#### SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

### UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

#### INSTITUTO DE BIOLOGIA

Cristiani Zanetoni Israel de Souza

# Carcinogênese experimental no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a) Gristiani Zanetoni Israel
de Souza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Campinas, 2007

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

So89c	Souza, Cristiani Zanetoni Israel Carcinogênese experimental no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia / Cristiani Zanetoni Israel Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.
	Orientador: Sebastião Roberto Taboga. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	<ol> <li>Gerbil. 2. N-metil-N-nitrosouréia. 3. Alfa-metilacil- CoA-racemase. 4. Lesões proliferativas. 5. Próstata. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</li> </ol>
	(scs/ib)

Título em inglês: Experimental carcinogenesis in the ventral lobe of the Mongolia's gerbil prostate.

**Palavras-chave em inglês**: Gerbil; N-Methyl-N-Nitrosourea; Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase, Proliferative lesions; Prostate.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Sebastião Roberto Taboga, Renée Laufer Amorim, Ana Cláudia Polli Lopes, Wilson de Mello Júnior, Luís Fernando Barbisan.

Data da defesa: 29/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 29 de janeiro de 2007.

#### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)

Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior

Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Profa. Dra. Ana Cláudia Polli Lopes

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino

Prof. Dr. Classius de Oliveira

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Assinatura Assinatura

hatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

#### Agradecimentos

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – pela oportunidade de incorporar-me e desenvolver-me em um dos melhores cursos dessa categoria no país.

Ao prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela orientação, paciência e persistência nesses anos de trabalho. A você, Sebaka, MUITO OBRIGADA!

Aos membros que compuseram a pré-banca e banca examinadoras pelas preciosas sugestões para melhoria do trabalho: Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior, Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, Profa. Dra. Ana Cláudia Polli Lopes, Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino, Prof. Dr. Classius de Oliveira e Profa. Dra. Rejane Maira Góes.

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

À Liliam Panagio pelo carinho, amizade e a presteza constante em auxiliar.

A Luiz Roberto Faleiros pela amizade e apoio técnico, tornando possível a realização deste trabalho.

À querida Lara Silvia Corradi pelas versões em inglês neste trabalho.

À CAPES por concessão de uma bolsa de estudos.

 $\hat{A}$  FAPESP pelo apoio financeiro destinado a este trabalho.

#### Agradecimentos Especiais

Aos queridos amigos Silvana e Sebaka por ajudarem-me a cumprir esta etapa da minha evolução.

Aos amigos e colegas de um tempo que já virou saudades: Ana Maria, Claudia, Daniele, Daniel, Fernanda A., Fernanda E., Flávia, Guilherme, Lara, Lucilene, Luiz, Maê, Manoel, Marcela, Mirian, Patrícia, Renato, Ricardo, Rodrigo, Sabrina, Sérgio, Silvana, Tatiana e Wellerson.

Aos eternos amigos: Ana Maria, Lara, Silvana e Wellerson. Não importa a distância, no meu coração vocês estarão sempre perto.

Aos meus pais, que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que realizássemos os nossos. A vocês, que muito amo, minha eterna gratidão, rogando a Deus e a Jesus abençoá-los hoje e sempre.

Ao meu amado irmão Júnior pela imensa ajuda, paciência e carinho. São tantos obrigadas, que aqui não caberia quase nada. Enfim...! Um enorme OBRIGADA por tudo que você fez por mim!

A minha doce irmã pelo exemplo de luta e perseverança.

Ao meu marido Denilso, tesouro de minha existência, pela sua dedicação, confiança e amor. "Nada é eterno neste mundo de ilusões. Por toda a eternidade somente o verdadeiro amor" (Elias).

Ao meu filho João Felipi, luz da minha vida, pelos momentos de felicidade plena...

Minha gratidão a Jesus, eterna inspiração da minha vida...

#### Dedico,

Ao meu orientador e amigo, Sebastião A minha amiga e companheira de trabalho, Silvana Aos meus amados pais, Sergio e Dirce A minha querida irmã, Alessandra Ao meu querido irmão e filho do coração, Júnior A minha sobrinha e filha do coração, Marcela Ao meu amado marido, Denilso E ao nosso maravilhoso filho, João Felipi

Haverá sempre um anjo que te aparecerá no caminho e como silencioso Cireneu te apontará o próximo calvário a galgar, emprestando-te forças e dizendo-te de coração a coração, fitando o mais alto do monte: "alcançarás!". Meimei

#### SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT11
INTRODUÇÃO12
OBJETIVOS
ARTIGOS
ARTIGO 1 - BIOLOGICAL BEHAVIOR OF THE GERBIL VENTRAL PROSTATE IN
THREE PHASES OF POSTNATAL DEVELOPMENT
ARTIGO 2 - Tumores no lobo ventral da próstata do gerbilo (Meriones
UNGUICULATUS) INDUZIDOS POR N-METIL-N-NITROSOURÉIA: AVALIAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA, IMUNOCITOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURAL47
CONCLUSÕES GERAIS
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

#### RESUMO

O câncer de próstata atualmente é o tumor mais comum em homens com mais de 50 anos de idade. Entre os fatores de risco que contribuem para o aumento dessa doença destaca-se o envelhecimento, período em que ocorrem acentuados desequilíbrios hormonais. Há muitas dificuldades na obtenção de material humano para estudos do desenvolvimento de tumores prostáticos, pois esta questão esbarra na ética médica. Vários grupos de pesquisa vêm tentando desenvolver, caracterizar e validar modelos roedores para análise do câncer de próstata. Modelos autóctones, nos quais são estudadas as lesões prostáticas espontâneas, têm desempenhado papel relevante nas pesquisas dessa neoplasia. Além disso, inúmeras investigações têm sido feitas sobre a indução experimental de tumores na próstata de roedores de laboratório: ratos, camundongos e cobaias. Em uma primeira etapa deste trabalho, foram realizadas análises morfológicas (estruturais e ultra-estruturais), quantitativas e funcionais dos componentes celulares dos compartimentos epitelial e estromal do lobo ventral da próstata do gerbilo velho (Meriones unguiculatus). A morfologia prostática nesses animais revelou que em uma mesma glândula puderam ser observadas regiões funcionais com epitélio secretor normal e outras áreas com alterações histopatológicas atípicas. Nesses, o declínio de testosterona esteve associado a alterações proliferativas na glândula, levando ao entendimento da importância desse andrógeno na homeostase e funcionalidade prostática. Devido a essas constatações, em uma segunda etapa, foi feita a indução experimental de tumores na próstata do gerbilo adulto, após tratamento conjugado de N-metil-N-nitrosouréia com propionato de testosterona. Depois de estabelecidos os tumores, as próstatas foram processadas para estudos histológico, imunocitoquímico e ultra-estrutural. Os resultados mostraram que em gerbilos o surgimento de lesões prostáticas ocorreu em períodos experimentais de até 9 meses e que tanto o cancerígeno como a testosterona, associados ou não, foram indutores de neoplasias. Sugere-se que as células atípicas possam apresentar potencial invasivo pela observação da ruptura da membrana basal pelos métodos de imunocitoquímica para laminina e análise ultra-estrutural. Detectou-se também no gerbilo a expressão da proteína citoplasmática Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) em células prostáticas neoplásicas, bem como é observado no câncer prostático do homem. Assim, este trabalho é pioneiro na demonstração da expressão de P504S em roedores. A partir dos resultados apresentados constatou-se que o gerbilo é um modelo animal para estudos de carcinogênese química prostática, que somados aos dados da literatura, levarão ao melhor entendimento da biologia de lesões da próstata.

#### ABSTRACT

The prostate cancer is the most common tumor that attacks men from the 50's decade. Among the risk factors that contribute to this disease's increase stand out the aging process, when hormonal unbalances happen frequently. Developmental studies of prostatic tumors have been complicated because of difficult in obtaining human material, once this question lies on medical ethics. Researchers group have had tried to develop, characterize and validate some rodent models to analyze the prostate cancer. Autoctone models used to study spontaneous prostatic lesions have performed important role to these kind of neoplasia. In addition, lots of investigations have been done about experimental induction of prostatic tumors in rats, mice and guinea pig. In a first phase of the present work, it was realized in the ventral lobe of old gerbil's prostate (Meriones unguiculatus) structural and ultra-structural morphological, quantitative and functional analyzes of the cellular compounds of epithelial and stromal compartments. The prostatic features of theses animals revealed that in a same gland could be noted functional regions containing normal secretory epithelium and regions completely altered, showing histopathological lesions. A testosterone concentration decrease associated to these proliferative sites confirms the important role of this androgen to the prostatic homeostasis. Because of these data, in the second phase of this work, it was done a prostatic tumors experimental induction in the adult gerbil, after conjugate treatment of N-metil-N-nitrosourea with testosterone propionate. Once the tumors were established, prostate fragments were processed for histological, immunocytochemical and ultra-structural studies. The results showed that in gerbils, the emergence of prostatic lesions happened in experimental periods of until 9 months and both the carcinogen and testosterone, associated or not, was able to induce these adenocarcinomas. The invase potencial of anomalus cells could be proved by ultra-structural analyzes and by the immunocytochemical test for laminima, noted in the basal membrane disruption. On the other hand, it was observed that gerbil is one of the pioneers in expression of the citoplasmatic protein Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S), which is found in the neoplastic cells, likely in prostatic human cancer. Concluding, this study is pioneer in the demonstration of the P504S expression in rodents. Based on these presented data, it was verified that gerbil is a good experimental model to chemical carcinogenesis research of the prostate, which taken together with previous literature will give a better and profounder understanding of prostatic lesions.

#### INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta, com a atividade secretora principalmente ligada à sua porção alveolar. Entretanto, os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (REESE et al., 1986). Entremeando as porções glandulares, existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com esparsas fibras conjuntivas (CARVALHO e LINE, 1996) e células musculares lisas que têm papel contráctil durante a ejaculação (ROSS et al., 1993). Nesse tecido estromal, também estão presentes nervos e terminações nervosas. Envolvendo este órgão, tem-se uma fina cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas ao órgão nos diversos mamíferos já estudados (PRICE, 1963). A próstata é responsável pela produção de nutrientes e gradientes iônicos e de pH ótimos para os espermatozóides no fluido seminal (UNTERGASSER et al., 2005).

O crescimento e desenvolvimento da próstata iniciam no período fetal e se estendem até que a maturidade sexual seja atingida (CUNHA et al., 1986; MARKER et al., 2003). A morfogênese glandular tem origem a partir do seio urogenital (uretra prostática), ou seja, uma estrutura composta de uma camada epitelial derivada da endoderme e envolvida por uma camada mesenquimal derivada da mesoderme (MARKER et al., 2003). A formação da próstata inicia-se por volta do 17º dia de gestação em camundongos, 18º dia em ratos e entre a 9-10ª semana em humanos (THOMSON, 2001). Embora ainda não tenha sido estabelecido o período exato para o início da formação da próstata do gerbilo, presume-se que seja próximo aos descritos para rato e camundongo devido à proximidade filogenética entre esses animais. Em roedores, inicialmente, surgem brotos prostáticos sólidos e, durante as três primeiras semanas após o nascimento, esses brotos alongam, ramificam e canalizam formando os ductos prostáticos (SUGIMURA et al., 1986; HAYWARD et al., 1996).

A organogênese prostática é iniciada e dependente de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos fetais (CUNHA et al., 1986; THOMSON e CUNHA, 1999; THOMSON et al., 2002), os quais masculinizam o trato reprodutor e conduzem à formação glandular (THOMSON, 2001). A produção de andrógenos é regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (DEBES e TINDALL, 2002). O principal andrógeno é a testosterona, com o testículo produzindo mais de 95% e a glândula adrenal menos de 5% desse esteróide sexual (HSING et al., 2002).

É sabido que a próstata, sendo uma glândula hormônio dependente desde seu desenvolvimento até a manutenção de sua forma funcional no animal adulto, apresenta uma alta dependência da testosterona. Em roedores tem-se atribuído que o lobo ventral é o mais responsivo às variações séricas de testosterona. Assim, muitos trabalhos de ablação desse andrógeno por castração cirúrgica (CARVALHO e LINE, 1996; VILAMAIOR et al., 2000) e por castração química (CORRADI et al., 2004; CORDEIRO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005) têm enfocado o lobo ventral da próstata.

