



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Marianna Zanatelli

“ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL: efeitos da ovariectomia e posterior reposição prolongada pelo estradiol e progesterona”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) *Marianna Zanatelli*
e aprovada pela Comissão Julgadora

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Z15a	<p>Zanatelli, Marianna, 1987- Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral: efeitos da ovariectomia e posterior reposição prolongada pelo estradiol e progesterona / Marianna Zanatelli. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Sebastião Roberto Taboga. Coorientador: Fernanda Cristina Alcântara dos Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata feminina. 2. Ovariectomia. 3. Estradiol. 4. Progesterona. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Santos, Fernanda Cristina Alcântara dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Morphofunctional aspects of gerbil female prostate during the estrous cycle: effects of ovariectomy and subsequent prolonged replacement by estradiol plus progesterone

Palavras-chave em Inglês:

Female prostate

Ovariectomy

Estradiol

Progesterone

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]

Wellerson Rodrigo Scarano

Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

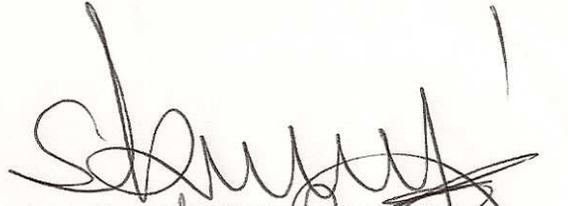
Data da defesa: 17-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 17 de fevereiro de 2012.

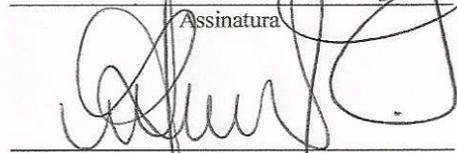
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



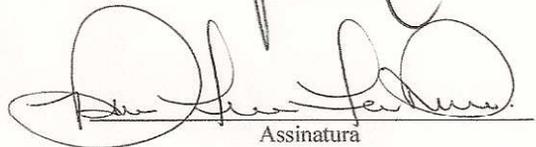
Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



Assinatura

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro



Assinatura

Prof. Dr. Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Assinatura

“ Dê sempre o melhor

E o melhor virá...

Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo...

Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra...

Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...

Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã...

Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante...

Dê o melhor de você assim mesmo.

E veja você que, no final das contas...

É entre VOCÊ e DEUS..

Nunca foi entre você e eles!”

*Agnes Gonxha Bojaxhiu
(Madre Teresa de Calcutá)*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por ter possibilitado a realização deste trabalho, por confiar na minha capacidade e, desta forma, me fazer buscar pelo melhor de mim.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, por todo auxílio prestado durante estes dois anos, por também ter acreditado no meu trabalho desde o início e por todo esforço realizado para que se fizesse possível a co-orientação à distância.

Aos membros da pré-banca e banca examinadora, Profs. Drs. Wellerson Rodrigo Scarano, Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, Edson Rosa Pimentel e Luis Antonio Justulin Junior, pela disponibilidade em participarem do enriquecimento e finalização desse trabalho.

À Fapesp, pelo grande suporte financeiro concedido nas formas de Bolsa de Mestrado (Processo nº 2009/12688-1) e Reserva Técnica.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e aos seus docentes, por estimularem nossa busca pelo conhecimento e serem exemplos admiráveis de profissionais.

À Liliam Panagio, secretária do PPG – Biologia Celular e Estrutural, pela eficiência e disponibilidade em ajudar sempre.

Aos meus amigos Diego e Filipe, por terem compartilhado comigo as boas e difíceis experiências que surgiram durante estes dois anos de trabalho. Agradeço especialmente ao Diego, que foi meu grande companheiro nas viagens pra Campinas, nas exaustivas disciplinas da Pós e em todas as etapas dos experimentos. Ter sua companhia e sua amizade tornou todo o processo mais confortável. Muito obrigada!

Ao Luiz Roberto Falleiros Jr., técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise, por todo auxílio prestado e pela incrível capacidade de nos fazer rir de tudo.

“Não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir junto”

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Microscopia e Microanálise pela companhia, por todos os auxílios prestados e por se empenharem em fazer do ambiente de trabalho um lugar confortável e alegre. Sem dúvida nenhuma, o sucesso de nossos estudos se deve à colaboração de todos do laboratório, que pensam e agem como uma verdadeira equipe. Gostaria de aqui, homenagear aqueles que não medem esforços para que o trabalho seja feito com excelência e que aliam isso à ótima convivência diária. Agradeço, em especial, a minha amiga Bianca, por ter participado deste trabalho e me auxiliado com empenho e dedicação que só uma grande pesquisadora possui. Obrigada pela amizade tão valiosa que descobri em você.

"Seja a mudança que você deseja ver no mundo."

Mais uma vez e sempre agradeço aos meus pais, Pedro e Marina, por terem me ensinado que “dar sempre o melhor” valeria a pena. Vocês continuam sendo os principais responsáveis pelas minhas conquistas e pelas minhas escolhas acertadas. Amo vocês demais!

“Há pais que gostam de dar presentes. Há pais que gostam de estar presentes.

Há pais que investem para os filhos. Há pais que investem nos filhos.

Há pais que deixam de herança valores em reais. Há pais que deixam de herança valores reais.”

Ao meu irmão e amigo Pedro Henrique, porque “você é a pessoa mais bonita que eu conheço”.

Ao Matheus, meu sempre amigo e confidente, o amor da minha vida, e a pessoa com quem ainda mais gosto de conversar... Esta é mais uma etapa que cumpro com você ao meu lado. Obrigada por ser meu companheiro e por me fazer acreditar que príncipes encantados existem...

"O Amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforma no melhor que podemos ser."

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
Desenvolvimento Embrionário da Próstata	10
A Próstata Feminina	14
O Modelo Experimental	16
Morfologia da Próstata do Gerbilo da Mongólia	16
Atuação do estrógeno e da progesterona no organismo feminino	18
Biossíntese dos hormônios sexuais.....	20
Relevância do presente estudo	21
OBJETIVO.....	23
ARTIGO.....	24
TABELA	46
FIGURAS.....	47
CONCLUSÕES GERAIS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

A próstata feminina é uma glândula funcionalmente ativa encontrada em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos e roedores. Em fêmeas adultas de gerbilos, a próstata apresenta localização parauretral, exibindo íntimo contato com a parede da uretra média. Esta glândula é homóloga à próstata ventral de roedores machos, sendo formada por um conjunto de ácinos e ductos inseridos em um estroma fibromuscular. O estudo da morfofisiologia prostática nas fases do ciclo estral tem demonstrado que a próstata feminina é influenciada pelas oscilações nos níveis séricos de estradiol e progesterona, com picos nas fases de estro e diestro II, respectivamente. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração combinada e prolongada de estradiol e progesterona sobre a próstata de fêmeas de gerbilo ovariectomizadas. A ovariectomia causou regressão glandular e diminuição da atividade secretora, aspectos sugeridos, entre outros, pela diminuição da massa prostática e a quase ausência de secreção glicoprotéica. Essas mudanças estão ligadas à supressão hormonal causada pela retirada dos ovários. A posterior reposição pelo estradiol e pela progesterona em associação mostrou uma grande recuperação da estrutura e fisiologia geral da próstata, evidenciada pelo aumento da altura do epitélio, da massa prostática e da atividade secretora. Os níveis hormonais aumentaram, justificando a recuperação da glândula, porém não atingiram o mesmo perfil observado no grupo controle. Também foram avaliadas as alterações na expressão de AR, ER α , ER β e no indicador de proliferação celular, PCNA, que mostraram maior imunorreatividade e maior número de células proliferativas no grupo tratado. A integridade da próstata não se relaciona apenas com os níveis de estrógeno e progesterona, mas também com o balanço cíclico entre esses hormônios no organismo feminino. Por fim, estudos sobre as ações do estrógeno e da progesterona na próstata podem abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos de importantes doenças prostáticas, as quais acometem tanto indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino.

ABSTRACT

The female prostate is a gland functionally active found in several species of mammals, including humans and rodents. In adult female gerbils, the prostate presents paraurethral location, showing close contact with the wall of the median urethra. This gland is homologous to the ventral prostate of male rodents and it is formed by a set of acini and ducts embedded in a fibromuscular stroma. The study of prostatic morphophysiology in the estrous cycle phases has shown that the female prostate is influenced by fluctuations in serum of estradiol and progesterone, with peaks in estrous and diestrus II phases, respectively. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of combined and prolonged administration of estradiol and progesterone on the prostate of ovariectomized female gerbil. Ovariectomy caused regression and decreased glandular secretory activity, aspects suggested by the shrinkage of the prostate and the almost absence of glycoprotein secretion. These changes are linked to hormonal supply caused by the ovaries removal. The subsequent replacement by estradiol and progesterone in combination showed a greater recovery of the structure and general physiology of the prostate, as evidenced by increased epithelial height, prostatic mass and secretory activity. The hormone levels increased, justifying the recovery of the gland, but did not achieve the same profile observed in the control group. We also evaluated the changes in the expression of AR, ER α , ER β and the cell proliferation marker, PCNA, which showed increased immunoreactivity and increased number of proliferating cells in the treated group. The integrity of the prostate is not only related to the levels of estrogen and progesterone, but also with the cyclical balance between these hormones in the female body. Finally, studies about the actions of estrogen and progesterone in prostate may be the starter for the development of treatments for important prostate diseases, which affect both males and females.

Desenvolvimento Embrionário da Próstata

As diferenças morfológicas entre os sexos são particularmente intrigantes, uma vez que surgem por diferenciação dicotômica de um conjunto comum de tecidos embrionários precursores. Embriões machos e fêmeas apresentam estágios iniciais de desenvolvimento gonadal idênticos, sendo que, em camundongos, as gônadas masculina e feminina passam a ser diferenciáveis apenas a partir do 13º dia de gestação (Staack *et al.*, 2003). Embriões de ambos os sexos possuem, inicialmente, dois pares de ductos genitais. Em machos, os ductos mesonéfricos ou de Wolf originam parte do trato genital, enquanto que os ductos paramesonéfricos ou de Müller desaparecem. Em fêmeas ocorre o oposto: são os ductos paramesonéfricos que originam o trato genital. Isto representa uma estratégia diferente usada no desenvolvimento do sistema reprodutor em ambos os sexos, a qual envolve uma diferenciação dicotômica de um tecido precursor bipotencial (Wilhelm & Koopman, 2006).

Em termos gerais, o desenvolvimento da masculinidade ou feminilidade depende da formação de testículos ou ovários, respectivamente, a partir das estruturas genitais iniciais ambipotentes. Essa diferenciação depende da presença e correto funcionamento do gene determinante da masculinidade presente no braço curto do cromossomo Y, o SRY, o qual atua em um conjunto específico de células da crista genital estimulando-as a se diferenciarem em células de Sertoli – as células que interagem e nutrem as células germinativas no macho. As células de Sertoli parecem, a partir daí, gerenciar a diferenciação de outros tipos celulares para formação dos testículos. Se o gene SRY é ausente, como no caso das fêmeas, outras cascatas regulatórias levam ao desenvolvimento dos ovários e das características femininas secundárias (Wilhelm & Koopman, 2006). No entanto, o desenvolvimento sexual é ainda mais complexo e depende de estruturadas redes de sinalização molecular que especificam sinais de diferenciação sexual, organogênese e funções endócrinas.

Em embriões machos de camundongos, os ductos Müllerianos se degeneram ativamente, em um processo envolvendo a ação da substância inibidora Mülleriana (MIS –

Müllerian Inhibiting Substance), secretada pelas células de Sertoli. Essa substância induz uma cascata sinalizadora que resulta na produção e secreção de metaloproteinases de matriz 2 (MMP2 - *Matrix Metalloproteinase 2*) que induzem processos de apoptose nas células epiteliais dos ductos de Müller (Behringer, 1994; Hoshiya, *et al.*, 2003; Imbeaud, *et al.*, 1994). Paralelamente, os ductos de Wolf, sob influência da testosterona produzida pelas células de Leydig, desenvolvem-se em uma série de estruturas – epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal – que conectam o testículo com a uretra (Pointis *et al.*, 1980). Em fêmeas, devido à ausência de estímulos androgênicos, o ducto mesonéfrico regride e, devido à ausência de MIS, o ducto paramesonéfrico se desenvolve, originando as tubas uterinas, cornos uterinos, canal cervical e parte superior da vagina (Staack *et al.*, 2003).

A próstata se desenvolve a partir da parte pélvica do seio urogenital (UGS – *Urogenital Sinus*), o qual é derivado da cloaca, a parte distal do intestino primitivo posterior. O seio urogenital se forma em machos e fêmeas aproximadamente no 13º de gestação para camundongos e sete semanas para humanos. Em roedores, ele se mantém indistinguível até o 17º-18º dias de gestação, quando os andrógenos testiculares começam a induzir no macho o crescimento de brotos sólidos a partir do epitélio do seio urogenital (UGE - *Urogenital Sinus Epithelium*) em direção ao mesênquima (UGM - *Urogenital Sinus Mesenchyme*) (Cunha, *et al.*, 1987; Marker *et al.*, 2003; Timms & Didio, 1994).

O septo uroretal divide a cloaca formando o UGS na região ventral e os canais retal e anal na região dorsal. Esta subdivisão da cloaca ocorre de maneira que os ductos mesonéfricos e paramesonéfricos terminam no UGS. Em fase posterior, o UGS é subdividido em vesícula urinária e UGS definitivo. Em camundongos, essas duas estruturas derivadas do UGS são claramente distinguíveis entre o 13º e 14º dias de gestação (Staack *et al.*, 2003).

Em machos, o evento inicial de formação da próstata é, portanto, o crescimento de brotos epiteliais do epitélio do seio urogenital em direção ao mesênquima circundante. Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento, no entanto, no período neonatal, conforme esses cordões crescem invadindo o UGM, eles começam a bifurcar-se em ramos laterais, originando três lobos prostáticos distintos: o ventral, o dorsolateral e a glândula coaguladora ou lobo anterior (Marker *et al.*, 2003). Simultaneamente

ao processo de ramificação dos ductos ocorre também a formação do lúmen e a citodiferenciação epitelial e estromal da próstata (Wang *et al.*, 2001).

A morfogênese prostática é dependente da ação de hormônios esteróides, de forma que, em machos, os andrógenos são necessários para o início do desenvolvimento prostático, para o seu crescimento embrionário e neonatal e para iniciar a atividade secretória prostática na puberdade (Isaacs *et al.*, 1994). No entanto, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática, e desta forma, a ação androgênica não é exercida diretamente sobre as células epiteliais. Com a diferenciação das células epiteliais, os níveis de receptores androgênicos (AR - *Androgenic Receptors*) aumentam e a expressão de receptores estrogênicos (ER α e ER β - *Estrogenic Receptors*) é induzida. Por outro lado, também existe uma sinalização parácrina do epitélio para o mesênquima. Esta sinalização regula a diferenciação do mesênquima que circunda os brotos em formação em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward *et al.*, 1996). Assim, durante a morfogênese prostática, o AR é necessário no mesênquima e não no epitélio, sendo que sua expressão precede o surgimento dos brotos prostáticos. Nas células epiteliais, a função do AR se restringe à regulação de proteínas secretórias e, talvez, à diferenciação celular (Cunha *et al.*, 2004).

Em embriões de fêmeas de ratos e humanos, a ausência de testosterona induz o UGS a originar a parte inferior da vagina e a uretra (Shapiro *et al.*, 2004). O UGM passa a circundar o epitélio uretral e é morfologicamente subdividido em três zonas: o mesênquima periuretral, a zona mesenquimal, que sofre diferenciação em músculo liso, e a zona que contém o mesênquima condensado ventral (VMP - *Ventral Mesenchymal Pad*). Esta última região representa o mesênquima do UGS sem a invasão do UGE e apresenta localização análoga à próstata ventral masculina (Thomson *et al.*, 2002).

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

Durante a diferenciação do mesênquima, os andrógenos regulam a espessura e a continuidade da camada de músculo liso formada, de modo que a ausência de andrógenos em

embriões femininos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua. Esta camada separa o VMP do epitélio uretral, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP. Desse modo, a espessa camada de músculo liso impede a interação do VMP com os brotos prostáticos em formação, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson *et al.*, 2002). Em machos, como há presença de andrógenos, a formação do músculo liso é inibida ou atrasada e os brotos prostáticos emergem da uretra e podem penetrar no VMP. Assim, a interação parácrina epitélio-mesênquima é estabelecida, ocasionando a ramificação e expansão da próstata ventral. A Figura 1 mostra o modelo ilustrativo da indução prostática em machos e fêmeas proposto por Thomson e colaboradores (2002).

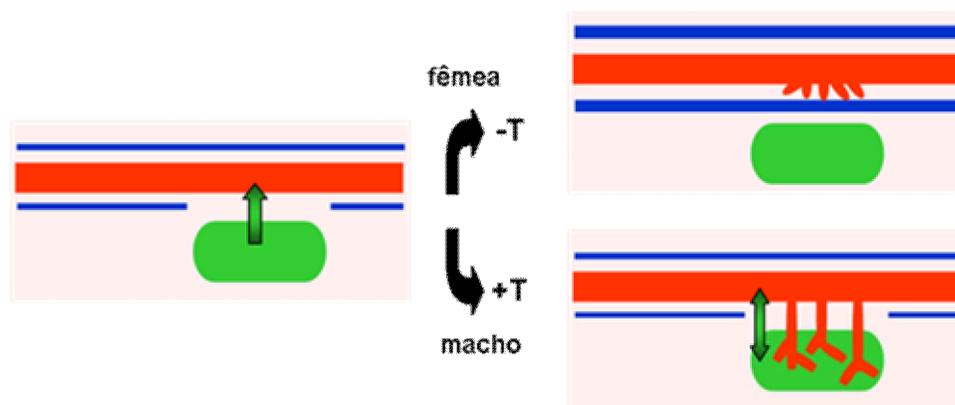


Figura 1. Modelo descritivo da indução da próstata ventral em embriões femininos e masculinos de ratos. Do lado esquerdo pode-se observar o VMP (verde) durante os estágios iniciais de indução prostática (17-18 dias de gestação). Observe que a camada de músculo liso (azul) é descontínua e permite a sinalização entre o VMP e o epitélio uretral (vermelho). Do lado direito pode-se observar a morfogênese prostática em machos e fêmeas (a partir de 21,5 dias de gestação). Em fêmeas, a ausência de testosterona permite que o músculo liso forme uma camada espessa e contínua, impedindo a sinalização parácrina entre os brotos prostáticos em crescimento (vermelho) e o VMP. Em machos, a testosterona induz a formação de uma camada muscular delgada e descontínua que permite a interação epitélio-mesênquimal. Os brotos que emergem do epitélio uretral (vermelho) invadem o VMP. Neonatalmente, esses brotos sofrem bifurcações laterais dentro do VMP, originando a próstata ventral (Adaptado de Thomson *et al.*, 2002).

A formação de brotos prostáticos é um processo constitutivo de machos e fêmeas, porém a ramificação e expansão desses brotos é regulada por andrógenos. Em fêmeas, o

isolamento entre o VMP e o epitélio uretral, que é provocado pela camada de músculo liso, impede a formação de uma glândula prostática desenvolvida e lobulada. Desse modo, o reduzido tecido prostático observado em fêmeas de várias espécies é originário do UGS que não sofreu estímulo androgênico. No entanto, embora a próstata feminina adulta seja menor que a masculina (cerca de 15% a 25% do tamanho da próstata ventral masculina), ela apresenta um epitélio secretor diferenciado e funcional (Zaviačič *et al.*, 2000a; Santos *et al.*, 2003; Custódio *et al.*, 2004). Como a próstata de fêmeas cresce e desenvolve-se em um ambiente com baixos níveis androgênicos (apenas 5% do total produzido no organismo masculino), acredita-se que outros fatores além desses hormônios possam atuar no desenvolvimento e manutenção da função dessa glândula em adultos (Timms *et al.*, 1999).

A frequência de desenvolvimento de uma glândula prostática funcional em fêmeas é muito elevada. Na espécie humana, cerca de 90% das mulheres desenvolvem um tecido prostático maduro e ativo nos processos de secreção (Zaviačič *et al.*, 2000b). Em fêmeas de roedores, a morfogênese prostática parece ser influenciada pela posição intrauterina dos animais durante a gestação. Fetos que se desenvolvem entre dois fetos fêmeas apresentam níveis estrogênicos maiores, e os que se desenvolvem entre dois fetos machos, níveis androgênicos maiores. Na vida adulta, fêmeas que se desenvolveram entre dois fetos fêmeas apresentam maior frequência na presença de próstata (67%), comparado às que se desenvolveram entre dois fetos machos (29%). Isso ocorre porque os estrógenos são os responsáveis pela modulação dos efeitos androgênicos no desenvolvimento da próstata e induzem o crescimento de brotos prostáticos durante a morfogênese da glândula (Clark *et al.*, 1991; Timms *et al.*, 1999).

A Próstata Feminina

A primeira menção da “próstata feminina” foi feita em 1672, quando Reinier de Graaf se utilizou deste termo para descrever um conjunto de glândulas localizadas ao redor da uretra com homologia semelhante à próstata masculina (de Graaf, 1672 in Santos & Taboga, 2006). Em 1880, Alexander Skene fez nova referência à esta glândula descrevendo-a como dois ductos parauretrais que se abriam em vários pontos ao longo da uretra, tendo, possivelmente,

função secretora limitada (Skene, 1880 in Santos & Taboga, 2006). Desde então, até meados de 1950, este órgão era considerado vestigial e sem grande importância biológica para o organismo feminino (Zaviačič & Ablin, 2000). No entanto, nas últimas décadas, novos estudos tem discutido a próstata feminina e considerado seu relevante papel nas funções reprodutivas do organismo feminino (Huffman, 1948; 1951; McCrea, 1952; Tepper *et al.*, 1984; Wernet *et al.*, 1992; Zaviačič, 1993; Zaviačič *et al.*, 1993; 1997a; b; 2000a; b; Santos *et al.*, 2004; 2005). Apesar disso, nenhum desses trabalhos investigou efetivamente os mecanismos que regem o funcionamento da glândula prostática feminina.

Até agora, o papel biológico da próstata no organismo feminino não é totalmente esclarecido. Sabe-se, no entanto, por meio de estudos bioquímicos que o fluido prostático liberado durante a ejaculação feminina apresenta a mesma composição química do fluido prostático masculino. Os componentes mais abundantes encontrados neste fluido são os antígenos prostáticos específicos (PSA - *prostate specific antigen*), fosfatases ácidas prostáticas específicas (PSAP - *prostate specific acid phosphatase*), zinco e frutose (Zaviačič, 1993; 1999). Evidências indicam que a frutose produzida por esta glândula flui em pequenas quantidades da uretra para a vagina e, por ser a principal fonte de energia para os espermatozoides, contribui para nutrição e sobrevivência dos mesmos quando já no trato reprodutor feminino, desempenhando assim um importante papel no processo de fertilização. Outra possível função da próstata feminina está relacionada com a sensibilização sexual (Zaviačič, 1993). Alguns trabalhos científicos associam a próstata feminina ao ponto de Gräfenberg (ou ponto-G), enfatizando a relevância do estímulo deste ponto para ocorrência da ejaculação feminina (Schubach, 2002 in Santos & Taboga, 2006). Segundo Gräfenberg (1950), o ponto-G refere-se a uma área ou zona ricamente inervada situada na parede ântero-superior da vagina, local onde a próstata feminina pode ser acessada. Outros artigos ainda defendem que a próstata feminina e o ponto-G sejam a mesma estrutura (Addiego *et al.*, 1981; Hines, 2001 in Santos & Taboga, 2006).

O Modelo Experimental

Os experimentos com material humano são muito limitados, pois a próstata feminina só pode ser obtida a partir de necrópsias de mulheres que sofreram morte cerebral (Zaviačič, 2000a). Assim, torna-se necessária a adoção de modelos experimentais que apresentem uma glândula prostática semelhante à da mulher, a fim de se extrapolar os dados para a espécie humana. Para nosso grupo de pesquisa a adoção do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*, Gerbilinae, Muridae – Fig. 2) como modelo experimental tem trazido resultados muito satisfatórios, uma vez que a próstata feminina deste roedor apresenta grande homologia com a próstata feminina humana e com a próstata ventral do gerbilo macho (Taboga *et al.*, 2001). Além disso, a ocorrência de próstata em fêmeas desses animais é muito elevada, sendo que cerca de 80% das fêmeas apresentam uma glândula prostática bem desenvolvida e ativa nos processos de secreção (Santos *et al.*, 2003).



Figura 2. Gerbilo da Mongólia.

Morfologia da próstata do Gerbilo da Mongólia

Em fêmeas de gerbilo, a próstata é composta por um conjunto de glândulas e ductos que exibem íntimo contato com a parede da uretra média. Os ductos estão inseridos na musculatura envolvente da uretra, e se abrem em vários pontos da luz uretral (Santos *et al.*, 2003). A parte secretora da próstata é revestida por um epitélio que varia de cúbico simples a colunar pseudoestratificado. O epitélio acinar é composto principalmente por células basais,

que formam uma camada descontínua de células-fonte para a manutenção do crescimento prostático, e células secretoras, que apresentam um citoplasma rico em organelas envolvidas nos processos de síntese e secreção de glicoproteínas (Santos *et al.*, 2003). Encontram-se ainda, entre as células secretoras, células neuroendócrinas, células claras e células ciliadas (Santos & Taboga, 2006; Santos *et al.*, 2007). As glândulas e os ductos prostáticos estão associados a um estroma fibromuscular composto por células musculares lisas e fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Fig. 3) (Santos *et al.*, 2001).

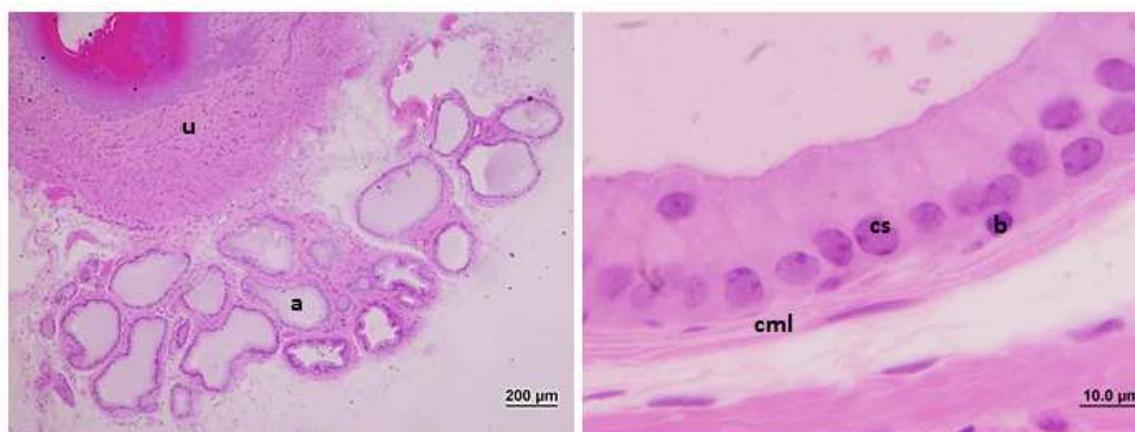


Figura 3. Histologia da próstata do Gerbilo da Mongólia (u: uretra; a: ácinos; cs: célula secretora; b: célula basal; cml: camada muscular lisa. Arquivo pessoal)

As características morfofuncionais da próstata feminina adulta normal do gerbilo demonstram que esta glândula é madura e fisiologicamente ativa, embora a produção de andrógenos no organismo feminino seja muito reduzida (Santos *et al.*, 2003). Desse modo, acredita-se que outros hormônios esteróides influenciem a fisiologia prostática. Assim, torna-se fundamental compreender os fatores que regulam a diferenciação, crescimento e secreção da próstata feminina, uma vez que alterações nestes fatores podem levar à instalação de lesões malignas.

Em fêmeas adultas de roedores ocorrem alterações hormonais cíclicas, que são influenciadas pelo ciclo estral do animal. Em gerbilos, o ciclo estral tem duração de 4 a 6 dias,

sendo dividido em proestro, estro, diestro I (metaestro) e diestro II (Nishino e Totsukawa, 1996). Os dados publicados por Santos *et al.* (2011), em estudos que relacionam o perfil estromal da próstata com as fases do ciclo estral nas fêmeas de gerbilo mostraram que as maiores alterações hormonais ocorrem durante a fase de estro, que apresenta pico de estradiol, e diestro II, que apresenta pico de progesterona. Assim, a oscilação cíclica de estradiol e progesterona é a responsável pelas alterações histofisiológicas ocorridas na próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral, visto que os níveis séricos de testosterona se mantêm constantes em todas as fases. Deste modo, torna-se importante investigar como estes hormônios atuam na regulação da fisiologia prostática.

Atuação do estrógeno e da progesterona no organismo feminino

O ciclo reprodutivo de fêmeas envolve uma complexa interação de vários órgãos e hormônios. Em última instância, o útero é o órgão alvo para implantação de ovócitos fertilizados, mas o ambiente hormonal ideal deve ser obtido e mantido para que a reprodução seja bem sucedida. Os principais hormônios esteróides envolvidos na preparação do endométrio uterino para a implantação são a progesterona e o estradiol, ambos produzidos pelo ovário. O estrógeno é importante para a proliferação do epitélio uterino (Galand *et al.*, 1971) e melhora a ação da progesterona através da indução do gene do receptor de progesterona (PR) (Graham & Clarke, 1997). A progesterona desempenha um papel na proliferação, diferenciação e manutenção do estroma uterino e endométrio. Ela inibe a proliferação celular induzida pelo estrógeno nos compartimentos epitelial e glandular uterinos, além de estimular a diferenciação do epitélio na preparação para implantação do embrião (Weitlauf, 1988). Estrógeno e progesterona também são importantes para o desenvolvimento e diferenciação das glândulas mamárias no período da gravidez. O estrógeno induz fatores de crescimento na glândula mamária e age sistemicamente para elevar a secreção de prolactina pituitária, o que também estimula o crescimento da mama. Além disso, é também necessário para morfogênese ductal e acentua a ação da progesterona, elevando os níveis de PR. A progesterona é necessária para a ramificação e desenvolvimento lobuloalveolar (Daniel *et al.*, 1987; Silberstein *et al.*, 1994).

Receptores esteróides tem sido caracterizados e analisados desde que foram primeiramente identificados e implicados como mediadores de atividades biológicas em tecidos de várias espécies. Hormônios como o estradiol e a progesterona, exercem seus efeitos em tecidos que contém receptores, que são fatores de transcrição nuclear que se ligam ao hormônio e regulam a transcrição dos genes alvo (Evans, 1988; Vegeto *et al.*, 1996; Chen, 1998).

Os estrógenos apresentam efeitos diretos importantes na glândula prostática adulta e tem sido amplamente relacionados com a formação de doenças da próstata (Thomas & Keenan 1994; Castagnetta & Carruba, 1995). Estudos *in vitro* envolvendo controle e regulação hormonal evidenciam que os efeitos estrogênicos na próstata são diretamente mediados pela expressão de receptores de estrógenos (ERs) (Prins, 1992; Nevalainen *et al.*, 1993; Jarred *et al.*, 2000). Estes receptores (ER α e ER β) são membros de uma grande família de fatores de transcrição nucleares e, diferentemente dos receptores de andrógenos e de progesterona, não são considerados isoformas. Sabe-se que são codificados por diferentes genes e apresentam formas distintas.

O modelo clássico de ação do estrógeno sugere que o ER resida no núcleo, mas seja sequestrado por um complexo inibidor multiproteico na ausência do hormônio. A ligação ao hormônio provoca uma mudança conformacional no receptor, transformando-o para um estado ativado, que o homodimeriza, mostrando aumento da fosforilação e o liga a um elemento de resposta estrogênica (ERE) inserido no gene promotor. O complexo ERE/receptor interage com o aparato de transcrição por meio de proteínas regulatórias para promover a transcrição do gene alvo (Mosselman *et al.*, 1996; Katzenellenbogen *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que ER α e ER β são expressos em diferentes compartimentos da glândula prostática, sendo que o ER α é primariamente localizado nas células estromais e o ER β , expresso nas células epiteliais. Essa localização diferencial, bem como a diferença na afinidade destes receptores pelos seus ligantes, pode explicar a diversidade das funções biológicas dos estrógenos na próstata e sua regulação na promoção de doenças desta glândula (Prins, 2008).

Biossíntese dos hormônios sexuais

A biossíntese dos hormônios esteroides ocorre nos testículos, ovários e glândulas adrenais por meio de reações e participação de enzimas específicas para este processo (Fig. 4). O colesterol é a molécula precursora para formação desses hormônios. O primeiro passo da síntese ocorre com a clivagem da cadeia lateral do colesterol para formação de pregnenolona, uma reação catalisada pela enzima de clivagem da cadeia lateral citocromo P450 (Payne & Hales, 2004; Ghayee & Auchus, 2007).

A pregnenolona formada na glândula adrenal é metabolizada em deidroepiandrosterona (DHEA) e/ou em progesterona. A DHEA pode ser convertida em androstenediona que é então convertida em testosterona. A testosterona pode ser aromatizada em estradiol pela enzima aromatase. Alternativamente, a DHEA pode ser convertida em androstenediol, e posteriormente, em testosterona. Os ovários também sintetizam andrógenos e estrógenos. Após ativação pelo hormônio luteinizante (LH) nas células da teca, as quais expressam altos níveis de citocromo P450₁₇, os ovários convertem o colesterol em androstenediona e posteriormente em testosterona. A testosterona é então aromatizada para formar estradiol nas células da granulosa, nos folículos em crescimento, após serem estimulados pelo hormônio folículo estimulante FSH (Sasano *et al.*, 1989; Havelock *et al.*, 2004). Após a expulsão do oócito pelo ovário, o folículo se torna o corpo lúteo e inicia a produção de progesterona (Morani *et al.*, 2008).

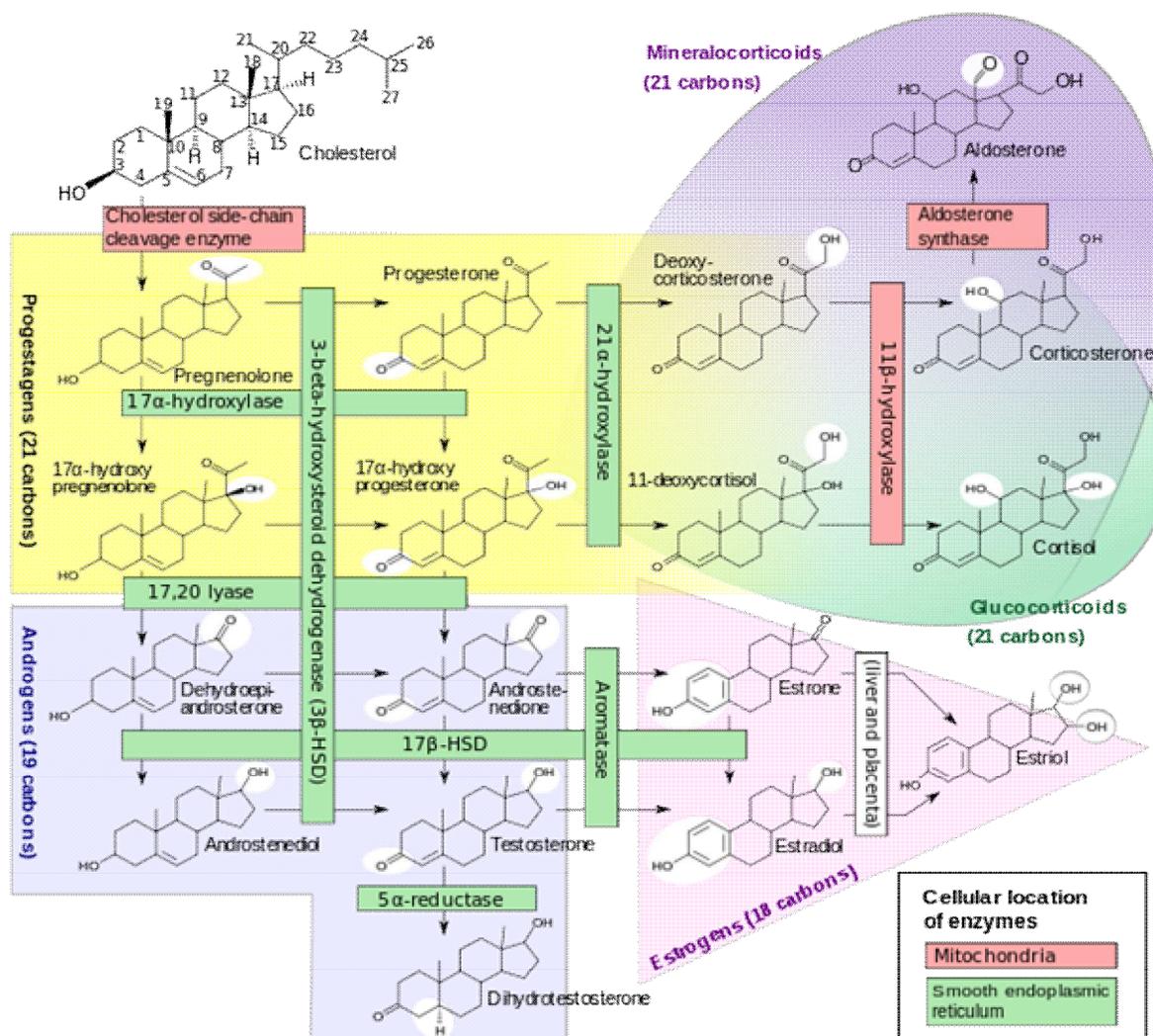


Figura 4. Biossíntese dos hormônios sexuais na adrenal e gônadas. (Fonte: *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. Elsevier/Saunders. pp. page 1300. ISBN 1-4160-2328-3).

Relevância do presente estudo

A próstata é uma glândula sexual acessória específica de mamíferos e possui papel relevante na reprodução, contribuindo com a produção de fluido com propriedades nutritivas. A alta incidência em humanos de doenças prostáticas, incluindo tumores malignos e benignos torna necessário o entendimento da biologia deste órgão. Estudos realizados nas últimas

décadas tem descrito a ocorrência de cânceres de uretra originados a partir da próstata feminina (Dodson *et al.*, 1994, 1995; Ali *et al.*, 1995; Ebisuno *et al.*, 1995; Sloboda *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005; McCluggage *et al.*, 2006; Sharifi-Aghdas & Ghaderian, 2004). Além disso, existem evidências de que outras patologias prostáticas como prostatites e hiperplasias prostáticas benignas podem ocorrer na próstata feminina com o mesmo nível de severidade observado para próstata masculina (Zaviačič, 1999). A cistite aguda é a infecção do sistema urinário feminino mais comum, apresentando incidência de 0,5 a 0,7 episódios por mulher por ano nos Estados Unidos, e sendo usualmente descrita como tendo sua origem na próstata feminina (Zaviačič, 1999; Santos & Taboga, 2006). Quando ocorre alguma inflamação do tecido prostático, esta pode se disseminar por todo sistema genital feminino resultando em uretro-prostatocistites, devido à comunicação existente entre a próstata, a uretra e a porção anterior da vagina (Zaviačič, 1999).

Pelo fato da próstata feminina ser um órgão ainda negligenciado clinicamente, há uma carência científica referindo-se às interações hormonais atuantes neste órgão. Dessa forma pouco se sabe sobre o efeito hormonal no órgão feminino. Estudos em nosso laboratório observaram que os desníveis hormonais provocados com o envelhecimento (Custódio *et al.*, 2006), com a suplementação hormonal pela testosterona (Santos *et al.*, 2006; 2007) e com tratamentos por drogas anti-estrogênicas (Santos e Taboga, 2006) comprometem a próstata feminina com as mesmas lesões descritas para a glândula masculina, tais como: prostatites, hiperplasias, neoplasias intra-epiteliais e carcinomas (Santos *et al.*, 2006).

Sabe-se que o equilíbrio entre os níveis de estrógeno e progesterona influencia grandemente a função reprodutiva da fêmea e que o balanço cíclico destes hormônios promove adaptações histofisiológicas de todo o trato reprodutor feminino. Entretanto pouco existe até o momento, na literatura, a respeito na próstata feminina.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar, por métodos estruturais, sorológicos, citoquímicos e imunocitoquímicos, o efeito combinado e prolongado do estrógeno e da progesterona sobre a manutenção da histofisiologia prostática de fêmeas de gerbilo ovariectomizadas.

**AÇÃO SIMULTÂNEA DO ESTRADIOL E DA PROGESTERONA SOBRE A
PRÓSTATA DE FÊMEAS DE GERBILO OVARIECTOMIZADAS: RECUPERAÇÃO
HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DA CASTRAÇÃO**

Submetido para publicação na revista
“Reproduction, Fertility and Development”

**AÇÃO SIMULTÂNEA DO ESTRADIOL E DA PROGESTERONA SOBRE A
PRÓSTATA DE FÊMEAS DE GERBILO OVARIETOMIZADAS: RECUPERAÇÃO
HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DA CASTRAÇÃO**

Marianna Zanatelli¹

Diego Augusto Lopes da Silva¹

Filipe Zardini Shinohara¹

Fernanda Cristina Alcântara dos Santos²

Sebastião Roberto Taboga^{3*}

¹Departamento de Biologia Celular e Estrutural – IB – Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

²Departamento de Morfologia – UFG – Goiânia, GO, Brasil. ³Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Financiado por:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. N° 2009/12688-1)

*Correspondência para:

Prof. 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, Brasil, CEP: 15054-000

Resumo

A próstata feminina é uma glândula funcionalmente ativa encontrada em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos e roedores. O estudo da morfofisiologia prostática nas fases do ciclo estral tem demonstrado que a próstata feminina é influenciada pelas oscilações nos níveis séricos de estradiol e progesterona. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração combinada e prolongada do estradiol e da progesterona sobre a próstata de fêmeas de gerbilo ovariectomizadas. A ovariectomia causou atrofia glandular e diminuição da atividade secretora, aspectos ocorridos devido à supressão hormonal. A posterior reposição pelo estradiol e pela progesterona em associação mostrou uma grande recuperação da estrutura geral da próstata, evidenciada pelo aumento da altura do epitélio, da massa prostática e da atividade secretora, sem provocar o aparecimento de importantes focos de lesões. Os níveis hormonais aumentaram, justificando a recuperação da glândula. A avaliação da expressão de AR demonstrou aumento da imunorreatividade no grupo tratado, enquanto que a imunomarcção de ER α diminuiu nos grupos castrados, aumentando novamente no grupo submetido ao tratamento hormonal. ER β não apresentou alterações na imunoexpressão entre os grupos estudados. A avaliação do índice de proliferação celular demonstrou maior quantidade de células proliferativas no grupo tratado. Os dados obtidos com este estudo indicam que a interação hormonal entre estradiol e progesterona possa ser a responsável pela manutenção da histofisiologia da glândula prostática feminina.

Palavras-chave: próstata feminina, gerbilo, ovariectomia, estradiol e progesterona.

Introdução

A próstata é uma glândula sexual acessória específica de mamíferos e possui papel relevante na reprodução, contribuindo com a produção de fluido com propriedades nutritivas. Em fêmeas de gerbilo, ela é composta por um conjunto de ácinos e ductos que exibem íntimo contato com a parede da uretra média. Os ductos estão inseridos na musculatura envolvente da uretra, e se abrem em vários pontos de sua luz. As características morfofuncionais da próstata feminina adulta normal demonstram que esta glândula é madura e fisiologicamente ativa, embora a produção de andrógenos no organismo feminino seja muito reduzida (Santos *et al.*, 2003).

Em fêmeas adultas de roedores ocorrem alterações hormonais cíclicas, que são influenciadas pelo ciclo estral do animal. Em gerbilos, o ciclo estral tem duração de 4 a 6 dias, sendo dividido em proestro, estro, diestro I e diestro II (Nishino e Totsukawa, 1996). Estudos recentes mostraram que essa glândula apresenta maiores alterações hormonais durante as fases de estro e diestro II, cercadas por picos de estradiol e progesterona respectivamente (Santos *et al.*, 2011). Desse modo, acredita-se que a oscilação cíclica de estradiol e progesterona seja a responsável pelas alterações morfológicas ocorridas na próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral, visto que os níveis séricos de testosterona se mantêm constantes em todas as fases.

Estradiol e progesterona são hormônios esteroides produzidos principalmente pelos ovários e que estão amplamente relacionados com a reprodução feminina. Participam da proliferação, diferenciação e manutenção do epitélio e estroma uterinos e, durante o período da gravidez, atuam no desenvolvimento e diferenciação das glândulas mamárias. Estudos de imunocitoquímica demonstram que receptores de estrógenos (ER α e ER β) e de progesterona (PR) estão presentes no tecido prostático de fêmeas de humanos e roedores, indicando que seus respectivos hormônios tenham ação na manutenção estrutural e funcional desta glândula (Santos & Taboga, 2006). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito combinado e prolongado do estrógeno e da progesterona sobre a manutenção da histofisiologia prostática de fêmeas de gerbilo ovariectomizadas, utilizando-se de uma série de análises morfológicas e imunocitoquímicas.

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Trinta e duas fêmeas adultas, com 90 dias de idade, foram utilizadas no presente estudo. Todas as fêmeas foram mantidas no Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Campus de São José do Rio Preto (SP) em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, sob condições de luminosidade e temperatura adequadas, e alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Unesp e do COBEA (Protocolo nº 16/07-CEEA).

Com exceção do grupo Controle, todas as fêmeas foram submetidas à ovariectomia bilateral aos 90 dias de idade, após serem anestesiadas pela cetamina (100 µL) / xilasina (30µL) (1mL/Kg). Passados dez dias para recuperação da cirurgia, foram formados os seguintes grupos experimentais, com oito animais cada: Castrado (Ca), fêmeas que passaram apenas pela ovariectomia bilateral; Castrado + Óleo (CaO), fêmeas ovariectomizadas que receberam 0,1 mL de óleo mineral – Nujol/Mantecorp – a cada 48 horas, do 10º ao 40º dia após a cirurgia; Castrado + Estradiol + Progesterona (CEP), fêmeas ovariectomizadas que receberam doses subcutâneas de estradiol (β-estradiol 3-benzoato – Sigma, St Louis, Mo, USA) e de progesterona (Sigma), ambos 0,1mg/kg a cada 48 horas diluídos em 0,1 mL de óleo mineral, do 10º ao 40º dia após a cirurgia; Controle (Co), fêmeas intactas, em fase de proestro, que foram sacrificadas com a mesma idade das demais fêmeas.

Todas as aplicações de hormônio/veículo ocorreram sempre às 10h00min da manhã. Os animais de cada grupo foram mortos entre as 08h00min e as 10h00min da manhã, 24 horas após a última injeção do hormônio ou do veículo (131º dia). Todos foram submetidos à inalação de CO₂ e, depois de pesados, foram decapitados para a coleta do sangue, que foi submetido à dosagem hormonal. As próstatas (removidas juntamente com a uretra = complexo prostático) foram devidamente pesadas e fixadas de acordo com a metodologia adequada para cada uma das análises.

Dosagem hormonal sérica

As amostras de sangue de cinco animais por grupo experimental foram coletadas em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3.000 rpm e o soro separado e congelado para posterior análise. As medições foram realizadas em analisador quimioluminescente ultra-sensível automático (VITROS Eci Johnson & Johnson Orthoclinical Diagnostics, Divisão, Rochester, NY). Foram feitas as seguintes dosagens: testosterona, progesterona, estradiol. A sensibilidade foi de 0,1–3814 pg/ml para estradiol, 0,1–150 ng/ml para testosterona e 0,15–60 pg/ml para progesterona.

Citoquímica

Os complexos prostáticos coletados foram fixados por imersão em fixador Karnovsky a 4% diluído em Tampão Fosfato 0,2M, pH 7,2, durante 24 horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol e incluído em historresina (Historesin embedding Kik – Leica, Nussloch, Germany). Cortes de 3 μ m foram produzidos em micrótomo rotativo (RM2155 – Leica). Para avaliar as diferenças morfológicas na próstata de fêmeas dos diferentes grupos experimentais, os cortes histológicos foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina para análise geral da estrutura glandular e quantificações celulares e à coloração por Periodic Acid and Schiff (PAS) para análise de secreção glicoprotéica. As avaliações foram feitas em microscopia de luz e as imagens histológicas foram digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus versão 4.5 para Windows (©Media Cybernetics).

Análises Morfométrica, Cariométrica, Estereológica e Populacional

A análise estereológica foi realizada para a obtenção da frequência relativa dos diferentes compartimentos prostáticos (epitélio, lúmen, camada muscular lisa e estroma não muscular) dos grupos em estudo. Para isso, foram capturadas 40 imagens em aumento de 20x, de cortes histológicos corados pela HE, de cinco animais por grupo, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. As medidas foram então realizadas

de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1963) e aplicado à próstata segundo Huttunen *et al.* (1981). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência relativa (%) dos compartimentos prostáticos, utilizando-se os pontos do Sistema-teste que coincidiam com cada compartimento e transformando esse número de pontos em porcentagem. A análise morfométrica foi realizada para que se determinassem as medidas de altura (μm) das células epiteliais secretoras e espessura (μm) da camada de células musculares lisas. Da mesma forma, a análise cariométrica determinou as medidas de área (μm^2) e perímetro (μm) nucleares das células epiteliais secretoras. Todas as medidas realizadas para análise morfométrica foram feitas de maneira automatizada pelo programa devidamente calibrado por régua micrométrica. Para ambas as análises utilizou-se 200 medidas para cada grupo experimental. A determinação da frequência populacional por ácino prostático foi feita a partir da contagem de células secretoras, basais, claras e ciliadas em trinta ácinos por grupo experimental e transformado esse número em porcentagem.

Imunocitoquímica

Os complexos prostáticos femininos foram fixados em paraformol tamponado a 4% durante 24 horas. Cortes histológicos de $4\mu\text{m}$ foram submetidos à imunocitoquímica para detecção dos receptores de andrógenos (AR) e de estrógeno ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$), além do marcador de proliferação celular PCNA. Os anticorpos primários para AR (rabbit polyclonal IgG, SC-N-20, Santa Cruz Biotechnology), $\text{ER}\alpha$ (Clone 1D5 Code M7047 Monoclonal mouse, anti-human, Dako), $\text{ER}\beta$ (rabbit polyclonal IgG, SC-H-150, Santa Cruz Biotechnology) e PCNA (anti-PCNA, F-2, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia) foram utilizados em diluições variadas (entre 1:50 a 1:200, de acordo com as instruções de cada anticorpo). Os cortes foram incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase (Rabbit ABC Staining System SC-2018 – Santa Cruz Biotechnology) e revelados com a diaminobendizina (DAB). A contra-coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris.

Índice de Proliferação Celular

Para quantificação da marcação de células em proliferação no epitélio e estroma prostáticos foram capturadas 30 imagens, em aumento de 40x, por grupo experimental, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. As células epiteliais e estromais reativas e não reativas para a técnica foram contadas em sua totalidade, e os valores obtidos foram transformados em porcentagem.

Análise Estatística

A análise exploratória e estatística dos resultados foi realizada em gráficos e planilhas dos softwares Microsoft Excel e GraphPad InStat 3.02 (Copyright© 1990-1998, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA), com dados expressos pelas médias \pm desvio padrão. Para as análises cariométrica, morfométrica, estereológica e de imunorreação do PCNA foram utilizados os testes Anova e de Tukey. Para as análises biométrica e sorológica, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Análise Biométrica

A análise biométrica representada na tabela I demonstrou que o peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença significativa entre si. Já os dados de pesos dos complexos prostáticos demonstraram que a próstata feminina diminuiu com a castração e aumentou além do peso das próstatas do grupo Co após o tratamento hormonal com estradiol e progesterona em associação.

Para obtenção dos pesos relativos foi feita a razão entre o peso prostático e o peso corpóreo. Os dados demonstraram novamente que, após a ovariectomia, as próstatas dos animais dos grupos Ca e CaO sofreram redução do peso relativo. Após o tratamento hormonal,

as próstatas tiveram um aumento significativo do seu peso relativo, atingindo valores maiores do que os encontrados nos animais do grupo controle.

Análise Sorológica

Os níveis sorológicos de testosterona, estradiol e progesterona dos grupos experimentais estão demonstrados na tabela I. Os níveis de testosterona decaíram significativamente nos grupos Ca e CaO, elevando-se novamente após o tratamento hormonal. A concentração de estradiol apresentou-se estatisticamente semelhante nos grupos Co, Ca e CaO, sendo significativamente maior nos animais do grupo CEP. Finalmente, quanto aos níveis de progesterona, os animais dos grupos Co e CEP apresentaram valores estatisticamente semelhantes, sendo que os animais dos grupos Ca e CaO apresentaram redução significativa destes níveis.

Análises Morfométrica, Cariométrica, Estereológica e Populacional

A análise morfométrica, representada na tabela I, demonstrou que a altura epitelial e a espessura da camada muscular lisa (CML) que envolve os ácinos prostáticos sofreram redução significativa nos grupos Ca e CaO, sendo que, no grupo tratado pelo estradiol e pela progesterona a espessura da CML voltou a atingir valores próximos dos normais, enquanto a altura das células epiteliais aumentou além dos valores encontrados no grupo controle. Da mesma forma, a análise cariométrica (tabela I) também revelou redução da área e perímetro nucleares das células epiteliais secretoras dos grupos Ca e CaO com relação ao observado no grupo Co, sendo que, no grupo CEP, houve clara recuperação dessas características morfológicas nucleares.

Os dados estereológicos, apresentados na tabela I, revelaram que os compartimentos prostáticos sofreram certa alteração em volume dentre os grupos experimentais analisados. Os compartimentos epitelial e luminal não sofreram alterações significativas entre os grupos. A camada de músculo liso apresentou aumento no grupo CaO ao mesmo tempo em que o estroma não muscular sofreu diminuição em volume neste grupo. Com relação a estes aspectos, os outros grupos mantiveram-se inalterados.

A frequência dos diferentes tipos celulares do epitélio está demonstrada na figura 1. A proporção de células secretoras apresentou valores semelhantes entre todos os grupos experimentais, com pequena variação do conjunto de dados (Fig. 1a). A frequência de células basais entre os grupos experimentais não sofreu alterações acentuadas, o que foi representado pelos valores aproximados das medianas (Fig. 1b). A população de células claras demonstrou expressivo aumento no grupo Ca, quando comparado aos demais grupos, semelhantes entre si para este aspecto (Fig. 1c). Células ciliadas foram encontradas em baixa frequência nos grupos Co e Ca, sendo ausentes nos demais grupos (Fig. 1d).

Aspectos morfológicos

Anatomicamente, a próstata de fêmeas de gerbilo é composta por um conjunto de ductos e ácinos que estão inseridos em um estroma fibromuscular. Em condições normais, observadas no grupo Co, os ácinos são revestidos por um epitélio simples que varia de cúbico a prismático, com lúmens volumosos que armazenam os produtos de secreção (Fig. 2a). O epitélio apresenta dois tipos celulares principais: células basais e células secretoras (Fig. 2b).

A morfologia geral da glândula dos grupos Ca e CaO mostrou grande regressão estrutural quando comparada à glândula do grupo controle. O epitélio dos ácinos prostáticos apresentou configuração ondulada e disforme, gerando tal aspecto regressivo à glândula (Fig. 2c,f). A diminuição da altura das células epiteliais acinares revelou, da mesma forma, a atrofia ocorrida na glândula (Fig. 2g). Além disso, a regressão acinar também foi constatada por uma grande redução na atividade secretora da próstata quando comparada ao grupo Co, evidenciada pelo método de PAS (Fig. 2j,k,l). A região epitelial apresentou, entre as células secretoras, células ciliadas e células claras (Fig. 2d,e). As células claras se caracterizam por apresentar citoplasma cromóforo e núcleo elíptico e recebem este nome devido ao aspecto pálido que demonstram após coloração por HE. O grupo CEP, que recebeu reposição hormonal pelo estradiol e pela progesterona, apresentou uma importante reestruturação no arranjo tecidual da próstata feminina do gerbilo. As glândulas mostraram uma reversão no processo de regressão evidenciada pela morfologia circular dos ácinos, pelo aumento da altura epitelial e pela

recuperação da atividade secretora, comprovada pela grande quantidade de secreção glicoproteica no interior dos ácinos (Fig. 2h,i,m).

Nas próstatas dos animais de todos os grupos experimentais foram encontradas algumas lesões e alterações morfológicas que destoavam o padrão estrutural prostático: prostatites (Fig. 3a,e); projeções epiteliais em direção ao estroma (Fig. 3b, d), e algumas neoplasias intraepiteliais prostáticas de natureza pré-maligna (NIP) (Fig. 3f). Nos grupos Ca e CaO foram comumente encontradas *debris* celulares no interior dos lúmens acinares (Fig. 3c).

Imunorreação do AR

A imunorreação do AR nas próstatas dos diferentes grupos experimentais está representada na figura 4. Os grupos Co, Ca e CaO apresentaram marcação semelhante, abrangendo células epiteliais e estromais (Fig. 4a-f). As próstatas das fêmeas do grupo CEP demonstraram intensa marcação para AR, presente em praticamente todas as células epiteliais acinares e grande parte das células estromais (Fig. 4g,h).

Imunorreação do ER α e ER β

A imunomarcação dos receptores de estrógeno está representada nas figuras 5 e 6. A análise demonstrou marcação do ER α principalmente nas células estromais da próstata controle (Fig. 5a,b), sendo que a mesma diminuiu nos grupos Ca e CaO (Fig. 5c-f), aproximando-se da normalidade no grupo CEP (Fig. 5g,h). Já a imunorreatividade para ER β apresentou-se de forma muito semelhante entre todos os grupos experimentais, sendo que esta ocorreu, principalmente, nos núcleos das células epiteliais (Fig. 6a-h).

Marcador de Proliferação Celular - PCNA

A figura 7 apresenta os resultados da análise imunocitoquímica para PCNA (Fig. 7a-h), bem como os gráficos obtidos pela contagem de células imunomarcadas pela técnica (Fig. 7i,j). De acordo com esses dados, os grupos Ca e CaO apresentaram diminuição significativa do número de células epiteliais e estromais em proliferação, quando comparados aos valores

do grupo controle. O grupo CEP demonstrou aumento significativo na quantidade de células epiteliais imunomarcadas com relação aos demais grupos, enquanto que as células estromais em proliferação apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

Discussão

Estudos anteriormente realizados têm demonstrado que a próstata feminina é um órgão funcionalmente ativo e que seu desempenho na reprodução é dependente da ação de hormônios esteróides (Santos *et al.*, 2008). Oscilações naturais desses hormônios durante o ciclo estral da fêmea do gerbilo são acompanhadas por importantes alterações na estrutura e funcionamento da glândula prostática.

O aspecto geral da glândula observado nos animais em fase de proestro do grupo Controle é semelhante ao que foi descrito por Santos e colaboradores (2003, 2006). Uma estrutura semelhante foi descrita por Scarano e colaboradores (2008) para a próstata ventral de machos da mesma espécie utilizada neste estudo (*Meriones unguiculatus*).

Os animais que foram submetidos à ovariectomia e compuseram os grupos Ca e CaO apresentaram resultados histofisiológicos bem semelhantes, de maneira que pode-se considerar que a aplicação do veículo não foi a responsável pelas alterações observadas no grupo tratado pelo estradiol e pela progesterona.

A supressão hormonal provocada pela ovariectomia ocasionou na glândula prostática feminina um processo de atrofia evidenciado por inúmeros aspectos morfológicos. A diminuição da altura do epitélio dos ácinos observada nos animais do grupo Ca e CaO consiste em uma resposta semelhante à encontrada na próstata de machos que também passaram pela restrição hormonal através da orquiectomia, e apresentaram epitélio acinar frequentemente cúbico ou cilíndrico baixo (Scarano *et al.*, 2008). A diminuição da área e perímetro nucleares das células epiteliais prostáticas, revelada pela análise cariométrica, pode estar diretamente relacionada à redução da atividade sintética dessas células nestes grupos experimentais. Esta redução também foi evidenciada pela quase ausência de secreção glicoproteica, corada pelo método de PAS, no interior dos ácinos prostáticos. A grande diminuição do peso prostático

relativo das fêmeas castradas é outro indício do acentuado processo de regressão acinar provocado pela supressão hormonal. Nas próstatas dos animais destes grupos, foram comumente encontradas *debris* celulares no interior dos lúmens acinares. A formação de *debris* ocorre em resposta à restrição hormonal como uma maneira rápida da glândula descartar grandes porções de células epiteliais que não tem mais estímulo para a secreção. A análise sorológica comprovou a diminuição dos níveis hormonais de testosterona e progesterona, no entanto, esta mesma diminuição não foi observada para os níveis séricos de estradiol. Uma via alternativa para o metabolismo de estradiol pode ser utilizada a partir da testosterona por meio da atividade da enzima aromatase nos tecidos periféricos (Corradi *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2006). No organismo feminino, a produção de testosterona ocorre primariamente nos ovários, mas também é observada nas glândulas supra-renais em menor quantidade (Davis, 1999; Davis e Trans, 2001). Acredita-se, portanto, que, devido à castração, a produção de estradiol permaneceu ativa por meio do processo de aromatização da testosterona nos tecidos periféricos e também por uma maior atividade das glândulas supra-renais. Isso explica o fato de os níveis séricos de estradiol terem se mantido inalterados após a retirada dos ovários.

A diminuição da espessura da camada de células musculares lisas observadas nas próstatas dos animais dos grupos Ca e CaO está em desacordo com dados prévios observados em próstatas de gerbilos machos castrados, nas quais um aumento no compartimento fibromuscular do estroma foi sugerido como consequência de um rearranjo desses tipos celulares (Góes *et al.* 2007). No entanto, pode-se considerar que, devido ao perfil hormonal do organismo feminino não ser o mesmo encontrado no organismo masculino, o comportamento da camada de músculo liso que envolve os ácinos seja diferente entre os dois sexos. Um estudo realizado por Santos *et al.* (2011) demonstrou que as maiores alterações estromais da próstata feminina coincidem com os picos hormonais de estradiol e progesterona durante o ciclo estral do animal, o que demonstra a importância destes hormônios na regulação do remodelamento estromal.

As fêmeas do grupo Ca apresentaram um acentuado aumento em frequência de células claras. Quando fêmeas adultas de gerbilo foram submetidas a tratamentos com testosterona exógena (Santos *et al.*, 2006) e letrozol, um inibidor da enzima aromatase (Santos *et al.*,

2008), um aumento na frequência de células claras também pode ser observado. Da mesma forma, Custódio *et al.* (2008) demonstrou um mesmo aumento na população destas células na próstata de fêmeas de gerbilo senis, identificando uma maior proliferação deste tipo celular em lesões neoplásicas e displásicas. Isso pode indicar que a ocorrência de células claras esteja relacionada ao desequilíbrio hormonal da glândula. Porém os fatores envolvidos nessa resposta devem ser melhor elucidados por meio de estudos mais aprofundados.

A reversão no processo de atrofia glandular observada no grupo tratado pelo estradiol e pela progesterona foi evidenciada por uma reestruturação morfológica geral do órgão, que voltou a apresentar ácinos com aspectos circulares e lúmens volumosos, bem como um aumento na altura das células epiteliais secretoras e na espessura da camada muscular lisa. As evidências de recuperação da atividade metabólica e sintética nas próstatas dos animais deste grupo, representadas pelo considerável aumento da área e perímetro nucleares das células epiteliais secretoras e pela grande quantidade de secreção encontrada nos lúmens dos ácinos prostáticos, demonstram o envolvimento do estradiol e da progesterona no desempenho dessas funções na glândula. Além disso, pode-se dizer que o tratamento hormonal duplo realizado recuperou a estrutura geral da glândula sem causar grandes focos de lesões, já que foram observados poucos desarranjos histopatológicos nas próstatas das fêmeas pertencentes a este grupo.

A análise sorológica do grupo CEP demonstrou que a administração de estradiol + progesterona elevou os níveis hormonais, mas não recuperou totalmente o perfil hormonal observado no grupo controle. Foi observado que, nas fêmeas deste grupo, o nível sérico de testosterona sofreu um significativo aumento quando comparado aos grupos Ca e CaO. A biossíntese de testosterona no organismo feminino pode também ocorrer a partir da progesterona, sob ação do citocromo P450 c17 que catalisa a produção de androstenediona, um pró-andrógeno que necessita ser convertido em testosterona para expressar seus efeitos androgênicos. Essa molécula é então convertida em testosterona pela ação da 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β -HSD) presente nos ovários e suprarrenais (Henry & Burger, 2002). Dessa forma, a recuperação parcial do perfil sérico de testosterona nos animais do grupo CEP pode ter ocorrido devido aos elevados níveis de progesterona presentes no organismo, já que este hormônio foi administrado como parte do tratamento experimental.

Com relação aos dados observados nas reações imunocitoquímicas, acredita-se que o tratamento hormonal realizado tenha sido responsável pelo aumento da expressão de AR e ER α no tecido prostático. Sabe-se que as células epiteliais secretoras e os fibroblastos da próstata de fêmeas tem expressão positiva para receptores de andrógenos (Santos & Taboga, 2006). O ER α , o qual é frequentemente expresso nas células estromais da próstata de humanos e roedores (Prins *et al.*, 2001; Rovuele *et al.*, 2001; Omoto *et al.*, 2005), é também detectado nas células epiteliais secretoras da glândula feminina.

A imunomarcção observada para o AR mostrou-se semelhante ao perfil sorológico apresentado pelas fêmeas dos diferentes grupos experimentais. A diminuição dos níveis séricos de testosterona nos grupos Ca e CaO foi acompanhada pela também diminuição na expressão de AR nas próstatas destes animais. A expressão deste receptor em praticamente todas as células epiteliais secretoras e grande parte das células estromais nas próstatas das fêmeas do grupo CEP é mais um indicativo para confirmação da hipótese de que os níveis androgênicos se elevaram nos animais deste grupo devido à conversão de progesterona em testosterona ou outros hormônios da linha androgênica.

Os dados apresentados neste estudo mostraram que, nos grupos de fêmeas ovariectomizadas que não passaram pelo tratamento hormonal, a expressão de ER α nas células estromais prostáticas diminuiu em comparação à expressão nas fêmeas controle. Um estudo feito por Wada-Hiraike e colaboradores (2006) envolvendo a atividade de receptores estrogênicos no epitélio luminal do útero de ratas ovariectomizadas, demonstrou resultado semelhante para a expressão de ER α , que, da mesma forma, sofreu redução após a supressão hormonal. No grupo de fêmeas submetidas ao tratamento hormonal do presente estudo, observou-se uma grande recuperação na expressão estromal de ER α . Estes dados estão de acordo com um estudo realizado com fêmeas de gerbilos que avaliou o efeito combinado de estradiol e progesterona sintéticos sobre o útero desses animais e que demonstrou que o tratamento hormonal realizado também aumentou a expressão de ER α neste tecido (Lv & Shi, 2012). Dessa forma, acredita-se que a expressão de ER α esteja sob influência da ação sinérgica do estradiol e da progesterona na próstata de fêmeas de gerbilo.

Por outro lado, a imunomarcção de ER β mostrou-se praticamente inalterada entre todos os grupos experimentais. Em roedores machos adultos, a castração leva a um acentuado

declínio da síntese e atividade do ER β no tecido prostático, o qual é revertido com a reposição por testosterona (Prins *et al.*, 1998). Estes dados não puderam ser elucidados pela técnica de imunocitoquímica utilizada para as fêmeas deste estudo. Como a expressão de ER β já é fortemente presente no epitélio de fêmeas controle, a diferença na atividade destes receptores entre os grupos experimentais deverá ser melhor detectada pelo uso de técnicas mais sensíveis. Desta forma, os fatores envolvidos na regulação da expressão do ER β na próstata feminina poderão ser melhor investigados e compreendidos.

Os resultados de imunomarcção para PCNA demonstraram diminuição do número de células epiteliais e estromais em proliferação nos grupos Ca e CaO. Dados semelhantes foram observados por Campos *et al.* (2010) em estudo com gerbilos machos senis que também passaram por supressão hormonal. Após submetidas ao tratamento combinado de estradiol e progesterona, as próstatas das fêmeas apresentaram expressivo aumento no número de células epiteliais proliferativas e recuperação do número de células estromais em proliferação, indicando, mais uma vez, que os hormônios envolvidos neste estudo influenciaram fortemente a recuperação morfológica e funcional da glândula, revertendo o processo de atrofia e estimulando a divisão celular para manutenção e reparo do tecido.

Os dados apresentados neste trabalho levam à conclusão de que os hormônios ovarianos são de grande importância para a manutenção da fisiologia da próstata feminina, uma vez que a ovariectomia causou regressão glandular e diminuição da atividade secretora. Foi também comprovado o importante papel desempenhado pelo estradiol em associação com a progesterona na regulação morfofuncional da glândula. Sabe-se que a integridade da glândula não se relaciona apenas com os níveis de estrógeno e progesterona, mas também com o balanço cíclico entre esses hormônios. Entretanto, estudos sobre a ação combinada do estrógeno e da progesterona na próstata podem abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos de importantes doenças prostáticas, as quais, segundo encontrado na literatura, acometem tanto indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino (Zaviačič, 1993; Dodson *et al.*, 1994, 1995; Ali *et al.*, 1995; Ebisuno *et al.*, 1995; Sloboda *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2001; Sharifi-Aghdas & Ghaderian, 2004; Kato *et al.*, 2005; McCluggage *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo são achados inéditos, principalmente no que se refere ao papel da progesterona, ou da interação estrógeno/progesterona, que é muito pouco explorada nos

estudos sobre a próstata. Além disso, apesar de o tratamento hormonal realizado neste trabalho não ter tornado a próstata totalmente semelhante ao observado em animais normais, este foi o único tratamento realizado até agora que conseguiu recuperar a atividade secretora sem causar grandes focos de lesões estruturais no tecido prostático. Esse achado pode ser um indicativo de que a ação sinérgica do estradiol com a progesterona é a responsável pelo equilíbrio hormonal ideal para manutenção da fisiologia saudável da glândula. Assim, a continuação dos estudos sobre a ação combinada desses hormônios na próstata feminina será de fundamental importância para a elucidação dos eventos que regulam a histofisiologia deste órgão.

Agradecimentos

A autora agradece ao Sr. Luiz Roberto Falleiros Junior pela assistência técnica, bem como a todos os amigos pesquisadores do Laboratório de Microscopia e Microanálise. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. Nº 2009/12688-1).

Referências

- Ali S.Z. et al. Primary adenoid cystic carcinoma of Skene's glands. *Gynecol Oncol*, 57:257-261, 1995.
- Campos S.G. et al. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol*. Oct; 91(5):394-407, 2010.
- Corradi L.S. et al. Increased androgen receptor and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc Res Tech*. Dec;72(12):939-50, 2009.
- Custódio, A. M. et al. Aging Effects on the Mongolian Gerbil Female Prostate (Skene's Paraurethral Glands): Structural, Ultrastructural, Quantitative, and Hormonal Evaluations. *The Anatomical Record* 291:463–474, 2008.
- Davis, S.R. Androgen replacement in women: a commentary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1886–1891, 1999.

Davis, S. R. and Trans, J. Testosterone influences libido and well being in women. *Trends In Endocrinology & Metabolism* Vol.12 No.1 January/February 2001.

Dodson M.K. et al. Skene's gland adenocarcinoma with increased serum level of prostate-specific antigen. *Gynecol Oncol*, 55:304-307, 1994.

Dodson M.K. et al. Female urethral adenocarcinoma: evidence for more than one tissue of origin? *Gynecol Oncol*, 59:352-357, 1995.

Ebisuno S., Miyai M., Nagareda T. Clear cell adenocarcinoma of the female urethra showing positive staining with antibodies to prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase. *Urology*, 45:682-685, 1995.

Góes R. M. et al. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron* 38 231-236, 2007.

Henry G. Burger, M.D. Androgen production in women. *Fertility and Sterility*. Vol.. 77, Nº. 4, Suppl 4, April 2002.

Islam A.H.M.M. et al. Adenocarcinoma of the female paraurethral duct showing neuroendocrine differentiation. *Urology*, 58:1058, 2001.

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

Kato H. et al. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119, 2005.

Lv, X., Shi, D. Combined Effects of Levonorgestrel and Quinestrol on Reproductive Hormone Levels and Receptor Expression in Females of the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Zoological Science* 29: 37-42, 2012.

McCluggage W.G. et al. Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix and vagina: report of a series with a detailed immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*, 30:209-215, 2006.

Nishino N., Totsukawa K. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45(3):283-288, 1996.

Omoto Y. et al. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:1484-1489, 2005.

Prins G.S. et al. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*. Mar;139(3):874-83, 1998.

Prins G.S. et al. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*, 13:241-252, 2001.

Rovuele M. et al. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol*, 168:447-454, 2001.

Santos F.C.A. et al. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue & Cell*, 35:447-457, 2003.

Santos F.C.A. et al. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75(3):370-9, 2006.

Santos F.C.A. et al. Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries. *Biology of Reproduction* 79 (4) 674-685, 2008.

Santos F.C.A. et al. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol*. Sep 15;173(3):419-27, 2011.

Santos F.C.A., Taboga S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006.

Scarano W.R. et al. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *International Journal of Experimental Pathology* 89 25-37, 2008.

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

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

Wada-Hiraike O. et al. Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 28;103(48):18350-5, 2006.

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

Zaviacic M., Sidlo J., Borovský M. Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene's paraurethral glands and ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423:503-505, 1993.

Legendas das Figuras

Tabela I. Biometria, sorologia, morfometria, cariometria das células secretoras e estereologia das próstatas dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores mencionados representam a média e o desvio padrão, respectivamente. *Alterações estatisticamente significativas no parâmetro analisado. ^{a,b,c,d} Letras sobrescritas indicam as diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Co, Controle; Ca, Castrado; CaO, Castrado + Óleo; CEP, Castrado + Estradiol + Progesterona.

Figura 1. Box-plots representando a frequência em porcentagem de células secretoras, basais, claras e ciliadas nas próstatas dos diferentes grupos experimentais. Co, Controle; Ca, Castrado; CaO, Castrado + Óleo; CEP, Castrado + Estradiol + Progesterona.

Figura 2. Aspectos estruturais e histoquímicos da próstata feminina dos diferentes grupos experimentais corada pela H&E (a-i) e pelo método de PAS (j-m). **(a)** Secção histológica da próstata feminina adulta normal em fase de proestro, mostrando o estroma fibromuscular (St), epitélio (Ep) e lúmen (*). **(b)** Detalhe do epitélio secretor mostrando as células secretoras (cs), células basais (b) e camada muscular adjacente (cml). **(c)** Visão geral da próstata feminina após castração. **(d)** Célula ciliada (seta) em meio às células secretoras. **(e)** Célula clara (seta) em meio às células secretoras do epitélio acinar. **(f)** Visão geral da próstata feminina após castração e administração do veículo. **(g)** Detalhe do epitélio secretor prostático (Ep) dos animais do grupo CaO. **(h)** Visão geral da próstata dos animais do grupo CEP. **(i)** Detalhe do epitélio secretor mostrando as células secretoras prismáticas, células basais (b) e camada muscular adjacente (cml). **(j)** Lúmens da próstata normal com grande quantidade de secreção glicoprotéica (*). **(k,l)** Lúmens regredidos com quase ausência de secreção glicoproteica (*). **(m)** Destaque para lúmens aumentados com grande quantidade de secreção glicoproteica (*).

Figura 3. Alterações histopatológicas identificadas na próstata feminina dos diferentes grupos experimentais. Coloração H&E. **(a)** Prostatite (seta) encontrada em ácino de animal do grupo Co. Lúmen (*). **(b)** Destaque para região de projeção do epitélio acinar em direção ao estroma,

ocorrido em animal do grupo Ca. (c) Ácino prostático do grupo CaO com presença de *debris* celulares (seta) no interior do lúmen. (d) Região de projeção epitelial em direção ao estroma encontrado em animal do grupo CEP (*) Lúmen. (e) Prostatite (seta) encontrada na próstata de animal do grupo CEP. (f) Ácino apresentando neoplasia intraepitelial prostática (NIP) com destaque para formação de arcos intraepiteliais (setas).

Figura 4. Reação de imunocitoquímica para AR contra corado com Hematoxilina de Harris. (a-f) Imunorreação do AR nas células epiteliais (setas) e estromais (setas tracejadas) dos animais dos grupos Co, Ca e CaO. (g,h) Evidência de alta imunorreatividade de AR nas células epiteliais da próstata feminina após tratamento hormonal.

Figura 5. Secções histológicas submetidas à imunocitoquímica para ER α e contra coradas com Hematoxilina de Harris. (a,b) Marcação do ER α nas células estromais da próstata de fêmeas controle (setas). (c-f) Baixa imunomarcção em células estromais da próstata de animais dos grupos Ca e CaO (setas). (g,h) Evidência de aumento da expressão de ER α no estroma da próstata de fêmeas tratadas com estradiol e progesterona (setas).

Figura 6. Reação de imunocitoquímica para ER β contra corado com Hematoxilina de Harris. (a,b) Imunomarcção do ER β (setas) em próstata de fêmeas controle. (c-h) Fêmeas dos grupos Ca, CaO e CEP apresentando imunomarcção do ER β em células epiteliais (setas) e estromais (setas tracejadas) do tecido prostático.

Figura 7. Secções histológicas submetidas à imunocitoquímica para detecção do marcador de proliferação celular PCNA. Lâminas contra coradas com Hematoxilina de Harris. (a,b) Imunomarcção do PCNA nas células epiteliais e estromais da próstata de fêmeas controle (setas). (c-f) Imunomarcção em células epiteliais e estromais da próstata de animais dos grupos Ca e CaO (setas). (g,h) Aumento na expressão do PCNA na próstata de fêmeas tratadas com estradiol e progesterona (setas). (i, j) Índice de proliferação celular calculados para células do epitélio e estroma da próstata dos diferentes grupos experimentais. Os valores mencionados representam a média e o desvio padrão, respectivamente. ^{a,b,c} Letras sobrescritas

indicam as diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$). Co, Controle; Ca, Castrado; CaO, Castrado + Óleo; CEP, Castrado + Estradiol + Progesterona.

Tabela I	Grupos Experimentais			
Biometria n=8	Co	Ca	CaO	CEP
Corpo (g)	59,4 ± 4,8	63,4 ± 3,7	57,8 ± 4,8	64,4 ± 4,8
Complexo prostático* (g)	0,054 ^a ± 0,02	0,039 ^b ± 0,01	0,034 ^b ± 0,005	0,08 ^c ± 0,009
Peso relativo*	0,0009 ^a ± 0,0001	0,0006 ^b ± 0,0001	0,0005 ^b ± 0,0001	0,0012 ^c ± 0,0002
Sorologia n=5				
Testosterona* (ng/ml)	0,3 ^a ± 0,02	0,05 ^b ± 0,01	0,04 ^b ± 0,02	0,1 ^c ± 0,01
Estradiol* (pg/ml)	38,5 ^a ± 4,9	40,6 ^a ± 4,0	22,0 ^a ± 4,5	182,4 ^b ± 38,7
Progesterona* (pg/ml)	10,1 ^a ± 2,5	1,6 ^b ± 0,2	0,4 ^b ± 0,2	9,2 ^a ± 1,2
Morfometria (µm) n=5				
Altura Epitelial*	18,8 ^a ± 5,4	15,7 ^b ± 7,2	11,1 ^c ± 6,2	26,0 ^d ± 5,5
Espessura CML*	14,3 ^a ± 5,3	12,6 ^b ± 7,1	10,8 ^c ± 4,2	14,9 ^a ± 5,3
Cariometria das células secretoras n=5				
Área Nuclear (µm ²)*	29,9 ^a ± 6,5	18,0 ^b ± 9,4	12,2 ^c ± 5,9	27,6 ^d ± 6,0
Perímetro Nuclear (µm)*	20,3 ^a ± 2,4	15,6 ^b ± 4,1	13,0 ^c ± 2,8	19,8 ^a ± 2,1
Estereologia (%) n=5				
Epitélio	30,1 ± 5,7	27,8 ± 9,9	27,2 ± 8,8	27,8 ± 7,5
Lúmen	19,3 ± 8,5	19,8 ± 8,2	22,8 ± 11,4	25,6 ± 16,7
CML*	16,6 ^a ± 7,5	19,1 ^a ± 7,1	25,2 ^b ± 4,8	18,4 ^a ± 6,5
Estroma não muscular*	33,8 ^a ± 8,4	33,1 ^a ± 11,0	24,6 ^b ± 7,9	28,0 ^{a,b} ± 12,6

FIGURA 1

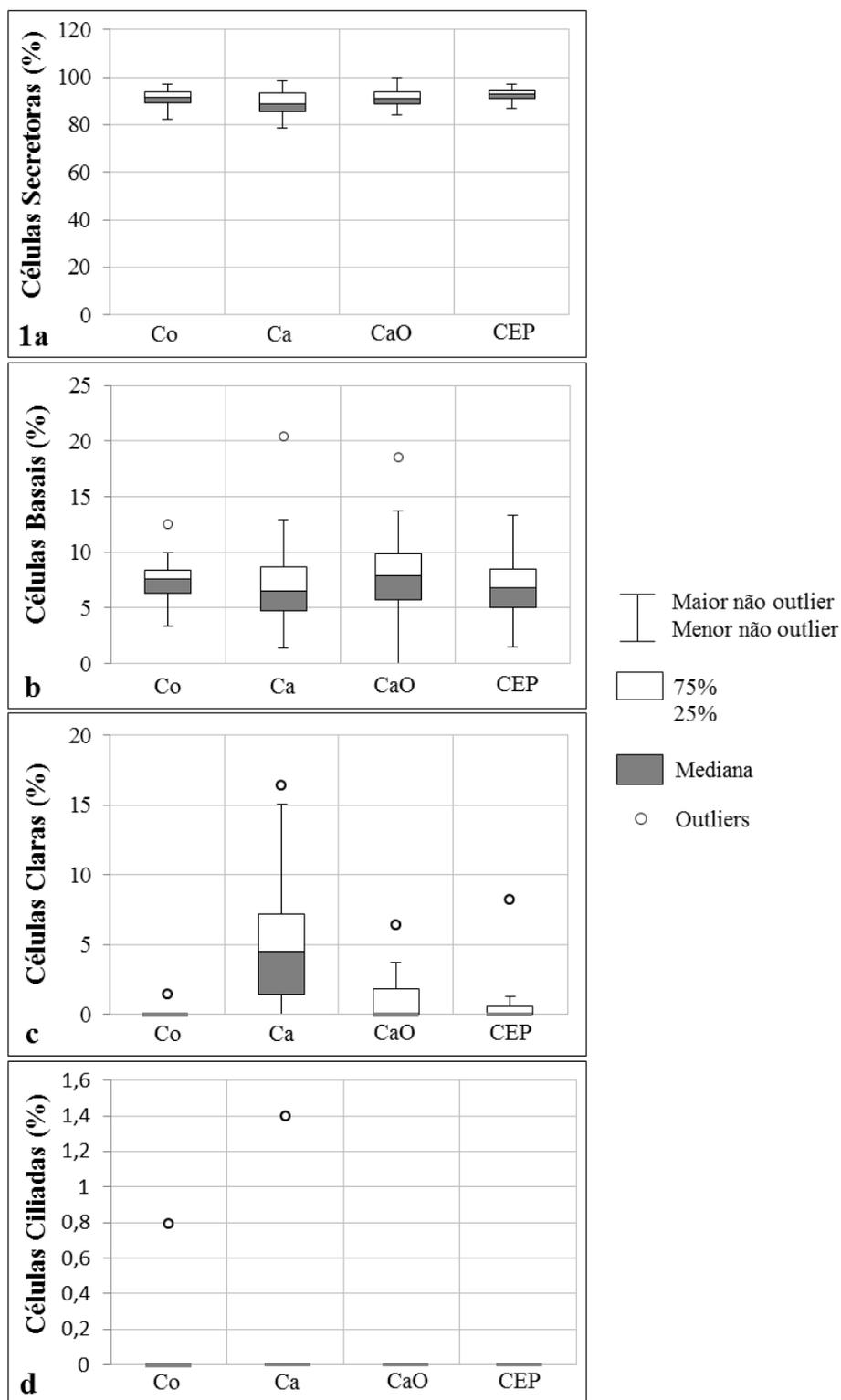


FIGURA 2

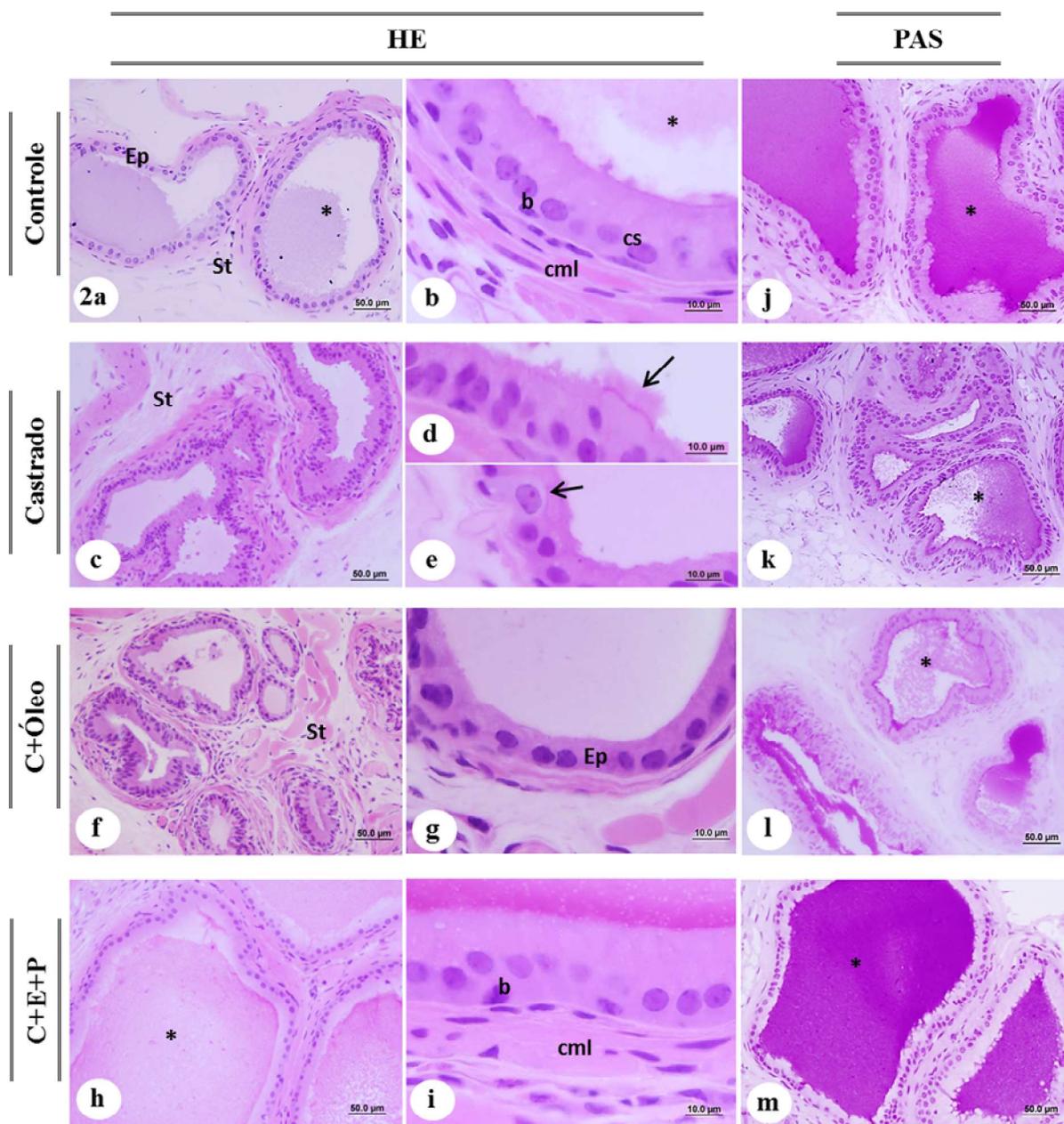


FIGURA 3

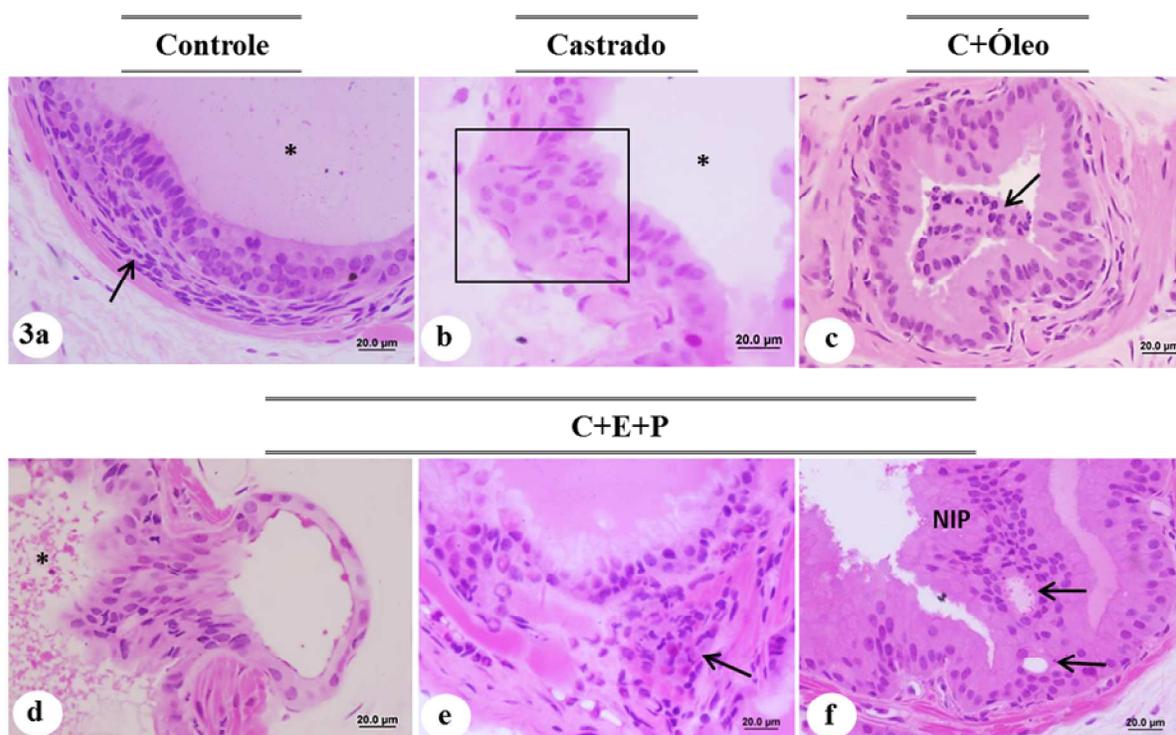


FIGURA 4

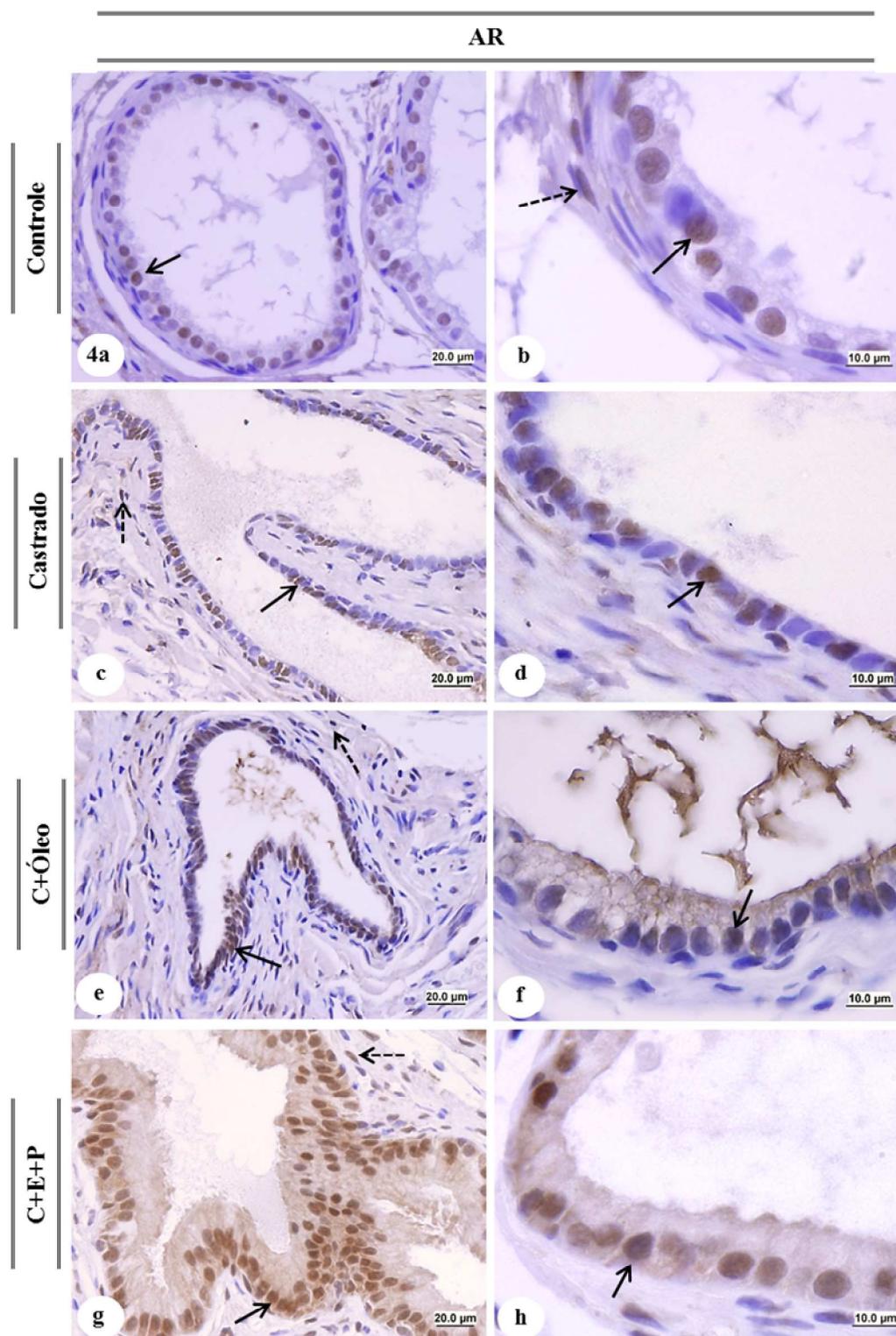


FIGURA 5

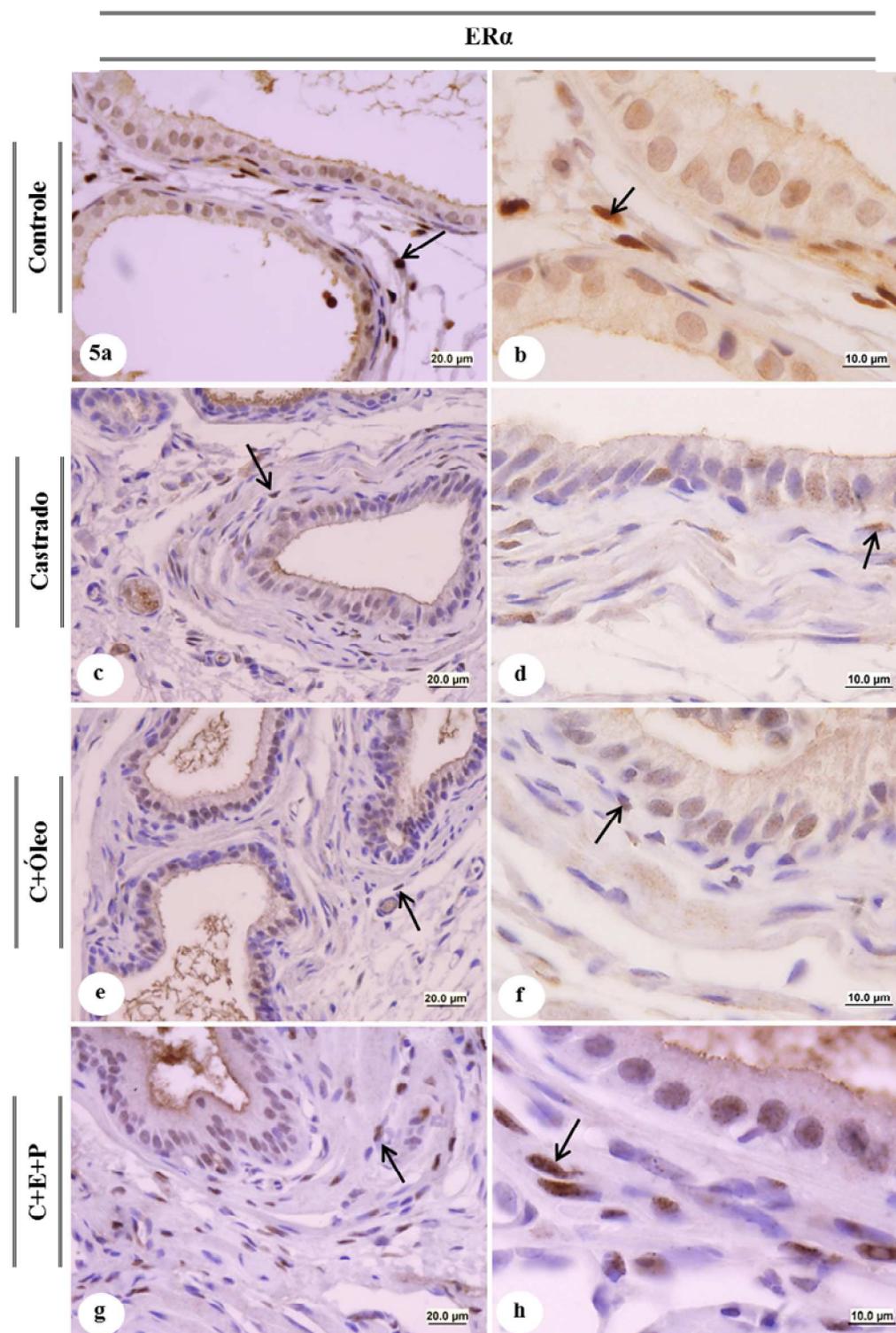


FIGURA 6

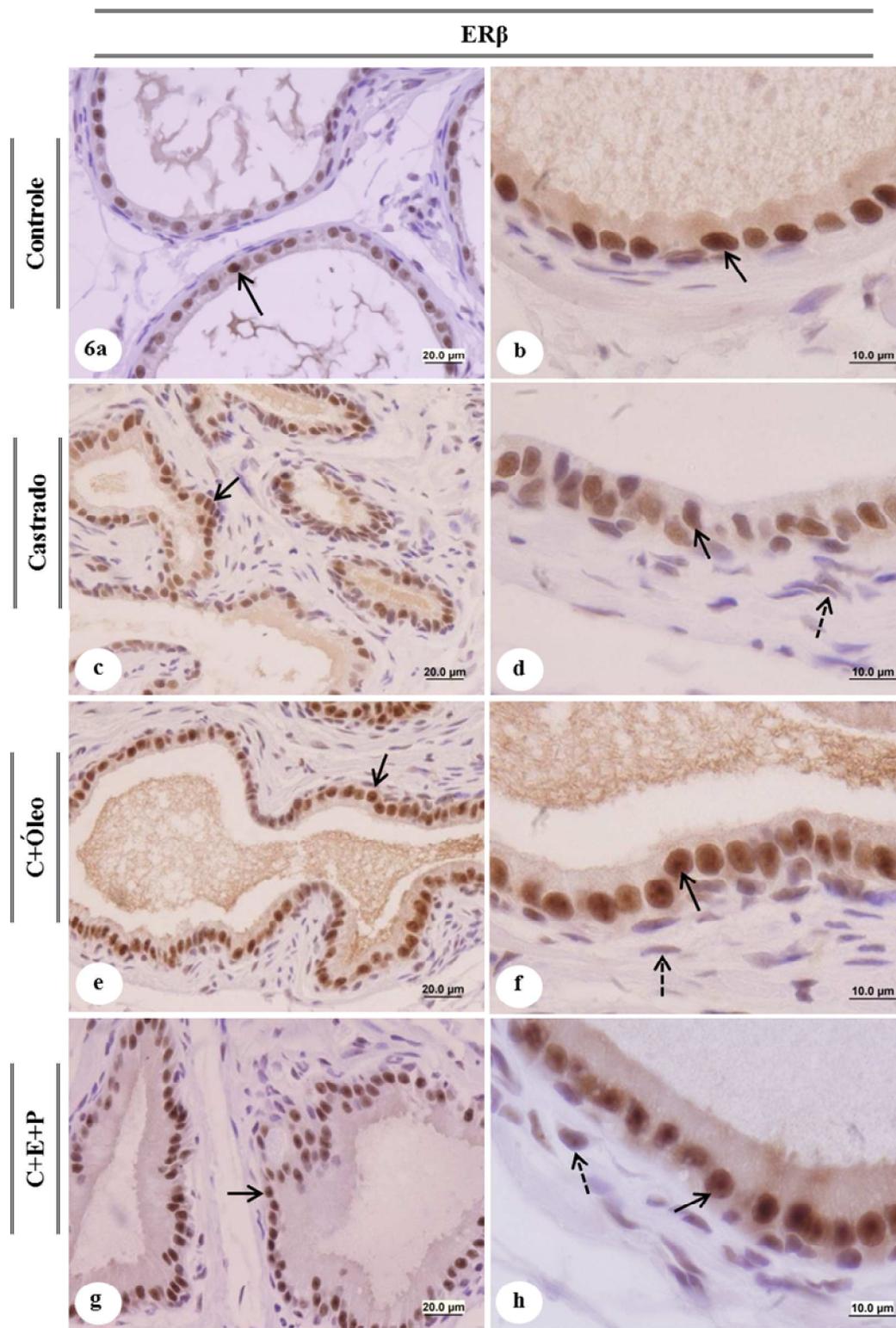
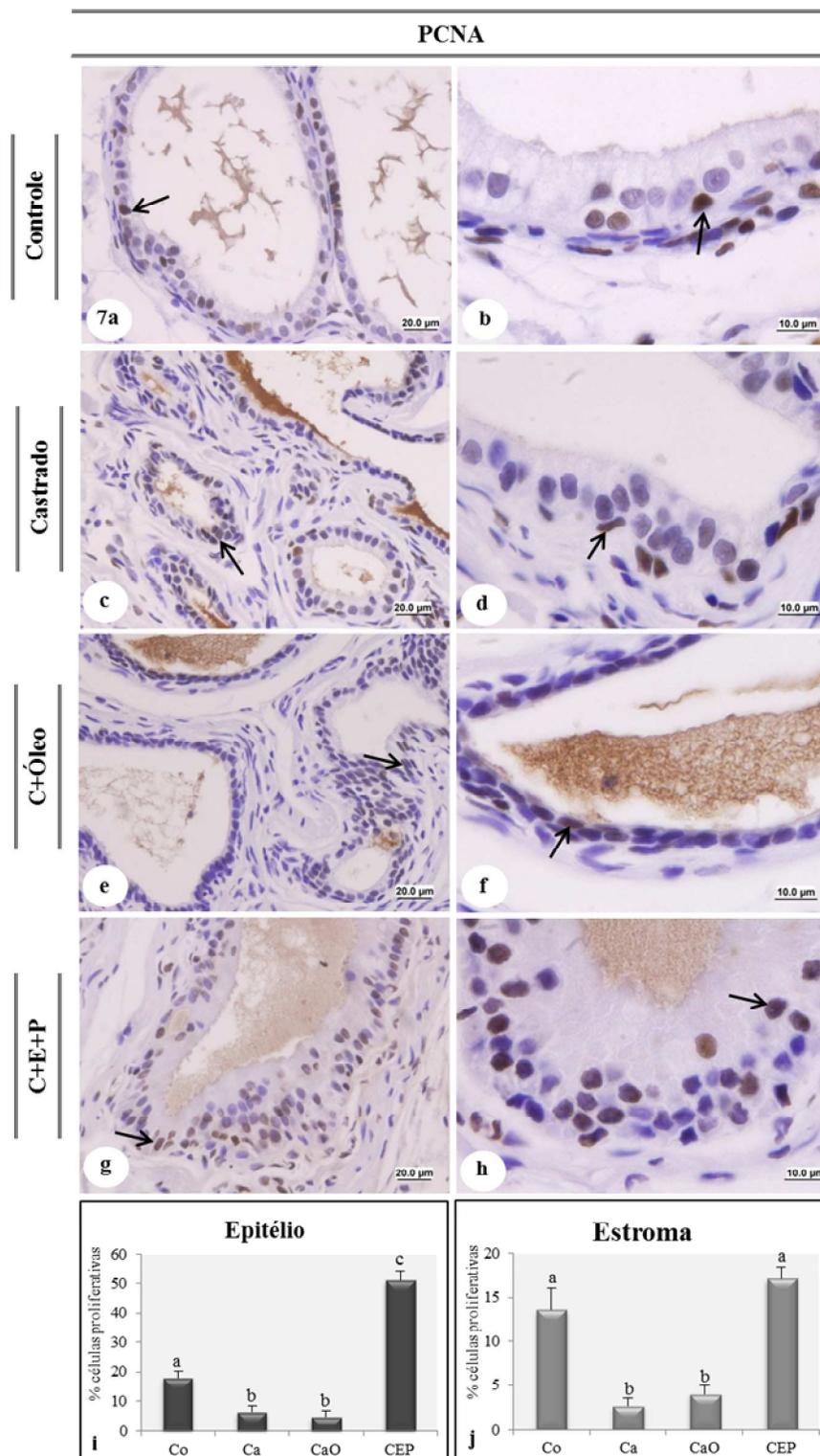


FIGURA 7



CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A ovariectomia causou regressão glandular;

- ✓ O tratamento hormonal do presente estudo foi responsável pela recuperação estrutural da próstata feminina;

- ✓ As análises imunocitoquímicas demonstraram o envolvimento dos receptores dos hormônios esteroides na manutenção da histofisiologia prostática;

- ✓ O tratamento associado do estradiol e da progesterona não foi causador de importantes focos de lesões prostáticas, indicando que essa interação hormonal possa ser a responsável pela homeostase da glândula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addiego F. et al. Female ejaculation: a case study. *J Sex Res*, 17:1-13, 1981.
- Ali S.Z. et al. Primary adenoid cystic carcinoma of Skene's glands. *Gynecol Oncol*, 57:257-261, 1995.
- Behringer, R. R. The *in vivo* roles of mullerianinhibiting substance. *Curr. Top. Dev. Biol.* 29,171-187, 1994.
- Castagnetta L.A.M., Carruba G. Human prostate cancer: a direct role for oestrogens. In: Non-reproductive actions of sex steroids. *Chichester: Wiley*; p. 269-89, 1995.
- Chen J.D., Li H. Coactivation and corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*; 8(2):169 -90, 1998.
- Clark M.M., Crews D., Galef B.G. Concentrations of sex steroids hormones in pregnant and fetal Mongolian gerbils. *Physiol Behav*, 49:239, 1991.
- Cunha G.R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* 8, 338-362, 1987.
- Cunha G.R., Cooke P.S., Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* Dec;67 (5):417-34, 2004.
- Custódio A.M.G., Góes R.M., Taboga S.R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biology International*, 28:335-344, 2004.
- Custódio A.M.G. et al. Secretor epithelium of the old female gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate and its lipofuscinogenesis age dependent. Senescence and estereoidal therapy induce alterations of the epithelial cells phenotypes in the gerbil female prostate. In: International Symposium on Extracellular Matrix – SIMEC 2006 Anais, Búzios, RJ.
- Daniel C.W., Silberstein G.B., Strickland P. Direct action of 17 bestradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res*; 47(22):6052-7, 1987.
- de Graaf R. De mulierum organis generationi inservientibus. Tractatus novus demonstrans tani homines et animália caetera omnia, quac vivípara dicuntut, haud minus quam vivípara ab ovo originem ducere. Leyden: [no ed.]. 66p. 1672. In: Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006

Dodson M.K. et al. Skene's gland adenocarcinoma with increased serum level of prostate-specific antigen. *Gynecol Oncol*, 55:304-307, 1994.

Dodson M.K. et al. Female urethral adenocarcinoma: evidence for more than one tissue of origin? *Gynecol Oncol*, 59:352-357, 1995.

Ebisuno S., Miyai M., Nagareda T. Clear cell adenocarcinoma of the female urethra showing positive staining with antibodies to prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase. *Urology*, 45:682-685, 1995.

Evans R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*; 240(4854):889 – 95, 1988.

Galand P., Leroy F., Chretien J. Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice. *J Endocrinol*; 49(2):243–52, 1971.

Ghayee H.K., Auchus R.J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord*; 8: 289–300, 2007.

Graham J.D., Clarke C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Rev*; 18:502–19, 1997.

Gräfenberg E. The role of the urethra in female orgasm. *Int J Sexol*, 3:145-148, 1950.

Havelock J.C., Rainey W.E., Carr B.R. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*; 228: 67–78, 2004.

Hayward S.W. et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat*, 155:81-93, 1996.

Hines T.M. The G-spot: A modern gynecologic myth. *Am J Obstet Gynecol*, 185:359-362, 2001. In: Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006.

Hoshiya M. et al. Persistent Mullerian duct syndrome caused by both a 27-bp deletion and novel splice mutation in the MIS type II receptor gene. *Birth Defects Res. A* 67, 868–874, 2003.

Huffman J.W. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am J Obstet Gynecol*, 55:86-101, 1948.

Huffman J.W. Clinical significance of the paraurethral ducts and glands. *Arch Surg*, 62:615-625, 1951.

Imbeaud S. et al. Molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome: a study of 19 families. *Hum.Mol. Genet.* 3, 125–131, 1994.

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

Islam A.H.M.M. et al. Adenocarcinoma of the female paraurethral duct showing neuroendocrine differentiation. *Urology*, 58:1058, 2001.

Jarred R. et al. Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology*; 141(9):3471–7, 2000.

Kato H. et al. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119, 2005.

Katzenellenbogen B.S. et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res*; 55:163–93 [discussion, 194–165], 2000.

Leung Y.K. et al. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(35): 13162–7, 2006.

Marker P.C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253:165-174, 2003.

McCluggage W.G. et al. Ectopic prostatic tissue in the uterine cervix and vagina: report of a series with a detailed immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*, 30:209-215, 2006.

McCrea L.E. Malignancy of the female urethra. *Urol Surv*, 2:85-149, 1952.

Morani A., Warner M., Gustafsson J.A. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med.* Aug;264(2):128-42, 2008.

Mosselman S., Polman J., Dijkema R. ER B: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS*; 392:49–53, 1996.

Nevalainen M.T. et al. Hormone regulation of human prostate in organ culture. *Cancer Res*; 53:5199–207, 1993.

Nishino N., Totsukawa K. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45(3):283-288, 1996.

Payne A.H., Hales D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*; 25: 947–70, 2004.

Pointis G., Latreille M.T., Cedard L. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. *J Endocrinol*, 86:483-488, 1980.

Prins G.S. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology*; 130(6):3703–14, 1992.

Santos F.C. A., Corradi L.S., Taboga S.R. Cytochemical characterization of the stromal compartment in gerbil female prostate. In Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Águas de Lindóia, Brazil, Suppl C. pp.207, 2001.

Santos F.C.A. et al. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue & Cell*, 35:447-457, 2003.

Santos F.C.A. et al. Effects of aromatase inhibition on the gerbil female prostate. In: Abstracts of the XII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, Campinas, Brazil. Brazilian Society of Anatomy. pp.B037, 2004.

Santos F.C.A. et al. Tamoxifen effects on the gerbil female prostate. *Braz J Morphol Sci Suppl*, 3:51-52, 2005.

Santos F.C.A. et al. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75(3):370 9, 2006.

Santos F.C.A. et al. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624, 2007.

Santos F.C.A. et al. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol*. Sep 15;173(3):419-27, 2011.

Santos F.C.A., Taboga S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006.

Sasano H. et al. Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J Reprod Fertil*; 85: 163–9, 1989.

Schubach G. The G-spot is the female prostate. *Am J Obstet Gynecol*, 186: 850, 2002. In Santos F.C.A., Taboga S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006.

Shapiro E. et al. The prostatic utricle is not a Müllerian duct remnant: immunohistochemical evidence for a distinct urogenital sinus origin. *J Urol*, 172:1753-1756, 2004.

Silberstein G.B., et al. Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology*;134(1):84 – 90, 1994.

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

Skene A.J.C. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am J Obstetr Diss Women Child*, 13:265-270, 1880. In: Santos F.C.A., Taboga S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3 (1): 3-18, 2006.

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

Staack A. et al. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*, 71:402-413, 2003.

Taboga S.R. et al. Ultrastructural characterization of the prostate secretory cells: a comparative study between the male and female organs. In: Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Águas de Lindóia, Brazil, Suppl C. pp.205, 2001.

Tepper S.L. et al. Homology between the female paraurethral (Skenes's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med*, 108(5): 423-425, 1984.

Thomson A.A. et al. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, 129:1905-1912, 2002.

Timms, B. G., Mohs, T. J. & Didio, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J. Urol*. 151, 1427–1432, 1994.

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

Thomas J.A., Keenan E.J. Effects of estrogen on the prostate. *J Androl*; 15(2):97–9, 1994.

Vegeto E. et al. The molecular pharmacology of ovarian steroid receptors. *Vitam Horm.*; 52:99-128, 1996.

Wang Y. et al. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68:270-279, 2001.

Weitlauf H.M. Biology of implantation. In: Knobil E, Neill J, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, Ltd., pp. 231–62, 1988.

Wernet N. et al. The “female prostate”: localion, morphology, immunohistochemical characteristics and significance. *Eur Urol*, 22:64-69, 1992.

Wilhelm D., Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet.* Aug;7(8):620-31. *Epub* Jul 11, 2006.

Zaviacic M., Ablin R.J. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in human female. *Histol Histopathol*, 15:131-142, 2000.

Zaviacic M. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *J Sex Res*,30:148-151, 1993.

Zaviacic M., Sidlo J., Borovský M. Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene's paraurethral glands and ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423:503-505, 1993.

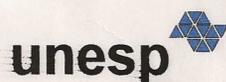
Zaviacic M. et al. Immunohistochemical localization of human protein 1 in the female prostate (Skene's Gland) and the male prostate. *Histochem J*, 29:219-227, 1997a.

Zaviacic M. et al. Immunohistochemical distribution of rabbit polyclonal antiurinary protein 1 antibody in the female (Skene's gland) and male prostate: new marker for neuroendocrine cells? *Acta Histochem*, 99:267-275, 1997b.

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

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

Zaviačič M. et al. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *Journal of Histotechnology*, 23(1):61-69, 2000b.

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 16/07-CEEA, sobre “*Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral*”, sob a responsabilidade de **SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da *COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA), nesta data.

Botucatu, 30 de março de 2007.



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



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA