparecimento de doenças espontâneas no gerbilo *Meriones unguiculatus*, como a obesidade, diabetes, arteriosclerose, neoplasias e outros. Nesse trabalho, os autores revisaram algumas áreas da patologia e patofisiologia experimentais, nas quais o gerbilo tem respondido significativamente, podendo oferecer um modelo de estudo das doenças humanas.

Este trabalho apresenta dados histológicos, histoquímicos e ultra-estruturais referentes à ocorrência de alterações morfológicas espontâneas na próstata do gerbilo velho. Visa ser mais um contribuinte no entendimento das lesões prostáticas, pois acredita-se que esse roedor seja um bom modelo experimental para estudos da biologia prostática (ZANETONI e TABOGA, 2001).

Material e Métodos

Animais

Para a realização das análises, foram utilizados 15 gerbilos (*Meriones unguiculatus*) velhos com 12 meses, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu (SP). Foram mantidos no laboratório dos 03 aos 12 meses de idade, em gaiolas apropriadas para sua criação e alimentados com ração Labina e água *ad libitum*.

Microscopia de luz

As próstatas removidas foram fixadas por imersão em Karnovsky modificado (solução de paraformaldeído a 2% e de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M) (GLAUERT, 1975), lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em óleo de cedro e, então, incluídas em Paraplast e seccionadas a 5 µm em micrótomo rotativo manual.

Parte do material fixado em Karnovsky modificado (GLAUERT, 1975), foi incluído em historresina Leica-historesin embedding kit e seccionado a 2µm em micrótomo rotativo manual. Esse material processado para historresina foi corado pela Hematoxilina-eosina. Além desta coloração, os cortes histológicos foram corados pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH4,0 (MELLO e VIDAL, 1980).

Os cortes histológicos de próstatas obtidos a partir de inclusão em Paraplast foram corados, segundo BEHMER e colaboradores (1976), pelo Tricrômico de Masson e pela Reticulina de Gömöri. Outras colorações feitas foram pelo método do Picrossírius Hematoxilina (JUNQUEIRA *et al.*, 1979) e pela Resorcina Fucsina de Weigert, com oxidação prévia pelo ácido peracético (GOLDFISCHER *et al.*, 1983).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de próstata foram fixados com glutaraldeído 3% em tampão Millonig pH 7,3 acrescido de ácido tânico a 0,25%, durante 15 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão Millonig pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavados brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976).

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 50-70 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático, com navalha de diamante. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2%, por 2 minutos (VENABLE e COGGESHALL, 1965, modificado). As telas foram observadas em microscópio eletrônico Zeiss – EM 910.

Resultados

Análise estrutural e histoquímica

A glândula prostática, no gerbilo velho, quando comparada com a do gerbilo adulto (Figuras 1-4), apresentou alterações morfológicas, as quais caracterizaram a hiperplasia estromal e a proliferação das células epiteliais (Figura 2). Notou-se, no epitélio glandular, células fenotipicamente alteradas, cujos nucléolos eram maiores e o citoplasma mais claro (Figura 4). Além disso, comparando a figura 4 com a 3, observa-se o epitélio prostático normal do animal velho discretamente cubóide e a ausência de secreção apócrina, sugerindo haver redução dessa secreção nesses animais.

A próstata do gerbilo velho apresentou alterações adenocarcinomas não invasivas, nas quais observou-se regiões de infiltrado inflamatório polimorfonuclear na região do lume glandular (Figura 6). Foi encontrado também lesões fenotipicamente semelhantes às neoplasias intra-epiteliais, isto é, projeções de células epiteliais atípicas e irregularmente dispostas no lume da glândula (Figuras 8 e 9), inclusive com padrão cribriforme que é característico de tal lesão. Neste caso, o epitélio prostático mostrou projeções à maneira de

glândulas que ocuparam o lume glandular (Figura 5). Essas lesões manifestaram frequências alteradas de divisão celular, indicando natureza proliferativa (Figura 6). A hiperplasia estromal também foi constatada, pois notou-se abundante ocorrência de células musculares lisas (Figura 7).

Os testes histoquímicos nos gerbilos velhos, quando comparados com os realizados nos gerbilos adultos (Figuras 10, 13, 16 e 18), mostraram que houve aumento na quantidade das fibras da matriz extracelular, bem como maior concentração das células musculares lisas (Figuras 11, 12, 14, 15, 17 e 19). Ocorreu aumento das fibras de colágeno tanto na base do epitélio, quanto entre as células musculares lisas (Figuras 11 e 14). As fibras de colágeno também mostraram-se abundantes nos ácinos glandulares com alterações neoplásicas (Figuras 12 e 15). As fibras reticulares sofreram aumento na sua quantidade, estando presentes em abundância no estroma e na base do epitélio, junto da membrana basal (Figura 17). Já as fibras do sistema elástico também sofreram aumento na sua quantidade (Figura 19), uma vez comparadas com as poucas fibras do sistema elástico encontradas nos gerbilos adultos (Figura 18).

Análise ultra-estrutural

A ultra-estrutura mostrou, no epitélio prostático do animal velho, quando comparado com o epitélio normal do animal adulto (Figura 20), presença de célula fenotipicamente alterada, cujo nucléolo era pouco evidente e o citoplasma menos elétron denso (Figura 21).

Na figura 23, o detalhe revela a transição do epitélio normal para o alterado, cujas células apresentam diferentes fenótipos nucleares. Nota-se também, na figura 24, uma porção do epitélio glandular alterado, com pleomorfismo no fenótipo nuclear das células, o que é característico de alterações neoplásicas.

Células em graus diferentes de degeneração foram observadas. Estas células foram vistas pelo aspecto aberrante do núcleo. (Figuras 22 e 25).

A avaliação ultra-estrutural da porção estromal deixou claro que as células musculares lisas apresentaram disposição entremeada às camadas de fibrilas de colágeno (Figuras 26 e 27). Nesse material analisado foi encontrado, além das células musculares lisas normais, células musculares isoladas em processo de degeneração (Figuras 28 e 29).

Discussão

A próstata do gerbilo foi descrita na sua histologia, histoquímica e ultra-estrutura por ZANETONI e TABOGA (2001). Estes aspectos descritos indicaram que a próstata desse roedor parece ser um bom modelo para estudos experimentais neste órgão, devido certas semelhanças com a glândula prostática dos humanos, além de serem animais de fácil manutenção em cativeiro (ZANETONI e TABOGA, 2001).

O presente trabalho mostrou que o climatério pode ser responsável pelo aumento na incidência de alterações morfológicas espontâneas na próstata dos gerbilos velhos. Neste órgão, detectou-se alterações neoplásicas intra-epiteliais, alterações adenocarcinomas não invasivas e também hiperplasia estromal. Os testes histoquímicos revelaram o aumento na quantidade de camadas das células musculares lisas, das fibras colagênicas e elásticas.

Durante muito tempo houve um consenso na literatura de que o processo hiperplásico seria exclusividade dos humanos, canídeos e alguns roedores maiores, como por exemplo o cobaio (HORSFALL *et al.*, 1994). Contudo, no modelo estudado no presente trabalho, detectou-se aumento hiperplásico no estroma da glândula. Os dados de HORSFALL e colaboradores (1994) indicaram que células musculares lisas podem ser as responsáveis por parte da síntese dos elementos de matriz extracelular no estroma. No gerbilo, parece ocorrer o mesmo fenômeno, pois organelas indicativas de secreção são observadas em abundância nas células musculares lisas.

Segundo BILLIS (1995), emprega-se a denominação neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) para lesões atípicas do epitélio de revestimento de ductos e ácinos e que teriam o potencial de serem precursoras do carcinoma invasivo. Descrevem-se quatro tipos arquiteturais na NIP: plano, ondulado, micropapilar e cribriforme. A análise dos resultados do presente estudo revelou ocorrência de neoplasias intra-epiteliais prostáticas de alto grau, como a alteração adenocarcinomatosa não invasiva e de NIP do tipo cribriforme, a qual caracteriza-se como sendo projeções do epitélio de revestimento glandular à maneira de glândulas que ocupam o lume acinar.

Segundo SHIBATA e colaboradores (1996), o progresso da neoplasia intra-epitelial prostática para carcinoma prostático invasivo tem sido estudado no modelo de camundongo

trangênico C3(1)/T_{AG}, parecendo ser muito similar ao processo proposto ocorrer em humanos. Lesões neoplásicas intra-epiteliais, nesses camundongos trangênicos, parecem histologicamente com as encontradas nos humanos e no gerbilo. Esse estudo relatou um aumento progressivo do número de neoplasias intra-epiteliais em consequência da idade. Além disso, a quantidade de apoptose foi um tanto baixa nas células epiteliais normais, moderada em neoplasias intra-epiteliais de baixo grau e alta em neoplasias intra-epiteliais de alto grau e carcinomas. Devido ao fato das neoplasias intra-epiteliais de alto grau mostrarem características similares às observadas em carcinomas e por essas mesmas neoplasias serem freqüentemente encontradas contíguas ao carcinoma, esses autores concluíram que a neoplasia intra-epitelial de alto grau é uma lesão precursora do carcinoma prostático nesse modelo de camundongo trangênico.

Os resultados do experimento feito por SCHLEICHER e colaboradores (1996) demonstraram que a administração intra-prostática de um carcinógeno combinada com um pré-tratamento apropriado para maximizar a atividade mitogênica e testosterona induz adenocarcinomas de próstata. Em resumo, a administração intra-prostática de N-metil-N-nitrosuréia oferece um meio de indução de carcinoma prostático em ratos.

Lesões de natureza proliferativa e cancerosa foram descritas em ratos por POLLARD e LUCKERT (1992), quando obtiveram experimentalmente próstatas cancerosas a partir de injeções de N-metil-N-nitrosuréia associada a injeções intra-dérmicas de testosterona. Além disso, esses autores mostraram a ocorrência de neoplasmas espontâneos relacionados com o envelhecimento dos ratos, isto é, 26% dos ratos controles com vinte e seis meses de idade apresentaram adenocarcinomas prostáticos espontâneos (POLLARD e LUCKERT, 1989).

COHEN e colaboradores (1994) também estudaram em ratos a patologia macroscópica e microscópica de tumores do complexo prostático, induzidos pela administração de N-metil-N-nitrosuréia associada à testosterona. Além disso, esse trabalho observou o desenvolvimento espontâneo de adenocarcinomas do complexo prostático em cerca de 25% dos animais idosos pertencentes ao grupo controle.

Um importante trabalho de revisão feito por HUSS e colaboradores (2001) discutiu a história dos modelos de ratos e de camundongos para o câncer de próstata, propondo uma estrutura para o desenvolvimento de futuros sistemas modelos.

Os trabalhos de SCHLEICHER e colaboradores (1996); POLLARD e LUCKERT (1992 e 1989); COHEN e colaboradores (1994); SHIBATA e colaboradores (1996); HUSS e colaboradores (2001) descreveram lesões em diferentes graus de malignidade e caracterizaram as gradações histológicas das referidas lesões carcinomatosas e hiperplásicas, as quais se assemelham muito com as observadas no presente estudo. Isto permite assumir que lesões desta natureza podem estar se desenvolvendo espontaneamente na próstata do gerbilo velho e que estas lesões estão ligadas ao processo de climatério neste animal.

Os achados deste trabalho são, neste momento, descritivos. No entanto, estudos detalhados sobre a expressão de genes e atividades de proteínas específicas devem ocorrer em nosso laboratório.

Referências

- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. 1976. *Manual de práticas para histologia normal e patológica*. EDART-EDUSP, SP.329p.
- BENITZ, K.F. & KRAMER, A. W. Jr. 1965. Spontaneous tumors in the Mongolian gerbil. *Lab. Anim. Care*, 15: 281-294.
- BILLIS, A. 1995. *Uropatologia: Próstata. Guia prático para o diagnóstico anatomopatológico*. UNICAMP, Campinas, SP, (apostila técnica). 165p.
- COHEN, M.B.; HEIDGER, P.M. & LUBAROFF, D.M. 1994. Gross and microscopic pathology of induced prostatic complex tumors arising in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res.*, 54: 626-628.
- 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.
- GLAUERT, A. M. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical methods in electron microscopy*. In: A. M. Glauert ed. N. Holland Publishing Company, NY, v.3., p. 1-207.
- GOLDFICHER, S.; COLTOFF-SCHILLER, B.; SCHWARTZ, E. & BLUMENFELD, O.O. 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J Histochem Cytochem.*, 31: 382-390.

- HORSFALL, D.J.; MAYNE, K.; RICCIARDELLI, C.; RAO, M.; SKINNER, J.M.; HENDERSON, D.W.; MARSHALL, V.R. & TILLEY, W.D. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab. Invest.*, 70 (Suppl.): 753-763.
- HUSS, W.J.; MADDISON, L.A. & GREENBERG, N.M. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biology*, 11:245-259.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G. & BRENTANI, R. 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.*, 11: 447-455.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher-Funcamp, Campinas, 71p.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1989. Prevention of prostate cancer and liver tumors in L-W rats by moderate dietary restriction. *Cancer*, 64 (3): 686-690.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1992. Early manifestations of induced prostate tumors in Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters*, 67: 113-116.
- RINGLER, D.H.; LAY, D.M. & ABRAMS, G.D. 1972. Spontaneous neoplasms in aging Gerbillinae. *Laboratory Animal Science*, 22 (3):407-414.
- SCHLEICHER, R.L.; FALLON, M.T.; AUSTIN, G.E.; ZHENG, M.; ZHANG, M.; DILLEHAY, D.L. & COLLINS, D.C. 1996. Intravenous vs. Intraprostatic administration of N-methyl-N-nitrosourea to induce prostate cancer in rats. *Prostate*, 28: 32-43.
- SHIBATA, M-A.; WARD, J.M.; DEVOR, D.E.; LIU, M-L. & GREEN, J.E. 1996. Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma in C3(1)/SV40 large T antigen transgenic mice: histopathological and molecular biological alterations. *Cancer Research*, 56: 4894-4903.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-408.
- VINCENT, A.L. & ASH, L.R. 1978. Further observations on spontaneous neoplasms in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Laboratory Animal Science*, 28 (3): 297-300.
- VINCENT, A.L.; GARY, E.R. & WILLIAM, A.S.Jr. 1979. The pathology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A Review. *Laboratory Animal Science*, 29 (5):645-651.
- WATSON, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 475-478.

WILLIAMS, W.M. 1974. *The Anatomy of the Mongolian Gerbil*. Tumblebrook Fram, Inc., USA. 107p.

ZANETONI, C. & TABOGA, S.R. 2001. Histologia, histoquímica e ultra-estrutura da próstata do esquilo da mongólia, *Meriones unguiculatus*. (Manuscrito em preparação).

Legendas das Figuras

Figuras 1-4 e 9. Cortes histológicos de próstatas processados para historresina, corados pela Hematoxilina-eosina (Figuras 1-4) e pelo Azul de Toluidina (Figura 9). **Figuras 5-8.** Cortes semi-finos de próstatas de gerbilos velhos corados pelo Azul de Toluidina. **Figura 1.** Visão geral da próstata do gerbilo adulto, mostrando os ácinos glandulares (a) e o estroma prostático (es). Aumento: 117x. **Figura 2.** Visão geral da próstata do gerbilo velho, cujos ácinos apresentam proliferação das células epiteliais (setas). No estroma da glândula, observar a abundância das células musculares lisas (cml). Aumento: 94x. **Figura 3.** Detalhe do epitélio (ep) prismático simples da próstata do animal adulto e das células musculares lisas (cml) ao redor do ácino glandular. Aumento: 750x. **Figura 4.** Detalhe do epitélio glandular no animal velho. Observar a presença de células fenotipicamente alteradas, cujos nucléolos são maiores (seta) e o citoplasma mais claro. Epitélio (ep) normal, discretamente cubóide. Aumento: 937x. **Figura 5.** Arranjo acinar com padrão cribriforme, característico de neoplasia intra-epitelial. Aumento: 75x. **Figura 6.** Alteração adenocarcinomatosa não invasiva. Região de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Célula com fenótipo apoptótico pode ser observada (seta). Metáfase localizada na base do ácino adenocarcinomatoso (cabeça de seta). Nota-se que o estroma e as células musculares lisas (cml) não sofreram alterações. Aumento: 600x. **Figura 7.** Observar a abundância de células musculares lisas (cml) no estroma hiperplásico. Aumento: 750x. **Figura 8.** Neoplasia intra-epitelial pronunciada e característica, com projeções de células epiteliais para o lume, à semelhança de um pólipo. Atenção para a área de transição entre células fenotipicamente alteradas e o epitélio normal (seta). Aumento: 240x. **Figura 9.** Detalhe de neoplasia intra-epitelial prostática (nip), no ácino glandular do animal velho. Aumento: 600x.

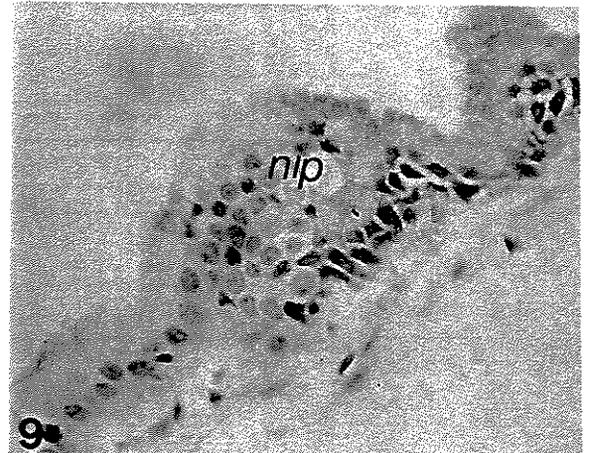
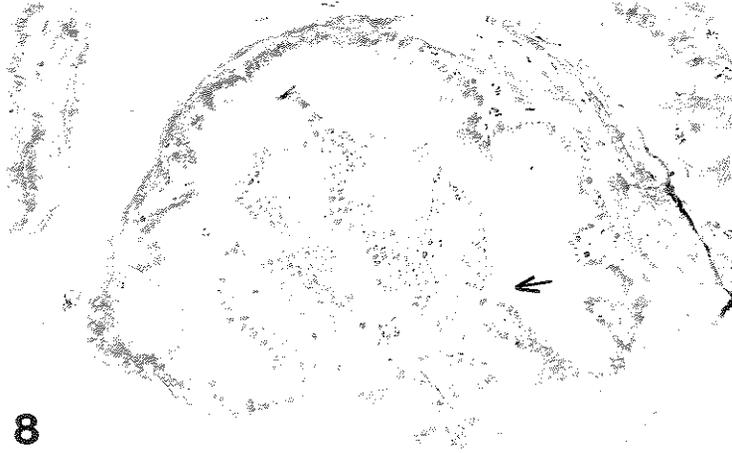
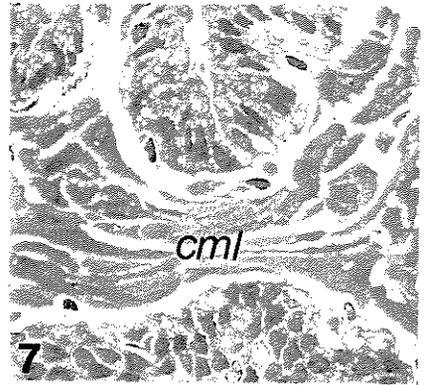
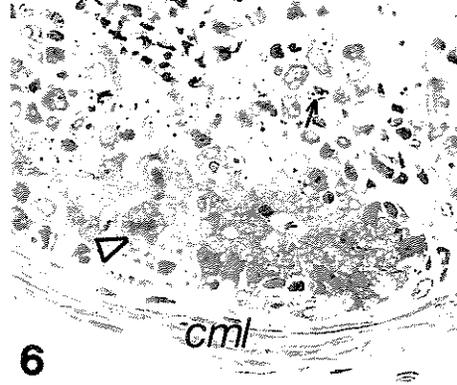
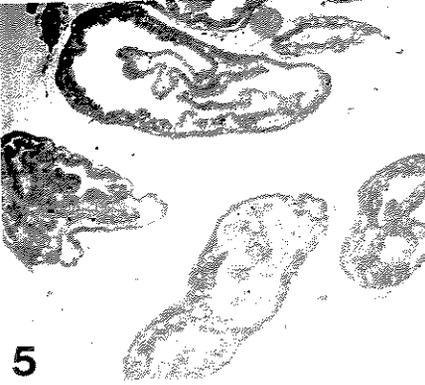
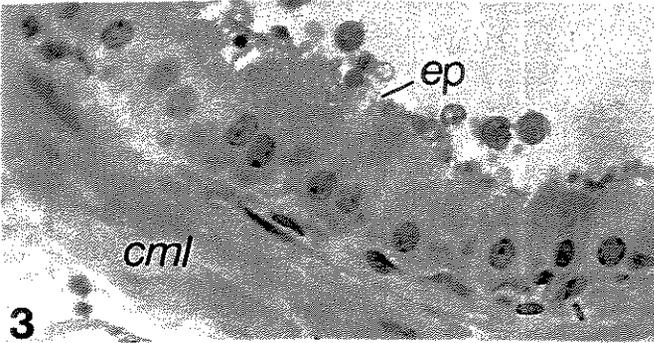
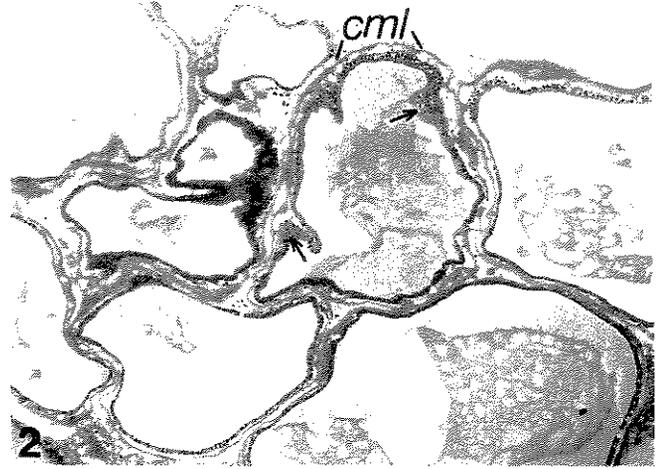
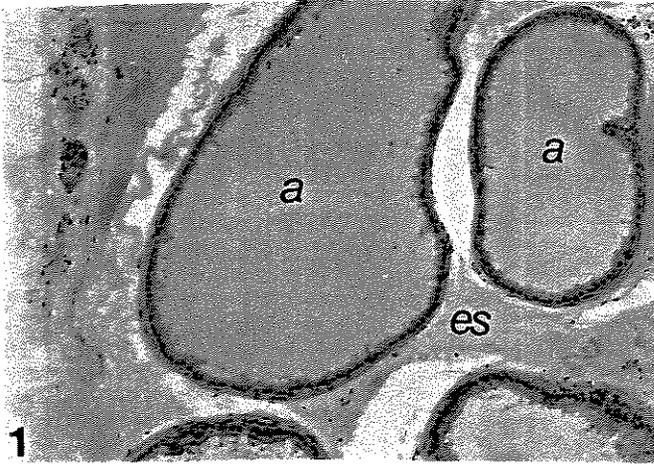
Figuras 10-19. Cortes histológicos de próstatas obtidos a partir de inclusão em Paraplast, corados pela técnica do Tricrômico de Masson (Figuras 10-12), pela técnica do Picrossírius Hematoxilina (Figuras 13-15), pelo método da Reticulina de Gömöri (Figuras 16 e 17) e pela técnica da Resorcina Fucsina de Weigert (Figuras 18 e 19). **Figura 10.** No detalhe da próstata do animal adulto, observar que o colágeno (co) encontra-se em maior concentração na base do epitélio (ep) do que entre as camadas de células musculares lisas (cml). Aumento: 937x.

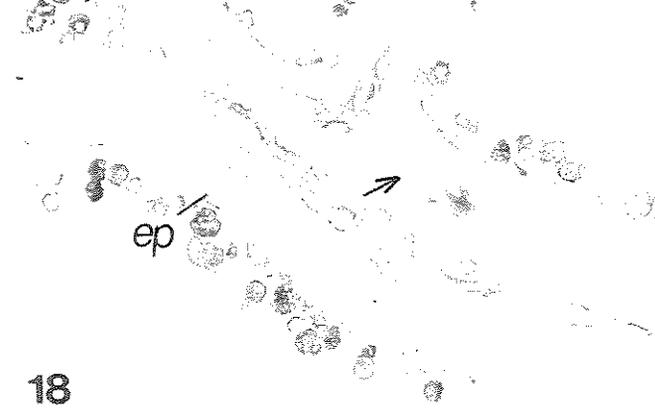
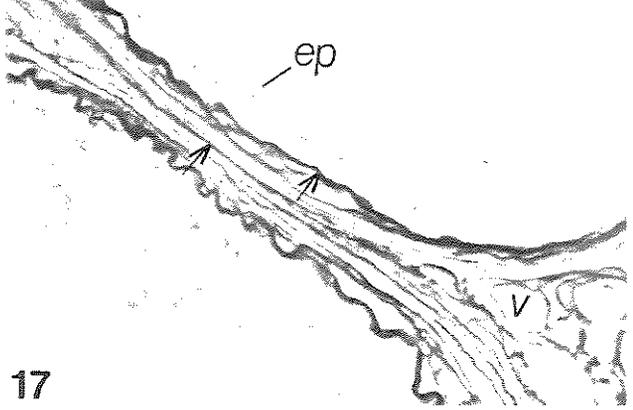
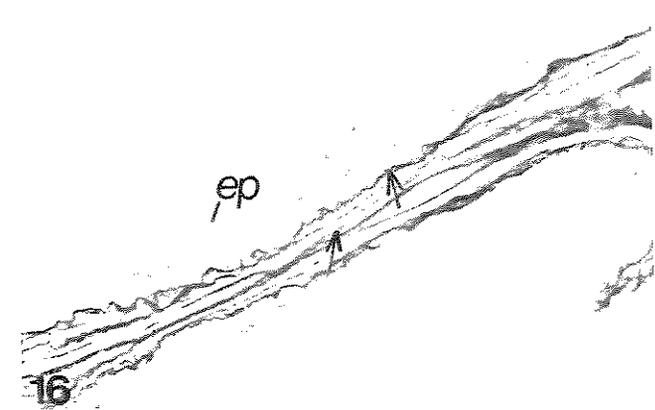
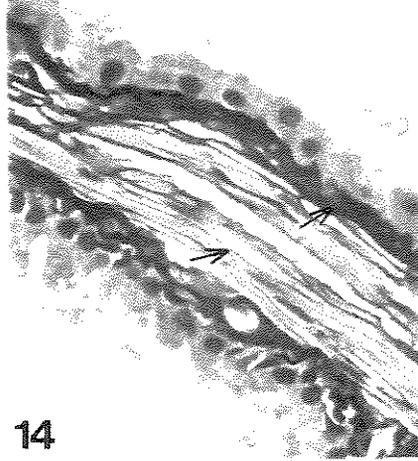
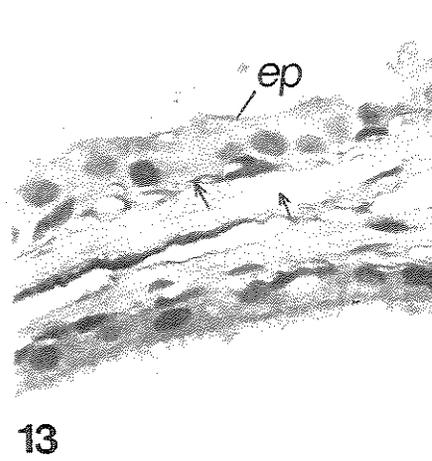
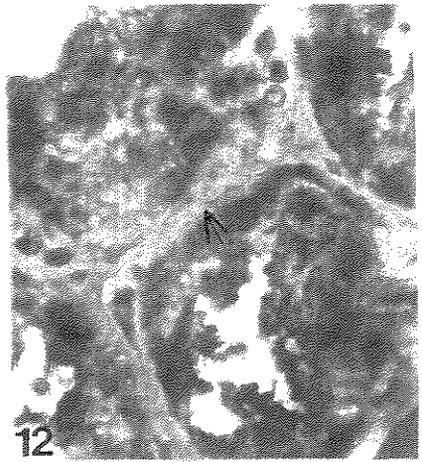
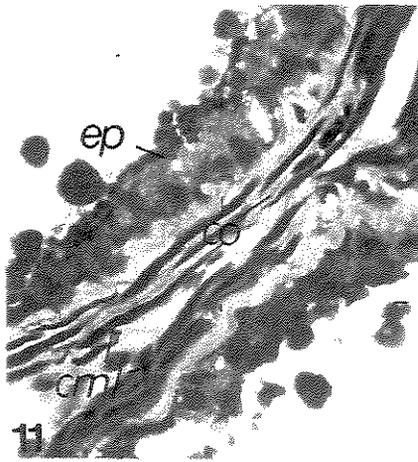
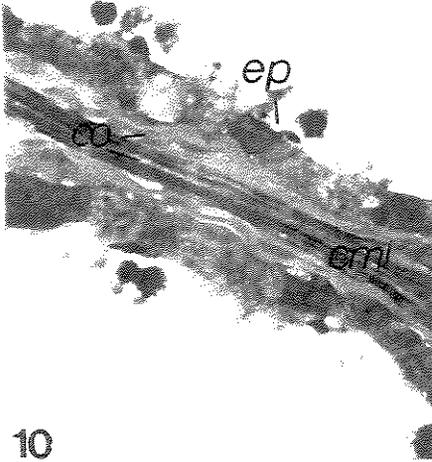
Figura 11. Nos animais velhos, o detalhe da glândula mostra a abundância de fibras de colágeno (co) encontradas na base do epitélio (ep) e entre as células musculares lisas (cml). Aumento: 750x. **Figura 12.** Atenção para a ocorrência, nos animais velhos, de fibras de colágeno entre as células proliferadas do nódulo neoplásico (seta). Aumento: 937x. **Figura 13.** Nos animais adultos, o detalhe glandular revela a relativa pobreza em fibras de colágeno existente entre as células musculares lisas (setas). Abaixo do epitélio (ep) o colágeno encontra-se mais evidente. Aumento: 937x. **Figuras 14 e 15.** Notar o aumento ocorrido na quantidade de fibras de colágeno tanto na base do epitélio, como entre as células musculares lisas (setas) da próstata dos animais velhos. Ocorrência de nódulo neoplásico intra-epitelial (nip) (Figura 15). Aumentos: 750x (Figura 14); 600x (Figura 15). **Figura 16.** No detalhe do órgão nos animais adultos, observar a riqueza de fibras reticulares na base do epitélio e no estroma prostático (setas). Epitélio (ep). Aumento: 750x. **Figura 17.** O detalhe da próstata dos animais velhos mostra o aumento de fibras reticulares ocorrido na base do epitélio e no estroma glandular (setas). Epitélio (ep); Vaso Sangüíneo (v). Aumento: 937x. **Figura 18.** Ocorrência de poucas fibras do sistema elástico (seta), no órgão dos animais adultos. Epitélio (ep). Aumento: 750x. **Figura 19.** No detalhe, observa-se maior quantidade de fibras elásticas (setas) no estroma prostático dos animais velhos, quando comparados com os animais adultos (Figura 18), principalmente entre as células musculares lisas. Epitélio (ep); Vaso sangüíneo (v). Aumento: 600x.

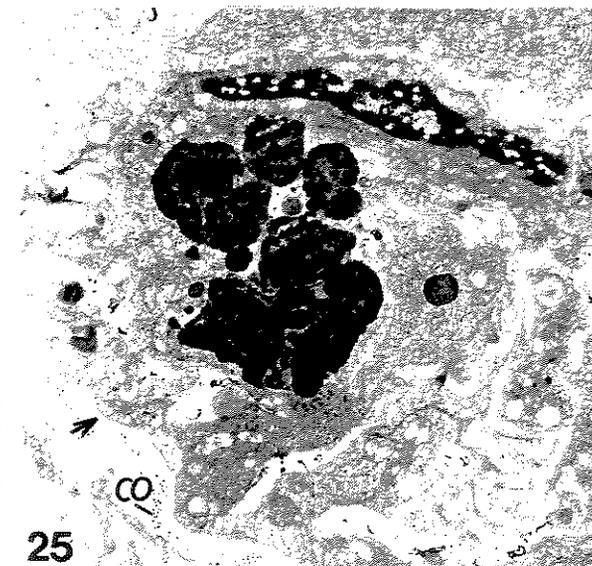
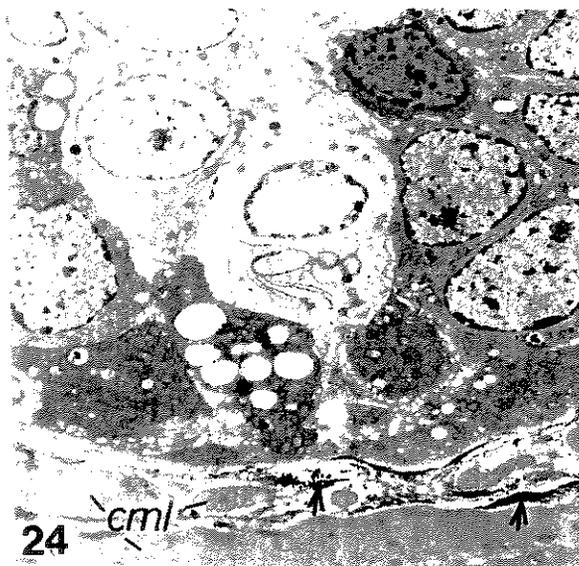
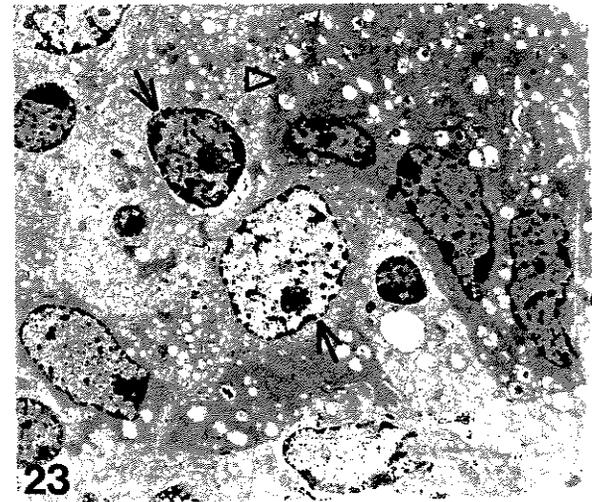
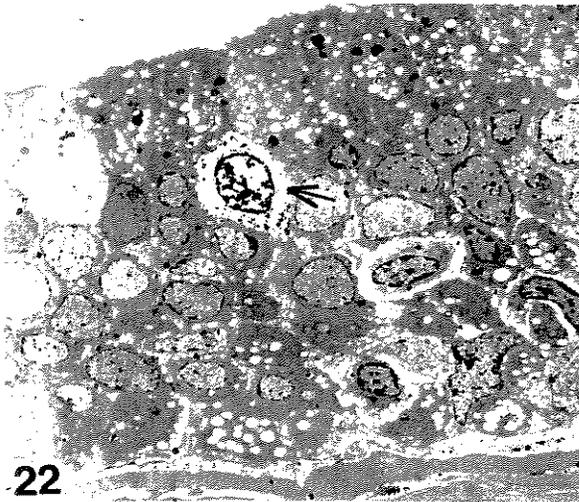
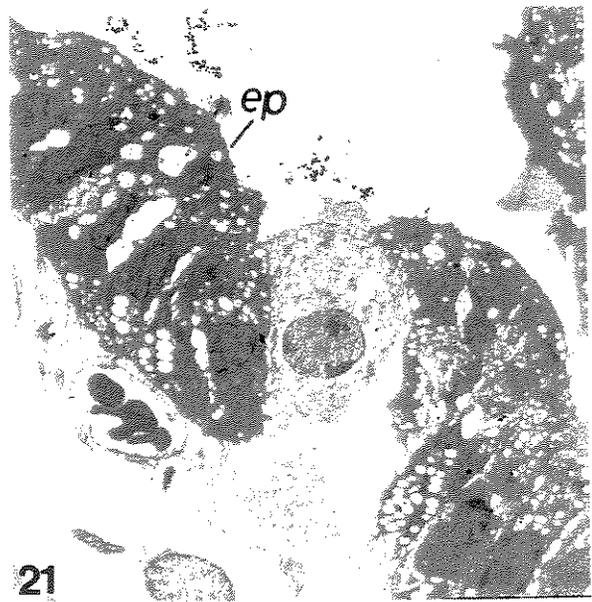
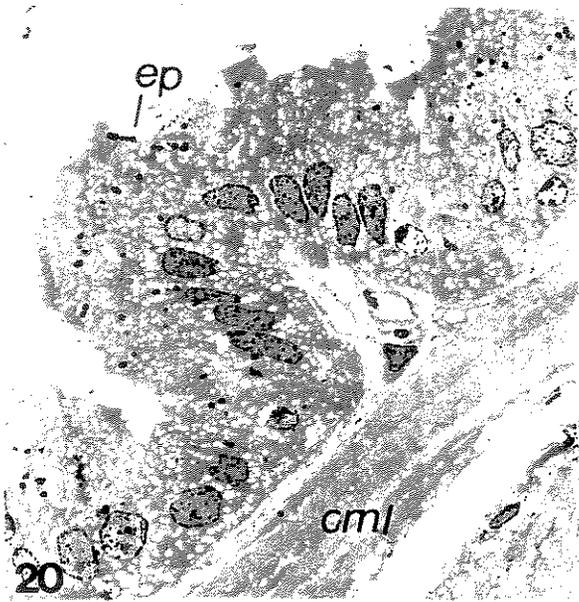
Figuras 20-25. Cortes ultra-finos de próstatas de gerbilos adultos (Figura 20) e velhos (Figuras 21-25) observados à microscopia eletrônica de transmissão. **Figura 20.** Epitélio (ep) prostático normal do gerbilo adulto. No estroma glandular, células musculares lisas (cml) dispostas ao redor do epitélio acinar. Aumento: 1200x. **Figura 21.** Presença de célula fenotipicamente alterada, no epitélio (ep) prostático do animal velho. Aumento: 2004x. **Figura 22.** Secção parcial do epitélio glandular. Notar a ocorrência de célula em degeneração (seta). Aumento: 2004x. **Figura 23.** Detalhe ultra-estrutural da figura 8, mostrando a transição do epitélio normal para o alterado (cabeça de seta), cujas células apresentam diferentes fenótipos nucleares (setas). Aumento: 3341x. **Figura 24.** Porção do epitélio glandular alterado, com heterogeneidade no fenótipo nuclear das células. Célula muscular lisa (cml); Fibrilas de

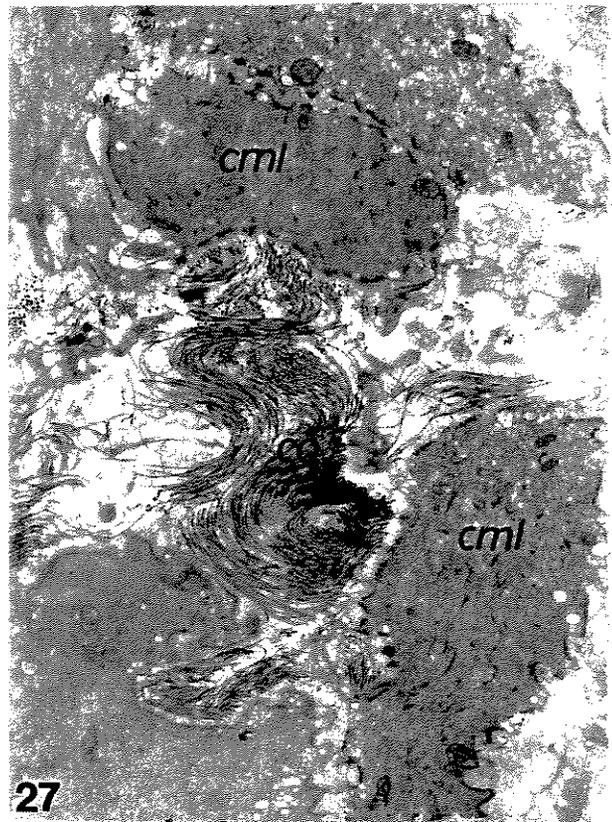
colágeno (setas). Aumento: 4316x. **Figura 25.** Detalhe de uma célula em alto grau de degeneração. Lâmina basal (seta); Fibrilas de colágeno (co). Aumento: 9300x.

Figuras 26-29. Cortes ultra-finos de próstatas de gerbilos velhos observados à microscopia eletrônica de transmissão. **Figura 26.** O detalhe mostra a célula muscular lisa (cml) com disposição entremeada às camadas de fibrilas de colágeno (co). Epitélio (ep); Lipídio (*); Fibroblasto (f). Aumento: 20688x. **Figura 27.** Detalhe da porção estromal, mostrando as células musculares lisas (cml) em corte transversal e entremeadas às fibrilas de colágeno (co). Aumento: 10200x. **Figura 28.** Secção parcial de uma célula muscular lisa normal. Núcleo (n); Fibrilas de colágeno (co). Aumento: 6125x. **Figura 29.** Detalhe de uma célula muscular lisa em degeneração. Observar a presença de grânulos de lipofusina (setas). Núcleo (n). Aumento: 11625x.









VI. Conclusões gerais

1. A próstata, no animal adulto, apresenta ácinos glandulares com epitélio prismático simples e altamente secretório. Entre as porções glandulares, encontra-se estroma conjuntivo vascularizado, com relativa pobreza em fibras de colágeno e poucas fibras do sistema elástico, além de abundantes células musculares lisas dispostas ao redor dos ácinos. Ultra-estruturalmente, o epitélio prostático apresenta heterogeneidade entre os seus tipos celulares e o estroma glandular mostra células musculares lisas com disposição entremeada às camadas de fibrilas de colágeno.

2. Na próstata do gerbilo, o epitélio glandular prismático simples e a heterogeneidade das células desse epitélio, vista à microscopia eletrônica, são características semelhantes à próstata humana. Além disso, são animais que apresentam anatomicamente seus lobos prostáticos fusionados, também à semelhança da glândula prostática humana; são roedores com tamanho menor que o dos ratos, mas maior do que o dos camundongos e hamsters; além de serem animais de fácil manutenção em cativeiro. Assim sendo, a caracterização histológica, histoquímica e ultra-estrutural da próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus* sugere a introdução deste novo modelo experimental para a averiguação de elementos importantes da biologia prostática.

3. No gerbilo velho, a glândula prostática apresenta alterações morfológicas espontâneas. Esse órgão manifesta alterações neoplásicas intra-epiteliais, alterações adenocarcinomas não invasivas e também hiperplasia estromal. Assim, lesões prostáticas de natureza pré-maligna e maligna podem estar se desenvolvendo espontaneamente no gerbilo velho, estando estas lesões ligadas ao processo de climatério neste animal.

VII. Referências

- AOKI-KOMORI, S.; SAYTO, T.R.; TAKAHASHI, K.W. & TANIGUSHI, K. 1994. Lectin histochemical studies on the scent gland in the Syrian hamster and Mongolian gerbil. *Jikken Dobutsu*, 43(2): 181-190.
- CARVALHO, H.F. & LINE, S.R.P. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, 20: 809-819.
- CARVALHO, H.F.; TABOGA, S, R. & VILAMAIOR, P.S.L. (1997a). Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue Cell*, 29: 163-170.
- CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L. & TABOGA, S, R. (1997b) Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchietomy. *Prostate*, 32: 27-34.
- CUNHA, G.R.; BIGSBY, R.M.; COOKE, P.S. & SUGIMURA, Y. 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell differentiation*, 17:137-148.
- DROLLER, M.J. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br. J. Urol.*, 79:42-52.
- GROSS, S.A. & DIDIO, L.J.A. 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol.*, 19 (1): 77-84.
- HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A. & CUNHA, G.R. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br. J. Urol.*, 79 (Suppl.): 18-26.
- HORSFALL, D.J.; MAYNE, K.; RICCIARDELLI, C.; RAO, M.; SKINNER, J.M.; HENDERSON, D.W.; MARSHALL, V.R. & TILLEY, W.D. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab. Invest.*, 70 (Suppl.): 753-763.
- ISHIKAWA, M. & ISHIKAWA, H. 1977. Light and electron microscopic histochemistry of the serous secretory granules in the salivary glandular cells of the Mongolian gerbil (*Merionis unguiculatus*). *Histochem.*, 189(1): 125-139.
- JEFFERS, G.W.; KLEI, T.R. & ENRIGHT, F.M. 1984. Activation of the jird (*Meriones unguiculatus*) macrophages by the filarial parasite *Brugia paghangi*. *Infect. Immun.*, 43(1): 43-48.
- JONES, D.; GONZALES, L.F.; CREWS, D.; GALEF, B.G.Jr. & CLARK, M.M. 1977. Effects of the intrauterine position on the metabolic capacity of the hypothalamus of female gerbils. *Physiol. Behav.*, 61(4): 513-519.

- KARR, J.F.; KANTOR, J.A.; HAND, P.H.; EGGENSBERGER, D.L. & SCHOLM, J. 1995. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.*, 55: 2455-2462.
- KRAMER, A.W.Jr. 1964. Body and organ Weights and linear measurements of the mongolian gerbil. *Anat. Rec.*, 150 (4): 343-347.
- MÜLLER, M.; NIELSEN, J.T. & van VEEN, T. 1979. Effect of superior cervical ganglionectomy on monoamine content in the epithalamic area of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*): a fluorescence histochemical study. *Cell Tissue Res.*, 201(1): 1-9.
- NAWA, Y.; HORII, Y.; OKADA, M. & ARIZONO, N. 1994. Histochemical and cytochemical characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 104(3): 249-254.
- NEMETH, J.A. & LEE, C. 1996. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate*, 28: 124-128.
- NOLAN, C.C.; BROWN, A. W. & CAVANAGH, J.B. 1990. Regional variations in nerve cell responses to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbil. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 81(2): 204-212.
- PEITZ, B.; FOREMAN, D. & SCHIMMITT, M. 1979 The reproductive tract of the male spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and coagulation studies with other species. *J. Reprod. Fert.*, 57: 183-188.
- PRICE, D. 1963. Comprative aspects of development and structure in the prostate. *Nat. Can. Inst. Monogr.*, 12: 1-27.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1987. Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate*, 11: 219-227.
- REDECKER, P. 1987. Golgi like immunostaining pf pituicytes and tanocytes positive for glial fibrillary acidic protein in the neurohypophysis of the Mongolian gerbil (*Meriones unghuiculatus*). *Histochem.*, 87(6): 585-595.
- REDECKER, P. 1991. Ultrastructural demonstration of neuhaemal contacts in the internal zone of the median eminence of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): correlation with synaptophysin immunohistochemistry. *Histochem.*, 95(5): 503-511.

- REESE, J.H.; McNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SAMLOFF, I.M. & STAMEY, T.A. 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.*, 136: 1148-1152.
- ROBINSON, D.G. 1974. Publisher's Foreword. In: *The anatomy oof the Mongolian Gerbil*. By: W.M. Williams. Tumblebrook, USA, p.V.
- ROSAI, J. 1996. Male reproductive system. In: J. Rosai ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby-Year, INC., 8ed., St.Louis-USA, 1: 1221-1256.
- ROSS, M.H.; REITH, E.J. & ROMRELL, L.J. 1993. *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, RJ., 779p.
- SCHWENTKER, V. 1963. The Gerbil. A new laboratory animal. *Veterinarian*, 6 (4): 5-9
- SLAYTER, M.V.; ANZANO, M.A.; KADOMATSU, K.; SMITH, J.M. & SPORN, M.B. 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: A system for histological scoring and grading. *Cancer Res.*, 54:1440-1444.
- SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R. & DONJACOUR, A.A. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol. Reprod.*, 34: 961-971.
- WILLIAMS, W.M. 1974. *The Anatomy of the Mongolian Gerbil*. Tumblebrook Fram, Inc., USA. 107p.