Os efeitos androgênicos em células alvo resultam de uma interação do hormônio com receptores de andrógenos (AR) presentes nestas células (CUNHA et al., 1986). Na próstata, a testosterona é convertida a 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), forma androgênica mais ativa, pela ação da enzima 5- $\alpha$ -redutase tipo 2 (GALBRAITH e DUCHESNE, 1997; HSING et al., 2002). Caso haja um bloqueio na conversão de testosterona para DHT durante o desenvolvimento prostático há uma acentuada redução da morfogênese e crescimento do órgão (MARKER et al., 2003), ou até mesmo importantes modificações no estroma dos indivíduos adultos quando tratados com o inibidor desta enzima (CORRADI et al., 2004).

O epitélio prostático apresenta ao menos três tipos celulares distintos, os quais podem ser diferenciados por suas características morfológicas e significância funcional (ABATE-SHEN e SHEN, 2000). As células luminais secretoras correspondem ao principal tipo celular, em seguida estão as células basais, localizadas entre as células luminais e a membrana basal e não são secretoras (HAYWARD et al., 1996; MARKER et al., 2003). O terceiro tipo corresponde às células neuroendócrinas, as quais aparecem em menor proporção e suas funções estão relacionadas, possivelmente, com a manutenção da homeostase da atividade secretora na glândula madura (ABRAHAMSON, 1999). Esses três tipos celulares componentes do epitélio prostático diferem quanto à sua regulação hormonal. São responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular, que são componentes do fluido prostático (BONKHOFF e REMBERGER, 1996; 1998).

Independente dos aspectos macroscópicos serem heterogêneos entre as espécies, a função dos componentes epiteliais e estromais são semelhantes, o que corrobora com a correlação na homologia morfo funcional (PRICE, 1963; KARR et al., 1995).

Segundo PRICE (1963), a próstata de roedores é composta por um par de lobos ventrais posicionados estrategicamente no ístmo da bexiga e por um grupo de ácinos dorsolaterais e seus ductos. No rato, as glândulas coaguladoras ou próstata anterior e vesículas seminais circundam dorsolateralmente a uretra na base da bexiga, formando um anexo anatômico separado. Histologicamente existem diferenças marcantes entre os vários lobos da próstata de ratos e camundongos, considerando suas respectivas secreções (MANN, 1954).

Em termos de homologia com as partes da próstata humana, nota-se que o lobo ventral da próstata do rato corresponde à zona de transição da próstata humana e o lobo dorsal do rato à parte dorsal ou zona posterior da próstata humana. As vesículas seminais são as mesmas, estrutural e funcionalmente, em ambas as espécies (SLAYTER et al., 1994). Os tipos de populações celulares são similares e, provavelmente, desempenham as mesmas funções fisiológicas, porém a distribuição relativa dessas populações varia entre as espécies (IMAMOV et al., 2004).

Partindo destas semelhanças morfo-funcionais pré-estabelecidas pode-se, então, buscar situações experimentais, onde a análise das respostas do epitélio ou até mesmo dos componentes do estroma são avaliadas. Assim, existem na literatura trabalhos relacionados à ação de agentes químicos (cancerígenos) na próstata, como os trabalhos de POLLARD e LUCKERT (1987) e ação de agentes endógenos (hormonais) como os trabalhos desenvolvidos por CARVALHO e colaboradores (1996; 1997b). Desta forma, extrapolam-se os resultados para a espécie humana.

É sabido que, durante a senescência do indivíduo, muitas alterações histológicas ocorrem na próstata, em resposta às descompensações hormonais durante o envelhecimento (ROSAI, 1996). No homem, as principais alterações estão relacionadas com algumas afecções que levam à retenção urinária, conhecidas como hiperplasias benignas (DROLLER, 1997). Além disso, podem-se desenvolver na próstata do idoso lesões malignas como adenocarcinomas, existindo ou não a pré-disposição genética para essas lesões (HAYWARD et al., 1997). No mundo, o número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento. O câncer de próstata é o mais prevalente em homens. Entre todos os tipos de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2006).

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

A próstata desse roedor apresenta ácinos glandulares com epitélio variando entre prismático simples e/ou pseudo-estratificado e altamente secretor. Entre as porções glandulares encontra-se um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com poucas fibras conjuntivas e elásticas, além de abundantes células musculares lisas dispostas concentricamente aos ácinos. Ultra-estruturalmente o epitélio prostático apresenta heterogeneidade entre os seus tipos celulares, tendo sido até o presente descritas as células secretoras principais e intermediárias, além das neuroendócrinas e basais. Já o estroma glandular mostra esparsas células musculares lisas com disposição concêntrica e entremeada às camadas de colágeno (GÓES et al., 2006; SANTOS et al., 2003).

A morfologia prostática em gerbilos tem se mostrado semelhante à humana, no referente à fusão parcial de lobos por uma cápsula fibrosa comum (ZANETONI et al., 2001; GÓES et al., 2006) (Figura 1). Este tipo de conformação anatômica não está presente no rato e no camundongo, onde os lobos são bem distintos (PRICE, 1963).

Uma deficiência no campo da pesquisa do câncer de próstata é a falta de modelos que permitam sua investigação acurada (SHIRAI et al., 2000; WANG et al., 2001; SCHULZ et al., 2003). Vários grupos vêm tentando desenvolver, caracterizar e validar modelos de murinos que melhor representem os aspectos bioquímicos e patológicos do câncer de próstata humano. Modelos autóctones têm desempenhado um papel essencial nesse campo de pesquisa (HUSS et al., 2001). Porém, o desenvolvimento de câncer espontâneo em animais experimentais tem sido um evento raro que ocorre em baixa incidência e sob longo período de latência (POLLARD e LUCKERT, 1986; 1987; 1992; 1994).

Existem vários estudos de modelos experimentais para indução de tumores na próstata. HUSS e colaboradores (2001) fizeram uma revisão sobre os modelos com camundongos utilizados no estudo do câncer prostático. Por outro lado, alguns trabalhos utilizam os ratos como animais experimentais na indução dos tumores de próstata (BOSLAND et al., 1983; POUR et al., 1987; SHIRAI et al., 1991; POLLARD e LUCKERT, 1986, 1987 e 1992; COHEN et al., 1994; SCHLEICHER et al., 1996).

BOSLAND e colaboradores (1983) utilizaram a N-nitroso-N-metiluréia associada ao acetato de ciproterona e testosterona, na indução do carcinoma prostático em ratos da linhagem Wistar. Já POUR e colaboradores (1987) utilizaram a combinação do propionato de testosterona ao cancerígeno N-nitrosobis(2–oxopropil)amina para induzir o tumor de próstata nos ratos da linhagem Wistar. O tratamento com 3, 2' dimetil-4-aminobifenil em associação ao propionato de

testosterona, para indução do carcinoma de próstata, em ratos da linhagem F344, foi utilizado por SHIRAI e colaboradores (1991).

Lesões de natureza proliferativa e neoplásicas foram descritas em ratos Lobund-Wistar por POLLARD e LUCKERT (1986, 1987 e 1992), os quais obtiveram experimentalmente próstatas cancerosas a partir de injeções intra-venosas de N-metil-N-nitrosouréia em associação com injeções intra-dérmicas de propionato de testosterona. Este modelo, descrito como eficaz, foi amplamente difundido nos Estados Unidos, pois em 45 semanas desenvolviam-se os tumores em até 90% dos animais submetidos ao tratamento. No entanto, a reprodutividade desse experimento é questionável para outras linhagens de ratos Wistar (SCHLEICHER et al., 1996). Mesmo não se conseguindo a porcentagem de 90% de indução tumoral, a associação do cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia com testosterona sintética em aplicações subcutâneas é o tratamento aceito como o mais eficaz. SCHLEICHER e colaboradores (1996) compararam a aplicação intra-venosa com a intra-prostática do cancerígeno e conseguiram aumentar a porcentagem de tumores nas aplicações intra-prostáticas.

Durante o processo de diferenciação celular normal ou patológico, principalmente durante a tumorigênese, a ocorrência de modificação no padrão de expressão de muitas moléculas pode ser indicativo de diagnóstico histopatológico para discriminação ou até para gradação do padrão histoarquitetural das lesões (ROSAI, 1996). As moléculas constituintes da matriz extracelular (ZIOBER et al., 1996; GOODMAN e von der MARK, 1996; CARVALHO et al., 1997a), do citoesqueleto e dos complexos supramoleculares de adesão celular (HIROHASHI, 1998) têm sido amplamente estudadas nos processos de invasão tumoral ou no estabelecimento de lesões benignas hiperplásicas.

A Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) é uma proteína citoplasmática que encontra-se super-expressa em carcinoma prostático humano, apresentando expressão variável em neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau e baixa expressão em próstata normal. Esse tipo de expressão foi associado ao diagnóstico de câncer ou proximidade ao foco neoplásico (JIANG et al., 2001; ANANTHANARAYANAN et al., 2005). A partir dessas constatações, esses autores indicaram a P504S como um novo marcador molecular em tecido para detecção de carcinoma prostático humano.

Devido às dificuldades na obtenção do material humano para estudos do desenvolvimento dos tumores prostáticos, uma vez que esbarram na ética médica, algumas questões fundamentais precisam ser elucidadas. Assim sendo, modelos experimentais de indução tumoral, quando estabelecidos, podem facilitar sobremaneira a interpretação e possibilitar a extrapolação dos resultados para a espécie humana.

Gerbilo adulto



Vista dorsal



Vista ventral



**Figura 1.** Gerbilo adulto e sua próstata. A glândula prostática se divide em lobos dorsais (LD), lobos ventrais (LV), lobos anteriores ou glândula coaguladora (GC). Podem também ser visualizadas: a bexiga (B), as vesículas seminais (VS) e a uretra (U).

#### **OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivos:

 Avaliar morfologicamente e por quantificação os componentes epiteliais e estromais do lobo ventral da próstata do gerbilo velho (*Meriones unguiculatus*) \*;

2. Validar o modelo de carcinogênese química prostática em gerbilos (*Meriones unguiculatus*), utilizando-se injeção intra-peritonial do cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia em associação com a administração intra-dérmica de testosterona sintética;

3. Analisar a morfologia, a expressão de laminina e Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) pela imunocitoquímica e a ultra-estrutura nos tumores prostáticos induzidos quimicamente.

<sup>\*</sup> **Observações:** O objetivo de descrever a próstata dos indivíduos velhos teve o propósito de dar continuidade aos estudos da dissertação de mestrado, relatando o desenvolvimento espontâneo da carcinogênese nesses animais. Simultaneamente, as pesquisas com os indivíduos jovens e adultos foram conduzidos pela doutora Silvana Gisele Pegorin de Campos e associados em um trabalho mais completo, resultando no artigo 1 desta Tese.

ARTIGOS

#### ARTIGO 1.

#### Biological Behavior of the Gerbil Ventral Prostate in Three Phases of Postnatal Development \*

Trabalho publicado na revista Anatomical Record

<sup>\*</sup> **Observações:** Neste trabalho, as duas primeiras autoras contribuíram igualmente, sendo que uma parte dos resultados está presente na tese de Doutorado de Silvana Gisele Pegorin de Campos e outra na tese de Doutorado de Cristiani Zanetoni Israel de Souza - nota do orientador.

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

Silvana Gisele Pegorin de Campos<sup>1</sup> Cristiani Zanetoni<sup>1</sup> Rejane Maira Góes<sup>2</sup> Sebastião Roberto Taboga<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology – Institute of Biology - UNICAMP, CP 6109 - 13084-864 - Campinas, SP, Brazil <sup>2</sup>Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology - IBILCE/UNESP, 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

#### \*Correspondence to:

Dr. Sebastião Roberto Taboga (e-mail: taboga@ibilce.unesp.br) Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil, Zipcode: 15054-000 Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390.

Running title: Biological behavior of gerbil's prostate

#### Funded by:

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

#### ABSTRACT

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

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

#### INTRODUCTION

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

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

Some murine species of the subfamily Gerbillinae have been utilized as models for studies of the male reproductive tract. Among them, stand out *Praomys natalensis* (Gross and Didio, 1987),

*Psammomys obesus* (Sprando et al., 1999), *Meriones unguiculatus* (Williams, 1974), the last species being known as the Mongolian gerbil.

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

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

#### MATERIALS AND METHODS

#### Animal and sample preparations

Male gerbils, being 10 young with  $48 \pm 15.9$  days (mean age), 10 adults ( $112 \pm 27.7$  days) and 10 old ( $18 \pm 5.4$  months) animals were housed under conventional conditions ( $25^{\circ}$ C, 40-70% relative humidity, 12h light/12h dark) and allowed access to chow and water *ad libitum*. The animals were placed in a chamber with CO<sub>2</sub> gas prior to sacrifice. After this, the entire prostatic complex was excised and the ventral prostate removed and cut into fragments. For light microscopy, the samples were fixed for 24h in Karnovsky solution (0.1M Sörensen phosphate buffer, pH 7.2, containing 5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde). After fixation the material was dehydrated in graded ethanol series and the embedding was performed in glycol methacrylate resin (Leica<sup>TM</sup> historesin embedding kit).

#### **Structural Analysis**

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

#### Transmission electron microscopy (TEM)

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

#### Quantitative analysis

Thirty random prostatic areas of each of the three phases of postnatal development staining by H&E sections were analyzed. The morphometric-stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 120 points and 60 test lines (Weibel, 1978) to compare the relative proportion (%) of the gland portions (glandular and stromal) and each prostatic tissue constituent (epithelium, lumen, non-muscular interacinar stroma, smooth muscle cell and collagen subepithelial layer). For the morphometric analyses, 200 random measurements of the epithelium height and the thickness of the smooth muscle layer which surrounds each acinum were also obtained.

Caryometric evaluation was carried out using Feulgen Reaction-stained sections. Nuclear areas, perimeters and the form factor (=  $4\pi$ .nuclear area/(nuclear perimeter)<sup>2</sup>) parameter were determined for 200 nuclei of the epithelial secretory cells in each phase. The form factor

parameter measures nuclear roundness in such a way that values < 1 are associated with nuclei which are more out rounded (Taboga et al., 2003).

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

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

#### Serum testosterone concentration

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

#### Statistical analysis

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

#### RESULTS

#### Prostate structure and ultrastructure

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

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

The stroma of the young animal was composed of two cellular types: SMC and fibroblasts (Fig. 2A). Among the fibrilar elements of the extracellular matrix, collagen and reticular fibers are found in large quantities, forming a sustentation net for the prostate gland (Fig. 1C). Ultrastructurally, the collagen fibrils are accumulated at the epithelium base and dispersed throughout the stroma, including between SMC, being disposed in different directions (Fig. 2D, E, F and H). The SMC are arranged in an expansive layer around each acinus (Fig. 1A and B) and they also join in a differentiation process with a nucleus and a dilated cytoplasm with low electrondensity and poor in contractile elements (Fig. 2F and G). The fibroblasts have a functional phenotype distributed at the base of the epithelium and among the muscle cells (Fig. 2A and E). Few elastic fibers were found to be associated with the cell surface of the fibroblasts (Fig. 2E) and/or involved in the SMC cytoplasmic process (Fig. 2H).

In the adult animal, the ventral prostate was recognized as a completely developed gland, with a wide acinar lumen, which indicates intense secretory activity, and with secretory epithelial cells (Fig. 1D) disposed in a simple columnar pattern (Fig. 1E). The epithelium, at the ultrastructural level, is composed of two cellular lineages, secretory and basal cells (Fig. 3A and B). The secretory cells remain in contact with the glandular lumen and have a cytoplasm with a well-

developed rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria and secretion vesicles at the apical pole (Fig. 3A, C and D). Their nuclei are bulky, with uniform outlines and deposits of condensed cromatin in the peripheral region (Fig. 3B and D). The inconspicuous basal cells localized along the basement membrane, have a largely undifferentiated phenotype with no secretory bleb production (Fig. 3B).

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

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

#### Quantitative analysis

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

As regards stereological parameters (Table 1), the proportions of the epithelial and stromal compartments of the ventral prostate in the young group were different from those of the other groups, because the glandular lumens were not so significant. At the same time, the proportion of the stromal compartment was greater due to the larger percentage of the non-muscular interacinar stroma and SMC. In the adult and senile phases, the prostate epithelial and stromal compartments were of similar stereological proportions. However, the percentages of epithelial tissue and the non-muscular subepithelial stroma (collagen layer) increased significantly with aging while the non-muscular interacinar stroma decreased. The thickness of the epithelium and the smooth muscular layer varied significantly during development, the lowest measurements being found in the adult stage. The significant increase in these measurements during aging confirms the occurrence of glandular hyperplasia during this phase, a process verified by histochemical evaluation.

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

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

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

#### DISCUSSION

The ventral prostate of the gerbil *Meriones unguiculatus* was evaluated morphologically and quantitatively throughout postnatal development. This gland structure, as in other rodents, consists of two ventrolateral lobes adjoining the urinary bladder, attached to the urethra by a series of ducts, smooth muscle and connective tissue (Shirai et al., 2000; Suwa et al., 2001).

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

Ventral prostate activity was found to be stable in adult and old animals. However, the general morphology of the gland was varied between those ages. In adults, the prostate was a completely functional gland with an intense amount of synthesis` organelles in the secretory cell cytoplasm and an accumulation of secretion products in the acinar lumen, which made this prostate component the most representative. The lower number of basal cells was dispersed in a discontinuous layer and exhibited a largely undifferentiated phenotype, as in other rodents. The specific function of the basal cells is still not clear, however several studies indicate them as prostate epithelial stem cell candidates (Garraway et al., 2003; Marker et al., 2003). Intermixed

with the glandular portions was a conjunctive stroma, where smooth muscular cells enclosed each acinus individually. Together with the fibroblasts, these cells are related to the expulsion of acinar secretions during ejaculation and also, to the synthesis of structural and regulatory components of the extracellular matrix (Horsfall et al., 1994; Tuxhorn et al., 2001). Supporting the observed results, the stroma fibrillar components (collagen and elastic fibers) were connected to each other and also to the cellular components of the prostate, and probably serve the role of guaranteeing the structural integrity of this organ. These fibrils must also participate in SMC contraction and elastic restoration during the normal functioning of the gland (Carvalho et al., 1997). The most significant difference between the human and the murine prostate is that, in humans, there are significantly more fibromuscular stroma while, in mice the glands are surrounded by a loose connective tissue (Roy-Burman et al., 2004). The gerbil's fibromuscular stroma was also looser, however the participation of the stromal elements in gerbil prostatic development and functionality is similar to that of the stromal components in the human prostate. As observed by Thomson et al. (2001), the maintenance of prostatic morphology and secretory activity during the adult phase is dependent upon high androgen levels, as opposed to initial postnatal period, which indicates a change in androgenic response throughout the development stages.

The general and ultrastructural morphology of the ventral prostate alters with senescence, although the secretory activity of the organ remains regular, in spite of low levels of testosterone. Comparing adult and old animals it was possible to confirm the main tissue alterations that occur in the ventral prostate during aging. The majority of the morphological alterations were quantitatively confirmed by statistical analysis. In most of the acini an increase in the number of epithelial cells was confirmed and, in some cases, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) occurred, contributing to a significant increase in glandular epithelial percentage during aging. Many authors consider PIN to be the precursor of prostatic carcinogenesis. Possible origins of PIN might be abnormal cellular differentiation, aberrant expression of growth factor receptors and controlling genes of cellular growth and differentiation (Bonkhoff and Remberger 1998; Bostwick et al., 1996). A common feature in the secretory cells was lipid accumulation in the whole cytoplasm. Swinnen et al. (1997) verified a similar process in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. In these cells, the cytoplasmic lipid droplets mainly consist of products of fatty acids and cholesterol, being the expression of lipogenic enzymes regulated by androgens. These lipid droplets can also be related to the peroxidation of unsaturated fatty acids, common in several tissues during aging (Alho et al., 1989). These deposits may have contributed to cellular expansion and a consequent thickening of the epithelial layer. Osmiophylic structures were occasionally found in the pericellular space in all cellular types, which seem to be ceramidelike deposits. The ultrastructure of these bodies was described in the gerbil prostate after finasteride therapy by Corradi et al. (2004). Ceramide generation has been considered to be a critical component in radiation-induced apoptosis in human prostate cancer cells (Kimura et al., 1999).

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

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

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

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

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

#### Acknowledgements

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

#### LITERATURE CITED

Abate-Shen C, Shen MM. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. Genes & Dev 14: 2410-2434.

Alho H, Koistinaho J, Laaksonen HM, Hervonen A. 1989. Effect of lifelong selenium and vitamin E deficiency or supplementation on pigment accumulation in rat peripheral tissues. Adv Exp Med Biol 266: 143-155.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. Endocrinology 141: 821-832.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. Endocrinology 142: 4066-4075.

Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ. 2005. Expression signature of the mouse prostate. J Biol Chem 280: 36442-36451.

Bonkhoff H, Remberger K. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. Virchows Arch 433: 195-202.

Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A. 1996. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. Prostate 29: 117-134.

Bostwick DG, Ramnani D, Qian J. 2000. Prostatic intraepithelial neoplasia: Animal models 2000. Prostate 43: 286-294.

Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior, PSL. 1997. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. Tissue & Cell 29: 163-170.

Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. 2000. AgNORs in breast tumors. Micron 31: 143-149.

Corradi LS, Goes RM, Carvalho, HF, Taboga SR. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. Differentiation 72: 198-208.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. Stain Technol 51: 7-11.

Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. 1986. Stromal-epitelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. Biochem Cell Biol 64: 608-614.

Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda, M. 2003. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. Prostate 55: 206-218.

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

Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. Acta Anat 155: 94-103.

Horsfall DJ, Mayne K, Ricciardelli C, Rao M, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. Lab Invest 70: 753-763.

Huss WJ, Maddison LA, Grenberger NM. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. Cancer Biol 11: 245-259.

Karalyan ZA, Djaghatspanyan NJ, Gasparyan MH, Hakobyan LA, Abroyan LO, Magakyan YH, Ter-Pogossyan ZR, Kamalyan LA, Karalova EM. 2004. Morphometry of the nuclear and nucleolar structures in a CaCo-2 cell line. Cell Biol Int 28: 249-253.

Kimura K, Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP. 1999. Tumor necrosis factor  $\alpha$  sensitizes prostate cancer cells to  $\gamma$ -irradiation-induced apoptosis. Cancer Res 59: 1606-1614.

Leav I, Schelling KH, Adams JY, Merck FB, Alroy J. 2001. Role of canine basal cells in postnatal prostatic development, induction of hyperplasia, and sex-hormone-stimulated growth, and ductal origin of carcinoma. Prostate 48: 210-224.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. Dev Biol 253: 165-174.

McNeal JE. 1983. The prostate gland: morphology and pathobiology. Monogr Urol 4: 3-37.

Öfner D. 2000. In situ standardized AgNOR analysis: a simplified method for routine use to determine prognosis and chemotherapy efficiency in colorectal adenocarcinoma. Micron 31: 161-164.

Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocr Relat Cancer 11: 225-254.

Sensibar JA, Pruden SJ, Kasjanski RZ, Rademaker A, Lee C, Grayhack JT, Koslowski JM. 1999. Differential growth rates in stromal cultures of human prostate derived from patients of varying ages. Prostate 38: 110-117.

Shirai T, Tahashi S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, Imaida K. 2000. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. Mutat Res 462: 219-226.

Sprando RL, Collins TFX, Black TN, Olejnik N, Rorie JI, West LJ, Bowers JD, Sass N, Robl M. 1999. Light microscopic observations on the reproductive tract of the male sand rat, *Psammomys obesus*. Tissue & Cell 31: 99-115.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. Biol Reprod 34: 961-971.

Suwa T, Nyska A, Peckham JC, Hailey JR, Mahler JF, Haseman JK, Maronpot RR. 2001. A retrospective analysis of background lesions and tissue accountability for male accessory sex organs in Fisher-344 rats. Toxicol Pathol 29: 467-478.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Esquenet M, Heyns W, Verhoeven G. 1996. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. Endocrinology 137: 4468-4474.

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

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

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

Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reative stroma in prostate cancer progression. J Urol 166: 2472-2483.
Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haughney PC, Rosen MS, Wu DS, Cunha TJ, Dahiya R, Cunha GR, Hayward SW. 2001. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. Cancer Res 61: 6064-6072.

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

Williams WM. 1974. The anatomy of the Mongolian Gerbil. Tumblebrook Far, Inc., USA. 107p. Zhang YH, Kanamaru H, Oyama N, Miwa Y, Suzuki Y, Akino H, Nokiki S, Okada K. 2000. Prognostic value of nuclear morphometry on needle biopsy from patients with prostate cancer: is volume-weighted mean nuclear volume superior to other morphometric parameters.Urology 55: 377-381.

#### **Figure Legends**

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

**Figure 2. 2A – H:** Ultrastructure of the young ventral prostate. **A:** Epithelium (ep) composed of immature epithelial cells with copious nuclei (N) and in the stroma (S), largely well-spaced undifferentiated SMC. The fibroblasts (arrows) emit cytoplasmic projections throughout stroma. Collagen fibrils (arrowhead); basement membrane (bm). 3597x. **B:** Immature epithelial cell with voluminous nucleus (N) and descondensed cromatin. Mitochondrias (mt). Collagen fibrils (arrowhead) distributed in different directions in the interface between epithelium and stroma associated with fibroblast projection (arrow) and basement membrane (bm). 7750x. **C:** Detail of the adherent junctions uniting two epithelial cells (arrowheads). Large mitochondrias (mt); Nucleus (N). 35970x. **D:** Collagen fibrils (co) transversally arranged below the epithelium (ep) intimately associated with basement membrane (bm). 16700x. **E:** Fibroblast with prominent

nucleus (N) and in association with elastic fibers (arrowhead). Collagen fibrils (co). 7750x. F: SMC are extensive, poor in contractile element and are not densely packed. Collagen fibrils (arrows) and fibroblast process (arrowhead) are inserted between them. 7750x. G: More electrondense SMC, and caveolae (arrow) in the cell membrane, indicating advanced differentiation process. 12930x. H: Detail of SMC showing elastic fibers inside their cytoplasmic process (arrowhead). Caveolae (arrow).

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

**Figure 4. 4A – F:** Ultrastructure of old ventral prostate. **A:** Site of normal secretory epithelial cells (ep) with secretory vesicle in the apex (arrow). Nucleus (N). 7750x. **B:** Site of epithelial cells (ep) with marked accumulation of lipid droplets (ld), a frequent event during gerbil aging. Nucleus (N) 4646x. **C:** Apical portion of a secretory cell with bleb (apocrine secretion, arrow), integrated lipid droplets (ld, \*) and lipofuscin-like structure (arrowhead). 16700x. **D:** Basal cell (bc) with large nuclei and few synthesis organelles, in the nuclear periphery ceramide-like (arrowhead) and lipofuscin-like deposits (doble arrowhead), surrounded by secretory cells full of secretory vesicles (arrow). A thick basement membrane (bm) delimits the epithelium of the stroma below which is a

larger deposit of collagen fibrils (co), another mark of the aging process. 10000x. E: Stroma (S) showing increase of collagen fibrils in subepithelial area (arrows) and between SMC, which maintain condensed cytoplasm. Fibroblast (F). 12930x. F: SMC with irregular and compressed nucleus (N) in the nuclear periphery. Lipofuscin-like structure (arrowhead) and remarkably extensive mitochondrias (mt). Collagen fibrils (arrow). 16700x.

		Groups	
Prostatic Measurements	Young (48 <u>+</u> 15.9 days)	Adult (112 <u>+</u> 27.7 days)	Old (18 <u>+</u> 5.4 months)
Testosterone levels (ng/mL)*	$3.95 \pm 0.57^{a}$	$4.82 \pm 0.33^{b}$	$2.80 \pm 0.23^{\circ}$
Density of Compartment (%)			
Glandular Epithelial ***	34.64 <u>+</u> 13.10 <sup>a</sup>	56.33 <u>+</u> 11.24 <sup>b</sup>	60.95 <u>+</u> 12.14 <sup>b</sup>
Stromal***	$65.36 \pm 13.10^{a}$	43.67 <u>+</u> 11.24 <sup>b</sup>	39.05 <u>+</u> 12.14 <sup>b</sup>
Volume of tissue components (%)			
Epithelium**	$22.00 \pm 6.60^{a}$	14.77 <u>+</u> 4.76 <sup>b</sup>	22.20 <u>+</u> 7.04 ª
Lumen***	12.64 <u>+</u> 9.87 <sup>a</sup>	41.56 <u>+</u> 11.99 <sup>b</sup>	38.74 <u>+</u> 13.96 <sup>b</sup>
Smooth muscle cells***	$27.72 \pm 7.82^{a}$	16.18 <u>+</u> 6.42 <sup>b</sup>	14.23 <u>+</u> 7.74 <sup>b</sup>
Colagen subepithelial layer ***	$1.10 \pm 1.66^{a}$	$3.08 \pm 2.59^{a}$	5.43 <u>+</u> 4.64 <sup>b</sup>
Non-muscular interacinar stroma**	36.54 <u>+</u> 11.94 <sup>a</sup>	24.41 <u>+</u> 11.83 <sup>b</sup>	19.38 <u>+</u> 7.81 <sup>b</sup>
Morphometry – Thickness (µm)			
Epithelium ***	14.83 <u>+</u> 3.31 <sup>a</sup>	11.11 <u>+</u> 2.33 <sup>b</sup>	18.53 <u>+</u> 4.22 <sup>c</sup>
Smooth muscle layer***	17.17 <u>+</u> 4.41 <sup>a</sup>	12.09 <u>+</u> 3.69 <sup>b</sup>	15.14 <u>+</u> 5.15 <sup>c</sup>
Nuclear and nucleolar morphometry			
Nuclear area (µm²)***	24.16 <u>+</u> 5.0 <sup>a</sup>	21.92 <u>+</u> 4.48 <sup>b</sup>	24.58 <u>+</u> 5.47 <sup>a</sup>
Nuclear perimeter (µm) ***	$20.24 \pm 2.30^{a}$	18.86 <u>+</u> 2.14 <sup>b</sup>	$20.12 \pm 2.53^{a}$
Nuclear Form Factor*	$0.74 \pm 0.09^{a}$	0.77 <u>+</u> 0.01 <sup>b</sup>	0.76 <u>+</u> 0.10 <sup>b</sup>
Nucleolar Area (µm²)*	$0.91 \pm 0.50^{a}$	1.31 <u>+</u> 0.44 <sup>b</sup>	1.30 <u>+</u> 0.53 <sup>b</sup>
Nucleolar perimeter (µm)	4.35 <u>+</u> 2.13	4.73 <u>+</u> 1.29	4.21 <u>+</u> 1.18
Nucleolus/Nucleus ratio			
Area	0.04 <u>+</u> 0.02	0.06 <u>+</u> 0.02	0.05 <u>+</u> 0.02
Perimeter	0.22 <u>+</u> 0.09	0.25 <u>+</u> 0.07	0.20 <u>+</u> 0.05

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

Values represent mean <u>+</u> SD. Statistical analysis basead on the Anova and Tukey Tests.

Significance, \* $p \le 0.01$ ; \*\*  $p \le 0.001$ ; \*\*\*  $p \le 0.0001$ . a, b, c = different superindices indicate intergroup significant differences.

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

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

Values represent mean  $\pm$  ED. Statistical analysis basead on the Anova and Tukey Tests.

Significance,  $*p \le 0.01$ . a, b = different superindices indicate inter-group significant differences.





44





# ARTIGO 2.

# Tumores no lobo ventral da próstata do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) induzidos por N-metil-N-nitrosouréia: avaliação histopatológica, imunocitoquímica e ultra-estrutural

Após reestruturação e versão para língua inglesa o artigo será submetido à Histology and Histopathology

# Tumores no lobo ventral da próstata do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) induzidos por N-metil-N-nitrosouréia: avaliação histopatológica, imunocitoquímica e ultra-estrutural

Cristiani Zanetoni<sup>1</sup> Silvana Gisele Pegorin de Campos<sup>1</sup> Sebastião Roberto Taboga<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology – Institute of Biology – UNICAMP, CP 6109 – 13084-971 – Campinas, SP, Brazil <sup>2</sup>Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology – IBILCE/UNESP, 15054-000 – São José do Rio Preto, SP, Brazil

# \*Correspondence to:

Dr. Sebastião Roberto Taboga (e-mail: <u>taboga@ibilce.unesp.br</u>) Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil Zipcode: 15054-000 Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390

# Funded by:

CAPES e FAPESP

#### **RESUMO**

O câncer de próstata é um dos tumores mais comuns que acometem o homem na atualidade. As dificuldades na obtenção de material humano para estudos do desenvolvimento de tumores prostáticos são grandes, pois esta questão esbarra na ética médica. Assim, várias investigações têm sido feitas sobre a indução experimental de tumores na próstata em roedores de laboratório: ratos, camundongos e cobaias. Neste trabalho foi feita a indução experimental de tumores na próstata do gerbilo adulto, após tratamento conjugado de N-metil-N-nitrosouréia com propionato de testosterona. Depois de estabelecidos os tumores, as próstatas foram processadas para estudos histológico, imunocitoquímico e ultra-estrutural. Os resultados mostraram que em gerbilos o surgimento de lesões prostáticas ocorreu em períodos experimentais de até 9 meses e que tanto o cancerígeno como a testosterona, associados ou não, foram indutores dessas neoplasias. O potencial invasivo das células neoplásicas pôde ser elucidado, ultra-estruturalmente e pelo teste imunocitoquímico com anticorpo anti-laminina, que demonstrou a ruptura da membrana basal em alguns ácinos. Detectou-se também no gerbilo a expressão da proteína citoplasmática Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) em células prostáticas neoplásicas, bem como é observado no câncer prostático do homem. Assim, este trabalho é pioneiro na demonstração da expressão de P504S em roedores. A partir dos resultados apresentados constatou-se que o gerbilo é um modelo animal para estudos de carcinogênese química prostática, que somados aos dados da literatura, levarão ao melhor entendimento da biologia de lesões da próstata.

# INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta, com a atividade secretora principalmente ligada à sua porção alveolar. Entretanto, os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (REESE et al., 1986). A glândula prostática é responsável pela produção de nutrientes e gradientes iônicos e de pH ótimos para os espermatozóides no fluido seminal (UNTERGASSER et al., 2005).

Uma deficiência no campo da pesquisa do câncer de próstata é a falta de modelos que permitam sua investigação acurada (SHIRAI et al., 2000; WANG et al., 2001; SCHULZ et al., 2003). Vários grupos vêm tentando desenvolver, caracterizar e validar modelos de murinos que melhor representem os aspectos bioquímicos e patológicos do câncer de próstata humano. Existem estudos de modelos experimentais para indução de tumores na próstata. HUSS e colaboradores (2001) fizeram uma revisão sobre os modelos com camundongos utilizados no estudo do câncer prostático. Por outro lado, alguns pesquisadores utilizam os ratos como animais experimentais na indução dos tumores de próstata (BOSLAND et al., 1983; POUR et al., 1987; SHIRAI et al., 1991; POLLARD e LUCKERT, 1986, 1987 e 1992; COHEN et al., 1994; SCHLEICHER et al., 1996).

Durante o processo de diferenciação celular normal ou patológico, principalmente durante a tumorigênese, a ocorrência de modificação no padrão de expressão de muitas moléculas pode ser indicativo de diagnóstico histopatológico para discriminação ou até para gradação do padrão histoarquitetural das lesões (ROSAI, 1996). A Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) é uma proteína citoplasmática que encontra-se super-expressa em carcinoma prostático humano, apresentando expressão variável em neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau e baixa expressão em próstata normal. Esse tipo de expressão foi associado ao diagnóstico de câncer ou proximidade ao foco neoplásico (JIANG et al., 2001; ANANTHANARAYANAN et al., 2005). A partir dessas constatações, esses autores indicaram a P504S como um novo marcador molecular em tecido para detecção de carcinoma prostático humano.

Devido às dificuldades na obtenção do material humano para estudos do desenvolvimento dos tumores prostáticos, uma vez que esbarram na ética médica, algumas questões fundamentais precisam ser elucidadas. Assim sendo, modelos experimentais de indução tumoral, quando estabelecidos, podem facilitar sobremaneira a interpretação e possibilitar a extrapolação dos resultados para a espécie humana.

A partir dessas observações, o presente trabalho buscou estabelecer no gerbilo (*Meriones unguiculatus*) um modelo de carcinogênese química para tumores prostáticos induzidos pela injeção intra-peritonial do cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia (MNU) em associação com a administração intra-dérmica de testosterona sintética. Uma vez estabelecidos esses tumores, foram realizados estudos histológico, imunohistoquímico e ultra-estrutural.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 100 gerbilos machos adultos, com 90 dias de idade. Todos os animais utilizados no presente projeto foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP, em gaiolas plásticas opacas, com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha de pinho, contendo cinco animais cada.

Os animais receberam água e ração comercial Nuvilab-CR1 (Nuvital, PR) *ad libitum*. A avaliação clínica e o peso corpóreo dos animais foram feitos uma vez por semana.

# Protocolo Experimental<sup>1</sup>

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos: um experimental (GEx) e 3 controle (GC).

O GEx recebeu em dose única intra-peritonial, o cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia na dose de 30mg/Kg de peso do animal. A droga foi pré-diluída em solução salina. A administração foi feita imediatamente após o preparo do cancerígeno. Esses animais receberam doses semanais intra-dérmicas de propionato de testosterona diluída em óleo de milho (2mg/Kg de peso do animal) durante 12 meses.

Os GC foram estabelecidos da seguinte forma: GC1 – recebeu somente o cancerígeno; GC2 – recebeu somente testosterona; GC3 – recebeu somente o agente diluidor. As coletas das próstatas foram feitas com intervalos de 90 dias, totalizando 3 coletas regulares.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> **Observações:** Este protocolo foi adaptado de POLLARD e LUCKERT (1992). Equipamentos de segurança pessoal foram utilizados durante o manuseio do cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia (MNU) e do propionato de testosterona. A neutralização de resíduos gerados na preparação e administração do MNU e de propionato de testosterona foi feita em solução saturada de NaOH, contendo aparas de alumínio, e em solução sulfonítrica por período de 48 horas, respectivamente (IARC, 1979). A maravalha das caixas, contendo urina e fezes dos animais, e as carcaças dos animais após o sacrifício foram embaladas e levadas a incineração.

#### Microscopia de luz

As próstatas removidas foram fixadas por imersão em Formalina tamponada 10%, lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol, incluídas em parafina e seccionadas a 5µm em micrótomo rotativo automático.

Parte do material foi fixado em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M), desidratado, incluído em historresina Leica e seccionado a 2µm em micrótomo rotativo automático.

Os cortes do material incluído em parafina, bem como os do incluído em historresina foram submetidos à coloração da Hematoxilina-eosina (HE), segundo BEHMER e colaboradores (1976). Além disso, no material incluído em parafina foram feitos os testes imunohistoquímicos para laminina e Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S). O controle positivo para reação da P504S foi efetuado em cortes histológicos de ressecções transuretrais ou prostatectomias radicais humanas, obtidas junto ao serviço de anatomia patológica do Hospital de Base da FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo.

As lâminas foram analisadas e as imagens capturadas utilizando um sistema analisador de imagens, Image-Pro-Plus.

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

Todos os experimentos e procedimentos seguiram de acordo com as normas éticas ditadas pelo CONEP - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa.

#### Teste imunocitoquímico para laminina

As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em gradiente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em Pepsina 0,4% em 0,01N HCl (40 min.). O bloqueio de peroxidases endógenas foi obtido com H2O2 3% em PBS. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em BSA 3% com TST (1 hora). Posteriormente, foram incubados à 4°C overnight com o anticorpo primário anti-laminina (La Product nº L9393, lot 067 H4838 Rabbit da SIGMA) numa diluição de 1:100 em BSA 1% em

TBST. Após serem lavados em TBST e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase, os cortes passaram por revelação com a diaminobenzidina (DAB). Para a contracoloração destes utilizou-se Metil Green. As lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan (Merck) e avaliadas em microscópio de luz convencional.

### Teste imunocitoquímico para P504S

As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em gradiente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em Tampão Citrato (45 min). O bloqueio de peroxidases endógenas foi obtido com H2O2 3% em metanol (15 min.). Para o bloqueio das proteínas inespecíficas, os cortes foram incubados em soro BSA 3% com PBS (1 hora). Posteriormente, foram incubados à 4°C overnight com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti p504S clone 13HA da DAKOCYTO, numa diluição de 1:100 em PBS/Soro. Após serem lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase, os cortes passaram por revelação com a diaminobenzidina (DAB). Para a contracoloração destes utilizou-se Hematoxilina de Mayer. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscópio de luz convencional.

#### Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os fragmentos de tecido foram fixados em ácido tânico a 0,25% e glutaraldeído 3% em tampão Milloning pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão Milloning pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavados brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em araldite, segundo COTTA-PEREIRA e colaboradores (1976).

O material destinado à MET foi submetido à rotina de microtomia para cortes semi-finos, ultra-finos e por fim à análise ao microscópio eletrônico de transmissão LEO-Zeiss 906.

#### RESULTADOS

#### Análise macroscópica

A avaliação macroscópica do complexo prostático foi efetuada durante a dissecção do animal, porém devido ao tamanho reduzido do lobo ventral, muitas vezes não se pôde detectar alterações macroscópicas evidentes. O grupo experimental (MNU + testosterona) em 12 meses apresentou a maior freqüência de indicativos tumorais (próstata reduzida, com aspecto de uma massa tecidual esbranquiçada) e cálculos no lobo ventral da próstata. A avaliação do fígado, intestino, pulmão e vesícula seminal foi feita macroscopicamente e da mesma forma, tumores foram identificados após 9 meses de tratamento.

#### Análises histológica, imunocitoquímica e ultra-estrutural

O lobo ventral da próstata do gerbilo, em condições morfológica e funcionais normais, corresponde a um conjunto de estruturas túbulo-acinares formadas por um epitélio simples envolto por um estroma fibromuscular (Figuras 1, 2A e 2B). Neste trabalho, essas regiões prostáticas foram consideradas como controle para estudos comparativos com lesões proliferativas.

Após três meses de tratamento, a análise morfológica da próstata dos animais do grupo experimental (GEx) e dos grupos controles (GC), GC1 e GC2 mostrou ocorrência de alterações histológicas. No GEx e GC1 observou-se neoplasia intra-epitelial (NIP) em 60% (GEx) e em 54.5% (GC1) da multiplicidade dos fragmentos<sup>2</sup> da próstata (Figuras 3A, 3B, 5 e 6) (Tabela 1), bem como hipertrofia e hiperplasia na quantidade de células musculares lisas (Figura 6). A figura 4 mostra ocorrência também de microácinos. No GC2, além de ácinos com NIP (em 50% da multiplicidade dos fragmentos prostáticos), foram observados ácinos adenocarcinomatosos (12.5%) (Figuras 7 e 8) (Tabela 1). As figuras 7 e 8 mostram na luz do ácino a presença de células inflamatórias, células em apoptose e necrose, ou seja, um "debree" celular. A próstata da maioria dos animais do GC3 não apresentou nenhuma modificação em sua histologia (Figuras 9 e 10)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Multiplicidade dos fragmentos: Variedade dos cortes não seqüenciais da próstata.

(Tabela 1), apenas 14.3% da multiplicidade dos fragmentos prostáticos apresentaram neoplasia intra-epitelial.

A parte ventral da próstata dos animais do GEx, GC1 e GC2 sofreu intensas alterações histológicas após seis meses de tratamento. Foi observada a presença de carcinoma microinvasivo em 16.7% (GEx), 15.4% (GC1) e 10% (GC2) da multiplicidade dos fragmentos da próstata e adenocarcinoma em 33.3% (GEx), 23.1% (GC1) e 20% (GC2) das mesmas (Figuras 11-16) (Tabela 2), além das freqüentes neoplasias intra-epiteliais (41.7% - GEx; 38.5% - GC1; 40% - GC2) (Tabela 2). As figuras 12 e 16 revelam com detalhe a existência de microácinos. Na maioria dos animais do GC3, não foi constatada alteração histológica prostática (Figuras 17 e 18) (Tabela 2), apenas 18.7% da multiplicidade dos fragmentos prostáticos apresentaram neoplasia intra-epitelial.

O GEx, GC1 e GC2 após nove meses de tratamento, revelaram também ocorrência de intensas modificações histológicas no lobo ventral da próstata. Além da neoplasia intra-epitelial presente em 26.3% (GEx), 33.3% (GC1) e 33.3% (GC2) da multiplicidade dos fragmentos prostáticos, foi constatado maior incidência de carcinoma microinvasivo (31.6% - GEx; 26.7% - GC1; 22.2% - GC2) e adenocarcinoma (42.1% - GEx; 33.3% - GC1; 22.2% - GC2) (Figuras 19-24) (Tabela 3). O GC3 (Figuras 25 e 26) apresentou com maior freqüência alterações histológicas, como a ocorrência de neoplasia intra-epitelial em ácinos glandulares de 28.6% da multiplicidade dos fragmentos prostáticos (Figura 26) (Tabela 3). A coleta da próstata dos poucos animais sobreviventes do GEx, GC1 e GC2 com 12 meses de tratamento foi feita para confirmar a evolução das neoplasias prostáticas constatadas e justificar o alto índice de mortalidade dos animais nesse período.

As figuras 27-29 mostram as marcações imunocitoquímicas para a glicoproteína laminina no GC1 após 9 meses de tratamento. Nas regiões da próstata com carcinoma microinvasivo e adenocarcinoma, foram observados pontos de marcação para laminina no estroma da glândula (Figuras 28 e 29), indicando ruptura da membrana basal.

As figuras 32-35 mostram as regiões de carcinoma prostático marcadas para a proteína citoplasmática Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S). Em 100% dos adenocarcinomas a reação foi positiva para esta enzima.

A análise ultra-estrutural possibilitou a confirmação dos dados constatados pela microscopia de luz. As figuras 36 e 37 mostraram que no GC2, após seis meses de tratamento, a porção ventral da próstata apresentou células epiteliais com alargamento das cisternas do retículo

endoplasmático rugoso (RER). O GEx, após nove meses de tratamento, apresentou células do epitélio com abundância em gotículas lipídicas no citoplasma, as quais se espalharam por toda extensão celular (Figuras 38 e 39). No GEx, após três meses de tratamento, as figuras 40 e 41 ilustram o comportamento da lâmina basal que em uma mesma célula epitelial encontra-se única, depois duplicada ou inexistente. Neste caso, indicando ruptura da membrana plasmática. A figura 42 mostrou que no GC1, após seis meses de tratamento, projeções citoplasmáticas estenderam-se em direção ao estroma prostático, comprimindo e rompendo a membrana basal. Este fato indica o potencial invasivo das células epiteliais iniciadas.

No GEx, após nove meses de tratamento, observa-se a ocorrência de carcinoma microinvasivo (Figura 43), tendo em vista a presença de células de origem epitelial invadindo o estroma da próstata.

# DISCUSSÃO

Alterações histopatológicas prostáticas foram observadas acometendo principalmente o compartimento epitelial. A maioria dessas alterações foi de ordem proliferativa, envolvendo perturbações na homeostase da população de células epiteliais secretoras. As neoplasias intraepiteliais, nos ácinos prostáticos, caracterizaram-se por acentuadas invaginações epiteliais para o lúmen e/ou estratificação celular, podendo estar associadas ou não a porções de epitélio normal. Nos carcinomas microinvasivos, agregados celulares invadiram o estroma ao redor, por provável ruptura da membrana basal. Nos adenocarcinomas, houve uma expansão acinar difusa, podendo ser observada a formação de microácinos devido à proliferação e rearranjo das células epiteliais secretoras. Segundo MOSTOFI e colaboradores (1992), microácinos são estruturas indicativas de tumorigênese prostática.

A neoplasia intra-epitelial tem sido aceita como uma lesão precursora do câncer de próstata (BOSTWICK et al., 2000). Esta lesão consiste de aglomeração e estratificação de células com forma desigual, havendo uma variação do tamanho nuclear, hipercromasia e cariomegalia. No entanto, a NIP fica retida na camada da membrana basal, estando as células proliferadas no limite do ácino. Já no adenocarcinoma, não há preservação dessa barreira, sendo as células extravasadas para o estroma. A NIP de alto grau não se diferencia do câncer invasivo, pois o padrão celular, as características ultra-estruturais de distribuição de organelas e a potencial capacidade de proliferação celular são semelhantes (BRAWER, 1992). Lesões pré-malignas como as neoplasias intra-epiteliais são decorrentes de anormalidades na diferenciação celular e expressão de receptores de fatores de crescimento e genes supressores de tumor (BONKHOFF e REMBERG, 1998). Esses eventos que ocorrem na NIP podem constituir um potencial fator para o estabelecimento ou iniciação de um processo neoplásico. Assim, uma célula pode passar por diversos fenótipos durante o processo de tumorigênese até atingir o fenótipo maligno. No adenocarcinoma prostático uma diversidade de graus é atingida, sendo uma doença heterogênea não somente pelos seus graus, mas também pela genética, ploidia e expressão de oncogêneses (LUCIA et al., 1998).

A marcação imunocitoquímica pelo anticorpo anti-laminina revelou-se decrescente no modelo de tumorigênese no gerbilo, aqui proposto para validação. O padrão de degradação e rearranjo dos elementos da membrana basal confirmados à MET constata a efetiva ação tumorigênica da MNU em associação com a testosterona. Interações entre células tumorais e matriz extracelular ocorrem em vários pontos durante o processo de metástase. Tumores epiteliais, os quais representam quase 90% das neoplasias humanas, invadem sua membrana basal para entrarem no estroma intersticial. Receptores de integrinas ligados às lamininas parecem mediar a adesão das células tumorais às membranas basais antes e durante a invasão. Várias mudanças ocorrem na ligação integrina-laminina durante a progressão do tumor (ZIOBER et al., 1996).

Segundo OLIVEIRA (2005), após a administração de testosterona, em gerbilos *Meriones unguiculatus* que sofreram orquiectomia bilateral, foi observado a presença de grande quantidade de RER que apresentou suas cisternas mais largas, indicando alta atividade de síntese protéica. Ademais, esses autores descrevem que a reposição hormonal pela testosterona após castração gera, em grandes áreas do epitélio prostático, regiões de enrugamento de membrana basal que são descritas como vestígios da ação de metaloproteases de matriz.

As gotículas lipídicas encontradas nas células epiteliais do gerbilo, nas condições aqui estudadas, também são comuns em gerbilos velhos, ratos velhos e linhagens de células humanas de câncer de próstata (COHEN et al., 1994; SWINNEN et al., 1997; CAMPOS, et al.). O aumento da lipogênese é uma das principais marcas das células cancerígenas e os genes codificadores de enzimas lipogênicas são regulados por andrógenos. Esse evento é encontrado tanto nos estágios iniciais da transformação neoplásica (NIP) como em carcinomas invasivos, persistindo até mesmo em células independentes de andrógenos (SWINNEN et al., 2004). Assume-se aqui que o aumento das gotículas de lipídio, pelo menos em parte, podem ser um fator de predisposição para tumorigênese. O potencial invasivo das células epiteliais alteradas pôde ser avaliado pela observação de projeções citoplasmáticas, comprimindo e rompendo a membrana plasmática. Essas projeções celulares são conhecidas como podossomos segundo SPINARDI e MARCHISIO (2005).

O modelo de carcinogênese prostática induzida por andrógeno e MNU em ratos tem emergido como uma valorosa ferramenta biológica para o acompanhamento das múltiplas etapas que envolvem a evolução do câncer de próstata. Este apresenta um aparecimento dependente do tempo de lesões histopatológicas envolvendo o espectro da carcinogênese de hiperplasia à displasia e desta, para carcinoma invasivo (THOMAS et al., 2003; LIAO et al., 2002; 2005; ARUNKUMAR et al., 2006). Embora poucos estudos têm caracterizado biomarcadores neste modelo, a inter-relação entre angiogênese, proliferação e apoptose, durante a carcinogênese prostática induzida por MNU mostra uma forte correlação com dados humanos publicados (LIAO et al., 2002). Em relação à inserção da técnica P504S como proposta de biomarcador de lesão em roedores, sua aplicação é importante no diagnóstico de tumores prostáticos, visto que os outros biomarcadores são de ordem geral para qualquer tipo de neoplasia, pois os fenômenos envolvidos, como vascularização, morte e proliferação celular são os que ocorrem em todos os tumores.

LIAO e colaboradores (2002) avaliaram a incidência de lesões prostáticas em ratos da linhagem Wistar-Unilever mediante tratamento de MNU e testosterona e constataram que no lobo ventral da glândula a incidência de câncer foi rara, enquanto que os lobos anterior e significativas incidências dorsolateral apresentaram de alterações histopatológicas. Adicionalmente, entre os espécimes analisados, 10% a 30% apresentaram alterações na vesícula seminal. Nesta mesma linhagem de ratos, THOMAS e colaboradores (2003) observaram que 75% dos espécimes apresentaram câncer de próstata com 13 meses de idade após tratamento com MNU e andrógeno. ARUNKUMAR e colaboradores (2006) notaram que em ratos Sprague-Dawly esse mesmo tratamento possibilitou a incidência de NIP em curto período de tempo (5 meses). Nesse modelo 40% dos animais desenvolveram NIP no lobo dorsolateral, enquanto que hiperplasia e displasia (55% - 65%) foram comuns neste lobo e também no lobo ventral. Embora a taxa de mortalidade nos animais experimentais deste trabalho tenha sido alta, os resultados foram promissores, pois revelaram após 3, 6 e 9 meses dos tratamentos com testosterona, MNU e MNU associado à testosterona o desenvolvimento de lesões prostáticas. A partir do aumento no tempo desses tratamentos, a incidência de neoplasia intra-epitelial diminuiu conforme o aparecimento de carcinoma microinvasivo e adenocarcinoma.

Os modelos roedores de carcinoma prostático estabelecidos, exceto os modelos de camundongos transgênicos, precisam de longos períodos experimentais, de dez a doze meses, para a ocorrência de câncer na próstata. Os cancerígenos, especialmente em combinação com testosterona, podem induzir o câncer de próstata em ratos. A indução de carcinoma prostático invasivo em ratos frequentemente requer longo prazo de administração de testosterona com ou sem aplicação de um cancerígeno (SHIRAI et al., 2000).

Os resultados deste trabalho mostraram que em gerbilos o estabelecimento de lesões prostáticas ocorreu em períodos experimentais de até 9 meses e que tanto o cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia "per se" como a testosterona, associados ou não, foram capazes de levar à formação de tumores prostáticos. Adicionalmente, assim como em câncer prostático humano, foi observado que a P504S também se encontra expressa no carcinoma prostático do gerbilo *Meriones unguiculatus*, revelando esse roedor como um bom modelo para estudo da carcinogênese química da próstata. Vários fenômenos subcelulares e/ou ultra-estruturais foram observados nas lesões prostáticas induzidas por N-metil-N-nitrosouréia, tais como: duplicidade, rompimento e inexistência da lâmina basal, além da presença de gotículas lipídicas no citoplasma das células epiteliais. Estes eventos são importantes marcadores morfológicos e podem ser comparáveis com outros modelos experimentais e até mesmo com os humanos. O foco principal nos estudos comparativos dos tumores prostáticos humanos (TABOGA et al., 2003) e na tentativa de extrapolações de modelos animais para compreensão dos eventos carcinogenéticos (POLLARD e LUCKERT, 1986; 1987; 1992; 1994; SHIRAI et al., 2000) está baseado na análise arquitetural do tumor (TABOGA e VIDAL, 2003), na cariometria (TABOGA et al., 2003) e na expressão gênica diferencial. Este trabalho vem apontar para um fator diagnóstico muito usado na histopatologia humana recente, mas que para roedores não havia sido descrito.

A partir dessas informações, assume-se aqui que o gerbilo é um modelo animal para estudos de carcinogênese química prostática, que somados aos dados da literatura levarão ao melhor entendimento da biologia de lesões da próstata.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANANTHANARAYANAN, V.; DEATON, R.J.; YANJ, X.J.; PINS, M.R. & GANN, P.H. 2005. Alpha-Methylacyl-CoARacemase (AMACR) expression in normal prostatic glands and highgrade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer. *The Prostate, 63:* 341-346.
- ARUNKUMAR, A.; VIJAYABABU, M.R.; SRINIVASAN, N.; ARULDHAS, M.M. & ARUNAKARAN, J. 2006. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol. Cell Biochem.*, 288(1-2):107-13.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. 1976. Manual de práticas para histologia normal e patológica. EDART-EDUSP, SP.329p.
- BOSLAND, M.C.; PRINSEN, M.K. & KROES, R. 1983. Adenocarcinomas of the prostate induced by N-nitroso-N-methilurea in rats pretreated with cyproterona acetate and testosterone. *Cancer Lett.*, *18*: 69-78.
- BOSTWICK, D.G.; RAMNANI, D. & QIAN, Q. 2000. Prostatic intraepithelial neoplasia: Animal models 2000. The Prostate, 43: 286-294.
- BONKHOFF, A.R. & REMBERGER, K. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal grow in the human prostate. *Virchows Arch.*, 433: 195-202.
- BRAWER, M.K. 1992. Prostatic intraepithelial neoplasia: a premalignant lesion. Symposium: The pathology of prostate cancer - prt 1: Calssic aspects of prostate cancer pathology. *Human Pathology*, 23: 242-248.
- CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; GÓES, R.M. & TABOGA, S.R. Histopathologic lesions in the ventral prostate microenvironment of old gerbil (*Meriones unguiculatus*). The Prostate submitted.
- COHEN, M.B.; HEIDGER, P.M. & LUBAROFF, D.M. 1994. Gross and microscopic pathology of induced prostatic complex tumors arising in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res., 54:* 626-628.
- COTTA-PEREIRA G.; RODRIGO F.G. & DAVID-FERREIRA, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol., 51:* 7-11.
- HUSS, W.J.; MADDISON, L.A. & GREENBERG, N.M. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biology*, *11*:245-259.

- IARC- Handling chemical carcinogenesis in the laboratory problems of safety. Edited by Montesano, R., Bartsch, H., Boyland, E., Della Porta, G., Fishbein, L., Griesemer, R.A., Swan, A.B., Tomatis, L. *LARC Scientific Publications n<sup>0</sup>*. 33, Lyon, 1979, pp.32.
- JIANG, Z.; WODA, B.A.; ROCK, K.L. et al. 2001. P504S: A new molecular marcker for the detection of prostate carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, *25(11)*: 1397-1404.
- LIAO, Z.; THOMAS, W-M.; BOILEAU, T.W.; ERDMAN, J.W. Jr & CLINTON, S.K. 2002. Interrelationships among angiogenesis, proliferation, and apoptosis in the tumor microenvironment during N-methyl-N-nitrosourea androgen-induced prostate carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis, 23 (10)*:1701–1711.
- LIAO, Z.; WANG, S.; BOILEAU, T.W.; ERDMAN, J.W. Jr & CLINTON, S.K. 2005. Increased phospho-AKT is associated with loss of the androgen receptor during the progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced prostate carcinogenesis in rats. *The Prostate, 64(2):*186-199.
- LUCIA, M.S.; BOSTWICK, D.G.; BOSLAND, M. et al. 1998. Workgroup I: Rodent models of prostate cancer. The Prostate, 36: 49-55.
- MOSTOFI, F.K.; SESTERHENN, I.A. & DAVIS JR., C.C. 1992. Prostatic carcinoma: problems in the interpretation of prostatic biopsies. Symposium: The pathology of prostate cancer – prt 1: Calssic aspects of prostate cancer pathology. *Human Pathology*, *23(3)*: 223-241.
- OLIVEIRA, S.M. 2005. A próstata ventral do gerbilo frente às diferentes formas de castração e subsequente reposição hormonal pela testosterona. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 65.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1986. Promotional effects of testosterone and high fat diet on the development of autochthonous prostate cancer in rats. *Cancer Letters, 32*: 223-227.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1987. Autocthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *The Prostate, 11:* 219-227.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1992. Early manifestations of induced prostate tumors in Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters, 67:*113-116.
- POUR, P.M. & STEPAN, K. 1987. Induction of prostatic carcinomas and lower urinary tract neoplasms by combined treatment of intact and castrated rats with testosterone propionate and N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Cancer Res., 47:* 5699-5706.
- REESE, J.H.; McNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SAMLOFF, I.M. & STAMEY, T.A. 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.*, *136*: 1148-1152.

- ROSAI, J. 1996. Male reproductive system. In: J. Rosai ed. Ackerman's Surgical Pathology. Mosby-Year, INC., 8ed., St.Louis-USA, 1: 1221-1256.
- SCHLEICHER, R.L.; FALLON, M.T.; AUSTIN, G.E.; ZHENG, M.; ZHANG, M.; DILLEHAY, D.L. & COLLINS, D.C. 1996. Intravenous vs. Intraprostatic administration of N-methyl-N-nitrosourea to induce prostate cancer in rats. *The Prostate*, *28*: 32-43.
- SCHULZ, W.A.; BURCHARDT, M. & CRONAUER, M.V. 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.*, 9(8): 437-448.
- SHAPPELL, S.C.; THOMAS, G.V.; ROBERTS, R.L.; HERBERT, R.; ITTMANN, M.M.;
  RUBIN, M.A.; HUMPHREY, P.A.; SUNDBERG, J.P.; ROZENGURT, N.; BARRIOS, R.;
  WARD, J.M. & CARDIFF, R.D. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice:
  definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor Meeting of the
  mouse models of human cancer consortium prostate pathology commitee. *Cancer Res., 64:* 2270-2305.
- SHIRAI, T.; FUKUSHIMA, S.; IKAWA, E.; TAGAWA, Y. & ITO, N. 1991. Induction of prostate carcinoma *in situ* at high incidence in F344 rats by a combination of 2, 3'-dimethyl-4-aminobifhenyl and ethinyl estradiol. *Cancer Res.*, 46: 6423-6426.
- SHIRAI, T.; TAKAHASHI, S.; CUI, L.; FUTAKUCHI, M.; KATO, K.; TAMANO, S. & IMAIDA, K. 2000. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutation Research*, 462: 219-226.
- SPINARDI, L. & MARCHISIO, P.C. 2005. Podosomes as smart regulators of cellular adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* In press.
- SWINNEN, J.V.; VAN VELDHOVEN, P.P.; ESQUENET, M.; HEYNS, W. & VERHOEVEN, G. 1997. Androgens markedly stimulate the accumulation of neutral lipids in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Endocrinology*, 137: 4468-4474.
- SWINNEN, JV.; HEEMERS, H.; VAN DE SANDE, T.; SCHRIJVER, E.; BRUSSELMANS, K.; HEYNS, W. & VERHOEVEN, G. 2004. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. J. Steroid Bioch. Mol. Biol., 92: 273-279.
- TABOGA, S.R.; SANTOS, A.B.; GONZATTI, A.G.R.; VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. 2003. Nuclear phenotypes and morphometry of human secretory prostate cells: a comparative study of benign and malignant lesions in Brazilian patients. *Caryologia*, 56: 313-320.
- TABOGA, S.R. & VIDAL, B.C. 2003. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 35(1): 11-6.

- THOMAS, W.-M.; BOILEAU, T.W.; LIAO, Z.; KIM, S.; LEMESHOW, S; ERDMAN, J.W. Jr.,
  & CLINTON, S.K. 2003. Prostate Carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)–
  Testosterone-Treated Rats Fed Tomato Powder, Lycopene, or Energy-Restricted Diets. J.
  Natl. Cancer Inst., 95: 1578–86.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S. & BERGER, P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol, 40:* 121-128.
- WANG, Y.; SUDILOVSKY, D.; ZHANG, B.; HAUGHNEY, P.C.; ROSEN, M.S.; WU, D.S.; CUNHA, T.J.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. & HAYWARD, S.W. 2001. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 61: 6064-6072.
- ZIOBER, B.L.; LIN, C.-S. & KRAMER, R.H. 1996. Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. *Cancer Biology*, 7:119-128.

#### LEGENDAS DAS FIGURAS

**Figura 1:** Corte histológico do lobo ventral da próstata de gerbilo incluído em parafina. Visão geral do lobo ventral da próstata. Os ácinos são formados pelo tecido epitelial (EP) que circunscreve o lúmen (L) e encontram-se envoltos pelo estroma (E). **Figuras 2A e B:** Cortes histológicos do lobo ventral da próstata incluídos em historresina. **2A:** Detalhe do ácino glandular, no qual observa-se o lúmen (L), o estroma com células musculares lisas (CML) e o epitélio prismático simples (EP). **2B:** Visão geral do lobo ventral da próstata. Observar epitélio (EP), lúmen (L) e estroma (E).

Figuras 3A, 3B e 4: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo experimental, incluídos em historresina (3B) e parafina (3A e 4), após três meses de tratamento. 3A e 3B: Observar a presença de neoplasia intra-epitelial (NIP). 4: No detalhe, notar os microácinos (setas). Epitélio normal (EP). Figuras 5 e 6: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC1, incluídos em historresina, após três meses de tratamento. Visão geral, mostrando ácinos com neoplasia intra-epitelial. 6: Notar hiperplasia das células musculares lisas (\*) ao redor dos ácinos. Figuras 7 e 8: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC2, incluídos em historresina, após três meses de tratamento. Visão geral (7) e detalhe (8) de ácino adenocarcinomatoso. "Debree" celular (\*\*). Figuras 9 e 10: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC3, incluídos em historresina, após três meses de tratamento. Visão três meses de tratamento. Visão geral (9) e detalhe (10) de ácinos sem alterações histológicas. Epitélio (EP); Lúmen (L); Estroma (E).

Figuras 11 e 12: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo experimental, incluídos em historresina, após seis meses de tratamento. 11. Visão geral de adenocarcinoma (setas) e carcinoma microinvasivo (\*). 12: No detalhe, notar a presença de microácinos (setas). "Debree" celular (\*\*). Figuras 13 e 14: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC1, incluídos em historresina, após seis meses de tratamento. Visão geral (13) e detalhe (14) de adenocarcinoma (setas). Epitélio normal (EP); "Debree" celular (\*\*). Figuras 15 e 16: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC2, incluídos em historresina, após seis meses de tratamento. 16: No detalhe, notar a presença de adenocarcinoma. 16: No detalhe,

notar a presença de microácino (seta). "Debree" celular (\*\*). **Figuras 17 e 18:** Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC3, incluídos em historresina, após seis meses de tratamento. Visão geral (**17**) e detalhe (**18**) de ácinos sem alterações histológicas. Epitélio (EP); Lúmen (L); Estroma (E).

Figuras 19 e 20: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo experimental, incluídos em historresina, após nove meses de tratamento. Observar a presença de microácinos (setas). 20: Atenção para carcinoma microinvasivo (\*). Epitélio (EP); Estroma (E). Figuras 21 e 22: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC1, incluídos em historresina, após nove meses de tratamento. Visão geral (21) e detalhe (22) de carcinoma microinvasivo (\*). Microácinos (setas). Figuras 23 e 24: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC2, incluídos em parafina, após nove meses de tratamento. 23: Visão geral de adenocarcinoma e carcinoma microinvasivo (\*). 24: Detalhe de adenocarcinoma. Figuras 25 e 26: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC3, incluídos em parafina, após nove meses de tratamento. Detalhe de ácino normal (25) e visão geral (26) de região prostática com ácinos apresentando NIP (\*). Epitélio normal (EP); Lúmen (L); Estroma (E).

Figuras 27-29: Cortes histológicos do lobo ventral da próstata do grupo controle, GC1, incluídos em parafina, após 9 meses de tratamento. Teste imunocitoquímico para laminina em região prostática normal (27) e com carcinoma microinvasivo (28 e 29). 27: No detalhe, a membrana basal das células epiteliais e musculares lisas marcada para laminina. 28 e 29: Observar pontos de marcação para laminina no estroma da glândula, indicando ruptura da membrana basal e extravasamento das células para o meio extracelular (setas). Epitélio normal (EP); Vaso sanguíneo (V); Ácino (A).

Figuras 30-35: Cortes histológicos de próstata incluídos em parafina. Teste imunocitoquímico para P504S em humano (30, 31A e 31B) e no gerbilo (32-35). 30: Visão geral de região prostática humana, com ácinos neoplásicos marcados para P504S (setas) e ácino benigno não marcado (\*). Observar visão geral (31B) e detalhe (31A) de ácinos carcinomatosos marcados para P504S. Visão geral (32) e detalhe (33) de carcinoma marcado para P504S (setas) e ácinos benignos não marcados (\*). 34 e 35: Detalhes de células tumorais marcadas para P504S.

Figuras 36 e 37: Micrografias eletrônicas do lobo ventral da próstata do GC2, após seis meses de tratamento. Observar na visão geral (36) e no detalhe (37) o alargamento das cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER). Epitélio (EP); Núcleo (N); Lâmina basal (seta); Célula muscular lisa (CML); Colágeno (CO). Aumentos: 3700x (36) e 17300x (37).

Figuras 38 e 39: Micrografias eletrônicas do lobo ventral da próstata do GEx, após nove meses de tratamento. Na visão geral (38) e no detalhe (39), observar o citoplasma celular rico em gotículas lipídicas (\*). Núcleo (N); Lâmina basal (seta); Fibroblasto (F). Aumentos: 6500x (38) e 20100x (39).

Figuras 40-41: Micrografias eletrônicas do lobo ventral da próstata do GEx, após três meses de tratamento. Atenção para o comportamento da lâmina basal que passa de única para dupla (40) e deixa de existir (41), indicando ruptura da membrana plasmática. Lâmina basal (setas); Núcleo (N); Colágeno (CO). Aumentos: 15900x (40) e 11800x (41). Figura 42: Micrografia eletrônica do lobo ventral da próstata do GC1, após seis meses de tratamento. Observar a presença de uma evidente projeção citoplasmática (seta) rompendo a membrana basal. Aumento: 20100x.

**Figura 43:** Micrografia eletrônica do lobo ventral da próstata do GEx, após nove meses de tratamento. Região de carcinoma prostático microinvasivo, na qual as células epiteliais invadiram o estroma da glândula. Elementos da membrana basal em degeneração (setas); Núcleo (N); Colágeno (CO); Fibroblasto (F); Célula muscular lisa (CML); Elastina (E). Aumento: 20000x.

		Tipos de Lesões		
	Neoplasia intra-epitelial (%)	Carcinoma microinvasivo (%)	Adenocarcinoma (%)	
Grupos tratamentos				
Controle Veículo (Óleo Vegetal) – GC3	14.3 (1/7)*	0	0	
Testosterona – GC2	50.0 (4/8)	0	12.5 (1/8)	
MNU – GC1	54.5 (6/11)	0	0	
MNU + Testosterona – GEx	60.0 (9/15)	13.3 (2/15)	13.3 (2/15)	

**Tabela 1.** Dados percentuais dos tipos de lesões proliferativas encontradas na próstata de gerbilos submetidos a 3 meses de tratamento com cancerígeno químico.

O período de cada tratamento é equivalente ao dobro da idade dos animais em meses.

\* A indicação no parêntese mostra o número da multiplicidade dos fragmentos alterados / número total da multiplicidade dos fragmentos avaliados.

Tabela	<b>2.</b> Dad	os percentuais	dos	tipos	de	lesões	proliferativas	encontradas	na	próstata	de
gerbilos	submeti	dos a 6 meses o	le tra	tament	to c	om can	cerígeno quími	co.			

		Tipos de Lesões	
	Neoplasia	Carcinoma	Adenocarcinoma (%)
Grupos tratamentos	intra-epitenai (70)	micromvasivo (70)	
Controle Veículo (Óleo Vegetal) – GC3	18.7 (3/16)*	0	0
Testosterona – GC2	40.0 (4/10)	10.0 (1/10)	20.0 (2/10)
MNU – GC1	38.5 (5/13)	15.4 (2/13)	23.1 (3/13)
MNU + Testosterona – GEx	41.7 (10/24)	16.7 (4/24)	33.3 (8/24)

O período de cada tratamento é equivalente ao dobro da idade dos animais em meses.

\* A indicação no parêntese mostra o número da multiplicidade dos fragmentos alterados / número total da multiplicidade dos fragmentos avaliados.

		Tipos de Lesões		
	Neoplasia intra-epitelial (%)	Carcinoma microinvasivo (%)	Adenocarcinoma (%)	
Grupos tratamentos				
Controle Veículo (Óleo Vegetal) – GC3	28.6 (2/7)*	0	0	
Testosterona – GC2	33.3 (3/9)	22.2 (2/9)	22.2 (2/9)	
MNU – GC1	33.3 (5/15)	26.7 (4/15)	33.3 (5/15)	
MNU + Testosterona – GEx	26.3 (5/19)	31.6 (6/19)	42.1 (8/19)	

Tabela	3.	Dados	percentuais	dos	tipos	de	lesões	proliferativas	encontradas	na	próstata	de
gerbilos	sub	ometidos	s a 9 meses d	e tra	tament	to co	om can	cerígeno quími	<b>c</b> O.			

O período de cada tratamento é equivalente ao dobro da idade dos animais em meses.

\* À indicação no parêntese mostra o número da multiplicidade dos fragmentos alterados / número total da multiplicidade dos fragmentos avaliados.




















## **CONCLUSÕES GERAIS**

1. Em gerbilos velhos, o declínio nos níveis de testosterona no soro está associado ao aparecimento de lesões histopatológicas no lobo ventral da próstata, sendo mais comuns as neoplasias intra-epiteliais (NIP).

O estabelecimento de lesões prostáticas nos gerbilos ocorreu em períodos experimentais de até
9 meses. O cancerígeno N-metil-N-nitrosouréia e a testosterona, associados ou não, foram indutores dessas neoplasias.

**3.** A Alfa-Metilacil-CoARacemase (P504S) encontra-se expressa no carcinoma prostático do gerbilo. Assim, este trabalho é pioneiro na demonstração da expressão de P504S em roedores, uma vez que essa proteína citoplasmática é usada como marcador na detecção de carcinoma prostático humano.

4. As análises ultra-estruturais revelaram a presença de acúmulos de lipídios no citoplasma das células epiteliais atípicas e o rompimento da lâmina basal. Esses eventos são importantes marcadores morfológicos e podem ser comparáveis aos outros modelos experimentais e até mesmo aos humanos.

**5.** O gerbilo é um modelo animal para estudos de carcinogênese química prostática, que somados aos dados da literatura, levarão ao melhor entendimento da biologia de lesões da próstata.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABATE-SHEN, C. & SHEN, M.M. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. Genes & Dev., 14: 2410-2434.
- ABRAHAMSON, P.A. 1999. Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocr* Related Cancer, 6: 503-519.
- ANANTHANARAYANAN, V.; DEATON, R.J.; YANJ, X.J.; PINS, M.R. & GANN, P.H. 2005. Alpha-Methylacyl-CoARacemase (AMACR) expression in normal prostatic glands and highgrade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): association with diagnosis of prostate cancer. *The Prostate, 63:* 341-346.
- BONKHOFF, H. & REMBERGER, K. 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *The Prostate, 28:* 98-106.
- BONKHOFF, H. & REMBERGER, K. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal grow in the human prostate. *Virchows Arch.*, *433*: 195-202.
- BOSLAND, M.C.; PRINSEN, M.K. & KROES, R. 1983. Adenocarcinomas of the prostate induced by N-nitroso-N-methilurea in rats pretreated with cyproterona acetate and testosterone. *Cancer Lett.*, *18*: 69-78.
- CARVALHO, H.F. & LINE, S.R.P. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int., 20:* 809-819.
- CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. & VILAMAIOR, P.S.L. 1997a. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue Cell*, 29: 163-170.
- CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L. & TABOGA, S.R. 1997b. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *The Prostate, 32*: 27-34.
- COHEN, M.B.; HEIDGER, P.M. & LUBAROFF, D.M. 1994. Gross and microscopic pathology of induced prostatic complex tumors arising in Lobund-Wistar rats. *Cancer Res., 54:* 626-628.
- CORDEIRO, R.S.; SCARANO, W.R.; GÓES, R.M. & TABOGA, S.R. 2004. Tissue alterations in the Guinea pig lateral prostate following antiandrogen flutamide therapy. *Biocell, 28(1):* 21-30.

- CORRADI, L.S.; GÓES, R.M. & TABOGA, S.R. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation*, *72(5)*: 198-208.
- CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A. & SUGIMURA, Y. 1986. Stromal-epitelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem. Cell Biol., 64:* 608-614.
- DEBES, J.D. & TINDALL, D.J. 2002. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.*, 187: 1-7.
- DROLLER, M.J. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. Br. J. Urol., 79:42-52.
- GALBRAITH, S.M. & DUCHESNE, G.M. 1997. Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur. J. Cancer*, *33(4)*: 545-554.
- GÓES, R.M.; ZANETONI, C.; TOMIOSSO, T.C.; RIBEIRO, D.L. & TABOGA, S.R. 2006. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron doi:10.1016/j.micron.2006.06.016*.
- GOODMAN, S. & VON DER MARK, K. 1996. Introduction: Extracellular matrix and integrins. *Cancer Biology*, 7: 97-98.
- HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; HAUGHNEY, P.C.; CUNHA, A.R.; FOSTER, B.A.; DAHIYA, R.; PRINS, G.S. & CUNHA, G.R. 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat.*, 155: 81-93.
- HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A. & CUNHA, G.R. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br. J. Urol., 79 (Suppl.):* 18-26.
- HIROHASHI, S. 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *American Journal of Pathology*, *153 (2)*: 333-339.
- HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V. & STANCZYK, F.Z. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *The Prostate, 52*: 213-235.
- HUSS, W.J.; MADDISON, L.A. & GREENBERG, N.M. 2001. Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Cancer Biology*, *11*:245-259.
- IMAMOV, O.; MORANI, A.; SHIN, G-J.; OMOTO, Y.; THULIN-ANDERSSON, C.; WARNER, M. & GUSTAFSSON J-A. 2004. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sc.,i* 101(25): 9375-9380.

- INCA. Incidência de câncer no Brasil 2006. Síntese de resultados e comentários. Disponível em: <a href="http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/">http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/</a>>. Acesso em 20 de dezembro de 2006.
- JIANG, Z.; WODA, B.A.; ROCK, K.L. et al. 2001. P504S: A new molecular marcker for the detection of prostate carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, *25(11)*: 1397-1404.
- KARR, J.F.; KANTOR, J.A.; HAND, P.H.; EGGENSPERGER, D.L. & SCHOLM, J. 1995. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.*, 55: 2455-2462.
- MANN, T. 1954. The biochemistry of semen. Ed. By Peters, R. & Young, F.G., London, Maathuen & Co., 240p.
- MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R. & CUNHA, G.R. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. *Dev Biol., 253*:165-174.
- OLIVEIRA, S.M. 2005. A próstata ventral do gerbilo frente às diferentes formas de castração e subsequente reposição hormonal pela testosterona. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 65.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1986. Promotional effects of testosterone and high fat diet on the development of autochthonous prostate cancer in rats. *Cancer Letters, 32*: 223-227.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1987. Autocthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *The Prostate, 11:* 219-227.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1992. Early manifestations of induced prostate tumors in Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters, 67:*113-116.
- POLLARD, M. & LUCKERT, P.H. 1994. Activation of dormant cancer cells in the prostates and seminal vesides of Lobund-Wistar rats. *Cancer Letters, 82:* 141-144.
- POUR, P.M. & STEPAN, K. 1987. Induction of prostatic carcinomas and lower urinary tract neoplasms by combined treatment of intact and castrated rats with testosterone propionate and N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Cancer Res., 47:* 5699-5706.
- PRICE, D. 1963. Comprative aspects of development and structure in the prostate. Nat. Can. Inst. Monogr., 12: 1-27.
- REESE, J.H.; McNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SAMLOFF, I.M. & STAMEY, T.A. 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. J. Urol., 136: 1148-1152.

- ROSAI, J. 1996. Male reproductive system. In: J. Rosai ed. Ackerman's Surgical Pathology. Mosby-Year, INC., 8ed., St.Louis-USA, 1: 1221-1256.
- ROSS, M.H.; REITH, E.J. & ROMRELL, L.J. 1993. *Histologia Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, RJ., 779p.
- SANTOS, F.C.A.; CARVALHO, H.F.; GÓES, R.M. & TABOGA, S.R. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (Meriones unguiculatus) female prostate. *Tissue & Cell*, *35(6)*: 447-57.
- SCHLEICHER, R.L.; FALLON, M.T.; AUSTIN, G.E.; ZHENG, M.; ZHANG, M.; DILLEHAY, D.L. & COLLINS, D.C. 1996. Intravenous vs. Intraprostatic administration of N-methyl-N-nitrosourea to induce prostate cancer in rats. *The Prostate*, 28: 32-43.
- SCHULZ, W.A.; BURCHARDT, M. & CRONAUER, M.V. 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.*, 9(8): 437-448.
- SHIRAI, T.; FUKUSHIMA, S.; IKAWA, E.; TAGAWA, Y. & ITO, N. 1991. Induction of prostate carcinoma *in situ* at high incidence in F344 rats by a combination of 2, 3'-dimethyl-4-aminobifhenyl and ethinyl estradiol. *Cancer Res.*, 46: 6423-6426.
- SHIRAI, T.; TAHASHI, S.; CUI, L.; FUTAKUCHI, M.; KATO, K.; TAMANO, S. & IMAIDA, K. 2000. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutat. Res.*, 462: 219-226.
- SLAYTER, M.V.; ANZANO, M.A.; KADOMATSU, K.; SMITH, J.M. & SPORN, M.B. 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: A system for histological scoring and grading. *Cancer Res.*, 54:1440-144.
- SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R. & DONJACOUR, A.A. 1986. Morphogical and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol. Reprod.*, 34: 973-983.
- THOMSON, A.A. & CUNHA, G.R. 1999. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development, 126:* 3693-3701.
- THOMSON, A.A. 2001. Role of androgen and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121: 187-195.
- THOMSON, A.A.; TIMMS, B.G.; BARTON, L.; CUNHA, G.R. & GRACE, O.C. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, *129*: 1905-1912.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S. & BERGER, P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol*, 40: 121-128.

- VILAMAIOR, P.S.L.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R. & CARVALHO, H.F. 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: A possible role for smooth muscle cells. *The Prostate*, 45 (3): 253-258.
- WANG, Y.; SUDILOVSKY, D.; ZHANG, B.; HAUGHNEY, P.C.; ROSEN, M.S.; WU, D.S.; CUNHA, T.J.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. & HAYWARD, S.W. 2001. A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 61: 6064-6072.

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

- ZANETONI, C. & TABOGA, S.R. 2001. Age-related modifications in stromal and epithelial compartments of the male prostate of *Meriones unguiculatus*. *Acta Microsc.*, *3(c)*: 203-204.
- ZIOBER, B.L.; LIN, C.-S. & KRAMER, R.H. 1996. Laminin-binding integrins in tumor progression and metastasis. *Cancer Biology*, 7: 119-128.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada Carcinogênese experimental no lobo ventral da próstata do gerbilo da Mongólia.

) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e ( biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_), tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1306-1).

) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo ( n⁰ )

austrioni Zonitori Inael de Serge

Cristiani Zanetoni Israel de Souza Aluna

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

loid Nome: Função:

Profa. Dra-ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP