

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Silvana Gisele Pegorin de Campos

DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DA PRÓSTATA VENTRAL DO GERBILO
Meriones unguiculatus
E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ASSOCIADAS AO
ENVELHECIMENTO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Silvana Gisele Pegorin de Campos
e aprovada pela Comissão Julgadora

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

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

C157d Campos, Silvana Gisele Pegorin de
Desenvolvimento pós-natal da próstata ventral do
gerbilo *Meriones unguiculatus* e alterações
histopatológicas associadas ao envelhecimento / Silvana
Gisele Pegorin de Campos. -- Campinas, SP: [s.n.],
2006.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gerbils. 2. Próstata. 3. Células - Proliferação.
I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Postnatal development of gerbil ventral prostate (*Meriones unguiculatus*) and histopathologic lesions associated to the aging.

Palavras-chave em inglês: Gerbils; Prostate; Cell proliferation.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

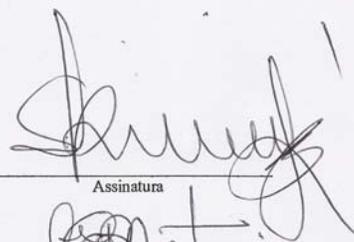
Banca examinadora: Sebastião Roberto Taboga, Sérgio Luiz Felisbino, Silvana Martinez Baraldi Artoni, Antonio Carlos Alessi, Hernandes Faustino de Carvalho.

Data da defesa: 27/01/2006.

Campinas, 27 de janeiro de 2006.

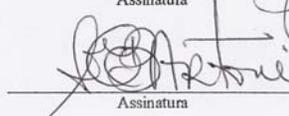
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni



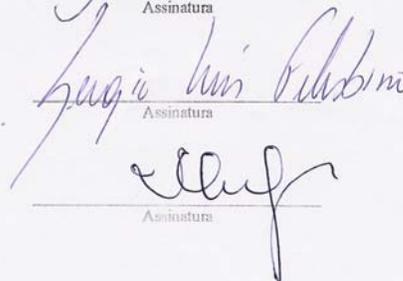
Assinatura

Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi



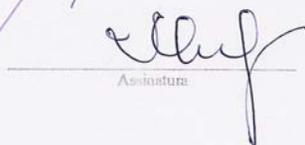
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino



Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Assinatura

Prof. Dra. Renée Laufer Amorim

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Prof. Dra. Rejane Maira Góes

Assinatura

Dedicatória

*Ao Prof. Dr. Sebastião,
Ao Fernando,
Aos meus pais e
Aos amigos de jornada.*

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

(Cora Coralina)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sebastião R. Taboga (caríssimo Sebaça) pela orientação nesses quatro anos e, principalmente, pela oportunidade de amadurecimento profissional. A humildade, prontidão e amizade são sua marca e estas se refletem a cada dia no laboratório, tornando o convívio no mesmo extremamente agradável.

Aos membros que compuseram a pré-banca e banca examinadoras pelas preciosas colaborações para melhoria do trabalho: Prof. Dr. José Carlos Alessi, Profa. Dra. Silvana M. B. Artoni, Profa. Dra. Valéria H. A. C. Quitete, Prof. Dr. Fernandes F. Carvalho, Prof. Dr. Sérgio L. Felisbino, Profa. Dra. Renée L. Amorin, Prof. Dr. Edson R. Pimentel, Profa. Dra. Rejane Maira Góes.

Ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural nas pessoas de Profa. Dra. Maria Julia Marques e Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel pela dedicação atribuída aos alunos e à manutenção da exímia qualidade do programa.

Ao departamento de Biologia do IBILCE-UNESP, por disponibilizar o espaço físico para realização deste trabalho.

À Lílíam Panagio pela atenção dispensada sempre que solicitada e a presteza em auxiliar.

À Profa. Dra. Maria Luíza S. Mello pela gentileza de aceitar me orientar durante o Mestrado e ter possibilitado a oportunidade de ingresso na pós-graduação. Agradeço por ter despertado cada vez mais meu interesse pela pesquisa através do privilégio de seu convívio.

A Luiz Roberto Falleiros Jr pelo inigualável apoio técnico, amabilidade e “alto-astral” diários, os quais tornam o ambiente de trabalho sempre harmonioso.

Ao Sr. Domingos Zanqueta Neto (FAMERP - SJRP) pelos auxílios em técnicas imunocitoquímicas e disponibilidade em esclarecer dúvidas.

À Aline Targa pelas preciosas contribuições na realização da técnica TUNEL e por ser uma amiga maravilhosa.

À Fernanda Alcântara pelos auxílios na aplicação de testes estatísticos e pela forma carinhosa de auxiliar o próximo.

À Lara Corradi por estar sempre pronta a ajudar, principalmente nas correções das versões em inglês de artigos científicos.

A todos que fizeram e fazem parte do grupo de Biologia da Reprodução e Laboratório de Microscopia e Microanálise: Cristiani Zanetoni, Fernanda Alcântara, Lara Corradi, Ana Maria Custódio, Renato Cordeiro, Wellerson Scarano, Sérgio Marcelino, Patrícia Vilamaior, Lucilene Maschio, Mãe Pinto, Sabrina Rochel, Daniele Ribeiro, Fernanda Egídio, Marcela de Freitas, Rodrigo Leite, Daniel Souza, Guilherme Paladino, Ricardo Fochi, Manoel Biancardi, Flávia Dellela, Tatiana Tomiosso, Mirian Merighi, Cláudia Pacheco.

Ao CNPq por concessão de uma bolsa de estudos.

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos do coração: Lara Corradi, Cristiani Zanetoni, Wellerson Scarano e Aline Targa. Não há palavras para agradecer tudo o que vocês fazem por mim... Para vocês, o meu mais sincero obrigado e minha prece diária... “Quantas injustiças podem ser esquecidas no abraço de um amigo. A amizade é o mais perfeito dos sentimentos porque é livre...” (Rousseau e Lacordaire).

À Mãe, Sabrina e Daniele por estarem sempre dispostas a ajudar, seja em uma rotina laboratorial ou em uma saída para um bate-papo descontraído...

À Profa. Dra. Maria Astride Corradi pelos gentis convites para apresentação de palestras e o carinho e atenção maternos sempre dispensados.

Aos queridos tios Miguel e Elisa Germano por toda força e incentivo constantes.

À tia Olga Pegorin por suas preces diárias e indescritíveis carinho e bondade.

Ao meu pai Jair de Campos por desde cedo ter me dado liberdade para seguir meu caminho de escolha, por respeitar todas as minhas decisões e me amar do jeito que sou.

Ao Fernando meu grande amor, por ser meu porto seguro... Por cuidar de mim e por não medir esforços para tornar nossos sonhos realidade.

A Jesus por guiar meus passos diários...

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract	10
Introdução.....	12
Próstata: Morfogênese, Estrutura e Fisiologia	12
Andrógenos e interações entre epitélio e estroma na próstata.....	15
Próstata e Envelhecimento.....	17
Câncer de Próstata.....	20
Modelos experimentais para estudo de câncer de próstata.....	23
Objetivos.....	27
Artigos.....	28
<i>Artigo 1 - Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development.....</i>	28
<i>Artigo 2 - Histopathologic lesions in the ventral prostate microenvironment of old gerbil (Meriones unguiculatus).....</i>	56
Conclusões Gerais.....	92
Referências Bibliográficas.....	94

RESUMO

Há um grande interesse em melhor compreender a biologia da próstata devido à sua alta propensão em desenvolver lesões proliferativas, estando entre as mais comuns neoplasias que acometem o homem na atualidade. Entre os fatores de risco que contribuem para o aumento destas doenças destaca-se o envelhecimento, período em que ocorrem acentuados desequilíbrios hormonais. Vários grupos de pesquisa vêm tentando desenvolver, caracterizar e validar modelos roedores para análise do câncer de próstata sob diferentes aspectos e, modelos autóctones, têm desempenhado papel relevante nesse campo. Neste trabalho foi realizada a avaliação do comportamento biológico da próstata ventral do roedor gerbilo (*Meriones unguiculatus*) em fases distintas de seu desenvolvimento pós-natal. Em uma primeira etapa caracterizou-se através de análises morfológicas (estruturais e ultra-estruturais) e quantitativas os componentes celulares dos compartimentos epitelial e estromal, bem como o papel funcional de suas populações celulares na glândula. Para tanto foram utilizados gerbilos jovens, adultos e velhos. Considerando a próstata de animais jovens, constatou-se que nestes a glândula encontra-se estrutural e funcionalmente imatura. Já em animais adultos e velhos a atividade sintética está bem estabelecida e permanece estável nestas duas idades. Entretanto, a morfologia prostática em animais velhos apresentou-se diferenciada. Em uma mesma glândula puderam ser constatadas regiões funcionais com epitélio secretor semelhante aos adultos e, em outras, áreas completamente alteradas, dispendo de lesões histopatológicas. O comportamento prostático nas três fases do desenvolvimento analisadas foi diretamente influenciado pelos níveis de testosterona no soro, comprovando a importância desse andrógeno para homeostase e funcionalidade glandular. E, em animais velhos, o declínio de testosterona esteve associado a alterações proliferativas na glândula. Devido a essas constatações em uma segunda etapa, avaliou-se, exclusivamente, a próstata de animais velhos com o intuito de se caracterizar os principais tipos de lesões que podem acometê-la. As alterações mais frequentes foram de origem epitelial, como as neoplasias intra-epiteliais (PIN), carcinomas microinvasivos e adenocarcinomas. O potencial invasivo das células anômalas pôde ser comprovado ultra-estruturalmente através da ruptura da membrana basal em alguns ácinos. No estroma,

hiperplasia celular, quando constatada, esteve sempre associada a sítios de epitélio anômalo. Adicionalmente, uma maior deposição de fibrilas de colágeno (gerando fibrose estromal) foi encontrada em todos gerbilos velhos analisados. Parâmetros nucleares e nucleolares somente não foram efetivos para diagnosticar o potencial de severidade das alterações. Os índices de proliferação e morte celular, porém indicaram maior *turnover* celular à medida que alterações histopatológicas tornaram-se invasivas. A partir destes dados constatou-se que o gerbilo é um bom modelo para análise do comportamento prostático em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. Adicionalmente, o animal velho tem alta propensão em desenvolver alterações prostáticas espontâneas e estas podem auxiliar na melhor compreensão da evolução biológica do câncer prostático humano propriamente.

ABSTRACT

There is a great interest in understanding the prostate biology due to its high propensity in developing proliferative lesions. At the present time, this kind of illness is one of the most common neoplasias which may damage men. Among the risk factors that contribute to the prostate cancer increase stands out aging, period when an accentuated hormonal unbalances happens. Several research groups are trying to develop, characterize and validate rodent models for analysis of the prostate cancer and, autochthonous models have been playing a relevant role in these aspects. In the present work, the biological behavior evaluation of the ventral prostate of gerbil rodent (*Meriones unguiculatus*) was accomplished in three different phases of postnatal development. Initially, the cellular components of epithelial and stromal compartments, as well as, the functional activity of those cellular populations in the gland were characterized through morphologic (structural and ultrastructural) and quantitative analyses. For this, young, adult and old gerbils were employed. Considering the prostate of young animals, it was verified that the prostate gland is structural and functionally immature. In adult and old animals the synthetic activity is well established and remained stable. However, in old animals, the prostatic morphology presented alterations. In a same gland it could be observed functional areas with a secretor epithelium similar to adults and regions completely modified, exhibiting histopathologic lesions. The prostatic behavior in the three phases of development was influenced directly by the serum testosterone levels, proving the importance of this androgen for glandular homeostasis and its functionality. In the old animals the testosterone decline was associated to the proliferative alterations presented in the gland. Because of these results, in a second stage of experiments, it was evaluated only the prostate of old animals with the purpose of characterizing the main types of lesions which may be develop in these gerbils. The most frequent changes noted were those originated in the epithelium, as the prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), microinvasive carcinomas and adenocarcinomas. Ultrastructurally, the invasive potential of anomalous cells could be confirmed by the basement membrane disrupted noted in some acini. In the stroma, the cellular hiperplasia, when verified, it was always associated to the anomalous epithelium sites. Additionally, a

larger deposition of collagen fibrils, which generates stromal fibrosis, it was found in all old gerbils analyzed. Nuclear and nucleolar parameters were not effective in diagnosing the severity potential of those alterations. The cellular proliferation and death indexes, however, indicated a larger cellular turnover according as the histopathologic lesions become invasive. Concluding, these analyses allow confirming that the rodent gerbil is a good model for prostate behavior analysis in different phases of postnatal development. The old animal revealed a high propensity in developing spontaneous prostatic alterations and these changes may help to comprehend the natural course of the neoplasia's multistep and its biological behavior, contributing to a better understanding of the human prostate cancer.

INTRODUÇÃO

Próstata: Morfogênese, Estrutura e Fisiologia

Todos os mamíferos machos adultos possuem pelo menos um par de glândulas acessórias ao seu trato reprodutor. Estas são nomeadas de acordo com sua estrutura, posicionamento anatômico e função nos indivíduos (Price, 1963). Dentre tais glândulas, as de maior importância morfo-funcional para estudos comparados são a próstata e a vesícula seminal, as quais são responsáveis pela formação das secreções seminais, liberadas durante a ejaculação (Hayward et al., 1996a; Kirby et al., 1996). A próstata é responsável pela produção de nutrientes e gradientes iônicos e de pH ótimos para os espermatozoides no fluido seminal (Untergasser et al., 2005).

Essa glândula circunda a uretra na base da bexiga e, em humanos corresponde a uma estrutura túbulo-alveolar com atividade secretora principalmente ligada à sua porção alveolar. Entremendo as porções glandulares há um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com células musculares lisas, as quais exercem papel contrátil durante a ejaculação (Ross et al., 1993). 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, o que favorece estudos referentes à homologia morfo-funcional entre diferentes espécies (Price, 1963; Karr et al., 1995).

Há um grande interesse em melhor compreender a biologia prostática devido à sua alta propensão em desenvolver tumores malignos, estando entre as mais comuns neoplasias que acometem o homem na atualidade (Bonkhoff e Remberger, 1996; Abate-Shen e Shen, 2000). Entre os fatores de risco que contribuem para o aumento da incidência de alterações patológicas prostáticas destaca-se a maior longevidade humana (Lee et al., 1997; Taplin e Ho, 2001; Schulz et al., 2003).

O crescimento e desenvolvimento da próstata iniciam no período fetal e se estendem até que a maturidade sexual seja atingida (Cunha et al., 1986; Marker et al., 2003). A morfogênese glandular tem origem a partir do seio urogenital (uretra prostática), ou seja,

uma estrutura composta de uma camada epitelial derivada da endoderme e envolvida por uma camada mesenquimal derivada da mesoderme (Marker et al., 2003). A formação da próstata inicia-se por volta do 17º dia de gestação em camundongos, 18º dia em ratos e entre a 9-10º semana em humanos (Thomson, 2001). Em roedores, inicialmente, surgem brotos prostáticos sólidos e, durante as três primeiras semanas após o nascimento, esse brotos alongam, ramificam e canalizam formando os ductos prostáticos (Sugimura et al., 1986; Hayward et al., 1996b).

A organogênese prostática é iniciada e dependente de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos fetais (Cunha et al., 1986; Thomson e Cunha, 1999; Thomson et al., 2002), os quais masculinizam o trato reprodutor e conduzem à formação glandular (Thomson et al., 2001). Os efeitos androgênicos em células alvo resultam de uma interação do hormônio com receptores de andrógenos (AR) presentes nestas células (Cunha et al., 1986).

A expressão de AR no mesênquima da vesícula seminal e no seio urogenital é um dos eventos que possibilitam o desenvolvimento das glândulas do trato genital masculino (Hayward et al., 1996 a, b). O mesênquima urogenital expressa altos níveis desse receptor, enquanto que no epitélio, este é praticamente indetectável durante esse período. A expressão de fatores de crescimento parácrinos pelo mesênquima, também é responsável pela morfogênese glandular e crescimento das células epiteliais na próstata em desenvolvimento. Durante a maturação do órgão, o AR começa a ser expresso pelas células epiteliais e, na próstata madura, células epiteliais secretoras e estromais expressam este receptor (Schulz et al, 2003).

O epitélio prostático apresenta ao menos três tipos celulares distintos, os quais podem ser diferenciados por suas características morfológicas e significância funcional (Abate-Shen e Shen, 2000). As células luminais secretoras correspondem ao principal tipo celular, em seguida estão as células basais, localizadas entre as células luminais e junto à membrana basal e não são secretoras (Hayward et al. 1996b; Marker et al., 2003). O terceiro tipo corresponde às células neuroendócrinas, as quais aparecem em menor proporção e suas funções estão relacionadas, possivelmente, com a manutenção da homeostase da atividade secretora na glândula madura (Abrahamson, 1999). Esses três

tipos celulares componentes do epitélio prostático diferem quanto à sua regulação hormonal. E, são responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular, as quais são componentes do fluido prostático (Bonkhoff e Remberger, 1996; 1998).

Uma grande quantidade de estudos relaciona a origem das células epiteliais a um precursor celular comum proveniente de uma subpopulação de células basais (Bonkhoff e Remberger, 1998; Garraway et al., 2003; Litvinov et al., 2003). Nesses estudos preconiza-se que a camada de células basais abriga uma pequena população de *stem cells* com grande capacidade de auto-renovação e proliferação ilimitada. Adicionalmente, a via de diferenciação de células basais para células luminais seria um processo induzido por andrógenos (Bonkhoff e Remberger, 1996).

O estroma prostático é um arranjo complexo de células musculares lisas (SMC) e fibroblastos imerso em uma matriz extracelular, além de armazenar fatores de crescimento, moléculas regulatórias e enzimas remodeladoras associados (Tuxhorn et al., 2001).

Durante o desenvolvimento prostático, o mesênquima frouxo é gradualmente substituído por feixes de células musculares lisas (Droller, 1997). A diferenciação dessas células ocorre a partir da uretra em direção às extremidades dos ductos e, aparentemente, acompanha o desenvolvimento do epitélio, sendo um processo ordenado e dependente de andrógenos testiculares (Hayward et al., 1996a).

Na próstata adulta, os feixes de músculo liso circundam os ductos epiteliais e têm papel contrátil, promovendo a eliminação das secreções prostáticas no interior da uretra durante a ejaculação (Hayward et al., 1996a; Kirby et al., 1996).

As células musculares lisas e os fibroblastos são responsáveis, ainda, pela síntese dos componentes estruturais e regulatórios da matriz extracelular. Entre os elementos estruturais destacam-se as fibras de colágeno e elásticas, as quais conferem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, além de servirem como substrato para a ancoragem e migração celular (Tuxhorn et al., 2001; Vilamaior et al., 2005).

A morfogênese da próstata de roedores e de humanos ocorre de maneira análoga (Cunha et al., 2004a). Em ratos e camundongos a próstata é composta por quatro lobos distintos: anterior (também chamado de glândula coaguladora), dorsal, lateral e ventral.

Esses lobos compõem arranjos circunferenciais ao redor da bexiga e apresentam características particulares de ramificação de ductos e produção de secreções protéicas (Sugimura et al., 1986). Em um mesmo lobo, os ductos prostáticos apresentam heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, resposta a andrógenos, síntese e secreção de proteínas (Banerjee et al., 1998).

Em humanos, a próstata tem uma morfologia mais compacta, sem lobos distintos, sendo geralmente diferenciada em três zonas: central, de transição e periférica (McNeal, 1983). Em termos de homologia entre espécies, nota-se que o lobo ventral da próstata de rato corresponde à zona de transição da próstata humana e o lobo dorsal do rato à porção dorsal ou zona posterior da próstata humana. Os tipos de populações celulares são similares e, provavelmente, desempenham as mesmas funções fisiológicas, porém a distribuição relativa dessas populações varia entre as espécies (Imamov et al., 2004).

Em humanos as células epiteliais basais formam uma camada contínua entre as células secretoras e a membrana basal. Em camundongos, tais células são escassas e se distribuem de maneira descontínua (Marker et al., 2003). Quanto ao compartimento estromal há uma marcante diferença entre humanos e murinos uma vez que nos primeiros, o estroma fibromuscular é bem mais expressivo, possibilitando a união das zonas prostáticas em um órgão discreto (Roy-Burman et al., 2004). As vesículas seminais apresentam homologia estrutural e funcional em ambas as espécies (Slayter et al., 1994). Partindo dessas correlações morfo-funcionais podê-se, então, avaliar as respostas do epitélio ou mesmo de componentes estromais mediante a exposição a várias condições experimentais em diferentes modelos animais, podendo tais dados ser extrapolados para os humanos.

Andrógenos e interações entre epitélio e estroma na próstata

Os andrógenos são requeridos nas atividades funcionais e crescimento normal da próstata mantendo, portanto, a homeostase do órgão (Cunha et al., 1986; Banerjee et al., 2000; Taplin e Ho, 2001; Debes e Tindall, 2002). A produção de andrógenos está sob controle endócrino, sendo regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Debes e

Tindall, 2002). Em humanos, o principal andrógeno é a testosterona, com as células de Leydig dos testículos produzindo mais de 95% e a glândula adrenal menos de 5% desse esteróide sexual (Hsing et al., 2002). Somente a testosterona livre é hábil para entrar nas células prostáticas e esse processo ocorre por difusão passiva (Ruijeter et al., 1999), uma vez que, mais de 90% desta é convertida no principal andrógeno prostático, a dihidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5- α -Redutase tipo 2 (Hsing et al., 2002).

Essa enzima é expressa pelas células epiteliais basais e fibroblastos estromais (Untergasser et al., 2005). Caso haja um bloqueio na conversão de testosterona para DHT durante o desenvolvimento prostático ocorre uma acentuada redução na morfogênese e crescimento do órgão (Marker et al., 2003), ou até mesmo importantes modificações no estroma dos indivíduos adultos quando tratados com o inibidor desta enzima (Corradi et al., 2004). Em indivíduos com deficiência no gene para 5- α -Redutase, a próstata é pequena ou não detectável (Heinlein e Chang, 2004).

As funções de testosterona e DHT na próstata são mediadas por AR, os quais controlam respostas androgênicas distintas no epitélio e estroma (Wang, et al., 2001). Na ausência de hormônio esteróide, o AR mantém-se associado a proteínas *heat-shock*, porém quando a DHT liga-se ao domínio ligante de andrógeno, há dissociação das proteínas *heat-shock* e o AR é hiperfosforilado e dimeriza. Seu domínio de ligação ao DNA então se liga a genes de resposta a andrógenos, os quais estão envolvidos com o controle da divisão celular prostática (Galbraith a Duchesne, 1997).

As interações à curta distância entre o epitélio e a musculatura lisa ao seu redor, também são de importância fundamental durante a morfogênese do embrião e estão claramente envolvidas na manutenção do órgão no período pós-natal (Cunha et al., 1986, 2004b; Hayward et al., 1997). Quando o epitélio e mesênquima são experimentalmente separados durante o desenvolvimento prostático, a diferenciação de ambos tecidos é interrompida, evidenciando a necessidade de interações parácrinas recíprocas entre esses elementos para a perfeita organogênese glandular (Marker et al., 2003).

Embora a função dos andrógenos seja importante para a homeostase prostática, estes sozinhos são insuficientes para manterem-na. Tal processo também requer interações entre fatores de crescimento peptídicos e moduladores de crescimento que são regulados

por andrógenos ou por outras vias moleculares (Lee et al., 1997). Esses fatores são secretados por células epiteliais e estromais de maneira autócrina ou parácrina, atuando no controle de proliferação e morte celular, em ambos compartimentos celulares (Galbraith e Duchesne, 1997, Untergasser et al., 2001).

Por exemplo, fatores regulatórios produzidos por células epiteliais agem sobre os fibroblastos estromais de forma parácrina, estes em retorno, promovem o crescimento da matriz extracelular para suporte do epitélio funcional e, também, influenciam a proliferação e diferenciação epitelial (Untergasser et al., 2005). Assim, as famílias de fatores de crescimento que atuam na regulação prostática dividem-se em estimuladores da proliferação celular, promotores de diferenciação e invasividade e inibidores do crescimento (Lee et al., 1997).

Os hormônios estrogênicos também influenciam a estrutura e funcionalidade da próstata uma vez que, estes podem aumentar a expressão de genes de resposta a andrógenos. Adicionalmente, estes hormônios parecem estar envolvidos com o controle da proliferação celular e carcinogênese prostática (Fujimoto et al., 2004; Harkonen e Makela, 2004).

O estrógeno é sintetizado via aromatização de andrógenos pela enzima aromatase (produto do gene CYP19) (O'Donnell et al., 2001; Risbridger et al., 2003). Em relação à presença intraprostática desta enzima, ainda, existem dados conflitantes. Porém, o estroma parece ser o principal alvo de ação estrogênica. Receptores de estrógenos (ER) são encontrados no epitélio (ER- β) e no estroma (ER- α) prostáticos, indicando uma ação direta desse hormônio na glândula (Royuela et al., 2001; Imamov et al., 2004). Acredita-se, também, que estrógenos influenciem o crescimento prostático indiretamente por ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o que resulta na supressão de produção de testosterona testicular por *feedback* negativo (Risbridger et al., 2001; Bianco et al., 2002).

Próstata e Envelhecimento

Em células epiteliais da próstata humana há uma baixa, porém balanceada taxa de proliferação e morte celular (<0.20% dia), o que resulta em um estado estável do órgão

sem crescimento líquido, com as células sendo renovadas continuamente (Berges et al., 1995; Imamov et al., 2004). Porém, durante o envelhecimento, alterações histológicas proliferativas ocorrem nessa glândula, possivelmente, em resposta a um desequilíbrio hormonal que se instala no organismo. Entre os fatores promotores desse evento está um acentuado declínio de testosterona no soro (Krieg et al., 1993; Bonkhoff e Remberger, 1996; Abate-Shen e Shen, 2000; Banerjee et al., 2000; Roy-Burman et al., 2004).

Em humanos, as lesões prostáticas mais comuns são a Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) e o câncer de próstata (McEntee et al., 1996; Droller, 1997; Meikle et al., 1997; Bonkhoff e Remberger, 1998; Banerjee et al., 2001; Leav et al., 2001). A BPH caracteriza-se por uma predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida. O câncer de próstata, em contraste, é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997).

Enquanto muitos carcinomas prostáticos retêm um padrão de crescimento baixo, aproximadamente, um terço torna-se invasivo localmente ou produz metástases, expandindo-se para os linfonodos locais e órgãos distantes como: ossos, fígado e pulmão (Schulz et al., 2003).

Alterações nos níveis endógenos de hormônios esteróides relacionados ao envelhecimento, também promovem alterações prostáticas em outras espécies de mamíferos. Em ratos Brown Norway velhos o crescimento espontâneo da próstata é confinado aos lobos laterais e dorsais, sendo, portanto, lobo-específico (Banerjee et al., 1998). Adicionalmente, diferenças na regulação da expressão de AR entre os lobos e alterações nos níveis destes com o envelhecimento podem contribuir para o desenvolvimento de hiperplasias nessa linhagem de rato (Banerjee et al., 2001).

Em cães também há uma propensão correlacionada com o envelhecimento ao aparecimento de lesões proliferativas espontâneas na próstata (Leav et al., 2001), bem como em primatas não-humanos (McEntee et al., 1996).

Em alguns homens a BPH é uma doença progressiva, caracterizada por um aumento prostático contínuo, podendo levar à retenção urinária e até intervenção cirúrgica. Essa hiperplasia ocorre na zona de transição prostática e áreas periuretrais, podendo

acometer mais de 80% dos homens com mais de 80 anos. Análises estereológicas indicam que o volume relativo do estroma em BPH aumenta 33% em relação ao da próstata normal (Marcelli e Cunningham, 1999).

O fator envelhecimento no desenvolvimento desta hiperplasia pode ser considerado um evento cumulativo, resultante da interação contínua entre fatores intrínsecos e extrínsecos à próstata (Lee et al., 1997). Os mecanismos que possibilitam o desenvolvimento de BPH não estão bem estabelecidos, entretanto sabe-se que estes dependem de andrógenos, em particular, a DHT. Os níveis deste hormônio, ao contrário da testosterona, permanecem constantes ao longo da vida do homem (Carson e Rittmaster, 2003).

No estroma prostático há um aumento na proporção estrógeno / andrógeno com o aumento da idade, tanto em homens normais como com BPH. Esse aumento pode ser devido à conversão de testosterona em estrógeno ou de androstenediona em estrona. Embora essas observações não sejam efetivas para predizer uma função do estrógeno no desenvolvimento de BPH, são sugestivas de um potencial patológico desse hormônio para a glândula (Krieg et al., 1993).

Além disso, o aumento do volume prostático na BPH, é causado por hiperplasia celular com aumento da sobrevivência de células estromais e redução de apoptose (Claus et al., 1997; Marcelli e Cunningham, 1999, Untergasser et al., 2005). A ruptura da homeostase entre proliferação e morte celular poderia surgir por alteração na resposta do AR ao ser estimulado pela DHT e/ou perturbações nos níveis ou função de fatores de crescimento que são mediados pela DHT (Carson e Rittmaster, 2003). Em culturas de células estromais de próstata humana, a porcentagem de células musculares lisas aumenta e a forma destas muda com o aumento da idade do doador (Sensibar et al., 1999).

Câncer de Próstata

Normalmente, o câncer de próstata humano inicia-se nas glândulas da zona periférica e retém algumas estruturas glandulares (Schulz et al, 2003). O envelhecimento é considerado o fator de risco mais importante no desenvolvimento desse tipo de lesão (Abate-Shen e Shen, 2000). Esta é uma doença com grande heterogeneidade, englobando a existência simultânea de entidades patológicas múltiplas como neoplasia intra-epitelial (PIN), adenocarcinomas dependentes e independentes de andrógenos e lesões metastáticas em um mesmo tecido (Tang e Porter, 1997; Lucia et al., 1998; Bostwick et al., 2000).

Em sua fase inicial a lesão prostática caracteriza-se por um acúmulo de alterações genótípicas e fenotípicas no epitélio (Cunha et al, 2004a). Esses processos resultam em sítios de desordens proliferativas, caracterizados por espessamento da camada de células basais e secretoras, originando a PIN (Bonkhoff e Remberger, 1998).

As taxas de proliferação frequentemente permanecem baixas tanto em PIN como em carcinoma. Assim como em BPH, o aumento no número de células resulta da redução de morte por apoptose (Banerjee et al., 1995; Lin et al., 1997; Tang e Porter, 1997; Leite et al., 1999; Taboga et al., 1999; O'Neill et al., 2001).

Banerjee e colaboradores (2000), observaram uma diminuição significativa na incidência de apoptose nos lobos prostáticos de ratos Brown Norway castrados com o decorrer do envelhecimento. Adicionalmente, células epiteliais degeneradas, que eventualmente “escapem” de sofrer apoptose, podem acumular mutações e, tornarem-se insensíveis a sinais anticrescimento, adquirindo um potencial replicativo ilimitado, compondo a base para o estabelecimento de neoplasias (Hanahan e Weinberg, 2000).

O desequilíbrio entre taxas de proliferação e apoptose celular tem sido considerado um fator chave na compreensão da carcinogênese (Berges, et al., 1995; Claus et al., 1997; Kyprianou et al., 2000; Xie et al., 2000). Ainda não se conhece se a habilidade para sofrer apoptose declina em toda e qualquer situação em células prostáticas com o envelhecimento. Porém, as características de crescimento do câncer de próstata sugerem uma maior resistência a esse processo de morte pelas células tumorais (Schulz et al., 2003).

Uma grande quantidade de pesquisas aponta a PIN de alto grau como precursora do câncer de próstata. As evidências são baseadas na análise de modelos animais, estudos epidemiológicos, genéticos e moleculares (Steiner, 2003). Tem sido proposto que as PINs surjam nos ácinos e se expandam para o interior dos ductos, dando a impressão que estas tenham origem ductal (Leav et al., 2001).

A perda da capacidade de síntese de proteínas formadoras de hemidesmossomos e moléculas adesivas por células epiteliais transformadas, constitui um evento importante na progressão da PIN para câncer invasivo (Bonkhoff e Remberger, 1998).

O estroma tem um papel ativo nas lesões proliferativas criando um microambiente que favorece o crescimento do carcinoma e fornece subsídios para este se tornar invasivo, através da quebra e remodelagem da matriz extracelular (Tuxhorn et al., 2001). Em tumores malignos, o estroma está associado a melhorias no suprimento vascular, nutrição celular, trocas gasosas e controle de resíduos (Morrison et al., 2000).

Estudos sugerem que as células transformadas da PIN promovam a ativação do estroma adjacente, induzindo alteração fenotípica e funcional nas células desse compartimento (Tuxhorn et al., 2002). Wong e Tam (2002), analisaram o comportamento estromal em próstatas de ratos Noble durante a carcinogênese e, constataram que uma acentuada “desdiferenciação” das células musculares lisas está relacionada com o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Tal evento ocorre devido à incapacidade do epitélio prostático transformado em manter a diferenciação normal das células musculares lisas adjacentes e, estas então, tornam-se “desdiferenciadas”. Assim, a sinalização da camada muscular sobre o epitélio também ficaria aberrante, resultando em perda do controle inibitório sobre a proliferação epitelial e, conseqüentemente, promoção da carcinogênese. Por esses estudos pode-se constatar que o estroma é uma parte integrante do tumor e contribui para algumas das características mais destrutivas de células transformadas e, sob algumas condições, esse compartimento pode exercer uma força dominante sobre o fenótipo maligno (Matrisian et al., 2001).

O câncer de próstata e a BPH são lesões multifatoriais, envolvendo um crescente número de fatores bioquímicos, genéticos e epigenéticos (Bonkhoff e Remberger, 1998). Em relação aos componentes genéticos, pode haver seleção de genes capazes de modificar

a expressão ou função de elementos controladores do crescimento e diferenciação celular (Bostwick et al., 1996).

Mutações no gene supressor de tumor p53 (Leite et al., 1999), aumento da expressão de reguladores apoptóticos como bcl-2 (Lu et al., 1996), alteração na expressão de caspases (O'Neill, 2001) aparecem como fortes candidatos ao favorecimento do crescimento tumoral por inibição da via apoptótica. A fração de aumento celular na lesão, geralmente é avaliada pela expressão de marcadores nucleares de proliferação como Ki-67 e/ou antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Botticelli et al., 1998; Xie, et al., 2000; Banerjee et al., 2001). A expressão aumentada do gene supressor apoptótico Bcl-2 foi encontrado em 20 % do epitélio secretor de PIN de alto grau em humanos.

A elevação na sobrevivência de células transformadas promove um ambiente de possível ocorrência de instabilidade genética, a qual poderia induzir a progressão para um fenótipo invasivo (Bonkhoff e Remberger, 1996; Bonkhoff et al., 1998). Apesar de muitos avanços nos estudos referentes ao câncer de próstata nos últimos anos, várias questões sobre a base celular e molecular desse processo de desordem proliferativa permanecem não compreendidas (Bonkhoff e Remberger, 1998).

Um ponto crucial na compreensão do potencial maligno do câncer de próstata é a sua capacidade de desenvolver independência a andrógenos (Schulz et al., 2003). Tentativas para explicar tais vias, normalmente residem na avaliação do comportamento de AR prostático, considerado o principal envolvido na aquisição de independência androgênica por tumores. A ativação desse receptor tanto na próstata normal como neoplásica conduz a eventos proliferativos, apoptóticos e angiogênicos. AR são expressos em quase todas as lesões tumorais, nos vários estágios da carcinogênese e, mesmo tumores independentes de andrógenos expressam esse receptor (Marcelli e Cunningham, 1999; Ruijter et al., 1999, Litvinov et al., 2003, Scher et al., 2004).

As vias de aquisição de independência a andrógeno podem incluir alterações na atividade do AR, função e/ou especificidade. Uma possibilidade é que a função do AR torne-se sensível a baixos níveis de andrógenos residuais (Abate-Shen e Shen, 2000). Mutação e amplificação do gene para esse receptor parecem ser freqüentes, bem como,

regulação do crescimento prostático por vias independentes dele (Marcelli e Cunningham, 1999).

A ativação de AR no núcleo de células musculares lisas estromais é um outro importante fator na progressão do câncer. Enquanto a expressão de certos fatores de crescimento é inibida por ativação de AR estromal, a secreção de fatores de crescimento peptídicos induzida por andrógenos influencia a diferenciação, proliferação ou sobrevivência de células epiteliais (Litvinov et al., 2003).

A supressão de andrógenos representa uma importante estratégia para o tratamento do câncer de próstata, com redução nos níveis de Testosterona e DHT. Esse evento pode ser realizado por orquiectomia (castração cirúrgica) e/ou administração de drogas antiandrogênicas (Ruijter et al., 1999). Porém, essa terapia pode conduzir ao desenvolvimento de células insensíveis a andrógeno, as quais são resistentes aos sinais apoptóticos e resultam em doença metastática (O'Neill, 2001).

Embora esteja evidente que o câncer de próstata surja no compartimento epitelial, a identificação do subtipo celular específico que inicia o processo carcinogênico tem recebido maior atenção recentemente. Em PIN e câncer de próstata as células possuem aspectos morfológicos e fenotípicos de células secretoras (expressão de citoqueratinas 8 e 18, PSA, AR), porém também contêm aspectos de células basais, como uma intensa auto-renovação (Litvinov et al., 2003). Para Bonkhoff e Remberger (1996), o câncer prostático é um tumor monoclonal, derivado de *stem cells* transformadas localizadas na camada de células basais, as quais adquirem características secretoras por estímulo androgênico. Porém, vários focos de carcinoma e PIN podem ser encontrados em uma mesma próstata, com variações no grau de displasia celular, desorganização tecidual e, possivelmente, alterações genéticas (Schulz et al., 2003).

Modelos experimentais para estudo de câncer de próstata

Uma deficiência no campo da pesquisa do câncer de próstata é a falta de sistemas modelos que permitam sua investigação acurada (Shirai et al., 2000; Wang et al., 2001; Schuz et al., 2003). Vários grupos vêm tentando desenvolver, caracterizar e validar

modelos de murinos que melhor representem os aspectos bioquímicos e patológicos do câncer de próstata humano e, modelos autóctones, têm desempenhado um papel essencial nesse campo de pesquisa (Huss et al., 2001). Porém, o desenvolvimento de câncer espontâneo em animais experimentais tem sido um evento raro que ocorre em baixa incidência e, sob longo período de latência (Pollard e Luckert, 1986a; 1987; 1992; 1994).

Ainda assim, esses estudos são necessários, uma vez que permitem a análise do processo natural dos múltiplos eventos neoplásicos, podendo estes ser avaliados sem a necessidade de exposição a agentes químicos (Shirai et al., 2000). Somado a isso, vários experimentos envolvendo recombinação entre tecido prostático humano e de roedor são capazes de desencadear a formação da próstata, sustentando a viabilidade da utilização de modelos roedores para estudos dessa glândula em humanos (Abate-Shen e Shen, 2000).

Modelos submetidos as mais diversas condições experimentais também têm elucidado vários questionamentos a respeito do comportamento prostático. Alguns exemplos a serem destacados, em linhagens de ratos são os trabalhos de Pollard e Luckert com carcinógenos (1986b; 1987), tratamentos hormonais (Pollard e Luckert, 1986a, Carvalho et al., 1996, 1997), castração (Banerjee et al., 1995). A construção de modelos de camundongos transgênicos (Greenberg et al., 1995) e *knock-out* (Xu et al, 2000) com propensão ao desenvolvimento de doenças prostáticas, bem como cultura de células genotipicamente alteradas (Wang et al., 2001), também têm se mostrado como fortes aliados na compreensão da carcinogênese prostática em nível genético e molecular.

Nosso grupo de pesquisa adotou como modelo experimental para o estudo da próstata o gerbilo *Meriones unguiculatus*. Esses animais também conhecidos como esquilos da Mongólia são roedores murídeos da subfamília Gerbillinae, provenientes das regiões áridas da China e Mongólia (Schwentker, 1963).

De anatomia similar à do rato e 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 valores próximos a 85 gramas (Kramer, 1964). Uma importante característica a ser considerada é que apresentam comportamento de micção pouco freqüente uma vez que, consomem mínimas quantidades de líquido. Esse parâmetro fisiológico facilita o processo de manutenção desses animais em cativeiro.

A morfologia prostática em gerbilos tem se mostrado semelhante à humana, no referente à compacidade e fusão de lobos (Zanetoni et al., 2001) (Figura 1). Adicionalmente, o modelo vem apresentando respostas significativas quanto a tratamentos hormonais (Santos et al., 2003), drogas contra hiperplasia prostática humana (Corradi et al., 2004), bem como, desenvolvimento de neoplasias espontâneas associadas ao envelhecimento, sendo que as últimas instalam-se de forma autóctone (Zanetoni et al., 2001). Porém, pouco é conhecido sobre o desenvolvimento e comportamento da glândula prostática desses animais em fases distintas do desenvolvimento pós-natal. Situação semelhante ocorre quanto a lesões histopatológicas prostáticas associadas ao envelhecimento.

Embora pesquisas envolvendo estudos moleculares e genéticos tenham evoluído, consideravelmente, aumentando o conhecimento sobre diversos aspectos do câncer prostático, ainda não há dados efetivos, quanto ao comportamento celular desse tipo de lesão. Além disso, o crescente reconhecimento da importância das relações entre epitélio e estroma, torna necessária a avaliação aprofundada das interações interteciduais prostáticas.

Partindo do pressuposto que o câncer prostático é uma doença relacionada com o envelhecimento, estudo detalhado em modelo animal que apresente espontaneamente esse tipo de lesão poderá trazer informações auxiliares na compreensão do comportamento neoplásico, bem como, novas perspectivas no estudo da biologia do câncer propriamente dito.

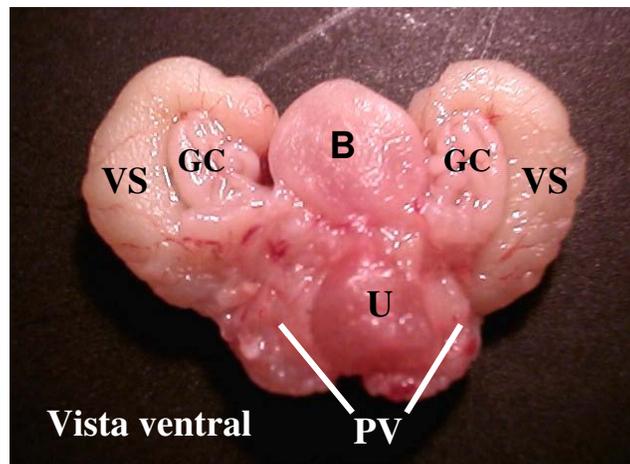
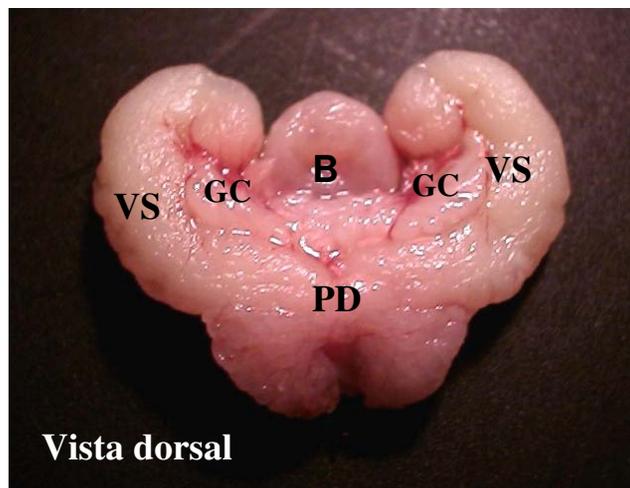


Figura 1. Gerbilo adulto e sua próstata, a qual se divide em lobos dorsais (PD), lobos ventrais (PV), lobos anteriores ou glândula coaguladora (GC). Podem também ser visualizadas: a bexiga (B), vesícula seminal (VS) e a uretra (U) (reproduzido com permissão de Taboga, SR).

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

⇒ 1. Avaliar fenotipicamente e por quantificação os componentes epiteliais e estromais do microambiente prostático do gerbilo em três fases distintas do desenvolvimento pós-natal (jovem, adulto e velho),

⇒ 2. Caracterizar as alterações histopatológicas na próstata ventral do animal velho por métodos histomorfométricos e ultra-estruturais.

ARTIGOS

ARTIGO 1.

**Biological behavior of the gerbil ventral prostate in
three phases of postnatal development**

Anatomical Record in press

Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development

Silvana Gisele Pegorin de Campos¹

Cristiani Zanetoni¹

Rejane Maira Góes²

Sebastião Roberto Taboga^{2*}

¹Department of Cell Biology – Institute of Biology - UNICAMP, CP 6109 - 13084-971 - Campinas, SP, Brazil

²Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology - IBILCE/UNESP, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

***Correspondence to:**

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

Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth,

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

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

Running title: Biological behavior of gerbil's prostate

Funded by:

Brazilian National R & D Council (CNPq), CAPES and São Paulo State Research Foundation (FAPESP)

ABSTRACT

In this study we characterized the gerbil's ventral prostate histology, ultrastructurally and quantitatively throughout of three phases of postnatal development (young, adult and old) in order to better comprehend its biological behavior and propensity to developing spontaneous lesions with aging. The gerbil prostate is composed of alveoli and ducts immersed in a stroma composed of smooth muscle, fibroblasts, collagen and elastic fibers and vessels. The prostate tissue components present morphological and quantitative aspects which vary according to age. Young animals have an immature gland with modest secretory activity. Synthetic activity remained stable in adult and old gerbil, however prostatic morphology was altered in the aging, showing an increased epithelium and stromal fibrosis. The nuclei of the secretory cells increased with aging, whereas nucleoli presented few alterations during postnatal development. The epithelial proliferation and stromal remodeling noted in this study indicate that the gerbil prostate may respond to the androgen declines typical of senescence, through epithelial proliferation and stromal remodeling.

Keywords: gerbil, ventral prostate, epithelium, stroma, proliferative lesions, aging.

INTRODUCTION

The prostate is a male accessory sex gland which, together with the seminal vesicle, produces the bulk of the seminal fluid. It is composed of two distinct compartments, the epithelial and the stromal or mesenquimal (Hayward et al., 1996). Prostatic morphogenesis is initiated in the fetal stage from the urogenital sinus, and lasts until sexual maturity is fully obtained. The growth and development of the prostate are dependent on circulating androgens produced by the testes, and its homeostatic state during adult life is maintained by these steroid hormones, which act via stromal-epithelial interactions (Cunha et al., 1986; Marker et al., 2003). Thus, when the prostate attains adult size, a balance between cell proliferation and cell death is established so that no further growth occurs in the gland (Banerjee et al., 2000; 2001). However, during aging in man and several other species, including the dog and some strains of rodent, cellular hyperplasias may occur, despite a decrease in the production of sex hormones such as testosterone, generating age-dependent prostatic hyperplasias (Bonkhoff and Remberger, 1998; Banerjee et al., 2001; Leav et al., 2001). These alterations may evolve into prostate cancer, a disease that affects men throughout the world, which takes the form of a lesion with heterogeneous behavior which is still poorly understood. For this reason recent decades have witnessed a growth in interest in both the morphology and behavior of the prostate during its normal development and in different disorders that target this gland during senescence.

A number of animal models, particularly murines, have been used for prostate study. These studies have examined significant similarities and differences in the gross and microscopic anatomy between the rat, mouse and human prostate, and have analyzed the potential of these models to recapitulate human prostatic disease (Huss et al., 2001; Roy-Burman, et al., 2004). The rodent prostate complex is composed of four distinct paired lobes, the ventral, lateral, dorsal and anterior, each of which serves a particular function in relation to histology and secretory protein production (Sugimura et al., 1986). The morphology of the human prostate is more compact, without distinct lobes, and is divided in to three zones: central, transitional and peripheral (McNeal, 1983).

Some murine species of the subfamily Gerbillinae have been utilized as models for studies of the male reproductive tract. Among them, stand out *Praomys natalensis* (Gross and Didio, 1987), *Psammomys obesus* (Sprando et al., 1999), *Meriones unguiculatus* (Williams, 1974), the last species being known as the Mongolian gerbil.

The gerbil's prostate has a similar morphology to that of the human gland with respect to the fusion of its lobes in a compact structure, unlike the prostate of mice and rats. However, more specific data on the prostate of these murines has not been found in current literature. It is therefore of interest to know more about the prostate structure of this animal, especially since, although several rodent models exist for the study of the normal morphological aspects and proliferative alterations in the prostate, at this moment, none is completely effective in representing aspects of human prostate cancer (Bostwick et al., 2000; Shirai et al., 2000; Wang et al., 2001).

In the present study we characterized the histological, ultrastructural and quantitative behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development (young, adult and old). Our goal was to improve our understanding of prostate biology in this animal species, besides its propensity to develop spontaneous lesions with aging.

MATERIALS AND METHODS

Animal and sample preparations

Male gerbils, being 10 young with 48 ± 15.9 days (mean age), 10 adults (112 ± 27.7 days) and 10 old (18 ± 5.4 months) animals were housed under conventional conditions (25°C, 40-70% relative humidity, 12h light/12h dark) and allowed access to chow and water *ad libitum*. The animals were placed in a chamber with CO₂ gas prior to sacrifice. After this, the entire prostatic complex was excised and the ventral prostate removed and cut into fragments. For light microscopy, the samples were fixed for 24h in Karnovsky solution (0.1M Sørensen phosphate buffer, pH 7.2, containing 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde). After fixation the material was dehydrated in

graded ethanol series and the embedding was performed in glycol methacrylate resin (LeicaTM historesin embedding kit).

Structural Analysis

The 3 µm histological sections were submitted to Hematoxylin-Eosin (H&E) staining for general morphological analysis, Gömöris reticulin staining for collagen and reticular fibers, Feulgen Reaction for nuclear phenotypes and AgNOR for nucleolus study. The microscopy analyses were performed with Zeiss-JenavalTM or OlympusTM photomicroscopes. The Image-Pro Plus software version 4.5 for WindowsTM software was used to digitize the images of each histological section.

Transmission electron microscopy (TEM)

Ventral prostatic fragments were fixed by immersion with 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer, pH 7.3 containing 0.54% glucose for 24 h (Cotta-Pererira et al., 1976). After washing with the same buffer, they were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 2 h, washed again, dehydrated in graded acetone series and embedded in AralditeTM resin. Ultrathin sections were cut using a diamond knife and contrasted with 2% alcoholic uranyl acetate for 30 min followed by 2% lead citrate in sodium hydroxide solution for 10 min. The samples were observed and evaluated with a LEO – ZeissTM 906 transmission electron microscope.

Quantitative analysis

Thirty random prostatic areas of each of the three phases of postnatal development staining by H&E sections were analyzed. The morphometric-stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 120 points and 60 test lines (Weibel, 1978) to compare the relative proportion (%) of the gland portions (glandular and stromal) and each prostatic tissue constituent (epithelium, lumen, non-muscular interacinar

stroma, smooth muscle cell and collagen subepithelial layer). For the morphometric analyses, 200 random measurements of the epithelium height and the thickness of the smooth muscle layer which surrounds each acinum were also obtained.

Caryometric evaluation was carried out using Feulgen Reaction-stained sections. Nuclear areas, perimeters and the form factor ($= 4\pi \cdot \text{nuclear area} / (\text{nuclear perimeter})^2$) parameter were determined for 200 nuclei of the epithelial secretory cells in each phase. The form factor parameter measures nuclear roundness in such a way that values < 1 are associated with nuclei which are more out rounded (Taboga et al., 2003).

Nuclei with the following numbers of nucleoli: 0 (no observed), 1, 2 and more than 2 were counted in 25 fields selected by group of animals. The absolute values found were converted into percentages. The nucleolus number/nucleus age ratio was calculated 30 area and perimeter measurements of nuclei and nucleoli simultaneously in each group were also taken. This parameter was adopted in order to verify whether the quantitative alterations suffered by the areas and nucleolar perimeters of the secretory cells were proportional to those suffered by the nuclei.

All measurements were obtained using the Image-Pro Plus™ program version 4.5 for Windows™.

Serum testosterone concentration

Blood samples were collected from each animal group. The serum was separated by centrifuge at 3.000 rpm and stored until assayed. Testosterone concentration was determined by automatic equipment (VITROS ECi-Johnson & Johnson™ Ultra-sensitive Quimioluminescent analysis) in a renowned clinical analysis laboratory, using specific reagents supplied by Johnson & Johnson Orthoclinical, USA. The sensitivity of this assay was 0.1-150.0 ng/ml.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Statistica 6.0 software (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). The ANOVA and Tukey HSD tests were applied and $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Prostate structure and ultrastructure

In postnatal phases, the gerbil prostate develops a branched alveoli and ducts resembling a tubulo-acinar gland. The stroma was composed of smooth muscle cells (SMC), collagen and elastic fibers and blood vessels (Fig. 1A, D and G).

In the young animal, the ventral prostate is an immature gland (Fig. 1A and B), composed of some acini still in the process of glandular modeling (Fig. 1B); the majority of the acini with defined ductal canalization and epithelial layer are arranged in such a way as to surround the narrow lumen (Fig. 1A). The epithelium is composed of voluminous cells with prominent nuclei occupying large portions of the cell (Fig. 1B and 2A). Ultrastructurally, the nuclear cromatin remains descondensed, suggesting synthetic activity. In the cytoplasm a relative scarcity of synthesis organelles, confirms the generally undifferentiated state of the epithelial cells (Fig. 2B). Specializations of the membrane, such as adherent junctions may be found uniting such cells and a basement membrane separates the epithelium from the stromal compartment (Fig. 2C and D).

The stroma of the young animal was composed of two cellular types: SMC and fibroblasts (Fig. 2A). Among the fibrilar elements of the extracellular matrix, collagen and reticular fibers are found in large quantities, forming a sustentation net for the prostate gland (Fig. 1C). Ultrastructurally, the collagen fibrils are accumulated at the epithelium base and dispersed throughout the stroma, including between SMC, being disposed in different directions (Fig. 2D, E, F and H). The SMC are arranged in an expansive layer around each acinus (Fig. 1A and B) and they also join in a differentiation process with a

nucleus and a dilated cytoplasm with low electron density and poor in contractile elements (Fig. 2F and G). The fibroblasts have a functional phenotype distributed at the base of the epithelium and among the muscle cells (Fig. 2A and E). Few elastic fibers were found to be associated with the cell surface of the fibroblasts (Fig. 2E) and/or involved in the SMC cytoplasmic process (Fig. 2H).

In the adult animal, the ventral prostate was recognized as a completely developed gland, with a wide acinar lumen, which indicates intense secretory activity, and with secretory epithelial cells (Fig. 1D) disposed in a simple columnar pattern (Fig. 1E). The epithelium, at the ultrastructural level, is composed of two cellular lineages, secretory and basal cells (Fig. 3A and B). The secretory cells remain in contact with the glandular lumen and have a cytoplasm with a well-developed rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria and secretion vesicles at the apical pole (Fig. 3A, C and D). Their nuclei are bulky, with uniform outlines and deposits of condensed chromatin in the peripheral region (Fig. 3B and D). The inconspicuous basal cells localized along the basement membrane, have a largely undifferentiated phenotype with no secretory bleb production (Fig. 3B).

The SMC acquire a fusiform phenotype shape, forming concentric layers and strongly packed layers around the acini with small intercellular spaces (Fig. 1D, E and 3F), which were occupied by collagen fibrils (Fig. 3F, H and I). The nuclei of the SMC usually accompany the shape of the cell and the cytoplasm are abundant in contractile filaments (Fig. 3G). The fibroblasts are located, preferentially, at the base of the epithelium (Fig. 3F) and, in some areas, their projections establish a close contact with SMC (Fig. 3H). The reticular fibers diminish accompanying the more slender pattern of the smooth muscle layer and, collagen fibers were found to form an approximately concentric subepithelial layer, as verified by the Gömöri method (Fig. 1F). Elastic fibers were observed to be bare and organized as short fibers associated with the collagen fibrils at the base of the epithelium (Fig. 3E) and/or deposited in the thicker layer around the muscle cells (Fig. 3I), maintaining contact with their membranes.

The prostate gland of the old animals was characterized by morphologically heterogeneous areas. In a single gland there were sites with a secretory epithelium

functionally (Fig. 1G, H and 4A) similar to that found in adult animals, with some secretory cells maintaining marked secretion liberation in their apex (Fig. 1H and 4C) while in others, there were altered sites with a hyperplastic increase in epithelial cells (Fig. 1I). In the latter case, infoldings of the epithelium into the luminal spaces could be observed and cells with phenotypic alterations (Fig. 1J), characterizing prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) (including pale cytoplasm and nuclear pleomorphism). In addition, secretory cells were observed to have fatty deposits distributed by the whole cytoplasm (Fig. 4B) and osmiophilic deposits resembling lipofuscin, indicative of cellular aging (Fig. 4C). The basal cells maintained their morphological characteristics and they also had lipofuscin-like and ceramide-like deposits (Fig. 4D). In senescence, the main alteration in the prostatic stroma was the fibrillar component remodeling of the extracellular matrix. This process involved a marked increase in the number of collagen fibers, which formed a wide subepithelial accumulation, including infoldings (Fig. 1H and L) and an increase in reticular fibers. This loose rearrangement contributed an alteration in the distribution of the muscular layer around many acini (Fig. 1L), but the majority of the SMC maintained their fusiform shapes (Fig. 1H). Some exhibited an irregular external outline, nuclear shrinkage and great mitochondria in the perinuclear area (Fig. 1F). The increase in the number and thickness of collagen fibrils among the SMC also contributed to a larger separation between them (Fig 4E and F).

Quantitative analysis

The data regarding quantitative analysis is set out in Tables 1 and 2.

As regards stereological parameters (Table 1), the proportions of the epithelial and stromal compartments of the ventral prostate in the young group were different from those of the other groups, because the glandular lumens were not so significant. At the same time, the proportion of the stromal compartment was greater due to the larger percentage of the non-muscular interacinar stroma and SMC. In the adult and senile phases, the prostate epithelial and stromal compartments were of similar stereological proportions. However, the percentages of epithelial tissue and the non-muscular subepithelial stroma (collagen

layer) increased significantly with aging while the non-muscular interacinar stroma decreased. The thickness of the epithelium and the smooth muscular layer varied significantly during development, the lowest measurements being found in the adult stage. The significant increase in these measurements during aging confirms the occurrence of glandular hyperplasia during this phase, a process verified by histochemical evaluation.

The area and perimeter nuclear values of the secretory cells (Table 1) showed that both measurements were significantly higher in young and old animals than in adults, which indicates a distinct degree of nuclear function in relation to age throughout development. As in the case of the other parameters analyzed, the nuclear measurements increased in the old animals, suggesting an increase and/or reincidence of secretory cell activity with the aging. The Factor Form value obtained was 0.7 in all three phases, indicating a circular form of the nuclei.

In all three phases, the majority of the secretory cell nuclei either had no evident nucleolus or exhibited nuclei with a single nucleolar corpuscle (Table 2). The young animals presented the largest percentages of nuclei, with two or multiple (more than two) nucleoli and, consequently, a larger mean number of nucleoli per nucleus in relation to the two other phases, indicating high proliferative activity. However, these parameters were not correlated proportionally by the area and perimeter nucleolar measurements (Table 1), and the total nucleolar area of the young group was smaller in relationship to that of the other two groups. The mean values of the perimeter and nucleolus/nucleus ratios for these parameters did not vary significantly throughout postnatal development, suggesting uniform functional behavior of these organelles in all three phases.

Serum testosterone levels varied significantly ($p \leq 0.05$) between young, adult and old animals, which confirmed an expected decrease in hormonal concentrations in the oldest group (Table 1).

DISCUSSION

The ventral prostate of the gerbil *Meriones unguiculatus* was evaluated morphologically and quantitatively throughout postnatal development. This gland structure,

as in other rodents, consists of two ventrolateral lobes adjoining the urinary bladder, attached to the urethra by a series of ducts, smooth muscle and connective tissue (Shirai et al., 2000; Suwa et al., 2001).

The prostate morphology of the young animals presented a distinct organizational pattern when compared to that of the adult and old animals. The quantitative analysis of the epithelial and stromal components, as well as of the thickness of the secretory epithelial and muscular layers, corroborated the existent morphological differences. At an age of between one and two months the prostate is an immature gland, with limited secretory activity. As in other mammals, the development, differentiation and activity of the prostate depend on androgens and interactions between the epithelial and estromal compartments (Banerjee et al., 2000; Cunha et al., 1986; Taplin e Ho, 2001). As the organogenesis of the gland occurs during periods of relatively low serum androgenic levels, which persist until puberty (Thomson, 2001), we wished to accompany prostate development from the beginning of postnatal life, under the effects of a low-hormone milieu.

Ventral prostate activity was found to be stable in adult and old animals. However, the general morphology of the gland was varied between those ages. In adults, the prostate was a completely functional gland with an intense amount of synthesis` organelles in the secretory cell cytoplasm and an accumulation of secretion products in the acinar lumen, which made this prostate component the most representative. The lower number of basal cells was dispersed in a discontinuous layer and exhibited a largely undifferentiated phenotype, as in other rodents. The specific function of the basal cells is still not clear, however several studies indicate them as prostate epithelial stem cell candidates (Garraway et al., 2003; Marker et al., 2003). Intermixed with the glandular portions was a conjunctive stroma, where smooth muscular cells enclosed each acinus individually. Together with the fibroblasts, these cells are related to the expulsion of acinar secretions during ejaculation and also, to the synthesis of structural and regulatory components of the extracellular matrix (Horsfall et al., 1994; Tuxhorn et al., 2001). Supporting the observed results, the stroma fibrillar components (collagen and elastic fibers) were connected to each other and also to the cellular components of the prostate, and probably serve the role of guaranteeing the structural integrity of this organ. These fibrils must also participate in SMC contraction

and elastic restoration during the normal functioning of the gland (Carvalho et al., 1997). The most significant difference between the human and the murine prostate is that, in humans, there are significantly more fibromuscular stroma while, in mice the glands are surrounded by a loose connective tissue (Roy-Burman et al., 2004). The gerbil's fibromuscular stroma was also looser, however the participation of the stromal elements in gerbil prostatic development and functionality is similar to that of the stromal components in the human prostate. As observed by Thomson et al. (2001), the maintenance of prostatic morphology and secretory activity during the adult phase is dependent upon high androgen levels, as opposed to initial postnatal period, which indicates a change in androgenic response throughout the development stages.

The general and ultrastructural morphology of the ventral prostate alters with senescence, although the secretory activity of the organ remains regular, in spite of low levels of testosterone. Comparing adult and old animals it was possible to confirm the main tissue alterations that occur in the ventral prostate during aging. The majority of the morphological alterations were quantitatively confirmed by statistical analysis. In most of the acini an increase in the number of epithelial cells was confirmed and, in some cases, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) occurred, contributing to a significant increase in glandular epithelial percentage during aging. Many authors consider PIN to be the precursor of prostatic carcinogenesis. Possible origins of PIN might be abnormal cellular differentiation, aberrant expression of growth factor receptors and controlling genes of cellular growth and differentiation (Bonkhoff and Remberger 1998; Bostwick et al., 1996). A common feature in the secretory cells was lipid accumulation in the whole cytoplasm. Swinnen et al. (1997) verified a similar process in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. In these cells, the cytoplasmic lipid droplets mainly consist of products of fatty acids and cholesterol, being the expression of lipogenic enzymes regulated by androgens. These lipid droplets can also be related to the peroxidation of unsaturated fatty acids, common in several tissues during aging (Alho et al., 1989). These deposits may have contributed to cellular expansion and a consequent thickening of the epithelial layer. Osmiophilic structures were occasionally found in the pericellular space in all cellular types, which seem to be ceramide-like deposits. The ultrastructure of these bodies was

described in the gerbil prostate after finasteride therapy by Corradi et al. (2004). Ceramide generation has been considered to be a critical component in radiation-induced apoptosis in human prostate cancer cells (Kimura et al., 1999).

As cellular and nuclear morphometry are still reliable prognostic factors in the evaluation of human prostate pathologies (Taboga et al., 2003), and it is our intention to evaluate spontaneous alterations occurring during gerbil aging, the secretory cell measurements obtained during the current research will serve as comparative controls in future studies. The nuclei of the secretory cells of young and old animals, whose higher area and perimeter values indicated greater activity of these organelles than in adult animals, also affected variations in the thickness of the according to age. The alterations observed in nuclear morphometry were not reflected in the Factor Forms, which gave a value close to 1 in all age groups. It should be mentioned that the degree of nuclear pleomorphism aids in the prognostic of prostate cancer (Zhang et al., 2000), and neoplastic cells typically have enlarged nuclei with prominent nucleoli (Roy-Burman et al., 2004). In the present study, in the old animals there was a tendency towards heterogeneity in nuclear form and size, mainly in PINs, although this was not significant.

The young animals were found to have a larger number of nucleolar corpuscles per nucleus than was the case in the other groups, however the morphometric values of these structures did not differ significantly between the groups, indicating uniform behavior of the organelle throughout the three phases of development. The nucleolus/nucleus ratio showed that dimensional variations undergone by the nuclei are accompanied by the nucleoli, which have a functional complementation among these organelles. Nucleolar DNA content is an indicator of functional condition and the degree of cellular proliferation (Karalyan et al., 2004). Studies have shown that quantitative analysis of AgNOR proteins provides additional information concerning the biological behavior of tumors, being an independent prognostic factor (Ceccarelli et al., 2000; Öfner, 2000).

In the senile animal, the stromal compartment proportions were a little smaller in relation to those of the other age groups, however increases in the thickness of the smooth muscular layer and the subepithelial collagen fibers, as well as a decrease in the interacinar spaces, combined to make the compartment more abundant in fibromuscular composition.

Similar alterations occurred in the adult gerbil ventral prostate when treated with finasteride, with a spreader arrangement of the smooth muscle and the wavy or sinuous collagen fibers (Corradi et al., 2004). In human stromal culture cells, a differential growth rate and cellular shape changes occur with increasing donor age and/or the development of benign prostatic hyperplasia (BPH), indicating that there may be an inherent difference in prostate stromal composition with age (Sensibar et al., 1999). Alterations in the form, amount and distribution of prostate tissue elements seem to be common during aging in different species of mammals, including the gerbil. These events are probably related to a decline in androgen levels and, due to these hormonal alterations, there is an increase in estrogen levels, which can contribute to the evolution of prostate pathological changes, such as benign hyperplasias and carcinomas (Banerjee et al., 2001).

Many studies have related that, although several rodent models exist for the study of human prostate pathologies, until the moment, none of them have been completely effective in extrapolating data for humans. In several rodents the occurrence of prostatic lesions is more evident in the ventral prostate. However, since the frequency of prostatic cancer in those animals is very low, there is some speculation about the relevance of these rodent models for human studies (Abate-Shen and Shen, 2000). Recently, this doubt was clarified by Berquin et al. (2005). Their analysis indicated that the gene expression pattern in the dorsolateral lobe of the mouse was similar to the one found on the human prostate peripheral zone, where the majority of human prostate cancers originates. This evidence supports the hypothesis that those prostate compartments are functionally equivalent and, therefore, comparative studies between human and rodent species are relevant. The features of the gerbil dorsolateral lobe had not been explored yet, however, it is known that this lobe is very prominent in the prostate of this animal (Rochel, personal communication).

Further study is required in order to evaluate the peculiar features of each lobe component of the gerbil prostate, as well as, their potential in developing spontaneous lesions, since the animal's tissue components alter morphologically and quantitatively with aging, in response to androgen decline.

Acknowledgements

This paper is part of the thesis presented by S.G.P.C. to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a PhD degree, and was supported by grants from the Brazilian agencies CNPq and FAPESP. The authors wish to thank Mr. Luiz Roberto Falleiros Jr. and MSc. Rosana S. Sousa for their technical assistance, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory. Acknowledgement is also due to Dr. Peter James Harris and MSc. Lara Silvia Corradi for English-language revision of this paper.

LITERATURE CITED

- Abate-Shen C, Shen MM. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Dev* 14: 2410-2434.
- Alho H, Koistinaho J, Laaksonen HM, Hervonen A. 1989. Effect of lifelong selenium and vitamin E deficiency or supplementation on pigment accumulation in rat peripheral tissues. *Adv Exp Med Biol* 266: 143-155.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141: 821-832.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142: 4066-4075.
- Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ. 2005. Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280: 36442-36451.
- Bonkhoff H, Remberger K. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch* 433: 195-202.
- Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. 1996. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29: 117-134.
- Bostwick DG, Ramnani D, Qian J. 2000. Prostatic intraepithelial neoplasia: Animal models 2000. *Prostate* 43: 286-294.

- Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior, PSL. 1997. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue & Cell* 29: 163-170.
- Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. 2000. AgNORs in breast tumors. *Micron* 31: 143-149.
- Corradi LS, Goes RM, Carvalho, HF, Taboga SR. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72: 198-208.
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* 51: 7-11.
- Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. 1986. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem Cell Biol* 64: 608-614.
- Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda, M. 2003. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate* 55: 206-218.
- Gross SA, Didio LJA. 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* 19: 77-84.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155: 94-103.
- Horsfall DJ, Mayne K, Ricciardelli C, Rao M, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* 70: 753-763.
- Huss WJ, Maddison LA, Grenberger NM. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biol* 11: 245-259.
- Karalyan ZA, Djaghatspanyan NJ, Gasparyan MH, Hakobyan LA, Abroyan LO, Magakyan YH, Ter-Pogossyan ZR, Kamalyan LA, Karalova EM. 2004. Morphometry of the nuclear and nucleolar structures in a CaCo-2 cell line. *Cell Biol Int* 28: 249-253.
- Kimura K, Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP. 1999. Tumor necrosis factor α sensitizes prostate cancer cells to γ -irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 59: 1606-1614.

- Leav I, Schelling KH, Adams JY, Merck FB, Alroy J. 2001. Role of canine basal cells in postnatal prostatic development, induction of hyperplasia, and sex-hormone-stimulated growth, and ductal origin of carcinoma. *Prostate* 48: 210-224.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. *Dev Biol* 253: 165-174.
- McNeal JE. 1983. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol* 4: 3-37.
- Öfner D. 2000. In situ standardized AgNOR analysis: a simplified method for routine use to determine prognosis and chemotherapy efficiency in colorectal adenocarcinoma. *Micron* 31: 161-164.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 11: 225-254.
- Sensibar JA, Pruden SJ, Kasjanski RZ, Rademaker A, Lee C, Grayhack JT, Koslowski JM. 1999. Differential growth rates in stromal cultures of human prostate derived from patients of varying ages. *Prostate* 38: 110-117.
- Shirai T, Tahashi S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, Imaida K. 2000. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutat Res* 462: 219-226.
- Sprando RL, Collins TFX, Black TN, Olejnik N, Rorie JI, West LJ, Bowers JD, Sass N, Robl M. 1999. Light microscopic observations on the reproductive tract of the male sand rat, *Psammomys obesus*. *Tissue & Cell* 31: 99-115.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34: 961-971.
- Suwa T, Nyska A, Peckham JC, Hailey JR, Mahler JF, Haseman JK, Maronpot RR. 2001. A retrospective analysis of background lesions and tissue accountability for male accessory sex organs in Fisher-344 rats. *Toxicol Pathol* 29: 467-478.
- Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Esquenet M, Heyns W, Verhoeven G. 1996. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology* 137: 4468-4474.

Taboga SR, Santos AB, Gonzatti AGR, Vidal BC, Mello MLS. 2003. Nuclear phenotypes and morphometry of human secretory prostate cells: a comparative study of benign and malignant lesions in Brazilian patients. *Caryologia* 56: 313 – 320.

Taplin ME, Ho S-M. 2001. The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3467-3477.

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

Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166: 2472-2483.

Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haughney PC, Rosen MS, Wu DS, Cunha TJ, Dahiya R, Cunha GR, Hayward SW. 2001. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 61: 6064-6072.

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

Williams WM. 1974. *The anatomy of the Mongolian Gerbil*. Tumblebrook Far, Inc., USA. 107p.

Zhang YH, Kanamaru H, Oyama N, Miwa Y, Suzuki Y, Akino H, Nokiki S, Okada K. 2000. Prognostic value of nuclear morphometry on needle biopsy from patients with prostate cancer: is volume-weighted mean nuclear volume superior to other morphometric parameters. *Urology* 55: 377-381.

Figure Legends

Figure 1. 1A - B, 1D - E and 1G-J: Hematoxylin-eosin stain. *A – C: young group.* **A:** General vision of the ventral prostate of the young gerbil constituted by the epithelial (ep) and stromal compartments (S) organized in small acini (a) surrounded by a thick smooth muscle (sm). Vessel (arrowhead). **B:** Detail of acini with epithelial cells exhibiting voluminous nuclei (arrowhead). Thick smooth muscle layer (sm). **C:** Dense arrangement of thin reticular fibers (white arrow) in base of epithelium (ep) and interspersed with SMC (arrows). *D – F: adult group.* **D:** General aspect of acinus (a) with wide acinar lumen active in secretion production (arrow). **E:** Secretory epithelium (ep) composed of columnar cells surrounded by compacted smooth muscle layer (sm). Note collagen deposit at the epithelium base (arrow). **F:** Disposal of thin reticular fibers in a more densely packed arrangement than that of young animals (arrows). Collagen deposit (white arrow) at the base of epithelial structure (ep). *G – L: old group.* **G:** Decreased interacinar spaces; some acini (a) with evident secretory activity (*) intercalated by acini with larger collagen accumulation (arrows) in the subepithelial region and allocated irregularly smooth muscle (sm). **H:** Denser and undulated epithelium (ep), increased density of subepithelial collagen (arrowhead) and thicker SMC. Secretion – blebs (arrow). **I:** Acinus (a) with high epithelial proliferation characterizing a prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). **J:** Detail of cells related to the proliferative aggregate exhibiting altered phenotypes and pale basophilic cytoplasm (arrow). **L:** Increased, denser reticular fibers (arrows), disposed in loose network accompanying SMC distribution. **1C, F and L:** Gömöri's reticulin method.

Figure 2. 2A – H: Ultrastructure of the young ventral prostate. **A:** Epithelium (ep) composed of immature epithelial cells with copious nuclei (N) and in the stroma (S), largely well-spaced undifferentiated SMC. The fibroblasts (arrows) emit cytoplasmic projections throughout stroma. Collagen fibrils (arrowhead); basement membrane (bm). 3597x. **B:** Immature epithelial cell with voluminous nucleus (N) and descondensed cromatin. Mitochondrias (mt). Collagen fibrils (arrowhead) distributed in different

directions in the interface between epithelium and stroma associated with fibroblast projection (arrow) and basement membrane (bm). 7750x. **C:** Detail of the adherent junctions uniting two epithelial cells (arrowheads). Large mitochondrias (mt); Nucleus (N). 35970x. **D:** Collagen fibrils (co) transversally arranged below the epithelium (ep) intimately associated with basement membrane (bm). 16700x. **E:** Fibroblast with prominent nucleus (N) and in association with elastic fibers (arrowhead). Collagen fibrils (co). 7750x. **F:** SMC are extensive, poor in contractile element and are not densely packed. Collagen fibrils (arrows) and fibroblast process (arrowhead) are inserted between them. 7750x. **G:** More electrondense SMC, and caveolae (arrow) in the cell membrane, indicating advanced differentiation process. 12930x. **H:** Detail of SMC showing elastic fibers inside their cytoplasmic process (arrowhead). Caveolae (arrow).

Figure 3. 3A – I: Ultrastructure of the adult ventral prostate. **A:** Epithelial cells (ep) with numerous secretory vesicles (sv) in the cytoplasm. Stroma (S). 3597x. **B:** Two cell types form the prostate epithelium, the secretory (sc) and basal cells (white arrow). Nucleus (N); Endoplasmic reticulum cisternae (RER, black arrow). The latter are smaller, have fewer synthesis organelles and the nucleus occupies most of the cell. Basement membrane (arrowhead). 10000x. **C:** Abundant Golgi stacks (G) and secretory vesicle in cytoplasm of secretory cell. Nucleus (N). 16700x. **D:** Endoplasmic reticulum cisternae (RER) in the perinuclear region. Deposit of condensed chromatin in nuclear periphery (arrow). Nucleus (N). 27800x. **E:** Collagen (arrow) and elastic fibers (arrowhead) associated with basal membrane (bm) in the interface between epithelium (ep) and stroma. **F:** Stroma (S) composed of fibroblasts (F) localized below glandular epithelium (ep) and packed SMC layer with reduced spaces between the cells, occupied by collagen fibrils (arrowhead). Basement membrane (arrow). Nucleus (N). 6000x. **G:** Differentiated SMC exhibiting abundant contractile elements (*) surrounded by collagen fibrils disposed in several directions (arrow). Nucleus (N). 7750x. **H:** Fusiform SMC with large nucleus accompanying cell shape and surrounded by fibroblast process (arrow). Collagen fibrils (co); mitochondrias (mt) 10000x. **I:** Detail of SMC in close contact with collagen (co) and elastic fibers (arrowhead) 12930x.

Figure 4. 4A – F: Ultrastructure of old ventral prostate. **A:** Site of normal secretory epithelial cells (ep) with secretory vesicle in the apex (arrow). Nucleus (N). 7750x. **B:** Site of epithelial cells (ep) with marked accumulation of lipid droplets (ld), a frequent event during gerbil aging. Nucleus (N) 4646x. **C:** Apical portion of a secretory cell with bleb (apocrine secretion, arrow), integrated lipid droplets (ld, *) and lipofuscin-like structure (arrowhead). 16700x. **D:** Basal cell (bc) with large nuclei and few synthesis organelles, in the nuclear periphery ceramide-like (arrowhead) and lipofuscin-like deposits (doble arrowhead), surrounded by secretory cells full of secretory vesicles (arrow). A thick basement membrane (bm) delimits the epithelium of the stroma below which is a larger deposit of collagen fibrils (co), another mark of the aging process. 10000x. **E:** Stroma (S) showing increase of collagen fibrils in subepithelial area (arrows) and between SMC, which maintain condensed cytoplasm. Fibroblast (F). 12930x. **F:** SMC with irregular and compressed nucleus (N) in the nuclear periphery. Lipofuscin-like structure (arrowhead) and remarkably extensive mitochondrias (mt). Collagen fibrils (arrow). 16700x.

Table 1. Values of the morphometric-stereological data in the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development.

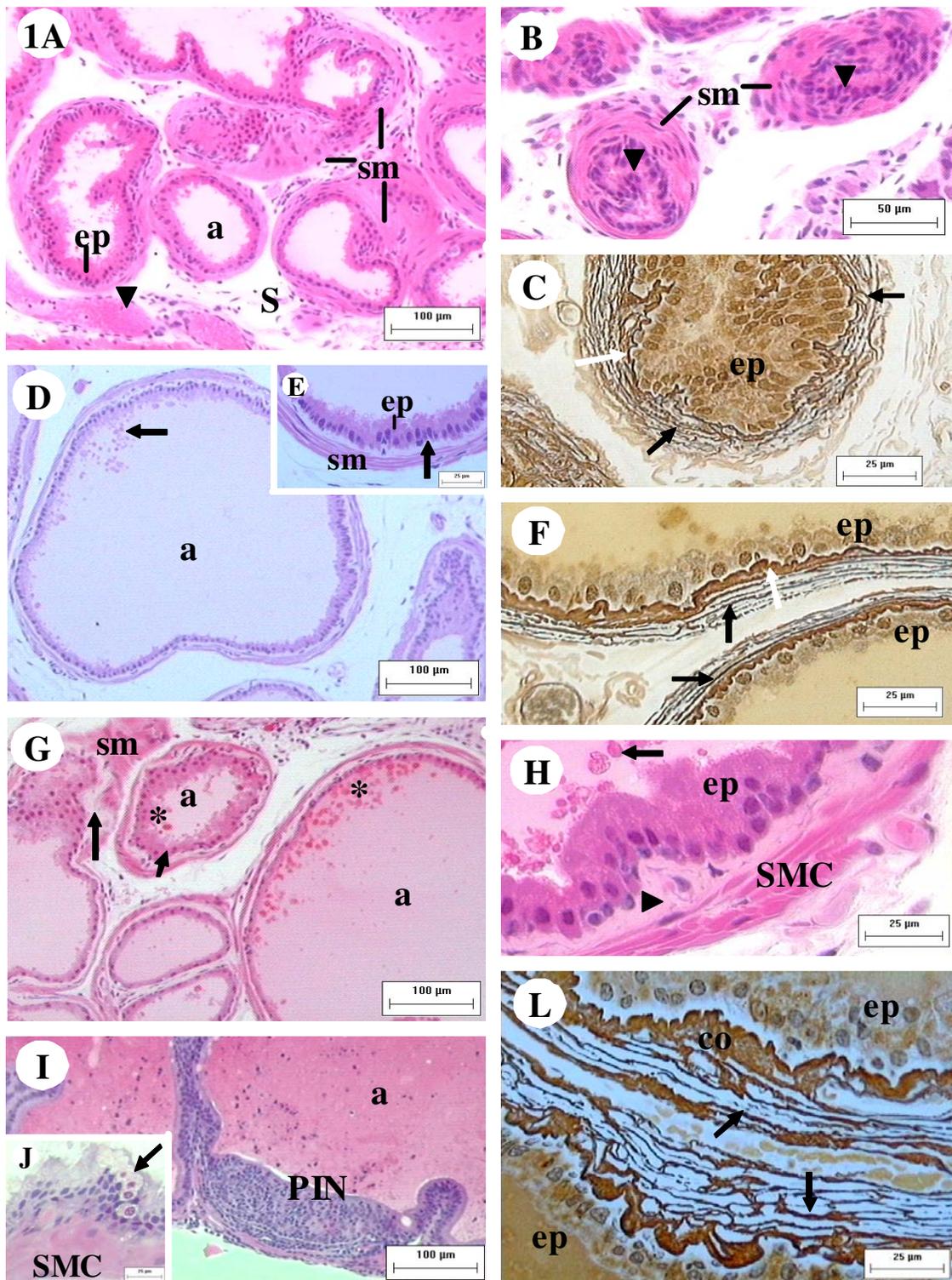
Prostatic Measurements	Groups		
	Young (48 ± 15.9 days)	Adult (112 ± 27.7 days)	Old (18 ± 5.4 months)
Testosterone levels (ng/mL)*	3.95 ± 0.57 ^a	4.82 ± 0.33 ^b	2.80 ± 0.23 ^c
Density of Compartment (%)			
Glandular Epithelial ***	34.64 ± 13.10 ^a	56.33 ± 11.24 ^b	60.95 ± 12.14 ^b
Stromal***	65.36 ± 13.10 ^a	43.67 ± 11.24 ^b	39.05 ± 12.14 ^b
Volume of tissue components (%)			
Epithelium**	22.00 ± 6.60 ^a	14.77 ± 4.76 ^b	22.20 ± 7.04 ^a
Lumen***	12.64 ± 9.87 ^a	41.56 ± 11.99 ^b	38.74 ± 13.96 ^b
Smooth muscle cells***	27.72 ± 7.82 ^a	16.18 ± 6.42 ^b	14.23 ± 7.74 ^b
Colagen subepithelial layer ***	1.10 ± 1.66 ^a	3.08 ± 2.59 ^a	5.43 ± 4.64 ^b
Non-muscular interacinar stroma**	36.54 ± 11.94 ^a	24.41 ± 11.83 ^b	19.38 ± 7.81 ^b
Morphometry – Thickness (µm)			
Epithelium ***	14.83 ± 3.31 ^a	11.11 ± 2.33 ^b	18.53 ± 4.22 ^c
Smooth muscle layer***	17.17 ± 4.41 ^a	12.09 ± 3.69 ^b	15.14 ± 5.15 ^c
Nuclear and nucleolar morphometry			
Nuclear area (µm ²)***	24.16 ± 5.0 ^a	21.92 ± 4.48 ^b	24.58 ± 5.47 ^a
Nuclear perimeter (µm) ***	20.24 ± 2.30 ^a	18.86 ± 2.14 ^b	20.12 ± 2.53 ^a
Nuclear Form Factor*	0.74 ± 0.09 ^a	0.77 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.10 ^b
Nucleolar Area (µm ²)*	0.91 ± 0.50 ^a	1.31 ± 0.44 ^b	1.30 ± 0.53 ^b
Nucleolar perimeter (µm)	4.35 ± 2.13	4.73 ± 1.29	4.21 ± 1.18
Nucleolus/Nucleus ratio			
Area	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02
Perimeter	0.22 ± 0.09	0.25 ± 0.07	0.20 ± 0.05

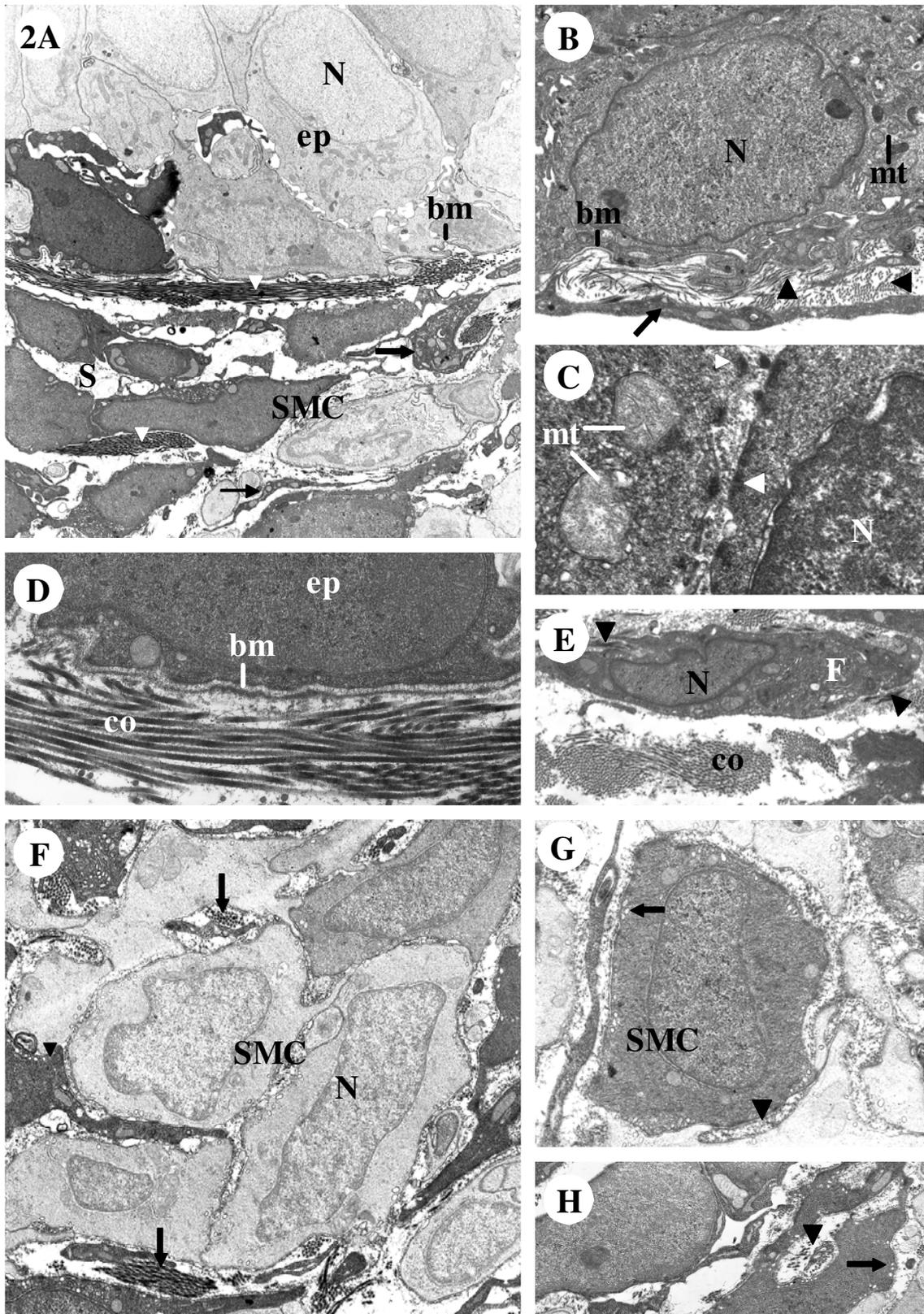
Values represent mean ± SD. Statistical analysis based on the Anova and Tukey Tests. Significance, *p ≤ 0.01; ** p ≤ 0.001; *** p ≤ 0.0001. a, b, c = different superindices indicate inter-group significant differences.

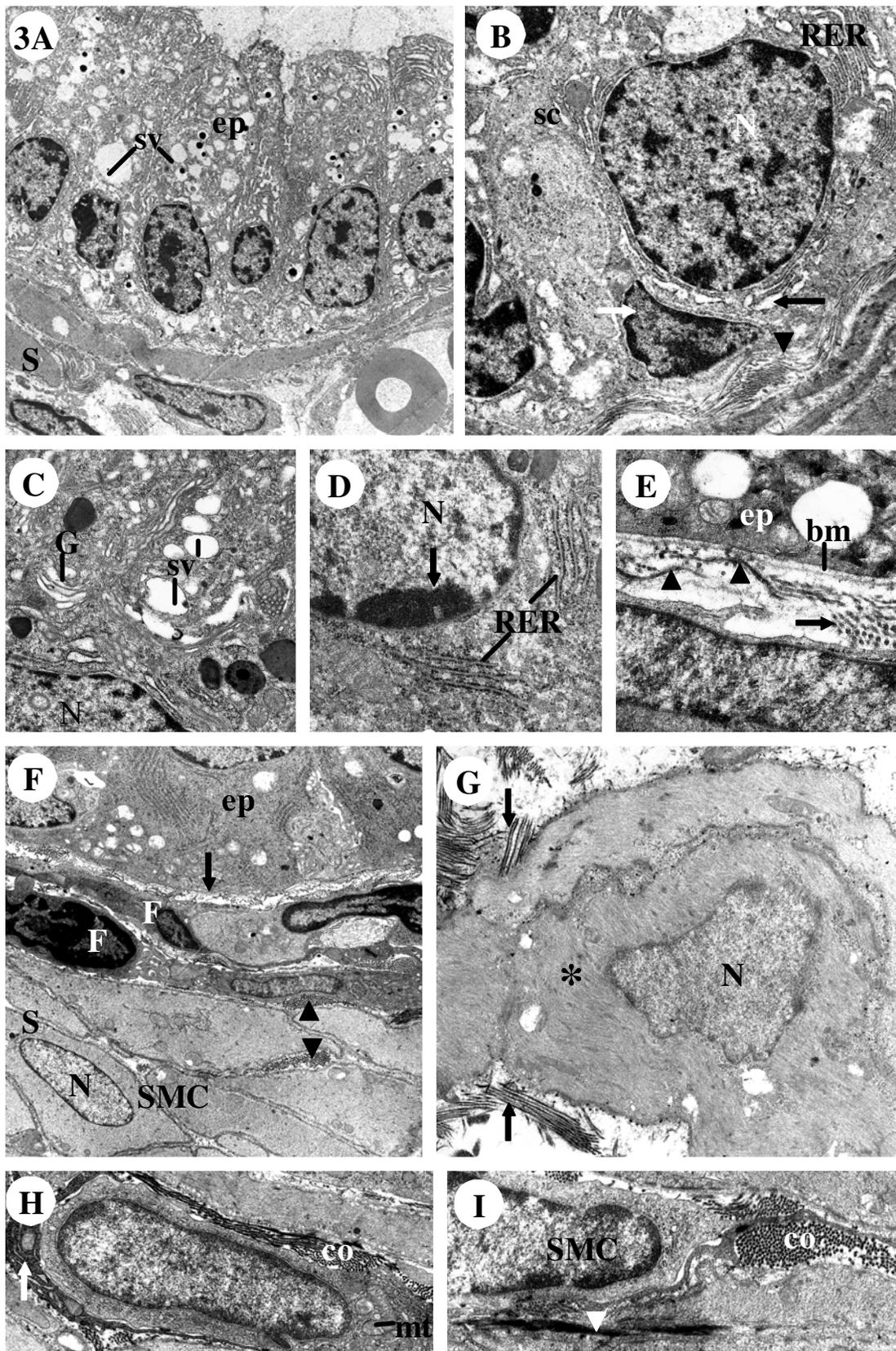
Table 2. Percentage distribution of the nuclei by nucleolus number in secretory epithelial cells in the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development.

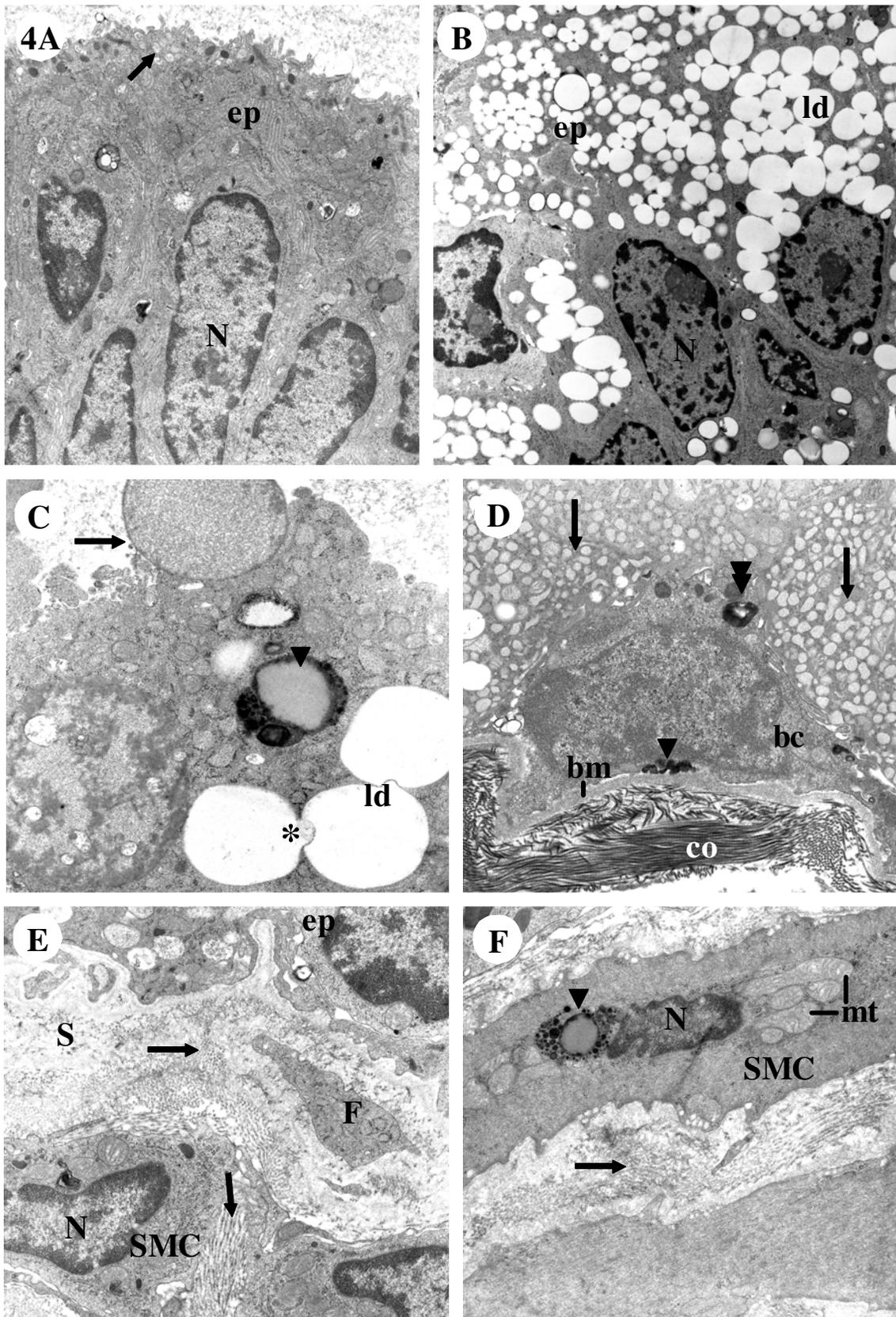
Groups	% of nuclei containing each number of nucleoli (0, Nucleolus no observed)				
	Number of nucleoli in each nucleus				
	0*	1	2*	More than 2*	Average number of nucleoli in group*
Young	43.20 ± 2.34 ^a	40.72 ± 2.19	10.40 ± 1.91 ^a	5.69 ± 1.61 ^a	0.78 ± 0.05 ^a
Adult	53.56 ± 2.45 ^b	42.03 ± 2.52	3.66 ± 0.91 ^b	0.74 ± 0.36 ^b	0.51 ± 0.03 ^b
Old	49.91 ± 2.58 ^{a,b}	41.26 ± 2.28	4.96 ± 1.21 ^b	3.86 ± 0.97 ^{a,b}	0.63 ± 0.04 ^b

Values represent mean ± ED. Statistical analysis based on the Anova and Tukey Tests. Significance, *p ≤ 0.01. a, b = different superindices indicate inter-group significant differences.









ARTIGO 2.

**Histopathologic lesions in the ventral prostate
microenvironment
of old gerbil (*Meriones unguiculatus*)**

Após a versão para a língua inglesa, será submetido à
Histology and Histopathology

Alterações histopatológicas no microambiente da próstata ventral do gerbilo velho (*Meriones unguiculatus*)

Silvana Gisele Pegorin de Campos¹

Cristiani Zanetoni¹

Rejane Maira Góes²

Sebastião Roberto Taboga^{2*}

¹Department of Cell Biology – Institute of Biology - UNICAMP, CP 6109 - 13084-971 - Campinas, SP, Brazil

²Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology - IBILCE/UNESP, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

***Correspondence to:**

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

Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth,

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

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

Funded by:

Brazilian National R & D Council (CNPq), CAPES and São Paulo State Research Foundation (FAPESP)

RESUMO

Desequilíbrios hormonais associados ao processo de envelhecimento podem contribuir com a evolução de alterações patológicas na próstata. Várias espécies de roedores vêm sendo utilizadas como modelo para estudo dos mecanismos envolvidos na carcinogênese desta glândula. O gerbilo *Meriones unguiculatus* tem apresentado respostas prostáticas significativas quanto a tratamentos hormonais, drogas contra hiperplasia prostática humana, bem como, desenvolvimento de neoplasias espontâneas no animal velho. A partir dessas observações o objetivo do presente trabalho foi classificação e caracterização de lesões espontâneas na próstata ventral do gerbilo velho e assim, inferir sobre a viabilidade desse modelo no estudo do câncer prostático. As alterações mais freqüentes foram de origem epitelial, como as neoplasias intra-epiteliais (PIN), carcinomas microinvasivos e adenocarcinomas. O potencial invasivo das células anômalas pôde ser comprovado através da ruptura da membrana basal. No estroma, hiperplasia celular, quando constatada, esteve sempre associada a sítios de epitélio anômalo. Adicionalmente, maior deposição de fibrilas de colágeno gerando fibrose estromal foi encontrada em todos gerbilos velhos analisados. A análise quantitativa mostrou que as proporções teciduais prostáticas diferiram em regiões alteradas, sendo particulares para cada tipo de lesão. Parâmetros nucleares e nucleolares somente não foram efetivos para diagnosticar o potencial de severidade das alterações. Os índices de proliferação e morte celular, porém indicaram maior *turnover* celular à medida que as lesões histopatológicas tornaram-se invasivas. A partir destas análises constatou-se que o gerbilo velho tem alta propensão em desenvolver alterações prostáticas espontâneas e estas podem auxiliar na melhor compreensão do comportamento biológico do câncer prostático humano.

INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino que contribui com a produção de nutrientes para o fluido seminal e promove a manutenção de gradiente iônico e pH adequado nesta secreção (Untergasser et al., 2005). Grande importância científica tem sido atribuída a esta glândula uma vez que, o adenocarcinoma prostático emergiu como a principal neoplasia a acometer o homem na atualidade (Taplin e Ho, 2001; Untergasser et al., 2001; Schulz et al., 2003). Apesar de importantes avanços na compreensão da carcinogênese prostática ter ocorrido nos últimos anos, esta continua sendo uma doença complexa, de história natural pouco conhecida (Bonkhoff e Remberger, 1998; Huss et al., 2001).

Desequilíbrios hormonais relacionados ao processo de envelhecimento, envolvendo acentuada diminuição nas proporções entre hormônios androgênicos e estrogênicos podem contribuir com a evolução de alterações patológicas prostáticas (Banerjee et al., 2001; Schulz et al., 2003). Somada ao desequilíbrio hormonal há uma perda progressiva da homeostase entre os processos de proliferação e morte celular apoptótica no tecido prostático em envelhecimento (Bostwick et al., 1996; Tang e Porter, 1997; Taboga et al., 1999).

Similaridades anatômicas existentes entre a próstata humana e de roedores têm auxiliado a sustentar a aplicação de modelos murinos para estudos de alterações moleculares que acompanham o desenvolvimento normal do órgão, bem como, a progressão do câncer prostático (Pollard e Luckert, 1986; 1987; Pollard, 1992; Huss et al., 2001). Nas duas espécies, a glândula prostática desenvolve-se a partir do seio urogenital e apresenta-se como um órgão sensível a andrógenos. As populações celulares são semelhantes e, provavelmente, exercem os mesmos papéis fisiológicos. As principais diferenças entre humanos e roedores são referentes à anatomia macro e microscópica glandular e estas podem dificultar a interpretação de alterações patológicas em roedores (Abate-Shen e Shen, 2001; Cunha et al., 2004; Roy-Burman et al., 2004; Shappell et al., 2004).

Nosso grupo de pesquisa adotou como modelo experimental para estudo da próstata o gerbilo *Meriones unguiculatus*. A próstata desse animal apresenta lobos bem próximos entre si e, portanto, anatomicamente a glândula é mais compacta em relação às demais espécies de roedores (Zanetoni e Taboga, 2001; Campos et al., 2006). Adicionalmente, o modelo vem apresentando respostas significativas quanto a tratamentos hormonais (Santos et al., 2003), drogas contra hiperplasia prostática humana (Corradi et al., 2004), bem como, desenvolvimento de neoplasias espontâneas associadas ao envelhecimento, sendo que estas últimas instalam-se de forma autóctone (Zanetoni e Taboga, 2001; Campos et al., 2006).

A partir dessas observações o objetivo do presente trabalho foi classificação e caracterização de lesões espontâneas na próstata ventral do gerbilo velho (*Meriones unguiculatus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, Preparação das amostras e Análise Estrutural

30 gerbilos velhos com idade média de 18 ± 5.42 meses foram divididos em não afetados (controles) e portadores de lesão prostática. Estes últimos foram subdivididos em 4 grupos de acordo com o tipo de alteração prostática mais representativa, ou seja, PIN (neoplasia intra-epitelial prostática), carcinoma microinvasivo, adenocarcinoma e hiperplasia prostática. A classificação dos grupos quanto ao tipo de lesão somente pode ser efetivada após necropsia, processamento histológico das amostras e análise em microscopia de luz. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP), sob condições convencionais de temperatura (25°C) e umidade relativa (40-70%), com fornecimento de água e ração balanceada *ad libitum*.

Os animais foram colocados em câmara contendo CO₂ e, imediatamente após, sacrificados e dissecados. Todo o complexo prostático foi removido, inicialmente, e a próstata ventral separada e então fragmentada.

Para microscopia de luz, uma parte do material foi submetida à fixação em formalina tamponada (formaldeído 10% em tampão fosfato pH 7.2) e incluída, posteriormente, em Histosec (Merk). Esse tipo de procedimento foi utilizado para amostras submetidas a métodos imuno-histoquímicos e de marcação apoptótica.

A outra parte dos fragmentos obtidos foi fixada em Karnovsky modificado (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2.5% em tampão fosfato Sørensen pH 7.2) e incluída em historresina (*Leica-historesin embedding kit*). Após serem realizados cortes histológicos (3µm), o material foi submetido a técnicas citoquímicas usuais. Hematoxilina-Eosina (análise tecidual geral), Reticulina de Gömori (seletiva para fibras de colágeno e fibras reticulares), Reação de Feulgen (fenótipos nucleares) e AgNOR (fenótipos nucleolares).

Os cortes histológicos prostáticos foram analisados em fotomicroscópio Olympus e a digitalização de imagens foi realizada em sistema de Análise de Imagens através do programa *Image-Pro-Plus – Media Cybernetics*.

Deteção de proliferação celular no epitélio prostático

Para análise imuno-histoquímica, os cortes foram desparafinizados, reidratados em gradiente de etanol. O antígeno Ki-67 foi localizado através de anticorpo monoclonal de camundongo (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA). A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato 10mM, pH 6.0, a 100°C (15 min.). O bloqueio de peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (3% em metanol) (5 min.) e, posteriormente, a incubação dos cortes com o anticorpo primário (1:100, BSA a 1% em PBS) foi efetuada *overnight* a 4°C. Após serem lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase, os cortes passaram por revelação com a diaminobenzidina (DAB). Para a contracoloração destes utilizou-se Hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscópio de luz convencional.

Detecção de fragmentação de DNA associada com apoptose

As lâminas foram desparafinizadas e rehidratadas, lavadas em tampão Tris base (TBS: Tris 20mM, pH 7.6, 140mM NaCl) e submetidas à digestão por Proteinase K (1:100 em Tris 10mM, pH 8.0) por 20 min. para permeabilização do tecido. Os cortes foram processados segundo as instruções do Kit apoptose (TdT-FragEl – DNA *fragmentation detection kit*, Oncogene), o qual é baseado na reação de TUNEL. A marcação foi revelada pela diaminobezidina/H₂O₂ (0.5mg/ml água). Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris e montados com Bálsamo do Canadá.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos prostáticos foram fixados em ácido tânico a 0.25% e glutaraldeído 3% em tampão Millonig pH 7.3 durante 24h (4°C) (Cotta-Pereira et al., 1976). Após lavagem em tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2h, lavado novamente, desidratado em acetona e incluído em resina Araldite. Os cortes semi e ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo LKB. As telas contendo os cortes ultrafinos foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 2% (20 min.), lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% (10 min.). As observações e obtenção de negativos micrográficos foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão LEO-Zeiss 906.

Análise Quantitativa

1. Análise Estereológica - Imagens de 30 campos histológicos (corados com HE) de cada grupo foram capturadas [Não afetado, PIN, hiperplasia estromal prostática (PH)]. As análises morfo-estereológicas foram obtidas segundo o método de Weibel (1978), no qual se faz uso de um sistema com 120 pontos e 60 linhas. A partir deste teste, obteve-se a proporção relativa (%) das porções glandulares e estromais da próstata, bem como de seus

componentes teciduais individuais (epitélio, lúmen, estroma muscular, estroma não-muscular subepitelial e estroma não-muscular interacinar) nos diferentes grupos velhos.

2. Análise Cariométrica – Foram realizadas 200 medidas de valores de área (μm^2), perímetro (μm) e fator forma $[4\pi \cdot \text{área nuclear} / (\text{perímetro nuclear})^2]$ nucleares de células epiteliais secretoras em cada grupo. A partir desses parâmetros pôde-se analisar o comportamento nuclear das células em lesões prostáticas como: PIN, carcinoma microinvasivo e hiperplasia estromal prostática (PH). Para um círculo perfeito tem-se que o fator forma é igual a 1 e, para as formas que se afastam do círculo, os valores são menores que 1 (Taboga et al., 2003).

3. Análise Nucleolar – A contagem do número de núcleos com os seguintes números de nucléolos: 0 (não observado), 1, 2 e mais de 2 foi realizada em núcleos de células epiteliais secretoras em 25 campos por grupo de animais [Não afetado, PIN, carcinoma microinvasivo e hiperplasia estromal (PH)]. Os valores absolutos encontrados foram convertidos em porcentagens. Posteriormente, a proporção do número de nucléolo/núcleo entre lesões proliferativas foi calculada.

Adicionalmente, foram realizadas 30 medidas de área (μm^2) e perímetro (μm) nucleares e nucleolares simultaneamente em cada grupo. Este parâmetro foi adotado para constatar se as alterações quantitativas sofridas pelas áreas e perímetros nucleolares foram proporcionais aos sofridos pelos núcleos

4. Frequência de proliferação e morte celular no epitélio prostático - Foram contados 2000 núcleos de células epiteliais secretoras por grupo animal. Para cálculo dos índices de proliferação e morte celular por apoptose, contou-se o número total de células epiteliais por campo analisado e, estas foram divididas em marcadas e não marcadas. Posteriormente, efetuou-se o índice de marcação por campo, (*número de núcleos marcados/número total de núcleos no campo*).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada em planilhas e gráficos do software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). Para a averiguação da significância dos resultados, foram utilizados os testes ANOVA e Tukey HSD, com $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. Estrutura e ultra-estrutura da próstata do animal velho

O perfil do lobo ventral da próstata do gerbilo velho, em condições morfológica e funcionalmente normais, corresponde a um conjunto de estruturas túbulo-acinares formadas por um epitélio simples envolto por um estroma fibromuscular (Fig. 1A). No presente trabalho, tais regiões prostáticas foram consideradas como controles para estudos comparativos com lesões proliferativas.

Em 80% dos animais analisados foram observadas alterações histopatológicas prostáticas acometendo, principalmente, o compartimento epitelial (Figs. 1B-1J). A maioria dessas alterações foi de ordem proliferativa, envolvendo perturbações na homeostase da população de células epiteliais secretoras (Figs. 1B- 1I).

Durante o presente trabalho, em nenhum dos espécimes analisados encontrou-se tumores palpáveis ou macroscopicamente proeminentes e todos eles mostraram-se saudáveis. Notou-se, porém que as próstatas destes animais apresentaram, normalmente, volumes maiores em relação a animais adultos, porém tais glândulas estiveram macroscopicamente íntegras.

As alterações epiteliais mais freqüentes foram as denominadas neoplasias intra-epiteliais (PIN), as quais apareceram em 46,67% (14/30) das próstatas analisadas. Lesões microinvasivas foram menos representativas, 26,67% (8/30) e, caracterizaram-se por carcinomas e adenocarcinomas. No estroma, hiperplasia celular ocorreu em 20% (6/30) dos espécimes analisados e esteve sempre associada a sítios de epitélio anômalo. A

classificação histopatológica das lesões prostáticas encontradas no gerbilo velho foi realizada de acordo com o sistema de Classificação Bar Harbor para a próstata de camundongos (Shappell et al., 2004).

A análise ultra-estrutural possibilitou confirmar as constatações feitas pela microscopia de luz convencional. Em porções acinares normais, o epitélio exibiu células colunares com núcleos alongados acompanhando a forma das mesmas (Fig. 3A). Nessas regiões houve manutenção da polaridade epitelial e uma membrana basal intacta pôde ser observada (Fig. 3A).

Adicionalmente, as células epiteliais apresentaram em sua maioria cromatina nuclear densamente condensada, distribuída em massas depositadas, principalmente, na periferia da organela (Figs. 3B e 3D). O citoplasma celular apresentou-se, comumente, rico em gotículas lipídicas (Figs. 3B – 3E), as quais se espalharam por toda extensão celular. As células epiteliais secretoras mantiveram suas características peculiares, dadas pela abundância de organelas de síntese e vesículas de secreção sendo desprendidas de seus ápices (Figs. 3C-3E). Frequentemente, inclusões citoplasmáticas semelhantes a lipofuscinas foram encontradas entre as populações de células epiteliais (Figs. 3C e 3D).

As PIN em ácinos prostáticos (Figs. 1C-1J) caracterizaram-se por acentuadas invaginações epiteliais para dentro do lúmen (Figs. 1C-1E) e/ou estratificação celular, (Figs. 1F-1J) podendo estas estarem associadas ou não a porções de epitélio simples normal (Figs 1D-1G).

Os tipos celulares componentes das PIN exibiram fenótipos distintos entre si em um mesmo agregado proliferativo (Figs 1F-1H) e/ou quando sítios proliferativos distantes foram comparados (Figs. 1F-1I). Algumas PIN foram compostas por células hipertrofiadas com núcleos evidentes e citoplasma com aspecto pálido, aparentando conter depósitos de mucinas (Figs. 1F-1H). No ápice das células componentes de PIN observou-se manutenção da atividade secretora, porém ainda não se conhece o tipo exato de produto liberado por tais células.

Em carcinomas microinvasivos (Fig. 2A e 2B), agregados celulares invadiram o estroma ao redor, por provável ruptura da membrana basal. As células carcinomatosas apresentaram, em sua maioria, núcleos hiper cromáticos, com citoplasma escasso e ausência

de formação glandular no estroma invadido (Fig. 2B). Ultra-estruturalmente, essas células apresentaram núcleos com formas bizarras (Fig. 3F) e, algumas puderam ser constatadas em processo de degeneração (Fig. 3G). Normalmente, esse tipo de lesão esteve localizado adjacente a ácinos com PIN, indicando que as células componentes desta podem ser as prováveis originárias de focos invasivos (Fig. 2A).

Em adenocarcinomas houve uma expansão acinar difusa (Figs. 2C e 2D) onde foram evidenciadas células epiteliais atípicas e um aumento de células estromais adjacentes à lesão. No interior de ácinos maiores pôde ser observada a formação de microácinos devido à proliferação e rearranjo das células epiteliais secretoras (Figs. 2C e 2D; Figs. 4A-4C). Seus produtos de secreção foram liberados nos pequenos lumens formados por esses novos arranjos celulares e, não raro, estruturas semelhantes a ceramidas foram encontradas nesses lumens (Figs. 4A-4C).

A membrana basal apresentou-se mais espessa em animais velhos e, nos sítios proliferativos, esta sofreu compressão permanente por projeções emanadas de células epiteliais atípicas (Fig. 5A-5D). Tais expansões apresentaram adesões focais, auxiliando na fixação celular, inferindo sobre um possível deslizamento de tais células (Fig. 5D). O potencial invasivo das células anômalas pôde ser comprovado através de pontos de ruptura na estrutura da membrana basal (Figs. 5E e 5G).

O estroma do animal velho sofreu um remodelamento tanto quando associado a sítios epiteliais normais como em regiões alteradas (Fig. 1A-1J) e esse evento foi identificado na maior parte dos animais analisados. Tanto nos sítios de carcinomas como em adenocarcinomas a vascularização sangüínea regional foi aumentada (Figs. 2A, 2C e 2D).

Um grande aumento na deposição de fibrilas de colágeno pôde ser constatado tanto abaixo do epitélio glandular como distribuído entre as células musculares lisas, comprimindo estas últimas. Tais fibrilas organizaram-se em feixes espessos e promoveram uma acentuada fibrose estromal (desmoplasia) (Fig. 5A, 5D-F). Quando associada a lesões epiteliais, a distribuição de tais fibrilas tornou-se irregular (Figs. 1C-1J) e, em alguns ácinos, estas formaram depósitos amorfos abaixo do epitélio (Figs. 1D e 1E). As células musculares lisas sofreram aumento e se dispuseram em arranjo mais frouxo e irregular

quando associadas a lesões epiteliais (Figs. 1C, D, F e G). Ultra-estruturalmente, em alguns casos, as células musculares apresentaram contornos externos e nucleares irregulares (Fig. 5H).

2. Análises Quantitativas

Os resultados referentes às análises quantitativas encontram-se nas tabelas 1 e 2 e nas figuras 8 e 9. As análises comparativas foram feitas entre animais velhos não afetados (controles) e animais com alterações histopatológicas prostáticas, sendo estes últimos divididos em 2 subgrupos de acordo com o tipo de lesão que prevaleceu (PIN, e hiperplasia estromal). Na presente análise, animais portando adenocarcinomas não foram incluídos por terem se apresentado em número abaixo do mínimo necessário para que se proceda a uma análise estatística confiável.

A proporção média do compartimento epitelial glandular dos 2 grupos de animais velhos alterados não diferiu significativamente de animais não afetados ($55.74\% \pm 13.52\%$) (Tabela 1). Entre as lesões, esse compartimento apresentou-se maior em áreas prostáticas com PIN, sendo tal fato justificado pelo aumento de tecido epitelial que caracteriza esse tipo de lesão. As áreas com hiperplasia celular estromal apresentaram-se sempre associadas a alterações epiteliais, sendo seu epitélio também aumentado em relação às áreas não afetadas.

O lúmen acinar diminui nos grupos alterados, porém a atividade secretora aparentemente permaneceu estável (Tabela 1).

As proporções do estroma prostático não diferiram entre grupos alterados e não afetados (Tabela 1), porém esse compartimento aumentou em áreas de hiperplasia estromal em relação a regiões de PIN. A expansão estromal esteve diretamente relacionada ao aumento médio de fibras musculares lisas, as quais, praticamente, dobraram sua frequência em relação a regiões normais. O estroma não-muscular subepitelial foi maior em animais não afetados uma vez que, nos grupos alterados, as fibras componentes desse tecido perderam sua disposição em feixes ao redor dos ácinos e passaram a distribuir-se de maneira aleatória entre os arranjos celulares. O estroma não-muscular intercinar não sofreu

oscilação significativa entre os grupos, permanecendo com valores próximos ao do controle não afetado ($18.22\% \pm 11.10\%$).

Em relação aos dados cariométricos, as regiões alteradas apresentaram medidas de áreas e perímetros nucleares significativamente menores quando comparados a sítios normais (Tabela 1). Entre lesões, PIN mantiveram valores médios de áreas maiores em relação aos demais grupos e, em se tratando do perímetro nuclear, os carcinomas apresentaram as menores medidas. Essas constatações podem ser indicativas de que em lesões prostáticas as células epiteliais secretoras diminuem suas atividades transcricionais nucleares. Quanto ao fator forma, embora tenha havido diferenças significativas entre os grupos, seus valores foram maiores que 0.7 em todas as situações, indicando uma quase uniformidade nuclear entre os grupos.

As análises referentes ao comportamento nucleolar indicaram que o fenótipo predominante entre os grupos foi de nucléolo não evidente em núcleo de células epiteliais secretoras (Fig. 8). Esse fenótipo foi mais acentuado estatisticamente em células epiteliais de regiões com hiperplasia estromal.

Animais velhos não afetados e o grupo com PIN apresentaram maiores medidas de áreas nucleolares enquanto que, medidas de perímetro não diferiram entre lesões e controle.

Em se tratando da razão nucléolo/núcleo (Fig. 9) de regiões alteradas constatou-se que em termos de medidas de áreas, a razão foi maior em PIN em relação aos demais grupos, os quais oscilaram com valores próximos aos não afetados.

Quanto aos índices de proliferação e morte celular, estes aumentaram significativamente com o aumento da agressividade da lesão (Tabela 2; Figs. 6A-6C; 7A-7C). Em PIN, os índices entre os dois processos permaneceram em equilíbrio, porém em carcinomas microinvasivos, a taxa de apoptose diminuiu em relação à taxa de proliferação celular, indicando desequilíbrio homeostático entre esses fenômenos opostos.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de câncer de próstata espontâneo é um evento relativamente raro na maioria dos modelos roedores conhecidos. Uma vez que esta é uma doença relacionada com o envelhecimento, especula-se que a expectativa de vida de animais experimentais seja muito curta para efetiva instalação e evolução desse tipo de doença (Pollard e Luckert, 1986; Banerjee et al., 1998). No entanto, sistemas modelos são primordiais para aquisição de maior conhecimento sobre patogênese, progressão e terapia para o câncer de próstata (Pollard e Luckert, 1987; Shirai et al., 2000; Wang et al., 2001).

O comportamento de lesões proliferativas espontâneas na próstata ventral do gerbilo velho foi avaliado e, constatou-se que o compartimento epitelial é o principal sítio de alterações histopatológicas, podendo estas acometer ácinos individuais ou grupos destes. No estroma prostático, o envelhecimento esteve associado ao aumento e redistribuição de componentes celulares e da matriz extracelular.

As alterações epiteliais mais comuns foram as neoplasias intra-epiteliais (PIN), seguidas pelos carcinomas microinvasivos e, em menor percentual encontraram-se os adenocarcinomas. As células epiteliais secretoras em PINs aumentaram demasiadamente, possibilitando que o compartimento epitelial atingisse frequência relativa de mais de 60%. Os carcinomas, quando presentes, estiveram sempre adjacentes a ácinos com PIN. Por essas observações, acredita-se que estas lesões intra-acinares sejam as precursoras do câncer prostático no gerbilo velho, à semelhança do que ocorre em outros animais, incluindo o homem.

Os animais analisados apresentaram em média 18 meses de idade e nesse período 46% tiveram algum grau de lesão prostática. Em ratos, o prazo médio para desenvolvimento de adenocarcinoma espontâneo é de 26 meses, com uma taxa de 26% dos animais acometidos (Pollard e Luckert, 1987). Aparentemente, o gerbilo necessita de um tempo menor para desenvolvimento de lesões espontâneas invasivas uma vez que, 26% dos animais analisados apresentaram focos microinvasivos no período de tempo analisado. Somado a esse dado, a administração de testosterona por longo tempo em gerbilos adultos

reduz o tempo para surgimento de lesões neoplásicas nesses modelos (Zanetoni et al., 2005).

Há uma grande contradição entre pesquisadores quanto ao local exato de início da carcinogênese prostática em roedores. No gerbilo o lobo ventral correspondeu ao principal sítio de origem e estabelecimento de lesões proliferativas, bem como, em camundongos transgênicos C3(1)/SV40 (Shibata et al., 1996). Já em ratos, Pollard e Luckert (1992), apontam os lobos anterior e dorsolateral como os locais onde as alterações prostáticas se iniciam, enquanto que Cohen et al., (1994) defendem que a propagação tumoral ocorre a partir da vesícula seminal desses animais. Porém, uma grande parte dos pesquisadores concorda que a evolução do câncer prostático ocorre a partir de células epiteliais secretoras, tratando-se, portanto, de adenocarcinomas (Bonkhoff e Remberger, 1998).

As PIN caracterizaram-se por aglomerados de células epiteliais fenotipicamente heterogêneas com provável atipia funcional. Ultra-estruturalmente, células anômalas apresentaram núcleos com formas bizarras e distribuição marginal da cromatina e seus citoplasmas estiveram repletos de acúmulos de gotículas lipídicas. Projeções citoplasmáticas estenderam-se em direção à matriz extracelular, comprimindo a membrana basal. Esta última apresentou ruptura em alguns locais, indicando o potencial invasivo das células epiteliais anômalas. Pôde-se, então, confirmar que os agregados proliferativos instalados no estroma prostático realmente tratavam-se de células de origem epitelial. Adicionalmente, dados ainda não publicados de nosso laboratório mostraram que, gerbilos adultos com lesões invasivas induzidas por carcinógeno químico apresentam expressão da enzima alfa-metilacil-CoA racemase (P405S), um novo importante marcador de células de câncer prostático (Zanetoni, comunicação pessoal).

As gotículas lipídicas encontradas nas células epiteliais do gerbilo também são comuns em ratos velhos e linhagens de células humanas de câncer de próstata (Cohen et al., 1994; Swinnen et al., 1997). O aumento da lipogênese é uma das principais marcas das células cancerígenas e, os genes codificadores de enzimas lipogênicas são regulados por andrógenos. Esse evento é encontrado tanto nos estágios iniciais da transformação neoplásica (PIN) como em carcinomas invasivos, persistindo até mesmo em células independentes de andrógenos (Swinnen et al., 2004).

Estruturas osmiofílicas foram observadas com frequência em células epiteliais e estromais no gerbilo velho e estas se assemelharam a depósitos de lipofuscinas e/ou ceramidas. Aumento nos níveis intracelulares destas parece ser um evento comum tanto na senescência como na resposta celular a fatores estressores (Hannun, 1996; Venable e Obeid, 1999). Nas células de câncer prostático humano LNCaP submetidas à radiação, a produção de ceramidas esta envolvida com a ativação de morte celular apoptótica (Kimura et al., 1999).

Ao contrário do que ocorre em outros modelos de câncer de próstata e em humanos, as medidas de área, perímetros e fator forma nucleares de células epiteliais secretoras não aumentaram nos grupos alterados, indicando um comportamento cariométrico particular das lesões proliferativas em gerbilos velhos. Adicionalmente, esse tipo de análise quantitativa somente não foi suficiente para diagnosticar o comportamento das lesões, entretanto, pôde-se inferir que há uma menor atividade transcricional por parte das células componentes das mesmas. Em doenças prostáticas humanas, os parâmetros cariométricos também não foram efetivos para discriminar adenocarcinomas com diferentes graus de Gleason, porém foram eficientes para comparar BPH e adenocarcinoma (Martinez-Jabaloyas et al., 2002; Taboga et al., 2003).

O conteúdo de DNA nucleolar é um indicador da condição funcional e grau de proliferação celular (Trére, 2000; Karalyan et al., 2004). Na próstata do gerbilo velho, o número de corpúsculos nucleolares aumentou suavemente em PINs e carcinomas, enquanto que em hiperplasia prostática quase 70% dos núcleos não apresentaram nucléolos evidentes. Quanto aos parâmetros de área e perímetro dessa organela, PINs apresentaram maior razão nucléolo/núcleo, indicando um aumento do tamanho nucleolar total e, possivelmente, uma maior atividade metabólica celular nesses sítios. Pressupõe-se que, após a aquisição de potencial invasivo, as células diminuam suas atividades transcricionais, restringindo seu metabolismo à manutenção do processo de replicação. O comportamento pouco variável de nucléolos na maior parte das células epiteliais de lesões pode inferir, ainda, um caráter pouco agressivo, inicialmente, dessas neoplasias. Concordando com isso, até o momento, nenhum animal velho analisado apresentou uma lesão que compromettesse totalmente a função prostática ou que fosse metastática.

Adicionalmente, os índices de proliferação e morte celular indicaram um maior *turnover* celular à medida que alterações histopatológicas tornaram-se mais severas no gerbilo velho. Em ratos e humanos eventos semelhantes de cinética celular foram também encontrados (Berges et al., 1995; Xie et al., 2000).

Em PIN houve um equilíbrio entre os processos de proliferação e morte celular, enquanto que em carcinomas o índice de proliferação celular sobrepôs o de apoptose. A redução ou maior resistência à morte celular apoptótica parece ser um evento comum em câncer de próstata e este fator acelera o crescimento do tumor (Shibata et al., 1996; O'Neil et al., 2001; Schulz et al., 2003).

Entre os eventos que contribuem para o desequilíbrio homeostático no tecido prostático durante o envelhecimento estão alterações nos níveis de hormônios androgênicos. Embora poucos estudos tenham realmente demonstrado uma relação significativa entre os níveis séricos de testosterona e câncer de próstata, a maioria dos trabalhos sugere a associação entre esses dois fatores (Hsing et al., 2002), inclusive em gerbilos. Nestes roedores, o nível médio de testosterona no soro é de 4.82 ng/mL em animais adultos, enquanto que em animais velhos esses valores declinam para 2.80 ng/mL (Campos et al., 2006). Receptores de andrógenos são expressos em todos tipos histológicos de câncer de próstata e, mutações somáticas no gene para esses receptores são comuns no tecido tumoral em humanos e, essas mutações, provavelmente, estão envolvidas na progressão e agressividade tumoral (Ruijter et al., 1999, Scher et al., 2004).

O estroma prostático do gerbilo também sofreu alterações associadas ao envelhecimento, principalmente, em áreas adjacentes a anormalidades epiteliais. Nestas houve um acentuado aumento das fibras de colágeno, caracterizando um processo de desmoplasia. Este tipo de resposta estromal é comum em muitos tipos de cânceres (Robert, 2002). A evidente vascularização observada no estroma do animal velho também ocorre em tumores malignos. Nos últimos, esse evento está relacionado a um maior suprimento nutricional, trocas gasosas e eliminação de resíduos (Morrison et al., 2000). A quebra e remodelamento da matriz extracelular foram eventos que, provavelmente, favoreceram a dispersão de células epiteliais no estroma. Adicionalmente, a transformação maligna é intimamente dependente da composição e estrutura da matriz extracelular e, acredita-se que

as células tumorais possam modificar a produção e a degradação de elementos de matriz, favorecendo o processo migratório (Robert, 2002).

Embora o gerbilo velho não apresente alta frequência de alterações prostáticas invasivas, as PIN são comuns em boa parte desses animais. Partindo do preceito de que estas lesões são pré-malignas e precursoras do câncer prostático, maior detalhamento do comportamento celular e molecular das mesmas, já seria suficiente para sugerir a continuidade do estudo da próstata desse modelo roedor. Além disso, mecanismos envolvidos nos estágios iniciais do câncer prostático ainda não são compreendidos (Xie et al., 2000), bem como, as vias promotoras envolvidas no curso natural de sua evolução (Shirai et al., 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate-Shen C. and Shen M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Dev.* 14, 2410-2434.
- Banerjee P.P., Banerjee S., Lai J.M., Strandberg J.D., Zirkin B.R. and Brown T.R. (1998). Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol. Reprod.* 59, 1163-1170.
- Banerjee P.P., Banerjee S. and Brown T.R. (2001). Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinol.* 142, 4066-4075.
- Berges R.R., Vulkanovic J., Epstein J.I., Carmichel M., Cisek L., Johnson D.E., Veltri R.W., Walsh P.C. and Isaacs J.T. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 473-480.
- Bonkhoff H. and Remberger K. (1998). Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch.* 433, 195-202.
- Bostwick D.G., Pacelli A. and Lopez-Beltran A. (1996). Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29, 117-134.

- Campos S.P., Zanetoni C., Góes R.M. and Taboga S.R. (2006). Biological behavior of the gerbil ventral prostate during postnatal development. *Anatomical Record* in press.
- Cohen M.B., Heidger P.M. and Lubaroff D.M. (1994). Gross and microscopic pathology of induced prostatic complex tumors arising in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res.* 54, 626-628.
- Corradi L.S., Carvalho, H.F., Góes R.M. and Taboga S.R. (2004). Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72, 198-208.
- Cotta-Pereira G., Rodrigo F.G. and David-Ferreira J.F. (1976). The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol.* 51, 7-11.
- Cunha G.R., Ricke W., Thomson A., Marker P.C., Risbridger G., Hayward S.W., Wang Y.Z., Donjacour A.A. and Kurita T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.* 92, 221-236.
- Hannun Y.A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855-1859.
- Huss W.J., Maddison L.A. and Grenberger N.M. (2001). Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biol.* 11, 245-259.
- Karalyan Z.A., Djaghatspanyan N.G., Gasparyan M.H., Karobyan L.A., Abroyan L.O., Magakian Y.H., Ter-Pogossyan Z.R., Kamalyan L.A. and Karalova E.M. (2004). Morphometry of nuclear and nucleolar structures in a CaCo-2 cell line. *Cell Biol. Inter.* 28, 249-253.
- Kimura K., Bowen C., Spiegel S. and Gelmann E.P. (1999). Tumor necrosis factor α sensitizes prostate cancer cells to γ -irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 1606-1614.
- Martínez-Jabaloyas J.M., Ruiz-Cerdá J.L., Hernández M. and Jiménez-Cruz F. (2002). Prognostic value of DNA ploidy and nuclear morphometry in prostate cancer treated with androgen deprivation. *Urology* 59, 715-720.

- Morrison C., Thornhill J. and Gaffney E. (2000). The connective tissue framework in the normal prostate, BPH and prostate cancer: analysis by scanning electron microscopy after cellular digestion. *Urol Res.* 28, 304-307.
- O'Neill A.J., Boran S.A., O'Keane C., Coffey R.N.T., Hegarty N.J., Hegarty P., Gaffney E.F., Fitzpatrick J.M. and Watson R.W.G. (2001). Capase 3 expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Prostate* 47, 183-188.
- Pollard M. and Luckert P.H. (1986). Promotional effects of testosterone and high fat diet on the development of autochthonous prostate cancer in rats. *Cancer Lett.* 32, 223-227.
- Pollard M. and Luckert P.H. (1987). Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate* 11, 219-227.
- Pollard M. and Luckert P.H. (1992). Early manifestations of induced prostate tumors in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett.* 67, 113-116.
- Robert L. (2002). Cell-matrix interactions in cancer spreading – effect of aging. *Sem. Cancer Biol.* 12, 157-163.
- Roy-Burman P., Wu H., Powell W.C., Hagenkord J. and Cohen M.B. (2004). Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 225-254.
- Ruijter E., Vandekaa C., Miller G., Ruitter D., Debruyne F. And Schalken J. (1999). Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr. Rev.* 20, 22-45.
- Santos F.C.A., Carvalho H.F., Góes R.M. and Taboga S.R. (2003). Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35, 447-457.
- Scher H.I., Buchanan G., Gerald W., Butler L.M. and Tilley W.D. (2004). Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 459-476.
- Shappell S.C., Thomas G.V., Roberts R.L., Herbert R., Ittmann M.M., Rubin M.A., Humphrey P.A., Sundberg J.P., Rozengurt N., Barrios R., Ward J.M. and Cardiff R.D. (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor Meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. *Cancer Res.* 64, 2270-2305.

- Shibata M.-A., Ward J.M., Devor D.E., Liu M.-L. and 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 Res.* 56, 4894-4903.
- Schulz W.A., Burchardt M. and Cronauer M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 437-448.
- Schwentker V. (1963). The Gerbil. A new laboratory animal. *Veterinarian* 6, 5-9.
- Shirai T., Tahashi S., Cui L., Futakuchi M., Kato K., Tamano S. and Imaida K. (2000). Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutation Res.* 462, 219-226.
- Swinnen J.V., Heemers H., Van de Sande T., Schrijver E., Brusselmans K, Heyns W. and Verhoeven G. (2004). Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J. Steroid Bioch. Mol. Biol.* 92, 273-279.
- Swinnen J.V., Van Veldhoven P.P., Esquenet M., Heyns W. and Verhoeven G. (1997). Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology* 137, 4468-4474.
- Taboga S.R. (1999). Apoptosis as a mediator of hyperplastic recovery in human prostate lesions: cytochemical and immunocytochemical evaluation. *Cytobios* 99, 19-26.
- Taboga S.R., Santos A.B., Rocha A., Vidal B.C. and Mello M.L.S. (2003). Nuclear phenotypes and morphometry of human secretoty prostatic cells: A comparative study of benign and malignant lesions in Brazilian patients. *Caryologia* 56, 313-320.
- Tang D.G. and Porter A.T. (1997). Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate* 32, 284-293.
- Taplin M.E. and Ho S.-M. (2001). The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocr Metabol* 86, 3467-3477.
- Trére D. (2000). AgNOR staining and quantification. *Micron* 31, 127-131.
- Untergasser G., Rumpold H., Plas E., Madersbacher S. and Berger P. (2001). A low-molecular-weight fraction of human seminal plasma activates adenyl cyclase and induces caspase 3-independent apoptosis in prostatic epithelial cells by decreasing mitochondrial potential and Bcl-2/Bax ratio. *FASEB J.* 15, 673-683.

- Untergasser G., Madersbacher S. and Berger P. (2005). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol.* 40, 121-128.
- Venable M.E. and Obeid L.M. (1999). Phospholipase D in cellular senescence. *Biochim. Biophys Acta* 1439, 291-298.
- Wang Y., Sudilovsky D., Zhang B., Haughney P.C., Rosen M.S., Wu D.S., Cunha T.J., Dahiya R., Cunha G.R. and Hayward S.W. (2001). A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res.* 61, 6064-6072.
- Weibel E.R. (1978). Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 12, 131-155.
- Xie W., Wong Y.C. and Tsao S.W. (2000). Correlation of increased apoptosis and proliferating with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate* 44, 31-39.
- Zanetoni C., Campos S.G.P., Góes R.M. and Taboga S.R. (2005). Experimental induction of prostatic tumors in the gerbil *Meriones unguiculatus*: Testosterone effects. *Anais do XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Águas de Lindóia – SP.*
- Zanetoni C. and Taboga S.R. (2001). Age-related modifications in stromal and epithelial compartments of the male prostate of *Meriones unguiculatus*. *Acta Microsc.* 3, 203-204.

Legendas das Figuras

Figura 1. 1A – J: Próstatas de gerbilos velhos (HE). **A:** Visão geral de ácino (a) prostático de animal velho, onde a camada epitelial (ep) e as células musculares lisas (sm) estão separadas por uma ampla faixa de colágeno subepitelial (cabeça de seta). No epitélio nota-se a manutenção da atividade sintética pela presença de vesículas de secreção (seta) no lúmen acinar. Estroma (S). **B:** Detalhe de ácino prostático com epitélio espesso (ep), distribuição irregular das células musculares lisas (sm) e amplo depósito de colágeno (co) separando o epitélio da camada muscular. **C:** Ácino com PIN, onde se observa invaginações do epitélio para o interior do lúmen. Algumas células componentes de PIN apresentam fenótipos atípicos, como forma globular, citoplasma claro e núcleo volumoso (cabeça de seta). Camada muscular (sm). **D:** Detalhe de ácino anômalo com distribuição alterada de células epiteliais (cabeça de seta) e células musculares lisas (seta). Epitélio normal (ep); vaso sanguíneo (V). **E:** Ácino com depósitos amorfos de colágeno (co) comprimindo o epitélio glandular (ep), aparentemente, normal. Na seta uma camada muscular lisa delgada. **F:** Detalhe de células componentes de PIN, onde, novamente pode ser vistas células globulares (cabeça de seta) em meio ao agregado proliferativo. Epitélio normal (seta); Colágeno (co); músculo liso (sm). **G:** Sítio prostático com hiperplasia de células estromais (PH) envolvendo epitélio glandular proliferativo. Ácino (a); células epiteliais globulares (cabeças de setas); epitélio normal (seta). **H:** Detalhe de PIN compostas por células exibindo diferentes fenótipos (pleomorfismo celular) (cabeças de setas). No lúmen acinar há deposição de estruturas cristalóides (seta). **I:** PIN exibindo estratificação celular desordenada e grande polimorfismo nuclear. Músculo liso (sm). **J:** Corte histológico de próstata de gerbilo velho submetido ao método de reticulina de Gömori. Estroma prostático (S) com aumento acentuado de fibras reticulares (setas) logo abaixo de uma PIN. Esse evento foi comum nos animais velhos.

Figura 2. 1A – D: Próstatas de gerbilos velhos (HE). **A:** Ácinos (a) com vários graus de PIN (setas) associados a um carcinoma microinvasivo (cabeça de seta dupla) no estroma (S). As células componentes desse agregado proliferativo apresentam dimensões

reduzidas. Epitélio normal (cabeça de seta). **B:** Maior aumento de células componentes de carcinoma microinvasivo. **C:** Adenocarcinoma. Notar a formação de arcos (microácinos) no epitélio anômalo devido à proliferação e rearranjos das células epiteliais (setas). No estroma (S), vasos sanguíneos (V) estão próximos à lesão e a camada muscular lisa (sm) ao redor parece aumentada. **Ácino (a);** Epitélio normal (cabeça de seta); Células globulares (cabeça de seta dupla). **D:** Adenocarcinoma com grande quantidade de pequenos ácinos (a) compostos por células epiteliais fenotipicamente atípicas. Nesta lesão observa-se uma maior quantidade de células globulares, com citoplasma pálido e núcleos proeminentes (setas) e a manutenção da atividade secretora (cabeça de seta). Camada muscular (sm); Vaso sanguíneo (V).

Figura 3. 3A – G: Eletromicrografias de próstatas de gerbilos velhos. **A:** Epitélio secretor (ep) normal exibindo células colunares típicas, com seus núcleos acompanhando a forma celular. Abaixo do epitélio nota-se uma camada de músculo liso (sm) rodeando-o. Membrana basal (seta); Estroma (S); Vaso sanguíneo (V). Aumento: 1000x. **B:** Citoplasma de célula epitelial repleto de acúmulos lipídicos (ld), um evento comum nas células de animais velhos. Próximos a estes depósitos encontram-se diversas mitocôndrias (setas pretas). Nota-se, ainda massas de cromatina condensada depositadas, principalmente, na periferia do núcleo (N) (setas brancas). Aumento: 10000x. **C:** Porção apical de uma célula epitelial secretora com vesículas (sv) sendo liberadas para o lúmen acinar. Citoplasma repleto de organelas de síntese (cabeças de setas, RER) e acúmulos lipídicos (ld). Estruturas semelhantes a lipofuscinas (setas) podem ser vistas no citoplasma e no lúmen acinar. Aumento: 7750x. **D:** Maior detalhe de uma célula epitelial com abundância de Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e um grande depósito de lipofuscina (seta). Núcleo (N). Aumento: 12930x. **E:** Detalhe de depósitos lipídicos (fa) em citoplasma célula epitelial e Retículo Endoplasmático Rugoso evidente (seta). 12930x. **F:** Células epiteliais atípicas (ep) componentes de agregado proliferativo, desprendidas umas das outras. Notar que os contornos citoplasmáticos e nucleares são irregulares (setas), sugerindo alterações fenotípicas neoplásicas. Núcleo (N); fibroblasto (F). Aumento: 6504x. **G:** Região do

epitélio com célula em processo de degeneração (seta) ao lado de célula epitelial íntegra. Núcleo (N). Aumento: 4646x.

Figura 4. 4A – C: Eletromicrografias de próstatas de gerbilos velhos. **A-C:** Arranjos em microácinos de células epiteliais componentes de adenocarcinomas. Notar que as células epiteliais (ep) apresentam organelas de síntese evidentes (cabeça de seta), representadas por Retículo Endoplasmático Rugoso, principalmente. Microvilosidades (setas) são comuns nos ápices dessas células. Produtos de secreção, entre eles ceramidas (*) estão presentes nos lumens (l) desses microácinos. Lúmen acinar (L). Aumentos: **A:** 6000x; **B:** 12930x; **C:** 12930x.

Figura 5. 5A – H: Próstatas de gerbilos velhos preparadas para a análise ao Microscópio Eletrônico de Transmissão. **A:** Visão geral do estroma (S) prostático, acima deste encontra-se o epitélio (ep). Fibrilas de colágeno dispostas em feixes (setas) distribuem-se abaixo do epitélio e entre as células musculares lisas (SMC). O núcleo (N) destas células é grande e, normalmente, acompanha a sua forma. Membrana basal (cabeça de seta); Fibroblasto (F). Aumento: 7750x. **B:** Detalhe da interface epitélio-estroma, onde se observa a membrana basal espessa (bm) e com ondulações (cabeças de setas) provocadas pela compressão realizada por projeções citoplasmáticas de células epiteliais (ep). Aumento: 16700x. **C:** Detalhe de célula epitelial atípica (ep) com expansões citoplasmáticas distintas (setas) comprimindo a membrana basal (cabeça de seta). Núcleo (N); Vaso sangüíneo (V). Aumento: 10850x. **D:** Novamente, detalhe de projeção citoplasmática de célula epitelial (ep) onde podem ser observadas adesões focais (cabeças de setas) favorecendo o deslocamento celular. Abaixo do epitélio, amplo depósito de colágeno (co), uma característica comum do estroma em gerbilos velhos. Fibra elástica (seta); Membrana basal (bm). Aumento: 27800x. **E:** Fibras de colágeno (co) dispostas em diferentes direções e associadas à membrana basal (cabeça de seta). Epitélio (ep); Acúmulos de lipídios (fa). Aumento: 10000x. **F - G:** Regiões de prováveis rupturas (setas) na estrutura da membrana basal (bm), favorecendo a invasão de células epiteliais (ep) no estroma prostático. Colágeno (co). Aumentos: **F:** 35970x; **G:** 50300x. **H:** Célula muscular

lisa (SMC) com fenótipo menos fusiforme e contornos citoplasmáticos e nucleares irregulares (seta). Colágeno (co). Aumento: 7750x.

Figura 6. 6A – C: Próstatas de gerbilos velhos submetidas à imunomarcação para anti-Ki-67. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. **A:** Epitélio normal (ep) com marcação única (seta). **B:** Marcação de proliferação em PIN (seta). **C:** Maior quantidade de células proliferativas no epitélio hiperplásico (ep) de animal velho.

Figura 7. 7A – C: Próstatas de gerbilos velhos (TUNEL / HE) para marcação de núcleos apoptóticos. As setas são indicativas de apoptose no epitélio prostático (ep). **A:** Epitélio normal. **B:** Carcinoma. **C:** PIN.

Tabela 1. Valores de dados morfométricos e estereológicos em lesões proliferativas na próstata ventral do gerbilo velho.

Medidas Prostáticas	Grupos			
	Não afetado (Controle)	Hiperplasia Estromal Prostática (PH)	Neoplasia Intra-epitelial Prostática (PIN)	Carcinoma Microinvasivo
Densidade dos compartimentos (%)				
Epitelial Glandular **	55.74 ± 13.52 ^a	51.26 ± 13.05 ^{a, b}	63.90 ± 13.40 ^{a, c}	NV
Estromal*	44.26 ± 13.52 ^a	47.20 ± 14.51 ^{a, b}	36.10 ± 13.40 ^{a, c}	NV
Volume				
Componentes teciduais (%)				
Epitélio**	17.33 ± 5.53 ^a	27.72 ± 6.99 ^b	35.77 ± 9.48 ^c	NV
Lumen**	38.41 ± 13.36 ^a	23.54 ± 13.67 ^b	28.13 ± 14.46 ^b	NV
Células Musculares Lisas***	14.28 ± 7.15 ^a	29.43 ± 6.75 ^b	15.28 ± 6.23 ^a	NV
Camada de colágeno subepitelial *	7.61 ± 5.36 ^a	0.51 ± 1.74 ^b	4.28 ± 4.28 ^c	NV
Estroma não-muscular interacinar	18.22 ± 11.10	17.26 ± 13.39	16.54 ± 10.50	NV
Morfometria Nuclear				
Área nuclear (µm ²)*	24.58 ± 5.47 ^a	19.00 ± 3.41 ^b	22.11 ± 6.45 ^c	20.19 ± 6.19 ^b
Perímetro nuclear (µm) ***	20.12 ± 2.53 ^a	18.18 ± 2.10 ^b	18.78 ± 2.82 ^{b, c}	17.64 ± 2.88 ^{b, d}
Fator Forma nuclear *	0.76 ± 0.1 ^a	0.73 ± 0.09 ^b	0.78 ± 0.08 ^a	0.80 ± 0.08 ^c

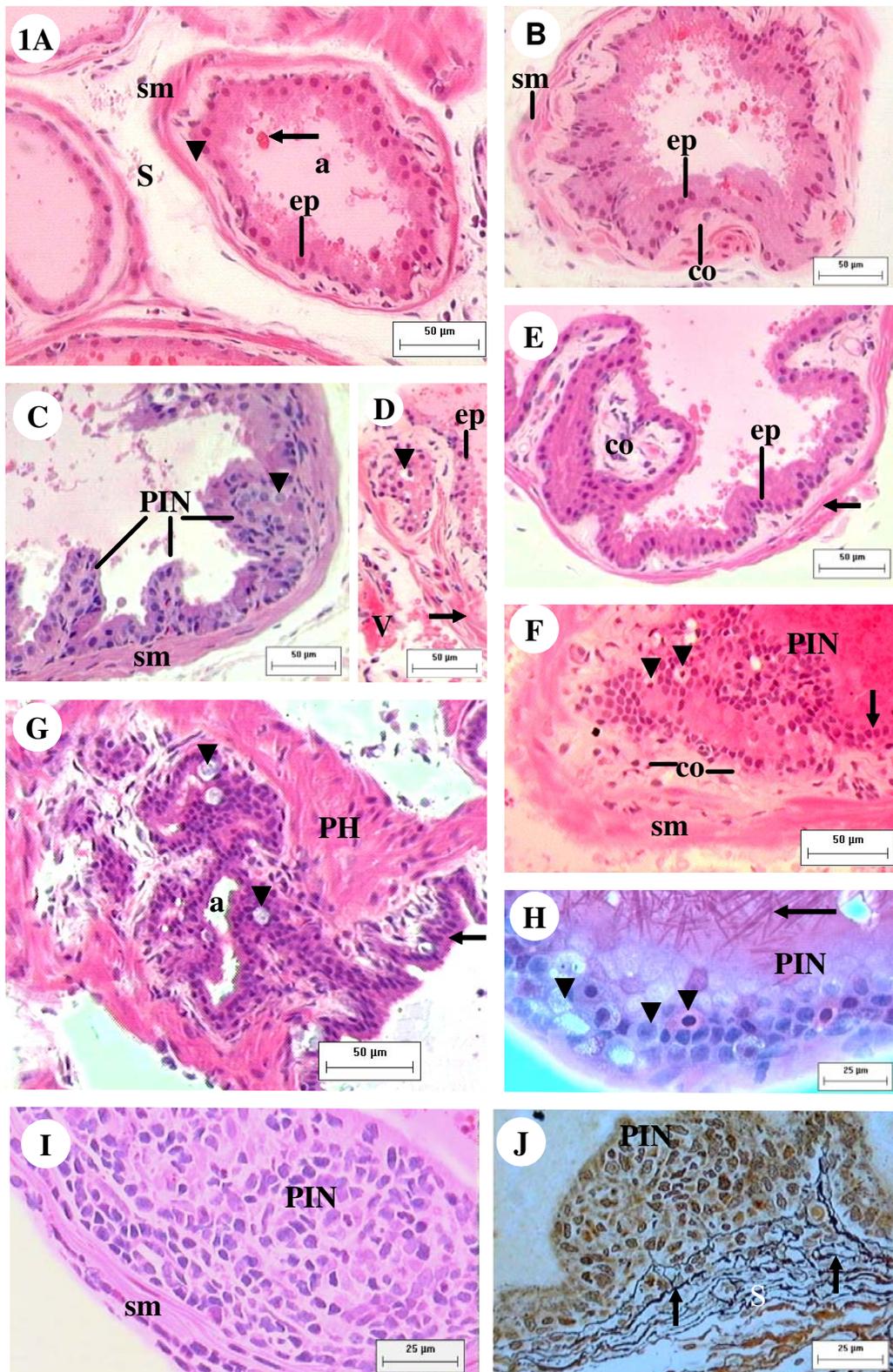
Valores representam média ± DP. Análise Estatística baseada nos testes ANOVA e Tukey. Significância, *p ≤ 0,01; ** p ≤ 0,001; *** p ≤ 0,0001. a, b, c, d = superíndices diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. NV – não verificado.

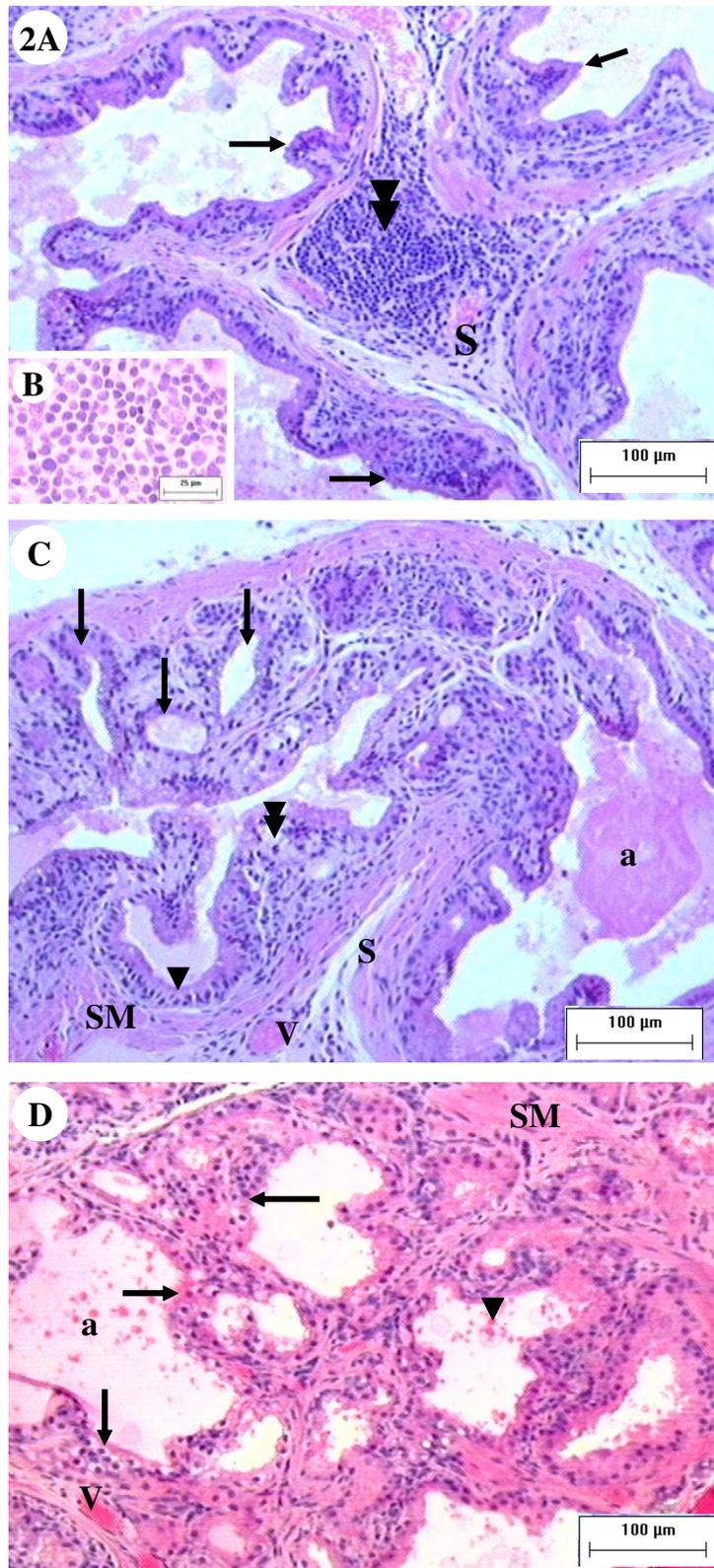
Tabela 2. Valores de índices de proliferação e morte celular apoptótica em lesões proliferativas epiteliais na próstata ventral do gerbilo velho.

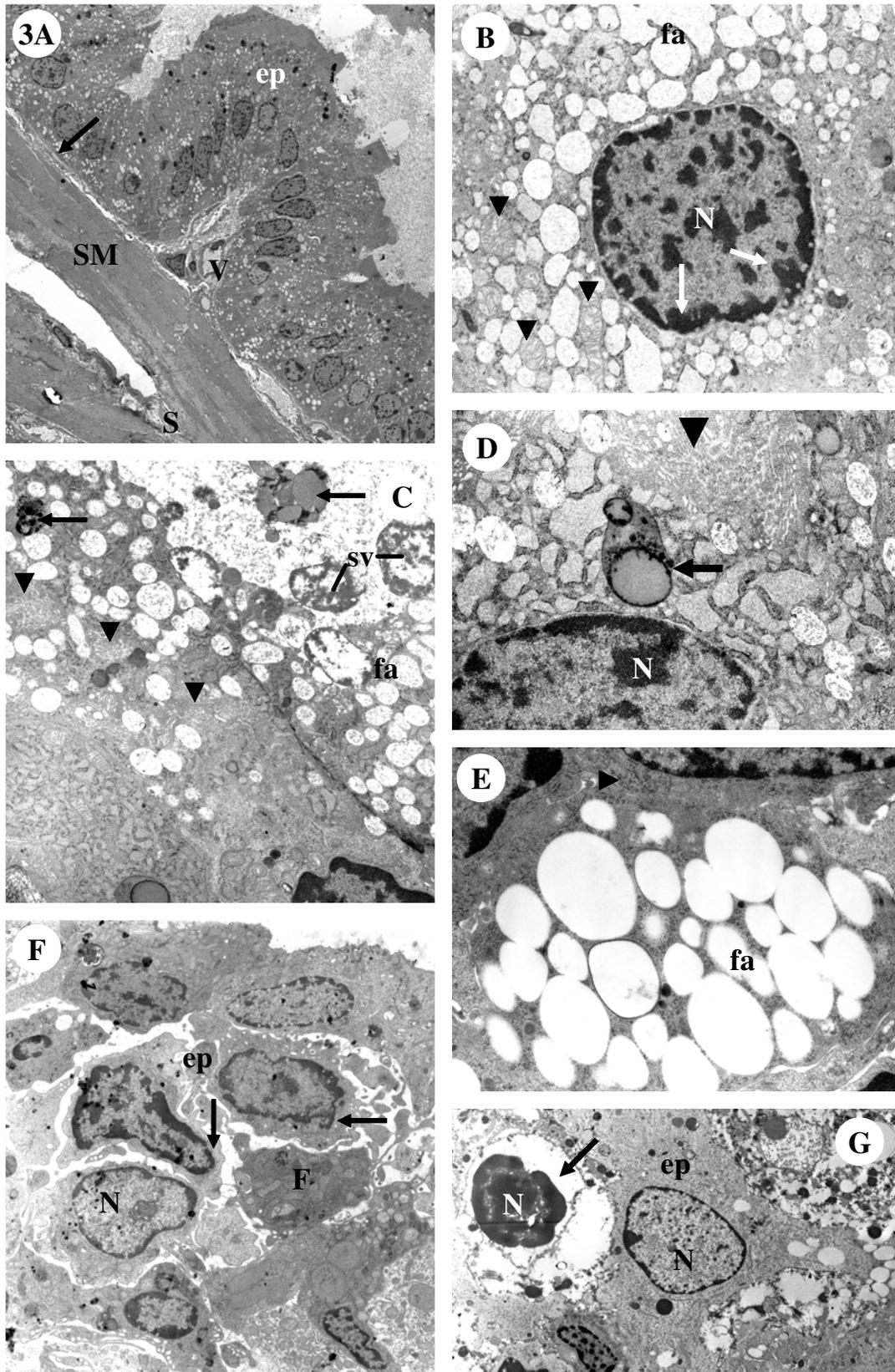
Grupos	Índice de Proliferação (IA)	Índice Apoptótico (IP)	IA/IP
Velho Controle	0.021 ± 0.004 ^a	0.062 ± 0.019 ^a	0.034
Neoplasia Intra-epitelial Prostática (PIN)	0.085 ± 0.018 ^b	0.089 ± 0.021 ^a	0.095
Carcinoma microinvasivo	0.162 ± 0.036 ^c	0.100 ± 0.040 ^b	1.620

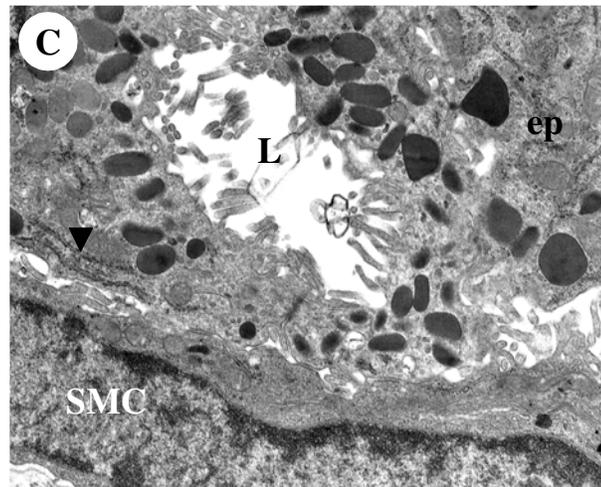
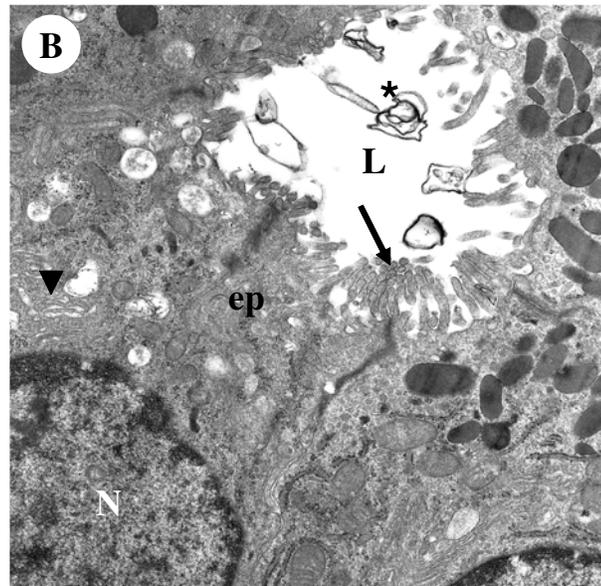
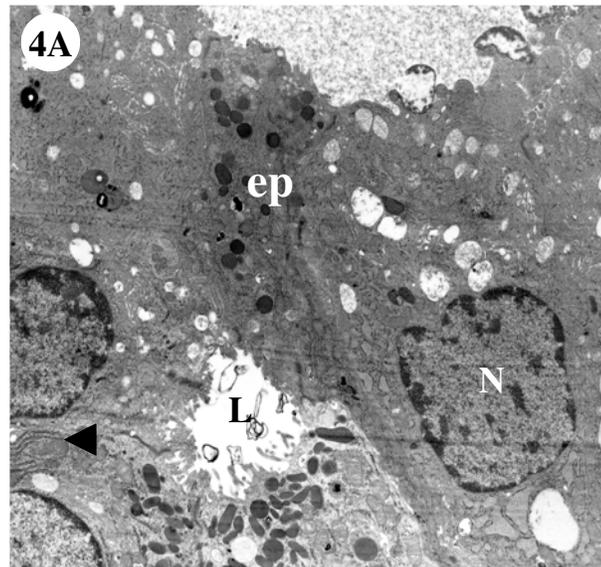
Valores representam média ± DP. Análise Estatística baseada nos testes ANOVA e Tukey.

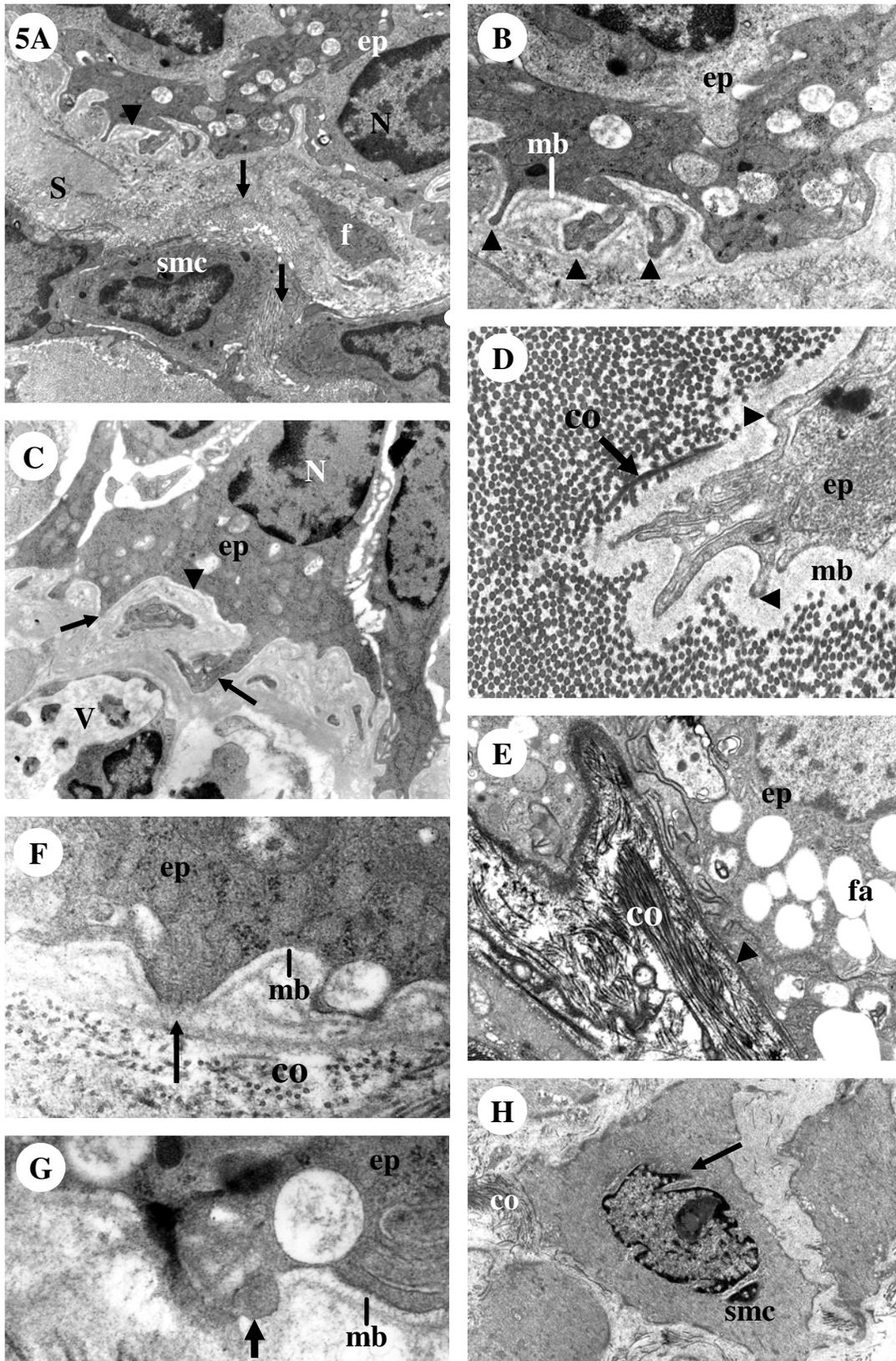
a, b, c= superíndices diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

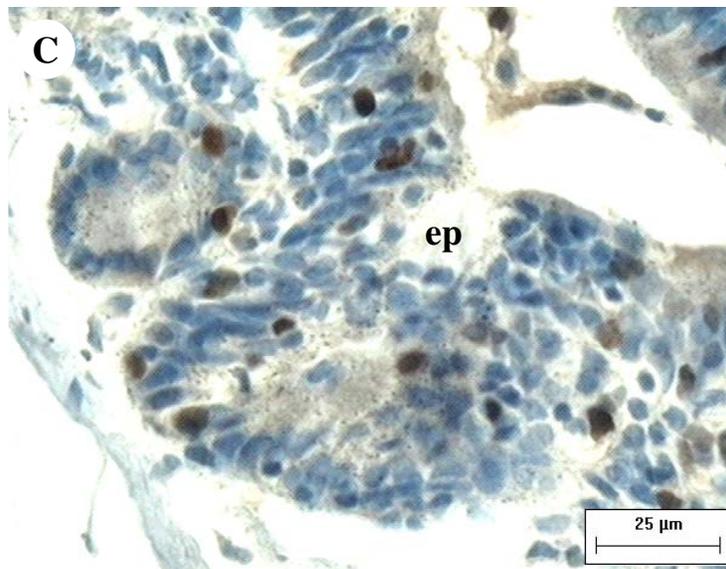
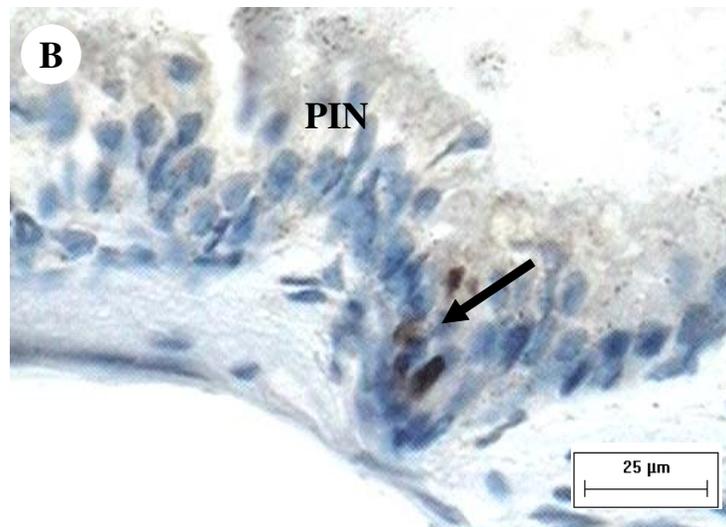
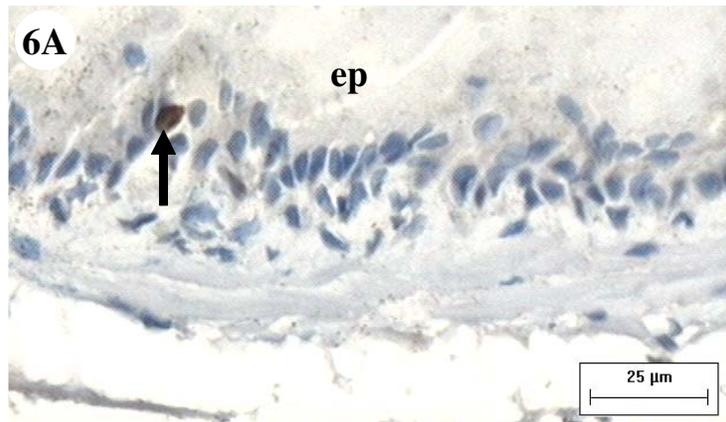


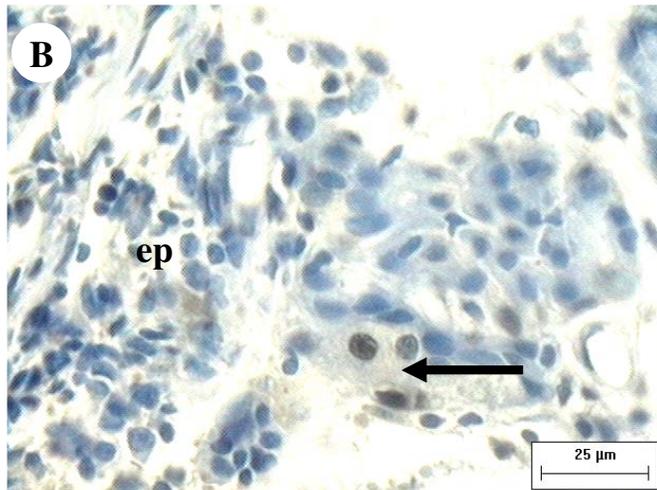
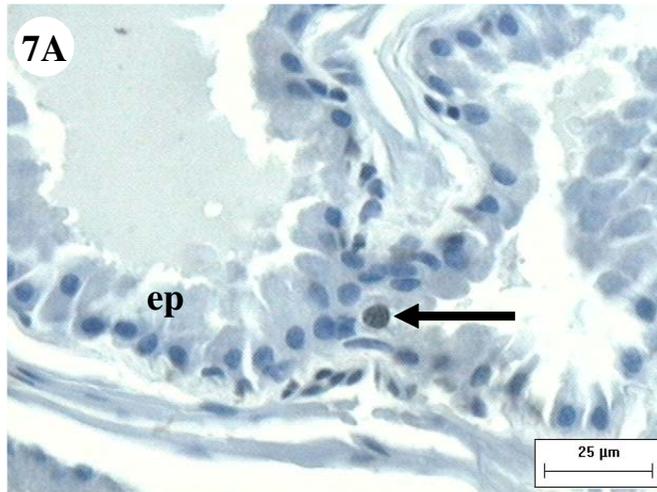












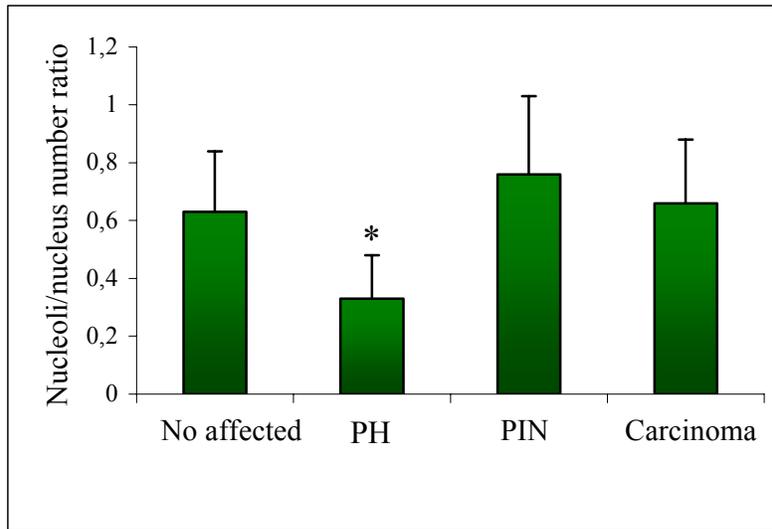


Figura 8. Gráfico da razão número de nucléolos/núcleo de células epiteliais da próstata do gerbilo velho em lesões proliferativas espontâneas.

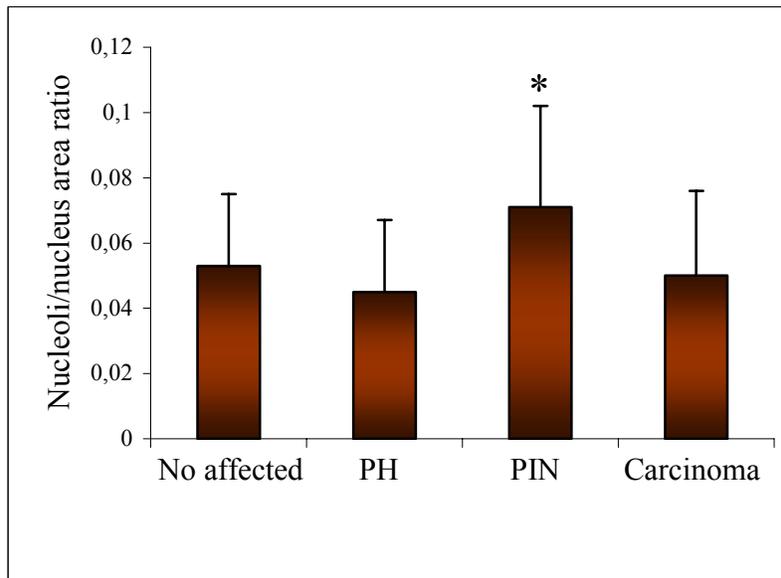


Figura 9. Gráfico da razão área nucléolos/núcleo de células epiteliais da próstata do gerbilo velho em lesões proliferativas espontâneas.

CONCLUSÕES GERAIS

⇒ 1. A morfologia e homeostase da próstata ventral do gerbilo são diretamente dependentes dos níveis séricos de testosterona.

⇒ 2. Gerbilos jovens (48 ± 15.9 dias) apresentam glândulas prostáticas imaturas quanto sua organização tecidual e atividade secretora.

⇒ 3. Lesões histopatológicas associadas ao envelhecimento foram comuns na próstata ventral do gerbilo, sendo mais comuns as neoplasias intra-epiteliais (PIN), as quais acometeram 46.67% do universo amostral prostático aqui analisado.

⇒ 4. O compartimento estromal da próstata ventral do gerbilo apresenta distribuição de elementos celulares e fibrilares peculiar à idade do animal, à semelhança do que ocorre em humanos e em outros roedores.

⇒ 5. Um acentuado processo de fibrose é comum no estroma do animal velho, devido, principalmente, a maior síntese e deposição de fibras reticulares e de colágeno abaixo do epitélio glandular e entre as células musculares lisas.

⇒ 6. A hiperplasia celular estromal, quando presente, está sempre adjacente a sítios de epitélio anômalo e associada à proliferação de células musculares lisas.

⇒ 7. Focos invasivos presentes no estroma correspondem a agregados proliferativos de células epiteliais, uma vez que a ruptura da membrana basal foi constatada em alguns ácinos por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

⇒ 8. Uma característica comum das células epiteliais secretoras anômalas é a presença de acúmulos de lipídios no citoplasma destas, à semelhança do que ocorre em linhagens de células humanas comprometidas com câncer de próstata.

⇒ 9. Os índices de proliferação e morte celular indicam um maior *turnover* celular à medida que as lesões tornam-se invasivas.

⇒ 10. O gerbilo é um bom modelo para estudo prostático tanto em nível de biologia normal do órgão quanto em alterações patológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate-Shen C, Shen MM (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Dev* 14: 2410-2434.
- Abrahamson PA (1999) Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocr Related Cancer* 6: 503-519.
- Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Brown TR, Zukin BR (1995) Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinol* 136: 4368-4376.
- Banerjee PP, Banerjee S, Lai JM, Strandberg JD, Zirkin BR, Brown TR (1998) Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod* 59: 1163-1170.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR (2000). Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinol* 141: 821-832.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR (2001) Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinol* 142: 4066-4075.
- Berges RR, Vulkanovic J, Epstein JI, Carmichel M, Cisek L, Johnson DE, Veltri RW, Walsh PC, Isaacs JT (1995) Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1: 473-480.
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP (2002) Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinol* 143: 4922-4933.
- Bonkhoff H, Remberger K (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28: 98-106.
- Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K (1998) Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 34: 251-258.
- Bonkhoff H, Remberger K (1998) Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch* 433: 195-202.

- Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A (1996) Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29: 117-134.
- Bostwick DG, Ramnani D, Qian J (2000) Prostatic intraepithelial neoplasia: Animal models 2000. *Prostate* 43: 286-294.
- Botticelli AR, Casali AM, Botticelli L, Zaffe D (1998) Immunohistochemical detection of cell-cycle associated markers on paraffin embedded and formalin fixed needle biopsies of prostate cancer: correlation of p120 protein expression with AgNOR, PCNA/cyclin, K-6/ MIB 1 proliferation-scores and Gleason gradings. *Eur J Histochem* 42: 41-48.
- Carson C, Rittmaster R (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61: 2-7.
- Carvalho HF, Line SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20: 809-819.
- Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR (1997) The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. *Prostate* 32: 27-34.
- Corradi LS, Góes RM, Taboga SR (2003) Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inducer of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72: 198-208.
- Claus S, Berges R, Senge T, Schulze H (1997) Cell kinetic in epithelium and stroma of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 158: 217-221.
- Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y (1986) Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem Cell Biol* 64: 608-614.
- Cunha GR, Will Ricke, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T (2004a) Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Bioch Mol Biol* 92: 221-236.
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004b) Role of stromal-epithelial interations in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67: 417-434.
- Debes JD, Tindall DJ (2002) The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett* 187: 1-7.

- Droller MJ (1997) Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol* 79: 42-52.
- Fujimoto N, Suzuki T, Honda H, Kitamura S (2004) Estrogen enhancement of androgen-responsive gene expression in hormone-induced hyperplasia in the ventral of F344 rats. *Cancer Sci* 95: 711-715.
- Galbraith SM, Duchesne GM (1997) Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur J Cancer* 33: 545-554.
- Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda M (2003) Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate* 55: 206-218.
- Greenberg NM, Demayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM (1995) Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3439-3443.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Harkonen PL, Makela SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 297-305.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996a) Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155: 94-103.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996b) Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155: 81-93.
- Heinlein CA, Chang C (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25: 276-308.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ (2002) Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52: 213-235.
- Huss WJ, Maddison LA, Grenberger NM. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biol* 11: 245-259.

- Imamov O, Morani A, Shin G-J, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson J-A (2004) Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9375-9380.
- Karr JF; Kantor JA; Hand PH; Eggensperger DL, 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.
- Kirby RS, Christmas TS, Brawer M (1996) Prostate cancer. Mosby ed. London, 170p.
- Kramer AWJr 1964. Body and organ Weights and linear measurements of the mongolian gerbil. *Anat. Rec.*, 150: 343-347.
- Krieg M, Nass R, Tunn S (1993) Effect of aging on endogenous level of 5 α -Dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 375-381.
- Kyprianou N, Chon J, Benning CM (2000) Effects of alpha(1)-adrenoceptor (alpha (1)-AR) antagonists on cell proliferation and apoptosis in the prostate: therapeutic implications in prostatic disease. *Prostate* 9: 42-46.
- Leav I, Schelling KH, Adams JY, Merck FB, Alroy J (2001) Role of canine basal cells in postnatal prostatic development, induction of hyperplasia, and sex-hormone-stimulated growth, and ductal origin of carcinoma. *Prostate* 48: 210-224.
- Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT (1997) Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31: 131-138.
- Leite KR, Srougi M, Nesralhah LJ, Camara-Lopes LH (1999) Analysis of p53 expression and proliferative assessment using PCNA in localized prostate carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 32: 283-288.
- Litvinov IV, De Marzo AM, Isaacs JT (2003) Is the Achilles` for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metabol* 88: 2972-2982
- Lucia MS, Bostwick DG, Bosland M, Cockett ATK, Knapp DW, Leav I, Pollard M, Rinker-Schaeffer C, Shirai T, Watkins BA (1998) Workgroup I: Rodent models of prostate cancer. *Prostate* 36: 49-55.

- Lu QL, Abel L, Foster CS, Lalani EN (1996) Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 27: 102-110.
- Marcelli M, Cunningham, GR (1999) Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metabol* 84: 3463-3468.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. *Dev Biol* 253:165-174.
- Matrisian LM, Cunha GR, Mohla, S (2001) Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and futures directions. *Cancer Res* 61: 3844-3846.
- McEntee MF, Epstein JI, Syring R, Tierney LA, Strandberg JD (1996) Characterization of prostatic basal cell hyperplasia and neoplasia in aged macaques: comparative pathology in human and nonhuman primates. *Prostate* 29: 51-59.
- McNeal JE (1983) The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol* 4: 3-37.
- Meikle AW, Stephenson RA, Lewis CM, Middleton RG (1997) Effects of age and sex hormones on transition and peripheral zone volumes of prostate and benign prostatic hyperplasia in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 571-575.
- Morrison C, Thornhill J, Gaffney E (2000) The connective tissue framework in the normal prostate, BPH and prostate cancer: analysis by scanning electron microscopy after cellular digestion. *Urol Res* 28: 304-307.
- O'Donnel L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 289-318.
- O'Neill AJ, Boran SA, O'Keane C, Coffey RNT, Hegarty NJ, Hegarty P, Gaffney EF, Fitzpatrick JM, Watson RWG (2001) Capase 3 expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Prostate* 47: 183-188.
- Pollard M, Luckert PH (1986a) Production of autochthonous prostate cancer in Lobund-Wistar rats by treatments with N-nitroso-N-methylurea and testosterone. *JNCL* 77(2): 583-587.
- Pollard M, Luckert PH (1986b) Promotional effects of testosterone and high fat diet on the development of autochthonous prostate cancer in rats. *Cancer lett* 32: 223-227.

- Pollard M, Luckert PH (1987) Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate* 11: 219-227.
- Pollard M, Luckert PH (1992) Early manifestations of induced prostate tumors in Lobund-Wistar rats. *Cancer lett* 67: 113-116.
- Pollard M, Luckert PH (1994) Activation of dormant cancer cells in the prostates and seminal vesides of Lobund-Wistar rats. *Cancer lett* 82: 141-144.
- Price D (1963) Comprative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr* 12: 1-27.
- Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G (2001) The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinol* 142: 2443-2450.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mcpherson SJ (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocr-Rel Cancer* 10: 187-191.
- Ross MH; Reith EJ, Romrell LJ (1993) *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana 2ed, RJ, 779p.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB (2004) Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 11: 225-254.
- Royuela M, Miguel MP, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua, R. (2001). Estrogen receptors α e β in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol* 168: 447-454.
- Ruijter E, Van De Kaa C, Miller G, Ruitter D, Debruyne F, Schalken J (1999) Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr Rev* 20: 22-45.
- 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.
- Scher HI, Buchanan G, Gerald W, Butler LM, Tilley WD (2004) Targeting the androgen receptor: improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11: 459-476.

- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003) Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9: 437-448.
- Schwentker V (1963) The Gerbil. A new laboratory animal. *Veterinarian* 6 (4): 5-9.
- Sensibar JA, Pruden SJ, Kasjanski RZ, Rademaker A, Lee C, Grayhack JT, Koslowski JM. (1999) Differential growth rates in stromal cultures of human prostate derived from patients of varying ages. *Prostate* 38: 110-117.
- Shirai T, Tahashi S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, Imaida K. 2000. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutat Res* 462: 219-226.
- Slyter MV; Anzano MA; Kadomatsu K; Smith JM, Sporn MB (1994) Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: A system for histological scoring and grading. *Cancer Res* 54: 1440-1445.
- Steiner MS (2003) High-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer risk reduction. *World J Urol* 21: 15-20.
- 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.
- Taboga SR (1999) Apoptosis as a mediator of hyperplastic recovery in human prostate lesions: cytochemical and immunocytochemical evaluation. *Cytobios* 99: 19-26.
- Tang DG, Porter AT (1997) Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate* 32: 284-293.
- Taplin ME, Ho S-M (2001) The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocr Metabol* 86: 3467-3477.
- Thomson AA, Cunha GR (1999) Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development* 126: 3693-3701.
- Thomson AA (2001) Role of androgen 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.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166: 2472-2483.

- Tuxhorn JA, Mcalwany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR (2002) Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res* 62: 3298-3307.
- Untergasser G, Rumpold H, Plas E, Madersbacher S, Berger P (2001) A low-molecular-weight fraction of human seminal plasma activates adenyl cyclase and induces caspase 3-independent apoptosis in prostatic epithelial cells by decreasing mitochondrial potential and Bcl-2/Bax ratio. *FASEB J* 15: 673-683.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P (2005) Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 40: 121-128.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF (2005) Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int* 29: 809-816.
- Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haughney PC, Rosen MS, Wu DS, Cunha TJ, Dahiya R, Cunha GR, Hayward SW (2001) A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 61: 6064-6072.
- Wong YC, Tam NNC (2002) Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation* 70: 633-645.
- Xie W, Wong YC, TSAO SW (2000) Correlation of increased apoptosis and proliferating with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate* 44: 31-39.
- Xu J, Zheng SL, Chang B, Smith J.R, Carpten JD, Stine OC, Isaacs SD, Wiley KE, Henning L, Ewing C, Bujnovszky P, Bleeker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs, WB (2000) Linkage of prostate cancer susceptibility loci to chromosome 1. *Hum Genet* 108: 335-345.
- Zanetoni C, Taboga SR (2001) Age-related modifications in stromal and epithelial compartments of the male prostate of *Meriones unguiculatus*. *Acta Microsc* 3: 203-204.