

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Wellerson Rodrigo Scarano



EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE A PRÓSTATA DA
COBAIA *Cavia porcellus* EM DIFERENTES FASES DO
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Wellerson Rodrigo
Scarano
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sc71e
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51586
PROC 16.837102
C _____ DI _____
PREÇO 12.11,00
DATA 15/11/02
Nº CPD _____

2

CM00176475-4

BIB ID 267689

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

Sc71e

Scarano, Wellerson Rodrigo

Efeito do estradiol sobre a próstata da cobaia *Cavia porcellus*
em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal/Wellerson
Rodrigo Scarano. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

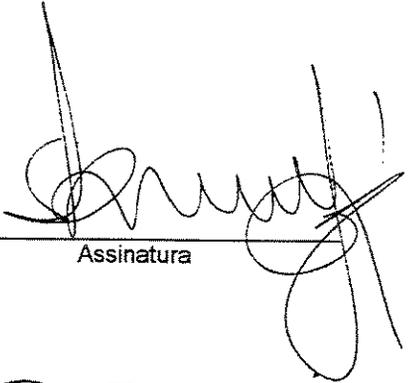
Orientador: Sebastião Roberto Taboga
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Próstata. 2. Cobiaia. 3. Estradiol. I. Taboga, Sebastião
Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 13 de Agosto de 2002

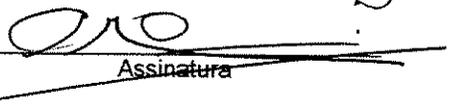
BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof.Dr. Antonio Marcos Orsi



Assinatura

Prof.Dr. Marcelo Martinez



Assinatura

Profª.Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

6h-57m-11s

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que em algum momento foram coadjuvantes
desta conquista e, àquela que nunca mediu esforços
para me ver chegar ao topo:
Minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, o amigo Sebaka, pela orientação, amizade e por acreditar na minha capacidade, mesmo não tendo sido meu orientador e/ou professor na graduação.

Aos Profs. Drs. Marcelo Martinez, Antonio Marcos Orsi e Valéria H. C. Quitete pelas sugestões na análise prévia da tese.

Aos Docentes do Departamento de Biologia Celular pelos seus ensinamentos, questionamentos e anseios no que diz respeito a profusão da Ciência, em especial ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho e à Prof.^a Dr.^a Shirley Maria Recco Pimentel.

À melhor secretária da Unicamp, Liliam Panagio (Departamento de Biologia Celular), pela amizade, apoio e dedicação.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em especial à Uyrá, Marla, Rodrigo, Adrian, Gustavo (Pônei), Fernanda (Makett), Adelina e Renato, que conviveram comigo durante as disciplinas da PG.

Aos técnicos de laboratório, Rosana Silistino de Souza (Departamento de Biologia IBILCE/UNESP) e Domingos Zancheta Netto (Laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Medicina FAMERP) pelo auxílio na execução e aprendizado de técnicas.

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

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

Aos meus primeiros amigos e mestres que de certa forma, influenciaram no resultado final deste trabalho, construindo em mim uma base sólida e servindo de exemplo como ótimos profissionais: Prof. Dr. Antonio Marcos Orsi, Prof.^a Dr.^a Maeli Dal Pai Silva, Prof.^a Dr.^a Wilma De Grava Kempinas e Prof.^a Dr.^a Máira Aparecida Stefanini.

Aos amigos de sempre: Ana Paula, Samara, Dr.^a Magaly, Dr. Flavio, Danielle, Angela Satiko, Júnior, Paulino, Kleber e Thomaz Barrela, meu muito obrigado por vocês existirem.

Aos amigos do Coral Memphys pelo apoio e amizade.

Em especial agradeço:

Ao meu pai Osmar, aos meus irmãos Keyla e Jefferson, aos meus tios Elizeu, Cláudia, Elizabeth, Elaine, Sonia e Estela; às minhas avós Ilda e Maria; ao meu afilhado Fábio e à minha cunhada Márcia, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

À Deus pela vida e pelo incomensurável amor.

SUMÁRIO

I.	Resumo.....	8
II.	Abstract.....	10
III.	Introdução.....	12
IV.	Objetivo.....	18
V.	Artigos.....	19
	Artigo 1: EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE O ESTROMA PROSTÁTICO DA COBAIA <i>Cavia porcellus</i> EM DIFERENTES IDADES.....	20
	Artigo 2: MODIFICAÇÕES DO EPITÉLIO GLANDULAR PROSTÁTICO DA COBAIA <i>Cavia porcellus</i> FRENTE À ADMINISTRAÇÃO DO ESTRADIOL EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL.....	40
VI.	Conclusões Gerais.....	57
VII.	Referências.....	58

RESUMO

A próstata é uma glândula anexa do sistema reprodutor masculino que tem despertado grande interesse na área biomédica devido às inúmeras patologias que a acometem. Frente ao desbalanço hormonal, ocasionado principalmente pelo processo de senescência, o tecido prostático desenvolve dentre outras doenças, a hiperplasia benigna prostática (BPH), metaplasias do epitélio, prostatites e o câncer prostático. O estrógeno parece ter papel fundamental na gênese da hiperplasia benigna prostática e do câncer da próstata, porém, os aspectos que envolvem a relação estroma-epitélio não são completamente esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração crônica do estradiol sobre os componentes epitelial e estromal da próstata de cobaias machos *Cavia porcellus* ao longo do desenvolvimento pós-natal, utilizando técnicas histológicas, histoquímicas e ultra-estruturais. Foram utilizados 10 animais de cada idade: pré-púbere, púbere, pós-púbere e adultos, sendo que 5 foram destinados ao grupo controle e 5 ao grupo tratado, que recebeu injeção subcutânea semanal de Benzoato de Estradiol durante 4 semanas. Após o tratamento as próstatas foram fixadas e incluídas para a microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Foram feitos testes histoquímicos para fibras colágenas (Tricrômico de Masson, Picrossírius-Hematoxilina), fibras elásticas (Resorcina Fucsina de Weigert) e fibras reticulares (Reticulina de Gömöri), além das colorações usuais pela Hematoxilina-eosina e pelo Azul de Toluidina. Para a caracterização quantitativa dos componentes prostáticos foi realizada uma análise morfométrica-estereológica, sendo que os dados obtidos foram comparados aplicando-se o Teste T ($p \leq 0.05$). Na microscopia eletrônica de transmissão foram feitos procedimentos rotineiros para a caracterização ultra-estrutural de elementos epiteliais e do estroma prostático. A análise histopatológica do material revelou regiões onde há ocorrência da Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) característica do padrão epitelial denominado cribriforme. Além disso, nota-se nos animais experimentais, um estreitamento da região clara supranuclear, descrita como sendo a região do complexo de Golgi. Observa-se perda da polaridade celular, núcleos de diversas formas e tamanhos, em diferentes alturas e com padrões de distribuição

cromatínica irregular. Tais alterações foram encontradas, principalmente, nos animais púberes, pós-púberes e adultos. A análise histoquímica, juntamente com a análise morfométrica-estereológica, revelaram nos animais tratados hiperplasia estromal com aumento da camada fibromuscular que circunda os ácinos glandulares nas idades pré-púbere, pós-púbere e adulta. Além disso, observou-se um aumento na quantidade dos elementos fibrilares da matriz estromal, como o colágeno, as fibras reticulares e as fibras do sistema elástico, entremeando células musculares lisas que se arranjam, às vezes, de forma não concêntrica. A ultra-estrutura mostrou que nos animais tratados ocorre um certo desarranjo no sistema de membranas internas nas células epiteliais que assumem fenótipos variados, hipertrofia de células basais, presença de feixes fibrilares colagênicos espessos e de fibras do sistema elástico em maior quantidade quando comparado aos animais do grupo controle, além de reforçar os achados histológicos como o padrão epitelial cribriforme e a hiperplasia estromal. Estes dados sugerem que o estrógeno pode provocar modificações celulares e teciduais em qualquer etapa do desenvolvimento, principalmente nas fases em que os níveis de testosterona estão aumentados (após a puberdade), e com isso provocar alterações fisiopatológicas relevantes para o funcionamento da glândula prostática.

ABSTRACT

The prostate is an attached gland of the male reproductive system that has developed great interest in the biomedical area because to the innumerable pathologies that attacks it. Front to hormonal disorder, caused mainly for the aging, the prostatic tissue develops amongst other diseases, the benign prostatic hyperplasia (BPH), metaplasias of the epithelium, prostatitis and the prostate cancer. The estrogen hormone seems to have essential role in genesis of the benign prostatic hyperplasia and prostate cancer however the aspects that involve the stroma-epithelium relation completely are not clarified. The objective of the present study was to evaluate the effect of the chronic administration of estrogen on epithelial and stromal components of the male Guinea pig prostate to long of development, being used the hystological and structural techniques. For this experiment were utilized 10 animals of each age: pre-puberal age, puberal age, post-puberal age and adult age, which 5 animals were destined to control group whereas 5 animals were destined to treated group that received weekly subcutaneous injections of Benzoate of estradiol during 4 weeks. After the treatment the prostates were fixed and embedded for light and transmission electron microscopy. Histochemical tests were carried out for collagen fibers (Masson's trichrome, Picrossirius Hematoxylin), elastic fibers (Weigert's Resorcin Fucsin) and reticular fibers (Gömöri's reticulin), as well as the usual staining methods with Hematoxilin-eosin and Toluidine blue. To quantitative characterization of the prostatic components were carried out using the morphometric-stereological analyze, where the data were compared using statistical test T ($p \leq 0.05$). At the transmission electron microscopy the routine procedures were followed for the ultrastructural characterization of the epithelium and prostatic stroma elements. The hystopatological analysis of the material disclosed regions where it has occurrence of Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN), characteristic of the cribriform epithelial pattern. Moreover, it is noticed in the experimental animals, a narrowing of the clear up-nuclear region, described as being the region of the Golgi complex. One observes loss of the cellular polarity, nuclei of diverse forms, sizes, in different heights and with pattern of irregular chromatin distribution.

Such alterations had been found, mainly, in the puberal, post-puberal and adult animals. The histochemical analysis, together with the morphometric-stereological analysis, had disclosed in the treated animals stromal hyperplasia with increased to the layer to fibromuscular that surrounds the glandular acini in the pre-puberal, post-puberal and adult ages. Moreover, there were an increased in the amount of the fibrillar elements from the stromal matrix, as the collagen and reticular fibers and the elastic system fibers, intermixing smooth muscular cells that if they arrange, sometimes, of disorganized form. The structural analysis showed that in the treated animals occurs a certain disarrangement in the system of internal membranes in the epithelial cells that assume varied phenotypes, hypertrophy of basal cells, presence of thick collagen fibers and the elastic system fibers in bigger amount than control group, besides strengthening the hysthologic findings as the cribriform epithelial pattern and the stromal hyperplasia. These data suggest that estrogen can provoke cellular and tecidual modifications in any stage of the development, mainly in the phases where the testosterone levels are increased (after the puberty), and with this to cause important physiopathological alterations for the functioning of the prostate gland.

Aspectos Gerais

Dentre as estruturas acessórias do sistema reprodutor masculino, a próstata apresenta-se como a glândula mais volumosa e a de maior expressividade funcional (NETTER, 1965). A próstata secreta um líquido fino de aspecto leitoso que aumenta o volume do sêmen. A secreção prostática apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito; colaborando com a neutralização do meio e contribuindo sobremaneira para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides (PRICE, 1963; GUYTON, 1994).

Histologicamente, a próstata constitui-se de glândulas túbulo-alveolares. O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se numa membrana basal que repousa sobre um estroma conjuntivo, contendo fibras musculares lisas que circundam os alvéolos e ductos, e inúmeros vasos. No estroma podem ser encontradas terminações nervosas de vários tipos, freqüentemente entre as células musculares lisas (ICHIHARA *et al.*, 1978) e associadas ao epitélio (PRICE, 1963). No homem, as unidades glandulares dispõem-se em três camadas de forma concêntrica ao redor da uretra prostática, onde se abrem os ductos individuais. Periféricamente, uma fina cápsula fibromuscular rica em células musculares lisas envolve a próstata, enviando septos que penetram na glândula (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Na maioria dos roedores, a glândula prostática apresenta-se como uma estrutura complexa composta de três lobos distintos, designados pela localização que cada um deles ocupa em relação à uretra. Assim, são identificados o lobo ventral anterior à base da bexiga e os lobos dorsal e lateral que circundam, dorsolateralmente, a uretra, a base da bexiga, a vesícula seminal e as glândulas coaguladoras (PRICE, 1963; JESIK *et al.*, 1982; SUGIMURA *et al.*, 1986). Assim como nas zonas da próstata humana, estes lobos diferem no que diz respeito à sua topografia, ao seu tamanho, à sua composição celular e sua organização estrutural, às suas secreções e aos respectivos processos secretórios (JESIK *et al.*, 1982; AUMULLER & SITZ, 1990; COLOMBEL & BUTTYAN, 1995).

Em cobaias (*Cavia porcellus*), o complexo prostático é dividido em lobos lateral, dorsal e a glândula de coagulação que está posicionada ventralmente. Ao contrário do que acontece em ratos e camundongos, onde a próstata ventral é bastante evidente, em cobaias esta não se encontra presente (WONG & TSE, 1981). A arquitetura glandular do lobo lateral de cobaias é homólogo ao lobo ventral de camundongos e, o lobo dorsal corresponde ao lobo dorsolateral de camundongos e ratos (ZHAO et al., 1993).

O epitélio das unidades secretoras e seus ductos são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas - as células epiteliais luminiais - e entre as bases destas podem estar distribuídas células menores, achatadas ou arredondadas - as células epiteliais basais (ICHIHARA et al., 1978).

São identificados nos lobos lateral e dorsal da próstata de cobaias machos três tipos de ácinos secretores. No primeiro tipo aparecem pregas epiteliais constituídas predominantemente de células colunares altas. O citoplasma aparece altamente basófilo especialmente na região central, próxima do núcleo e uma zona clara é evidenciada supranuclearmente na região do Aparelho de Golgi. O segundo tipo de ácino é largo, mas as células epiteliais são baixas e a mucosa não forma pregas. Observam-se também regiões mais claras correspondentes à região do aparelho de Golgi e o núcleo ocupa grande porção citoplasmática. O terceiro tipo engloba formas acinares transicionais entre os dois tipos supradescritos (WONG & TSE, 1981).

As células epiteliais dos ductos apresentam características ultraestruturais diferenciadas das células epiteliais acinares, cujo aparato secretor é bem desenvolvido, sugerindo que as células do ducto não são ativas na secreção como são as acinares (ICHIHARA et al., 1978).

Na porção conjuntiva da próstata podem ser observados células musculares lisas, fibroblastos, macrófagos fixos e células endoteliais dos vasos, cada qual com seu importante e específico papel na viabilidade e função secretora do tecido como um todo (FRANKS, 1967 apud PRINGS et al., 1991). O termo estroma é empregado para designar, no adulto, o tecido conjuntivo frouxo associado ao epitélio, correspondendo ao componente “não epitelial” de um órgão. O estroma no adulto é equivalente ao mesênquima, o qual é definido como tecido conjuntivo frouxo embrionário (CUNHA et al., 1985 e 1996). A manutenção da diferenciação epitelial na próstata adulta parece ser dependente de interações entre estroma e epitélio, sendo que a ativação de fatores de crescimento no estroma prostático, pode ser responsável pelo aparecimento da hiperplasia benigna de próstata (CUNHA et al., 1983).

A anatomia comparada de alguns mamíferos permitiu a descrição macro e microscópica deste órgão, já na década de 60, em animais como rato, coelho, camundongo, macaco e cão (PRICE, 1963). Mais recentemente, por interesse médico-veterinário e econômico, esta caracterização estendeu-se a animais de maior porte, como o búfalo, do qual foram estudadas a histologia, a ultraestrutura e a histoquímica da próstata (ABOU-ELMAGD & WROBEL, 1989). Os estudos da estrutura da próstata da cobaia são mais recentes, podendo ser referenciados os trabalhos de WONG & TSE, 1981, que realizaram um estudo histológico e ultraestrutural do complexo prostático da cobaia e, ZHAO et al., 1993, que através de um processo de microdissecção e digestão enzimática estudaram a morfogênese e o desenvolvimento dos ductos do complexo prostático nesta espécie.

Devido à grande importância da próstata para o funcionamento do aparelho reprodutor dos mamíferos machos, muitos trabalhos sobre efeitos experimentais vêm sendo desenvolvidos.

Desenvolvimento e fisiologia da próstata

O crescimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade funcional (secretora) e estrutural da próstata e dos demais órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes e ocorrem através de interações recíprocas entre o estroma e o epitélio (PRICE, 1963; AUMÜLLER & SEITZ, 1990; ROSAI et al., 1996; HAYWARD et al., 1997; THOMSON et al., 1997).

Durante a vida fetal, existe um período em que a dependência de andrógenos é absoluta, sendo que sua remoção neste período suprime a formação da próstata (WELLS *et al.*, 1954). Entretanto, o início do desenvolvimento pós-natal da próstata parece não ser estritamente dependente de hormônios, ou é minimamente dependente deles; o crescimento e a ramificação dos sistemas de ductos prosseguem nos primeiros 15 dias, mesmo após a castração neonatal (DONJACOUR & CUNHA, 1988).

O estágio adulto é um período em que o andrógeno mantém a morfologia e a função no tecido prostático, havendo uma taxa de proliferação extremamente baixa, que se equilibra com a morte celular (CUNHA et al., 1996).

As necessidades de se estudar as respostas deste órgão aos hormônios, sob várias condições, deve-se ao fato de ser a glândula prostática, em humanos, o sítio de um grande número de doenças relacionadas à idade, sendo que as de maior importância médica são o câncer prostático e a hiperplasia nodular, esta última conhecida também como BPH (benign prostatic hyperplasia). Os hormônios, entre outros fatores, exercem papel na etiologia destas lesões. Além disso, estas lesões, malignas ou não, podem ser tratadas por estratégias de remoção de andrógenos (PRICE, 1963; COLOMBEL & BUTTYAN, 1995; DROLLER, 1997; RAUCH et al., 1997) e/ou utilização de componentes estrogênicos (ISAACS & COFFEY, 1989).

As doenças benignas da próstata humana são de etiologia bastante complexa e compreendem modificações histopatológicas como hiperplasia glandular e estromal, atrofia glandular, fibrose e processos inflamatórios (prostatites). Devido à complexidade da BPH, estudos visando esclarecer os processos etiológicos e patogênicos são de suma importância.

A maior dificuldade em realizar tais estudos está no número limitado de modelos animais que mostram alterações histopatológicas semelhantes às humanas. Rotineiramente, o cão é relatado como um dos poucos animais não-primatas que desenvolvem espontaneamente hiperplasia prostática com o avançar da idade cronológica (MOORE et al., 1979). No entanto, HORSFALL et al., (1994), através de estudos correlacionando as alterações prostáticas com a idade, entre cobaias machos *Cavia porcellus* e o homem, propuseram ser essa um bom modelo para os estudos relacionados com o desenvolvimento prostático, principalmente do estroma, com relação a alterações de cunho histopatológico.

O estrógeno pode ter um papel complementar como fator predisposicional para desencadear a BPH e/ou o câncer prostático. A ação desse hormônio poderia envolver indução de mudanças permanentes ou transformação maligna progressiva em células prostáticas durante o desenvolvimento do animal (SANTTI et al., 1994).

Em ratos, o tratamento neonatal com 17 Beta-estradiol induz alterações metaplásicas irreversíveis no epitélio das regiões periuretrais da glândula de coagulação, ductos ejaculatórios, e regiões da parede dorsal da uretra (ARAI et al., 1977). Em adição à metaplasia escamosa, a exposição ao estradiol resulta na redução do tamanho dos órgãos reprodutores masculinos e causa persistentes mudanças no volume relativo dos componentes do tecido prostático (PYLKKÄNEN et al., 1991).

A exposição a estrógenos durante a idade adulta induz mudanças na próstata de várias espécies. A região periuretral posterior da próstata mostrou responder ao tratamento com estrógenos durante a idade adulta, com crescimento fibromuscular e/ou indução de tumores benignos, acompanhados por hiperplasia epitelial e metaplasia.

Já o tratamento crônico com estradiol e testosterona propiciaram o aparecimento de carcinomas na próstata dorsal de ratos da variedade Noble. Lesões hiperplásicas e displásicas nos ductos dos lobos dorsolateral da próstata, parecem ser precursores potenciais desses carcinomas (McNEAL *et al.*, 1988).

Em um estudo ultraestrutural, TAM & WONG (1991) demonstraram os efeitos do tratamento de oestradiol sobre a próstata lateral de cobaias machos. Neste estudo observou-se aumento no número de pequenos grânulos altamente elétron-densos, corpos multivesiculares e espaços intercelulares. Observou-se também um aparente aumento no volume da lâmina própria e no número de células estromais, além de um aumento na densidade de fibras colágenas no estroma, em 2 e 4 semanas após administração de oestradiol em animais adultos.

Há evidências de que muitos processos biológicos no tecido epitelial prostático são controlados por andrógenos e estrógenos através da produção de fatores estimulatórios e inibitórios pelo estroma e pelo tecido epitelial adjacente (CUNHA *et al.*, 1987; PRINS & BIRCH, 1995).

Estudos epidemiológicos provém dados sugerindo que a incidência de câncer é maior em homens com altas taxas de fator I de crescimento ligado a insulina (IGF-I) circulante (CHAN *et al.*, 1998; WOLK *et al.*, 1998). O IGF-I mostrou ser um agente anti-apoptótico e atua como um fator mitogênico na glândula prostática. A persistente expressão de IGF-I no epitélio basal da próstata de camundongos levou ao aparecimento de neoplasia nesse tecido (DI GIOVANINI *et al.*, 2000).

HUYNTH e colaboradores (2001) sugerem que na próstata, a expressão de receptores de IGF-I é dependente de estrógeno, enquanto a expressão do IGF-I é dependente de andrógeno. A expressão de receptores para IGF-I mostrou ter um importante papel na apoptose, na metástase de células prostáticas (BURFEIND *et al.*, 1996) e na tumorigênese (DI GIOVANINI *et al.*, 2000).

Apesar de vários estudos relatarem alterações fisiopatológicas relevantes frente ao tratamento experimental com estrógenos (sozinho), ou em combinação com outros

hormônios, faz-se necessário o melhor entendimento das relações entre o estroma e o epitélio prostático, principalmente na tentativa de explicar o rearranjo tecidual e fibrilar perante esse hormônio em diferentes estágios de desenvolvimento.

OBJETIVO

Tendo em vista a escassez de dados sobre a composição do estroma prostático, tanto dos componentes celulares quanto dos componentes fibrilares e os seus prováveis papéis regulatórios na biologia prostática e, acreditando ser a cobaia um bom modelo experimental para o estudo dos aspectos que envolvem a relação estroma-epitélio, o presente estudo teve por objetivo a análise morfológica e ultra-estrutural da próstata lateral de cobaias machos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, visando observar as modificações provocadas pela administração experimental do estradiol nos componentes epitelial e estromal.

O presente trabalho gerou 2 artigos que deverão, após vertidos para o inglês, ser submetidos a periódicos internacionais.

Artigo 1: EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE O ESTROMA PROSTÁTICO DA COBAIA *Cavia porcellus* EM DIFERENTES IDADES

Artigo 2: MODIFICAÇÕES DO EPITÉLIO GLANDULAR PROSTÁTICO DA COBAIA *Cavia porcellus* FRENTE À ADMINISTRAÇÃO DO ESTRADIOL AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

**EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE O ESTROMA PROSTÁTICO DA COBAIA
Cavia porcellus EM DIFERENTES IDADES**

Wellerson Rodrigo Scarano¹ e Sebastião Roberto Taboga²

¹ Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP, CP 6109 – 13084-971- Campinas, SP.
Brasil

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

Título resumido: Efeito do estrógeno sobre o estroma da próstata da cobaia.

Palavras-chave: Cobaia; estroma; próstata; estradiol

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n.º 00/06136-1).

Endereço para correspondência:

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

RESUMO

O estrógeno parece ter papel fundamental no crescimento fibromuscular que caracteriza a hiperplasia benigna prostática (BPH) e, está associado a produção de fatores de crescimento pelas células musculares lisas e fibroblastos que expressam receptores para este hormônio. O presente trabalho caracterizou os efeitos da administração crônica do Estradiol sobre os componentes celulares e fibrilares do estroma prostático da cobaia. Foram utilizados 10 animais de cada idade: pré-púbere, púbere, pós-púbere e adulta, sendo que, aleatoriamente 5 foram destinados ao grupo controle e 5 ao grupo tratado, que recebeu injeção subcutânea semanal de Benzoato de Estradiol. Após o tratamento, os órgãos foram coletados, fixados e processados para as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Os testes histoquímicos e morfométricos revelaram aumento do estroma fibromuscular que circunda os ácinos prostáticos nos animais tratados. Observou-se a presença de feixes espessos de colágeno adjacentes ao epitélio glandular e circundando as células musculares lisas, além de fibras do sistema elástico distribuídas em certa abundância na lâmina própria, mostrando um arranjo diferente do padrão de distribuição encontrado no grupo controle. Essas alterações foram observadas em todas as idades, exceto na idade puberal onde, segundo a literatura, ocorre menor expressão de receptores para o estrógeno no estroma. Tais alterações confirmam o fato de que o estrógeno pode ser o responsável pelo crescimento fibromuscular que ocorre na Hiperplasia Benigna Prostática, e que as células estromais estão susceptíveis a ação deste hormônio, praticamente, durante todo o desenvolvimento pós-natal.

INTRODUÇÃO

O estrógeno têm sido implicado na gênese da hiperplasia benigna prostática (BPH) e do câncer prostático. O aparecimento da BPH em homens mais velhos está associado com um aumento na concentração plasmática de estrógeno em relação aos níveis androgênicos

(WALSH, 1984). Além disso, a hiperplasia prostática inicia-se pelo componente fibromuscular do estroma (ROHR & BARTSCH, 1980); que é considerado o principal sítio da ação do estrógeno na próstata (MAWHIMMEY & NEUBAUER, 1979).

Tendo em vista a potencial importância do estroma prostático no desenvolvimento da BPH, vários estudos tem tentado definir os fatores envolvidos na regulação do crescimento celular neste compartimento (CHANG & CHUNG, 1989; LEVINE, 1992).

A maior dificuldade em realizar tais estudos está no número limitado de modelos animais que mostram alterações histopatológicas semelhantes às humanas. Rotineiramente, o cão é relatado como um dos poucos animais não-primatas que desenvolvem espontaneamente hiperplasia prostática com o avançar da idade cronológica (MOORE *et al.*, 1979). No entanto, HORSFALL *et al.*, (1994), através de estudos correlacionando as alterações prostáticas com a idade, entre cobaias machos *Cavia porcellus* e o homem, propuseram ser essa um bom modelo para os estudos relacionados com o desenvolvimento prostático, principalmente do estroma, com relação a alterações de cunho histopatológico.

Alguns estudos tem descrito alterações histológicas como displasia e metaplasia epitelial e hipertrofia estromal na glândula prostática após prologados tratamentos hormonais com testosterona em combinação com estrógenos, principalmente na idade adulta (LANE, 1997).

O presente estudo foi delineado para examinar os efeitos do estradiol sobre a estrutura do estroma fibromuscular da cobaia em diferentes idades, visando identificar em cada idade o comportamento das células musculares lisas e das fibras da matriz extracelular frente a administração exógena do hormônio feminino.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização do trabalho, foram utilizados 10 cobaias machos *Cavia Porcellus* de cada idade: fase pré-púbere (10 dias após o nascimento), fase púbere (20 dias após o nascimento), pós-púbere (80 dias após o nascimento), e adulta (120 dias após o nascimento),

HORSFALL *et al.*, (1994); provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (SP).

Os animais em cada idade, depois de acondicionados em gaiolas no biotério do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, foram divididos aleatoriamente: 5 animais para o grupo controle e 5 para o grupo tratado. O grupo tratado recebeu injeção subcutânea semanal de Benzoato de Estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluído em óleo de Girassol (25mg/ml) na dose de 0,4ml/semana/animal durante quatro semanas, enquanto os animais do grupo controle receberam injeção subcutânea semanal do veículo farmacológico (Óleo de Girassol – 0,4ml/semana/animal), TAM & WONG (1991). Os animais da idade pré-púbere receberam dose única do hormônio aos 10 dias de vida, tendo em vista o período de desmame e a fragilidade do animal recém-nato.

Após 15 (fase pré-púbere), 50 (fase púbere), 110 (fase pós-púbere) e 150 (fase adulta) dias (pós-nascimento), os animais de ambos os grupos foram levemente anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical

Microscopia de luz

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

Parte do material fixado em Karnovsky, foi incluído em historresina Leica-historesin embedding kit e seccionado a 2-3 µm em micrótomo rotativo manual. Esse material processado para historresina foi corado pela Hematoxilina-eosina. Além desta coloração, feita para o estudo morfológico geral da próstata, os cortes histológicos foram corados pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 (MELLO & VIDAL, 1980) e pela Resorcina Fucsina de Weigert modificado, com oxidação prévia pelo ácido peracético (GOLDFISCHER *et al.*, 1983).

Os cortes histológicos de próstatas obtidos a partir da inclusão em Paraplast foram corados, segundo BEHMER *et al.* (1976), pelo Tricrômico de Masson e pela Reticulina de

Gömöri. , além da coloração pelo método do Picrossírius Hematoxilina (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). A documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio Zeiss-Jenamed, utilizando filmes Kodacolor 35mm, ASA 100.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

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

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 200 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático, com navalha de diamante. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% por 2 minutos (VENABLE & COGGESHALL, 1965, modificado). As telas foram analisadas em microscópio eletrônico Zeiss – EM910 no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia – UNESP, São José do Rio Preto-SP.

Análise morfométrico-estereológica

Utilizando um sistema analisador de imagens (Image Pro-Plus) foram capturadas imagens de 30 campos histológicos de cada grupo experimental (em cada idade). Foram avaliadas 5 lâminas por grupo experimental (uma por animal), onde foram coletadas 6 imagens de cada uma delas. As imagens capturadas foram submetidas a análise morfométrico-estereológica segundo WEIBEL, (1979), na qual se utiliza um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas. Assim, obteve-se a proporção ocupada em 30 campos histológicos para cada grupo, para os seguintes componentes: lume do ácino, epitélio glandular, estroma muscular, estroma não-muscular (inter-acinar e sub-epitelial).

As proporções obtidas em porcentagem foram submetidas ao Teste T Student, e foram consideradas significativas as diferenças onde $p < 0.05$.

RESULTADOS

A próstata lateral da cobaia foi caracterizada como uma glândula túbulo-acinar composta, onde os ácinos glandulares apresentam-se circundados por tecido conjuntivo e uma camada concêntrica de fibras musculares lisas.

Adjacente ao epitélio observou-se um eixo conjuntivo vascularizado que sustenta os ácinos prostáticos. Nos animais púberes esse feixe é bem visível e conta com razoável quantidade de tecido conjuntivo e vasos sangüíneos (figura 3a).

Circundando a mucosa glandular observou-se uma camada muscular relativamente espessa e concentricamente organizada (Figuras 1a, 3a, 5a, 7a).

Com o avançar da idade, houve aumento no diâmetro dos ácinos e túbulos da próstata nesta espécie. Em animais do grupo controle observou-se que o aumento no diâmetro luminal dos ácinos promoveu um estreitamento do feixe conjuntivo e também dos feixes de musculatura lisa que os circundam (Tabela 1).

Através de reações histoquímicas, observou-se que o estroma de animais em condições hormonais normais é escasso em fibras colágenas e elásticas, entretanto, aquelas que estão presentes são relativamente finas e curtas (Figuras 1b, 1d, 3b, 3d, 5b, 5d, 7b e 7e). Ultra-estruturalmente as fibras colágenas se arranjam adjacentes ao epitélio e entre as células estromais, em alguns locais formando feixes, no entanto, na maioria das vezes, estão dispersas pelo estroma. Já as fibras elásticas foram raramente observadas no estroma prostático de animais do grupo controle (Figuras 9, 10, e 11). Ademais, as fibras reticulares dispuseram-se em uma ou duas camadas de fibras mais delgadas e distendidas abaixo do epitélio glandular (Figuras 1c, 3c, 5c, 7d).

No grupo tratado, principalmente nas idades pré-púbere, pós-púbere e adulta, observou-se um aparente aumento na quantidade e na espessura das fibras colágenas (Figuras 2b, 6b, 6c, 8b, 8c, 12 e 13) e elásticas (2d, 6e, 8e, 12 e 13) que compõem a porção fibrilar do eixo conjuntivo onde repousam os ácinos prostáticos. Acompanhando as pregas do epitélio glandular, fibras colágenas espessas e contínuas foram observadas no feixe conjuntivo adjacente ao epitélio como indicado nas figuras 6b e 8c.

Após o tratamento as fibras reticulares adjacentes ao epitélio tornaram-se aparentemente mais espessas e onduladas, principalmente nas fases pré-púbere, pós-púbere e adulta (Figuras 2c, 6d, 8d). Além do arranjo supradescrito, as fibras reticulares se dispõem de forma circular e concêntrica acompanhando as fibras musculares lisas que circundam os ácinos prostáticos em ambos os grupos experimentais.

Além do aumento fibrilar no compartimento estromal, houve um aumento na espessura dos feixes musculares lisos nos animais tratados conforme sumarizado na tabela 1 e observado nas figuras 2a, 6a e 8a. Observa-se ainda, a presença de feixes de colágeno entremeando as células musculares lisas, que se arranjam, às vezes, de forma não concêntrica (Figuras 6c, 8b e 14), mostrando um arranjo diferente do encontrado no grupo controle (Figura 7c).

DISCUSSÃO

O estrógeno tem sido implicado na patogênese da hiperplasia benigna prostática e da neoplasia e parece ter importância no metabolismo dos andrógenos, estimulando o crescimento do estroma prostático e interferindo na via hipotalâmica-hipofisária-gonadal como já descrito anteriormente por THOMPSON *et al.*, 1979.

Os resultados mostraram aumento do componente muscular do estroma prostático nas idades pré-púbere, pós-púbere e adulta, bem como aumento na densidade fibrilar estromal frente ao hormônio estrogênico, caracterizando a hipertrofia estromal.

HORSFALL e colaboradores (1994), identificaram um aumento na capacidade sintética das células musculares lisas em humanos e em cobaias de idade avançada, onde são constatados maiores níveis de estrógenos e declínio nos níveis séricos de testosterona.

No caso do tratamento com estrógenos, vários são os relatos de aumento fibromuscular no estroma prostático *in vivo* (TAM & WONG, 1991; NEUBAUER *et al.*, 1981; RHODES *et al.*, 2000) e *in vitro* (RICCIARDELLI *et al.*, 1994).

DROLLER (1997) identificou receptores para estrógenos em fibroblastos. Segundo esse autor, o estrógeno induz os fibroblastos estromais a expressarem receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF-R), receptores para fator de crescimento de fibroblastos (FGF-R), além de aumentar o nível de receptores para andrógenos. Tal estímulo parece ser

responsável pelo aumento na síntese de fibras da matriz extracelular e da hipertrofia das células musculares lisas.

Em cobaias, a administração de estradiol em animais adultos recém-castrados provoca um significativo aumento de fibras colágenas (MARIOTTI & MARHINNEY, 1982). Em animais intactos, o estrógeno induz hipertrofia no estroma fibromuscular segundo descrito por THOMPSON *et al.*, 1979.

A distribuição do colágeno em feixes espessos no estroma prostático leva a crer que as microfibrilas tenham papel estrutural, estabelecendo uma malha flexível que garante a integridade do tecido quando sob deformação causada por contração e pela expansão das células musculares lisas após o tratamento com o estradiol. Arranjo semelhante foi observado por ZAIA *et al.*, 1996 durante processo de atrofia induzido em glândulas submandibulares de camundongos e por VILAMAIOR, 1998, na próstata ventral de ratos após orquiectomia.

As fibras elásticas são encontradas em tecidos sujeitos a movimentos de distensão e relaxamento repetitivos ou estiramento e encurtamento passivos, dotando estes tecidos de flexibilidade e extensibilidade elástica (CLEARY & GIBSON, 1996). Devido a hipertrofia estromal observada nos animais tratados com estradiol, compreende-se o aumento na distribuição de fibras do sistema elástico pelo estroma, visando provavelmente, dar suporte a expansão tecidual que ocorre após o tratamento.

A maioria dos receptores de estrógeno estão presentes no estroma, enquanto que na porção epitelial predominam receptores androgênicos (TILLEY *et al.*, 1985). Esta diferença na distribuição de receptores para o estrógeno sugere que o estroma fibromuscular deve ser mais sensível a este hormônio. Dados mais recentes, no entanto, mostram que o epitélio pode, assim como o estroma, desenvolver-se pelo estímulo estrogênico, apresentando lesões displásicas intraepiteliais, principalmente após a puberdade (SCARANO & TABOGA, 2002, manuscrito em preparo).

Neste estudo observou-se que os animais na idade púbere não foram tão sensíveis ao tratamento como os animais de outras idades. Tal achado pode se basear no fato de que, durante a puberdade a expressão de receptores estromais para o estrógeno na próstata diminui em função do aumento sérico dos níveis de testosterona (TILLEY *et al.*, 1987).

A ação do estrógeno sobre o estroma nas diferentes idades estudadas, infere que o crescimento fibromuscular observado em animais experimentais, em condições de suplementação estrogênica, independe, pelo menos em parte, dos níveis androgênicos.

A caracterização dos efeitos do tratamento crônico com Benzoato de Estradiol sobre a próstata de cobaias machos em diferentes fases, mostrou modificações provocadas pelo hormônio em questão sobre os componentes do estroma fibromuscular prostático, de modo que o prosseguimento deste estudo parece ser fundamental para a melhor compreensão dos fenômenos patológicos que envolvem o hormônio estrogênico nesta glândula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHMER OA; TOLOSA EMC, FREITAS-NETO AG, 1976. *Manual para histologia normal e patológica*. Edart-Edusp, São Paulo, 225p.
- CHANG SM & CHUNG LW, 1989. Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture: role of androgen. *Endocrinology*, **125**: 2719-2727.
- CLEARY EG & GIBSON MA, 1996. Elastic tissue, elastin and elastin associated microfibrils. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix – Molecular components and interactions*. Vol.2. Harwood, New York.
- 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.
- DROLLER MJ, 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol*, **79 (Suppl.) 2**: 42-52.
- GLAUERT AM, 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Practical methods in electron microscopy*. In: A.M. Glauert ed. N. Holland Publishing Company, NY, v.3., p.1-207.
- GOLDFISHER S, COLTOFF-SCHILLER B, SCHWARTZ E & BLUMENFELD OO. 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J. Histochem. Cytochem.* **31**:382-390.
- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Age-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI R, 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem* **11**: 447-455.
- LANE KE, LEAV I, ZIAR J, BRIDGES RS, RAND WM, HO SM, 1997. Supression of testosterone and estradiol-17Beta-induced dysplasia in the dorsolateral prostate of Noble rats by bromocriptine. *Carcinogenesis*. **18**:1505-1510.

- LEVINE AC, REN M, HUBER GK, KMRSCHENBAUM A, 1992. The effect of androgen, estrogen, and growth factors on the proliferation of cultured fibroblasts derived from human fetal and adult prostates. *Endocrinol.* **130**:2413-419.
- MARIOTTI A, MAWHINNEY M, 1982. The hormonal maintenance and restoration of guinea pig seminal vesicle fibromuscular stroma. *J. Urol.* **128**:852-57.
- MAWHINNEY MG & NEUBAUER BL. 1979. Actions of estrogen in the male. *Invest. Urol.*, **16**:409-420.
- MELLO MLS & VIDAL BC. 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher – Funcamp, Campinas, 71p.
- MOORE RJ, GAZAC JM, QUEBBEMAN JF, WILSON JD, 1979. Concentration of dihydrotestosterone and 3-alfa-androstanediol in naturally occurring and androgen-induced prostatic hyperplasia in the dog. *Clin. Invest.* **64**:1003-10.
- NEUBAUER B, MAWHINNEY M, 1981. Actions of androgen and estrogen on Guinea pig seminal vesicle epithelium and muscle. *Endocrinol.* **108**:680-687.
- RHODES L, DING VD, KEMP RK, KHAN MS, NAKHLA AM, PIKOUNIS B, ROSNER W, SAUNDERS HM & FEENEY WP. 2000. Estradiol causes a dose-dependent stimulation of prostate growth in castrated beagle dogs. *Prostate*, **44**: 8-18.
- RICCIARDELLI C, HORSFALL DJ, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Effects of oestradiol-17Beta and 5-alfa- dihydrotestosterone on Guinea pig prostate smooth muscle cell proliferation and steroid receptor expression in vitro. *J. Endocrinol.* **140**:373-383.
- ROHR HP & BARTSCH G. 1980. Human benign prostatic hyperplasia: A stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. *Urology*, **16**:625-633.
- SCARANO WR & TABOGA SR. 2002. Modificações do epitélio glandular prostático da cobaia *Cavia porcellus* frente à administração do estradiol em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. *Em preparo*.
- TAM CC, WONG YC, 1991. Ultrastructural study of the effects of 17 β -Oestradiol on the lateral prostate and seminal vesicle of the castrated Guinea Pig. *Acta anat.* **141**:51-62.
- THOMPSON AS, ROWLEY DR, HEIDGER Jr. PM, 1979. Effects of estrogen upon the fine structure of epithelium and stroma in the rat ventral prostate gland. *Invest. Urol.* **17**: 83-9.

- TILLEY WD, HORSFALL DJ, CANT ELM, MARSHALL VR, 1985. Specific binding oestradiol to guinea pig prostate cytosol and nuclear fractions. *J. Steroid. Biochem.* **22**:705-711.
- TILLEY WD, HORSFALL DJ, McGEE MA, HENDERSON DW & MARSHALL VR, 1987. Distribution of oestrogen and androgen receptors between the stroma and epithelium of the Guinea-pig prostate. *J. Steroid Biochem.*, **22**:713-719.
- VENABLE JH, COGGESHALL R, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* **25**: 407-408.
- VILAMAIOR, PSL, 1998. *Estudo de alguns componentes macromoleculares do estroma da próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia*. Tese de Mestrado. Unicamp. Campinas-SP, Brasil, 59p.
- WALSH PC. 1984. Human benign prostatic hyperplasia: Etiological considerations. In *Progress in Clinical and Biological Research*, vol. 145, *New approaches in the study of benign prostatic hyperplasia*. Eds. F. A. Kimball, A.E. Buhl & D.B. Carter. New York: Alan R. Liss.
- WATSON ML. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**:475-478.
- WEIBEL, E.R., 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, **12**:131-155.
- ZAIA AA, COLETTA RD, ALMEIDA OP, LINE SRP, 1996. Expression of collagen and elastic fibers in duct-ligated submandibular glands of mice. *Eur. J. Oral Sci.*, **104**:627-629.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figuras 1a-d - Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo controle, idade pré-púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (m) que circunda o ácino glandular e a camada conjuntiva (cabeça de seta) abaixo do epitélio (e) pouco visível. Hematoxilina-Eosina em historresina. 232X. **(b)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se fibras colágenas (cabeça de seta) entre o epitélio glandular e o feixe de fibras musculares lisas. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 725X. **(c)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde está evidenciada uma camada delgada de fibras reticulares (cabeça de seta) logo abaixo do epitélio e em disposição circular acompanhando os feixes de musculatura que envolvem os ácinos. Reticulina de Gömöri em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se, raramente, a presença de fibras elásticas (cabeça de seta) na lâmina própria. Resorcina-Fucsina em historresina. 580X.

Figuras 2a-d – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo tratado, idade pré-púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (m) que circunda o ácino glandular a camada conjuntiva vascular (cabeça de seta) abaixo do epitélio (e) bem visível. Hematoxilina-Eosina em historresina. 232X. **(b)** – Detalhe de uma prega epitelial onde nota-se a presença de fibras espessas de colágeno (seta) na lâmina própria. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 580X. **(c)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas as fibras reticulares logo abaixo do epitélio (cabeça de seta) acompanhando o delineamento da lâmina basal e fibras se arranjando ao redor das células musculares lisas. Reticulina de Gömöri em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se um aumento da lâmina própria e em consequência das fibras elásticas (cabeça de seta). Resorcina-Fucsina em historresina. 580X.

Figuras 3a-d – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo controle, idade púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a organização do epitélio (e), da camada muscular (m) que circunda o ácino e da camada conjuntiva vascular (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina em historresina. 232X. **(b)** – Detalhe da transição

estroma-epitélio onde observa-se fibras colágenas delgadas (seta) abaixo do epitélio e entre as células musculares lisas. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 725X. **(c)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas fibras reticulares mais espessas logo abaixo do epitélio (cabeça de seta) e fibras mais delgadas dispostas entre as células da camada muscular. Reticulina de Gömöri em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se poucas fibras elásticas (cabeça de seta) distribuídas pela lâmina própria. Resorcina-Fucsina em historresina. 580X.

Figuras 4a-d – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo tratado, idade púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (m) que circunda o ácino e a camada conjuntiva vascular (cabeça de seta) abaixo do epitélio (e). Hematoxilina-Eosina em historresina. 116X. **(b)** – Detalhe de pregas epiteliais na transição epitélio-estroma onde nota-se a presença de fibras de colágeno (seta) mais espessas na lâmina própria. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 725X. **(c)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas as fibras reticulares que circundam as células estromais e camadas mais espessas abaixo do (cabeça de seta). Reticulina de Gomory em paraplast. 290X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se um aparente aumento na marcação de fibras do sistema elástico (cabeça de seta). Resorcina-Fucsina em historresina. 464X.

Figuras 5a-d – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo controle, idade pós-púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (m) que circunda o ácino e a camada conjuntiva abaixo do epitélio (e). Hematoxilina-Eosina em historresina. 91X. **(b)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se fibras colágenas bem delgadas (cabeça de seta) entre o epitélio glandular e o feixe muscular. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 464X. **(c)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas fibras reticulares mais espessas logo abaixo do epitélio (cabeça de seta) e fibras mais delgadas dispostas entre as células da camada muscular. Reticulina de Gomory em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se, raramente, a presença de fibras elásticas na delgada lâmina própria. Resorcina-Fucsina em historresina. 464X.

Figuras 6a-e – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo tratado, idade pós púbere. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (seta) que circunda o ácino glandular mais espessa e a camada conjuntiva vascular (cabeça de seta) abaixo do epitélio (e) bem visível. Hematoxilina-Eosina em historresina. 91X. **(b)** – Detalhe de uma prega epitelial onde nota-se a presença de fibras espessas de colágeno (seta) na lâmina própria. Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 725X. **(c)** – Detalhe da lâmina própria mostrando o aumento de fibras colágenas (azul) e a presença de células musculares lisas (smc) que se entremeiam entre essas fibras. Tricrômico de Masson em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas as fibras reticulares logo abaixo do epitélio (cabeça de seta) acompanhando o delineamento da lâmina basal. Reticulina de Gomory em paraplast. 725X. **(e)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se um aumento da lâmina própria e na densidade das fibras elásticas (cabeça de seta). Resorcina-Fucsina em historresina. 580X.

Figuras 7a-e – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias do grupo controle, idade adulta. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular (m) delgada que circunda o ácino glandular e a camada conjuntiva pouco visível abaixo do epitélio (e). Hematoxilina-Eosina em historresina. 145X. **(b)** – Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se fibras colágenas bem delgadas (cabeça de seta). Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 725X. **(c)** – Detalhe de um ácino prostático mostrando a íntima relação entre o epitélio e a camada concêntrica de fibras musculares lisas (vermelho) com poucas fibras colágenas (azul) entre eles. Tricrômico de Masson em paraplast. 464X. **(d)** – Detalhe de um ácino prostático onde estão evidenciadas as fibras reticulares (cabeça de seta) logo abaixo e em disposição circular acompanhando os feixes de musculatura que envolvem os ácinos. Reticulina de Gomory em paraplast. 290X. **(e)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se a presença de poucas fibras elásticas (cabeça de seta) na lâmina própria delgada. Resorcina-Fucsina em historresina. 464X.

Figuras 8a-e – Cortes histológicos de fragmentos da próstata de cobaias do grupo tratado, idade adulta. **(a)** - Visão geral de um ácino prostático mostrando a camada muscular espessa (seta) em meio as fibras estromais (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina em historresina.

181X. **(b)** – Visão de um ácino prostático onde observa-se as fibras colágenas (azul) logo abaixo do epitélio e em meio a camada muscular (vermelho). Tricrômico de Masson em paraplast. Aumento: 145X. **(c)** - Detalhe de uma prega epitelial na transição epitélio-estroma onde nota-se a presença de fibras espessas de colágeno (seta). Picrossírius-Hematoxilina em paraplast. 580X. **(d)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde estão evidenciadas as fibras reticulares logo abaixo do epitélio (cabeça de seta) as fibras que se arranjam ao redor das células musculares lisas. Reticulina de Gomory em paraplast. 725X. **(e)** - Detalhe da transição estroma-epitélio onde observa-se um aumento na densidade de fibras (cabeça de seta) do sistema elástico na lâmina própria da lâmina própria. Resorcina-Fucsina em historresina. 580X.

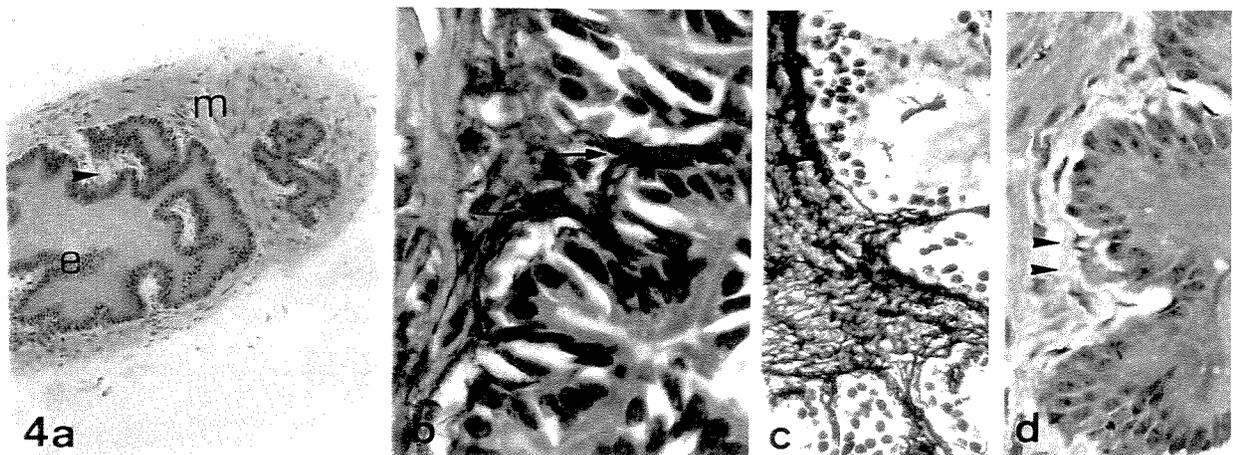
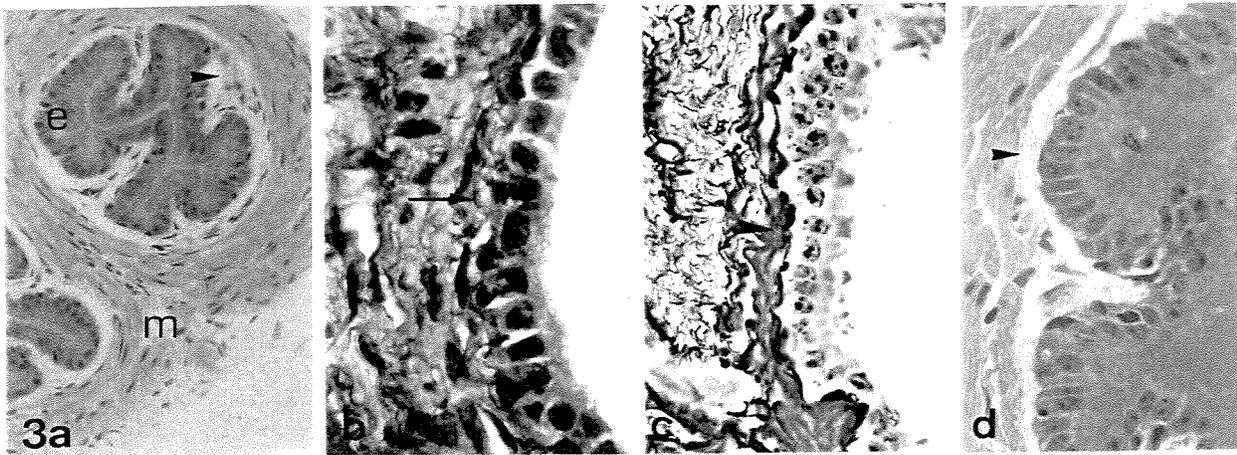
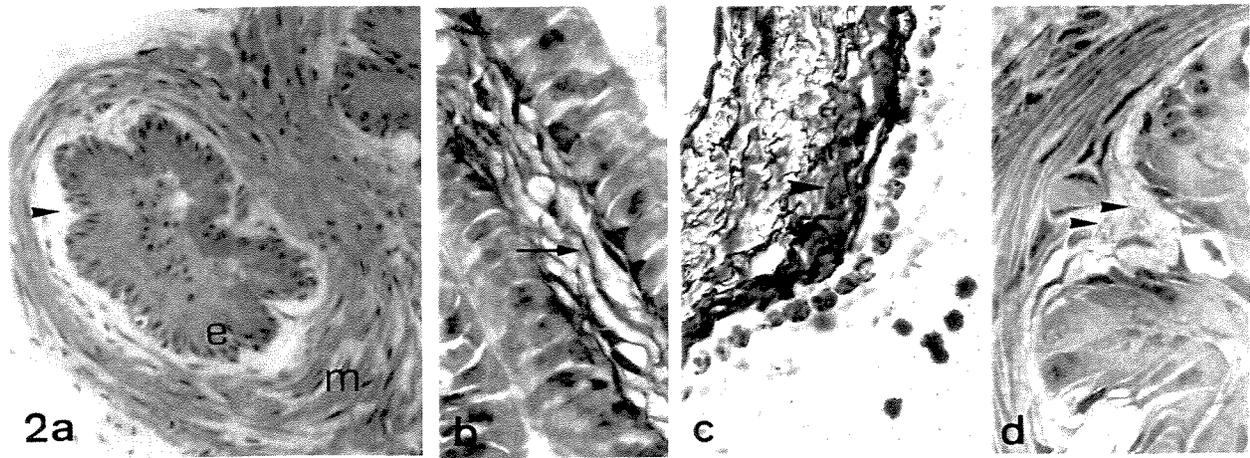
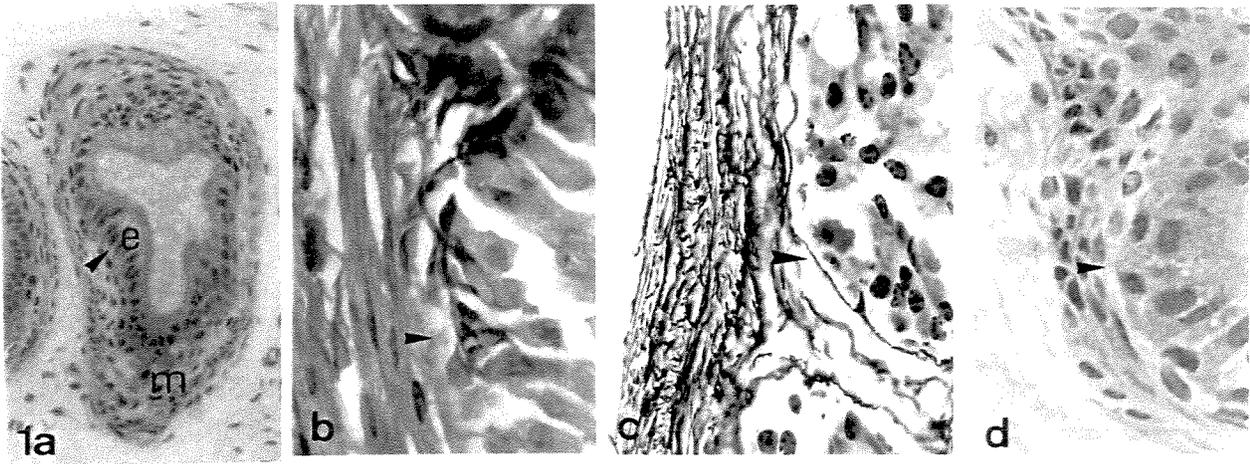
Figuras 9-14 – Cortes ultra-finos de próstatas de cobaias observados à microscopia eletrônica de transmissão. Nas figuras **9, 10 e 11** são observados detalhes do estroma fibromuscular de animais controle púbere, pós-púbere e adulto, respectivamente, mostrando as fibras colágenas (cabeça de seta) adjacentes a lâmina basal (bm) e entremeando-se entre as células musculares lisas (smc) e fibroblastos (f). Notar em 10 e 11 a presença de células basais (bc). 7.913X. Na figura **12** observa-se em detalhe o estroma fibromuscular de um animal pós-púbere tratado mostrando os feixes colágenos (co) distribuídos entre os fibroblastos (f) e as células musculares lisas (smc). Há presença de feixes elásticos (el) distribuídos com certa abundância sob o epitélio glandular (ep) e entre as células do estroma. 20.000X. A figura **13** mostra a transição epitélio-estroma de um animal adulto tratado, onde há abundância de feixes colágenos (co) abaixo do epitélio (ep) acompanhando o delineamento da lâmina basal (cabeça de seta) e entre as células estromais. Nota-se a presença de células musculares lisas (smc) e fibras do sistema elástico (el) espalhadas no estroma conjuntivo. 10.200X. **14** – Detalhe do estroma fibromuscular de um animal pós-púbere tratado onde observa-se abundância de feixes de colágeno (co) intercalados entre as células musculares lisas (seta) sob a lâmina basal (cabeça de seta) do epitélio glandular prostático (ep). 12.930X.

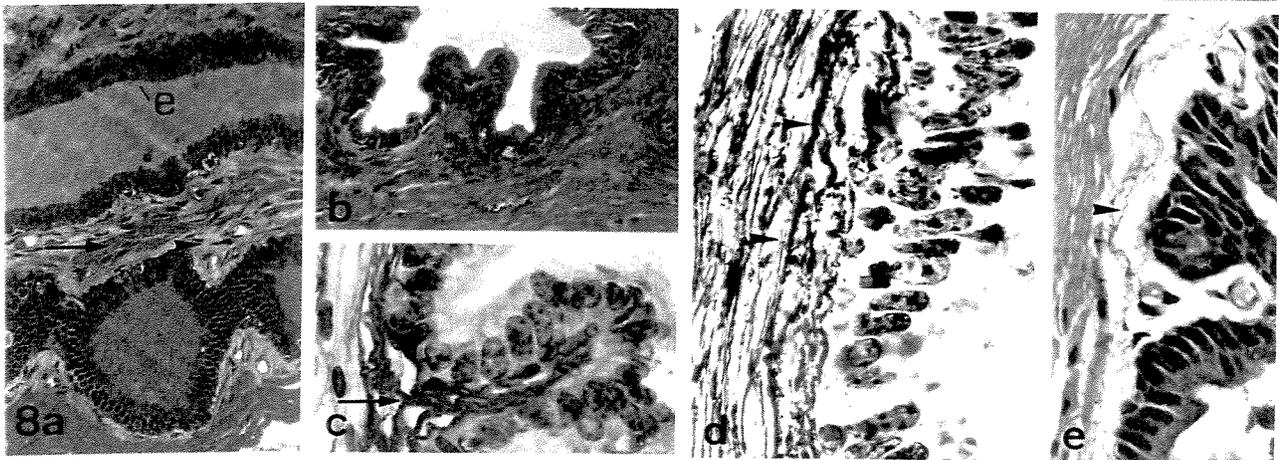
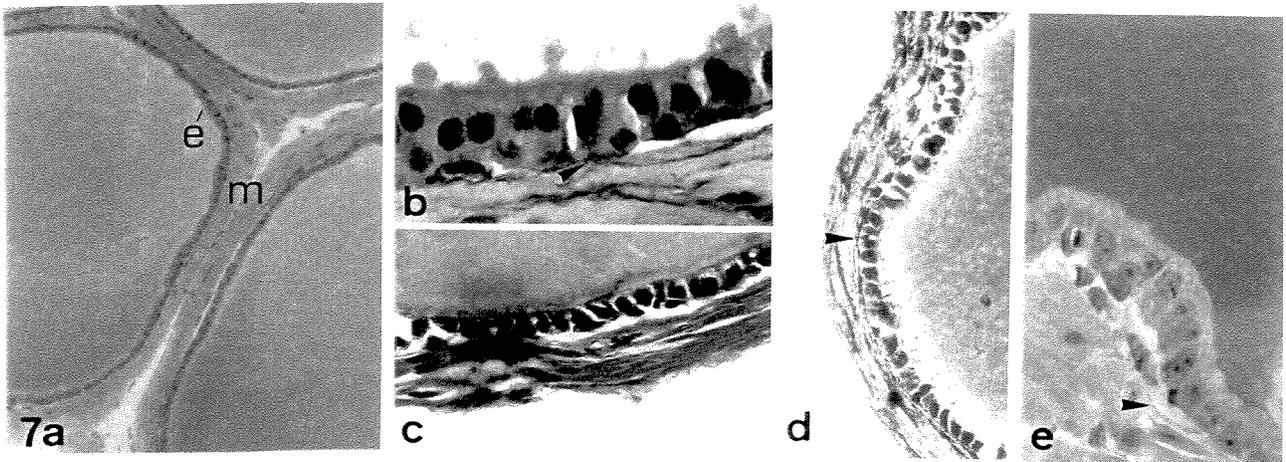
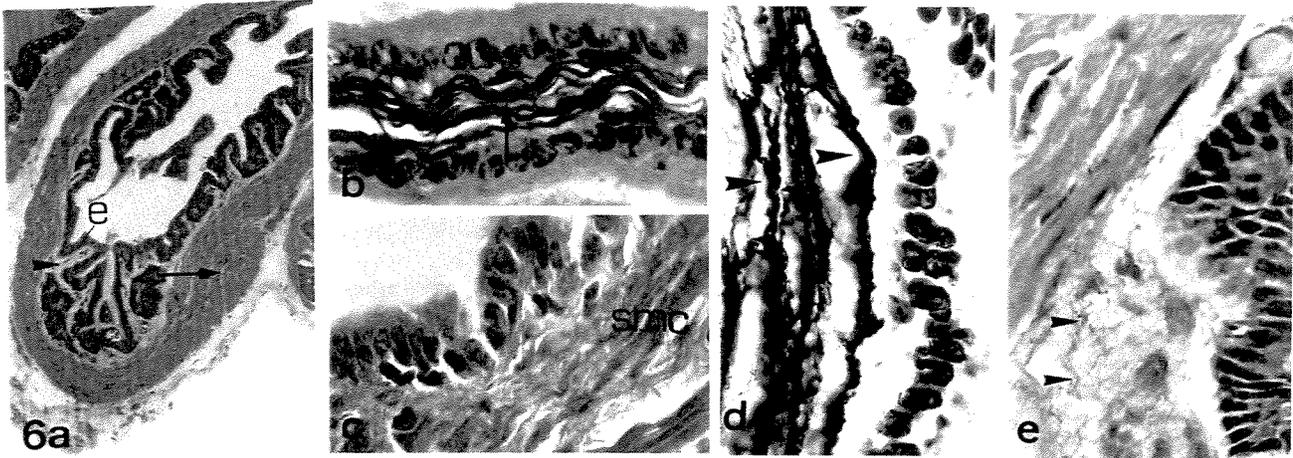
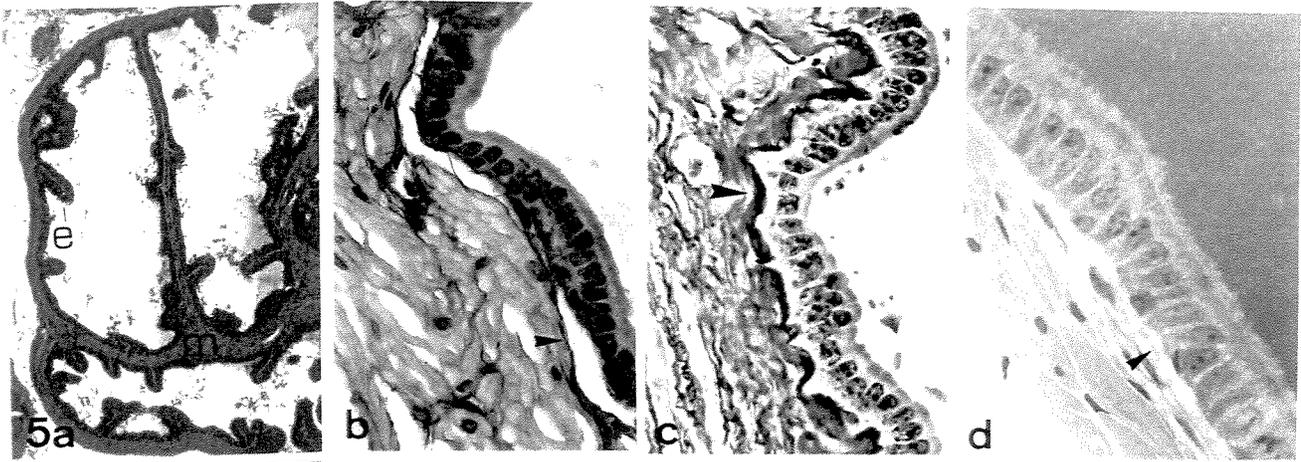
TABELA 1 – Frequência relativa dos componentes prostáticos (%) obtida à partir de análise morfométrico-estereológica de cobaias em diferentes idades.

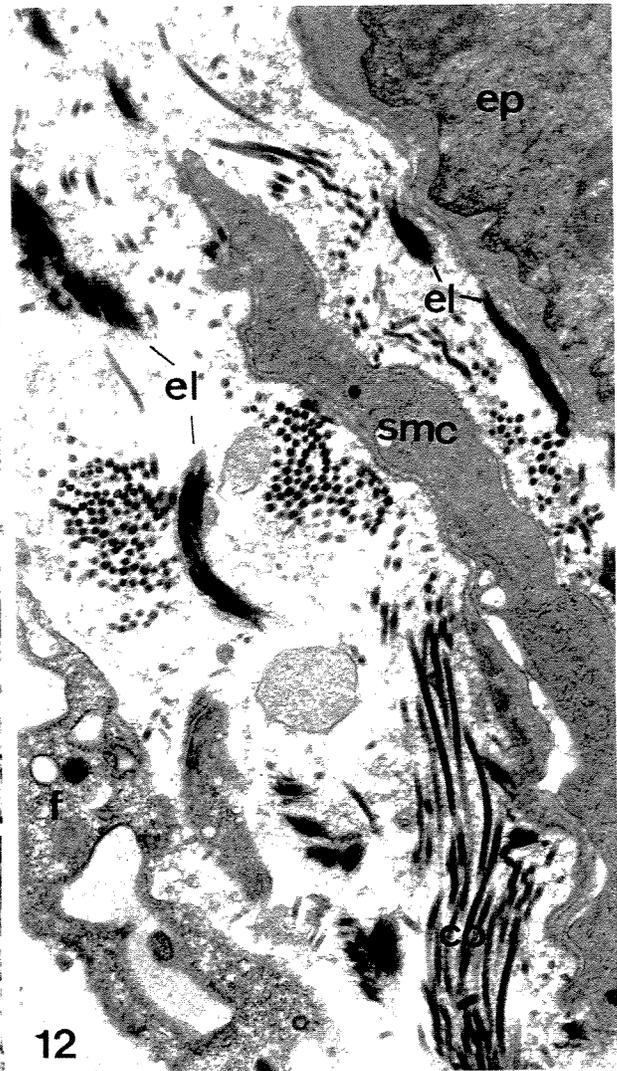
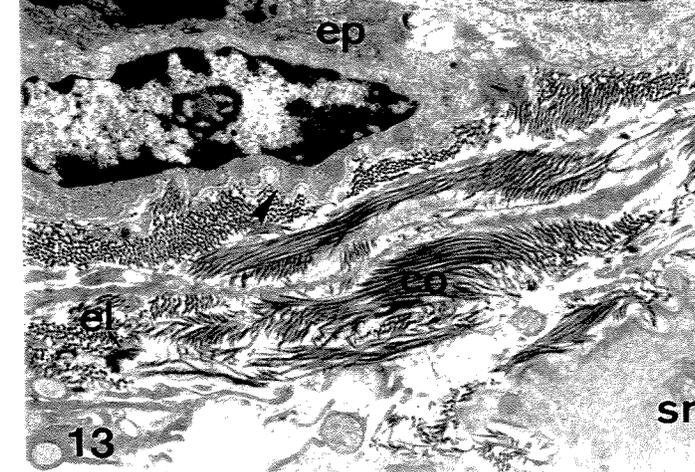
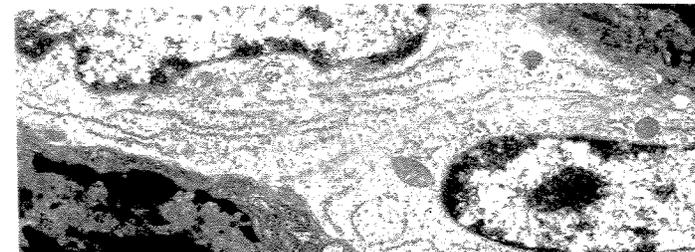
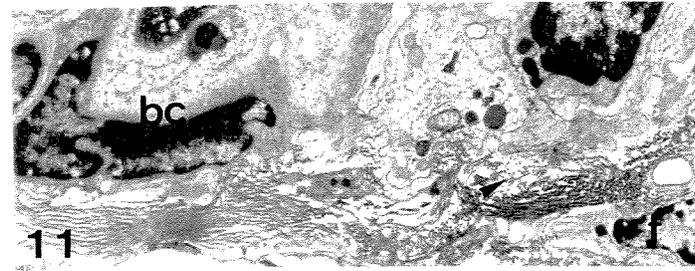
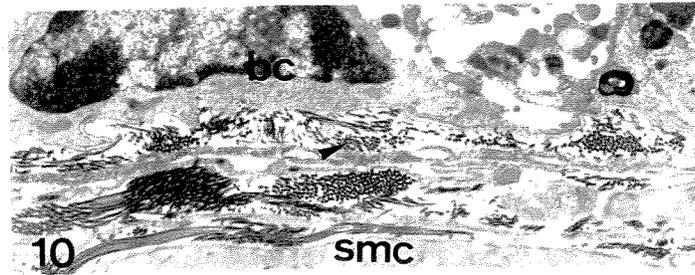
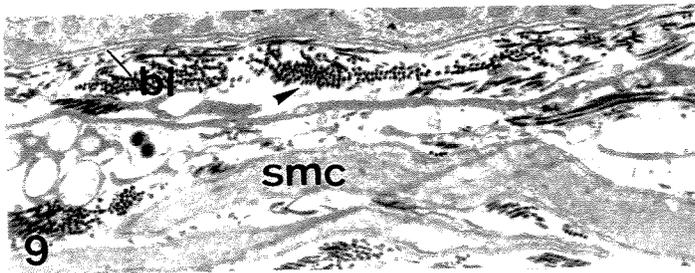
	Ephitelium	Non-muscular stroma	Muscular stroma	Lumen of the acini
Pre-puberal age	C- 23.31±2.69	C- 38.03±2.68*	C- 25.31±2.11*	C- 13.36±3.77
	T- 21.19±3.11	T- 21.64±3.83	T- 40.37±2.72	T- 16.80±4.29
Puberal age	C- 20.20±1.91	C- 26.41±3.73	C- 38.55±2.84	C- 14.84±1.95
	T- 29.27±3.61	T- 27.58±5.72	T- 24.35±3.52	T- 18.81±3.14
Post-puberal age	C- 17.38±1.91*	C- 14.87±1.93*	C- 25.26±3.05 *	C- 40.46±3.97*
	T- 30.36±1.83	T- 27.18±2.22	T- 27.28±4.23	T- 17.21±2.57
Adult age	C- 18.46±2.29*	C- 22.21±3.39*	C- 28.26±2.97**	C- 30.77±2.99*
	T- 25.23±3.01	T- 27.28±3.96	T- 30.49±2.39	T- 17.00±2.38

Test T Student: *p≤0.05, **p≤0.01

C= Control Group; T= Estrogen Treated Group







MODIFICAÇÕES DO EPITÉLIO GLANDULAR PROSTÁTICO DA COBAIA *Cavia porcellus* FRENTE À ADMINISTRAÇÃO DO ESTRADIOL EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

Wellerson Rodrigo Scarano ¹ e Sebastião Roberto Taboga²

¹ Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP, CP 6109 – 13084-971- Campinas, SP. Brasil

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

Título resumido: Efeito do estrógeno sobre epitélio prostático.

Palavras-chave: Cobaia; epitélio glandular; próstata; estradiol

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n.º 00/06136-1).

Endereço para correspondência:

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

RESUMO

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor dos mamíferos com grande volume e alta importância funcional. Muitos trabalhos inferem que, em adição aos andrógenos, os estrógenos podem estar associados com a hiperplasia benigna prostática e o câncer prostático, mas não existem evidências conclusivas sobre o papel dos estrógenos no tecido prostático normal e neoplásico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração crônica de Benzoato de Estradiol sobre a próstata lateral de cobaias nas fases pré-púbere, púbere, pós-púbere e adulta, com enfoque às modificações provocadas por este hormônio sobre o epitélio glandular. Foram utilizados 10 animais de cada idade, sendo que, aleatoriamente 5 foram destinados ao grupo controle e 5 ao grupo experimental, que recebeu injeção subcutânea semanal de Benzoato de Estradiol. Após o tratamento os órgãos foram coletados, fixados e processados para o estudo em microscopias de luz e eletrônica de transmissão. A análise histopatológica do material revelou regiões onde há ocorrência da Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP). Após análise ultra-estrutural, foi observada dilatação das membranas internas, heterogeneidade nos tipos celulares, hipertrofia de células basais e diminuição aparente das organelas citoplasmáticas em algumas células da NIP nos animais experimentais. Observou-se ainda, perda da polaridade celular, núcleos de diversas formas, tamanhos, em diferentes alturas e com padrões de distribuição cromatínica irregular. Tais alterações foram encontradas principalmente nos animais púberes, pós-púberes e adultos frente a administração crônica do estradiol. Tais dados reforçam os já existentes no entendimento do papel do estrógeno na etiologia das doenças prostáticas.

INTRODUÇÃO

A diferenciação e função das células prostáticas têm sido tradicionalmente, considerados processos exclusivamente dependente de andrógeno. No entanto vários estudos revelam o papel do estrógeno como agente proliferativo capaz de provocar metaplasias epiteliais (PILKKÄNEM, 1993), lesões hiperplásicas e displásicas (McNEAL, 1988) e adenocarcinomas (LEAV *et al*, 1988).

Há evidências de que muitos processos biológicos no tecido epitelial prostático são controlados por andrógenos e estrógenos através da produção de fatores estimulatórios e inibitórios pelo estroma e pelo tecido epitelial adjacente (CUNHA *et al.*, 1987; PRINS & BIRCH, 1995).

Os receptores de estrógeno β estão presentes nas células epiteliais basais e acinares (DROLLER, 1997). O estrógeno induz os fibroblastos estromais a expressarem receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF-R), além de aumentar o nível de receptores de andrógenos e estimular as células basais a produzirem fatores de crescimento que atuam nas células epiteliais (DROLLER, 1997).

Em ratos, o tratamento neonatal com 17 Beta-estradiol induz alterações metaplásicas irreversíveis no epitélio das regiões periuretrais da glândula de coagulação, dos ductos ejaculatórios, e de regiões da parede dorsal da uretra (ARAI *et al.*, 1977). Em adição à metaplasia escamosa, a exposição ao estradiol resulta na redução do tamanho dos órgãos reprodutores masculinos e causa persistentes mudanças no volume relativo dos componentes do tecido prostático (PYLKKÄNEN *et al.*, 1993).

Muitos trabalhos tem tentado esclarecer o papel do estrógeno sobre o tecido epitelial normal e neoplásico, no entanto, os resultados ainda são controversos. Por isso, o presente estudo pretende avaliar o papel do hormônio estrogênico sobre o epitélio glandular prostático em cobaias intactas tratadas com Benzoato de Estradiol em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização do trabalho, foram utilizados 10 cobaias machos (*Cavia Porcellus*) de cada idade: fase pré-púbere (10 dias após o nascimento), fase púbere (20 dias após o nascimento), pós-púbere (80 dias após o nascimento), e adulta (120 dias após o nascimento), HORSFALL *et al.*, (1994); provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (SP).

Os animais em cada idade, depois de acondicionados em gaiolas no biotério do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, foram divididos aleatoriamente: 5 animais para o grupo controle e 5 para o grupo tratado. O grupo tratado recebeu injeção subcutânea semanal de Benzoato de Estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluído em óleo de Girassol (25mg/ml) na dose de 0,4ml/semana/animal durante quatro semanas, enquanto os animais do grupo controle receberam injeção subcutânea semanal do veículo farmacológico (Óleo de Girassol – 0,4ml/semana/animal), TAM & WONG (1991). Os animais da idade pré-púbere receberam dose única do hormônio aos 10 dias de vida, tendo em vista o período de desmame e a fragilidade do animal recém-nato.

Após 15 (fase pré-púbere), 50 (fase púbere), 110 (fase pós-púbere) e 150 (fase adulta) dias (pós-nascimento), os animais de ambos os grupos foram levemente anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical.

Microscopia de luz

As próstatas removidas foram fixadas por imersão em Karnovsky modificado (solução de paraformaldeído a 2% e de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sörensen, pH 7,2 – 0,1M) (GLAUERT, 1975), lavadas em água, desidratadas em etanol, incluídas em historresina Leica-historresin embedding kit e seccionado a 2-3 μ m em micrótomo rotativo manual. Esse material processado para historresina foi corado pela Hematoxilina-eosina. Além desta coloração, feita para o estudo morfológico geral da próstata, os cortes histológicos foram corados pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0 (MELLO & VIDAL, 1980).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

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

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

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 200 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático, com navalha de diamante. Estes cortes foram contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% por 2 minutos (VENABLE E COGGESHALL, 1965, MODIFICADO). As telas foram analisadas em microscópio eletrônico Zeiss – EM910 no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia – UNESP, São José do Rio Preto-SP.

RESULTADOS

As análises estruturais e ultra-estruturais obtidas à partir do tratamento com Estradiol na cobaia mostraram padrões epiteliais, normais e alterados, comuns para a maioria das idades estudadas. Portanto, os resultados aqui apresentados serão descritos de forma geral, preocupando-se, no entanto, com particularidades encontradas em fases distintas.

O epitélio normal encontrado nos animais controles e em algumas regiões do epitélio glandular dos animais tratados são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas, variando de acordo com a região prostática e a idade do animal, podendo assumir característica de cúbicas ou pseudo-estratificadas (Figuras 1a, 2a, 3a, 4a, 5 e 10). Observou-se ainda, a presença das células basais em contato íntimo com a membrana basal (Figura 5).

As células epiteliais apresentam o complexo de Golgi bastante proeminente que localiza-se entre o núcleo, de localização basal, e a borda luminal, em uma área que aparece pouco corada à microscopia de luz (Figuras 1a, 2a, 3a e 4a).

Em meio ao epitélio glandular, nos animais adultos controle, foram identificadas populações celulares com fenótipo sintético, identificadas como claras e escuras (Figuras 4b e 11). Estas células apresentaram grânulos de extrusão na superfície, característicos de secreção do tipo apócrina e, por vezes merócrina.

Os núcleos se dispõem preferencialmente de forma polarizada na região basal das células, e na maioria dos casos têm a forma ovalada apresentando um aspecto regular de distribuição dos elementos cromatínicos (Figuras 2a, 3a e 4a).

Em linhas gerais, nos animais tratados com Benzoato de estradiol observou-se modificações na estrutura epitelial como aumento na densidade populacional de células com padrões de estratificação identificados como ondulado e cribriforme, heterogeneidade nos padrões celulares (displasia) (Figuras 2b, 3b, 4c, 4d, 12 e 16), alongamento citoplasmático (Figura 14), alteração no tamanho e forma dos núcleos (Figuras 1b, 8, 12 e 16), perda da polaridade basal e proeminência dos nucléolos (Figuras 2b, 3b e 12). Essas modificações caracterizam, em linhas gerais, a chamada Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP). Apesar de apresentarem processos hiperplásicos e displásicos, notou-se a integridade das membranas basais e das junções celulares laterais descaracterizando um processo neoplásico invasivo e maligno (Figuras 12 e 14).

Além das alterações descritas, o epitélio glandular dos animais tratados apresentou hipertrofia de células basais (Figuras 6 e 13), dilatação das membranas internas (Figuras 6, 8, 9, 12, 13, 14 e 16) e processos apoptóticos em meio à hiperplasia epitelial (Figuras 2b e 15). As modificações epiteliais descritas foram, sem dúvida, mais severas nos animais experimentais após a puberdade.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram as alterações morfológicas no epitélio prostático provocadas pela administração experimental do Benzoato de estradiol, preocupando-se em avaliar os efeitos morfológicos tecidual e celular. No entanto, a discussão se baseia em dados fisiopatológicos com enfoque endocrinológico (hormonal), os quais dão importante suporte bibliográfico para os achados estruturais aqui avaliados, sem no entanto, fazer parte dos objetivos do presente estudo.

O tratamento crônico com o estradiol propiciou o aparecimento focal de lesões intraepiteliais. Estas alterações no componente epitelial foram descritas anteriormente em humanos, como sendo a neoplasia intraepitelial prostática (SHIBATA et al., 1996) e, em animais experimentais estrogeneizados (PYLKKÄNEN, 1993).

A ação do estrógeno na próstata, principalmente no epitélio, pode ser mediado indiretamente pelo aumento da concentração de prolactina no sangue. Estudos realizados na próstata lateral de ratos mostraram que o estrógeno estimula a secreção de prolactina pela

hipófise (NEIL *et al.*, 1971). Alguns pesquisadores demonstraram que a elevação sérica de prolactina promove um efeito trófico na próstata lateral de ratos aumentando a conversão de diidrotestosterona no tecido (SCHACHT *et al.*, 1992).

THOMPSON e colaboradores (1979) demonstraram que o efeito estimulatório do estrógeno sobre o epitélio da vesícula seminal de ratos foi anulado na ausência da prolactina. Em acréscimo, o acúmulo de fluido como é observado em algumas espécies de ratos após o tratamento com estrógenos é parcialmente suprimido após a administração de um agente inibidor da prolactina (CORRALES *et al.*, 1981).

LANE e colaboradores (1997) demonstraram que a hiperprolactinemia provocada pelo aumento no nível sérico de estrógenos tem um papel importante na indução de hiperplasia e displasia epitelial na próstata lateral e dorsal de ratos.

No entanto, estudos recentes demonstram que as células epiteliais basais e secretoras possuem receptores para o estrógeno. Segundo DROLLER (1997), o estrógeno é capaz de induzir os fibroblastos estromais a expressarem receptores para fatores de crescimento epidermal, aumentar o nível de receptores androgênicos e estimular as células epiteliais basais da próstata a produzir fatores de crescimento que atuam nas células epiteliais luminais. Estes dados justificam, em parte, a hipertrofia nas células epiteliais basais e luminais observada em nosso trabalho.

O aparecimento de carcinomas em humanos, segundo dados epidemiológicos, está associado a altas taxas séricas de fator de crescimento I ligado a insulina (IGF-I) (CHAN *et al.*, 1998). O IGF-I mostrou ser um agente anti-apoptótico e mitogênico na glândula prostática. A persistente expressão de IGF-I no epitélio basal da próstata de camundongos levou ao aparecimento de neoplasia nesse tecido (DiGIOVANINI *et al.*, 2000).

Tanto no câncer prostático como na hiperplasia benigna prostática observa-se a expressão de receptores para IGF-I. Segundo COHEN e colaboradores (1994), as células estromais produzem IGF-I em resposta aos androgênios, que atua via autócrina nas células estromais, ou via parácrina estimulando a proliferação epitelial. A expressão de receptores para IGF-I mostrou ser importante no processo apoptótico, na metástase de células prostáticas (BURFEIND *et al.*, 1996) e na gênese tumoral (DiGIOVANINI *et al.*, 2000). Esse fato pode justificar, dentre outros, o processo apoptótico observado na NIP, além do aumento dos processos apoptóticos na hiperplasia nodular prostática (TABOGA, 1999).

Em estudo recente, HUYNH e colaboradores (2001) sugerem que, na próstata, a expressão de receptores para IGF-I é dependente de estrógeno, enquanto a expressão de IGF-I é dependente de andrógeno.

Tal resultado demonstra o porquê dos tratamentos combinados de estrógeno e testosterona serem mais efetivos em provocar lesões de natureza pré-maligna (PYLKKÄNEN *et al*, 1993) e maligna (BOSLAND *et al*, 1995) e, justificam também, porque observamos mais freqüentemente as lesões intraepiteliais após a puberdade, onde os níveis de testosterona podem potencializar a ação do estrógeno no epitélio glandular.

Foi observada dilatação das membranas internas das células epiteliais de padrão cribriforme e de células não estratificadas de animais tratados. Devido à hipertrofia e à displasia epitelial, não foi possível identificar a origem das membranas dilatadas, no entanto, entende-se que esse processo é produto do desbalanço metabólico provocado pelo processo de hipertrofia, onde ocorre síntese de componentes para o crescimento celular (MONTENEGRO & FRANCO, 1995). Além disso, sabe-se que as endomembranas, principalmente o retículo endoplasmático liso, são recrutadas durante os processos metabólicos que envolvem síntese e processamento de esteróides e lipídios (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001).

Nos animais tratados, principalmente, nas idades pós-púbere e adulta notamos núcleos com fenótipos irregulares, por vezes com aparência bizarra, em grande quantidade no epitélio glandular.

Efeitos semelhantes a estes foram detectados em ratos castrados, após administração de testosterona. ECHEVERRIA e colaboradores (1993) demonstraram que existe uma expressão superestimada de proteínas de matriz nuclear, o que proporciona alterações fenotípicas nos núcleos.

Os resultados obtidos aqui, demonstram que o estrógeno é um importante agente indutor de modificações no epitélio glandular principalmente após a puberdade, tendo um papel relevante na gênese das lesões proliferativas intraepiteliais, da displasia e da hipertrofia epitelial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAI Y, SUZUKI Y, NISHIZUKA Y, 1977. Hyperplastic and metaplastic lesions in the reproductive tract of male rats induced by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Virchows Arch.* 376:21-28.
- BOSLAND MC, FORD H & HORTON L. 1995. Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17B or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*, 16:1311-1317.
- BURFEIND P, CHERNICKY CL, RINISLAND F, ILAN J & ILAN J. 1996. Antisense RNA to the type I Insulin-like growth factor receptor supresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells *in vivo*. *PNAS*, 93:7263-7268.
- CARVALHO HF & RECCO-PIMENTEL SM. 2001. *A Célula 2001*. 1st. Ed. Editora Manole. São Paulo, 287p.
- CHAN JM, STAMPFER MJ, GIOVANUCCI E, GANN PH, MA J, WILKINSON P, HENNEKENS CH & POLLAK M. 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*, 279:563-566.
- COHEN P, PEEHL DM, BAKER B, LIU F, HINTZ RL & ROSENFELD RG. 1994. Insulin-like growth factor axis abnormalities in prostatic stromal cells from patients with benign prostatic hyperplasia. *Journ. Clin. Endocr. Metab.*, 79:1410-1415.
- CORRALES JJ, KADOHAMA N, CHAI LS, HOISAETER PA, HAMPTON MT, MURPHY GP, SANDBERG AA, 1981. Fluid imbibition as a factor in estrogen-induced increased of prostate weight in castrated rats. *Prostate*. 2:337-358.
- 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, COOKE PS, MEE S, BIGSBY RM, HIGGINS SJ & SUGIMURA Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, 8:338-362.
- DiGIOVANNI J, KIGUCHI K, FRIJHOFF A, WILKER E, BOL DK, BELTRAN L, MOATS S, RAMIREZ A, JORCANO J, CONTI C, 2000. Deregulated expression of

- insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *PNAS*. **97**:3455-3460.
- DROLLER MJ, 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol*, **79 (Suppl.) 2**: 42-52.
- ECHEVERRIA O. et al. (1991). Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol. Cell*. **72**: 223-29.
- GLAUERT AM, 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological specims. *Practical methods in electron microscopy*. In: A.M. Glauert ed. N. Holland Publishing Company, NY, v.3., p.1-207.
- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Age-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- HUYNH H, ALPERT L, ALAOUI-JAMALI MA, NG CY, CHAN TWM, 2001. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J. Endocr.* **171**: 109-118.
- LANE KE, LEAV I, ZIAR J, BRIDGES RS, RAND WM, HO SM, 1997. Supression of testosterone and estradiol-17Beta-induced dysplasia in the dorsolateral prostate of Noble rats by bromocriptine. *Carcinogenesis*. **18**:1505-1510.
- LEAV L, HO SM, OFNER P, MERK FB, KWAN PWL & DAMASSA D. 1988. Biochemical alterations in Sex hormone induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**:1045-1053.
- McNEAL JE, ALROY J, LEAV I, REDWINE EA, FREIHA FS, STAMEY TA, 1988. Immunohistochemical evidence for impaired cell differentiation in the premalignant phase of prostate carcinogenesis. *Am. J. Clin. Pathol.* **90**:23-32.
- MELLO MLS & VIDAL BC. 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher – Funcamp, Campinas, 71p.
- MONTENEGRO MR & FRANCO M. 1995. *Patologia: processos gerais*. 3rd ed. Editora Atheneu. São Paulo, 263p.
- NEIL JD, FREEMAN ME, TILLSON SA, 1971. Control of the proestrus surge of prolactin in luteneizing hormone secretion by estrogen in the rat. *Endocrinol.* **98**:1448-53.

- PRINS GS & BIRCH L. 1995. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, **136**:1303-1314.
- PYLKKÄNEN L, MAKELA S, VALVE E, HARKONEN P, TOIKKANEN S, SANTTI R, 1993. Prostatic dysplasia associated with increased expression of C-MYC in neonatally estrogenized mice. *Journ. Urol* **149**:1593-601.
- SCHACHT MJ, NIEDERBERGER CS, GARNETT JE, SENSIBAR JA, LEE C, GRAYHACK JT, 1992. A local direct effect of pituitary graft on growth of the lateral prostate in rats. *Prostate*. **20**:51-8.
- SHIBATA MA, WARD JM, DEVOR DE, LIU ML, GREEN JE, 1996. Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma in C3(1)/SV40 large T antigen transgenic mice: histopathological and molecular biological alterations. *Cancer research*. **56**: 4894-4903.
- TABOGA SR. 1999. Apoptosis as a mediator of hyperplastic recovery on human prostate: cytochemical and immunocytochemical evaluation. *Cytobios*, **99**:19-26.
- TAM CC, WONG YC, 1991. Ultrastructural study of the effects of 17 β -Oestradiol on the lateral prostate and seminal vesicle of the castrated Guinea Pig. *Acta anat*. **141**:51-62.
- THOMPSON AS, ROWLEY DR, HEIDGER Jr. PM, 1979. Effects of estrogen upon the fine structure of epithelium and stroma in the rat ventral prostate gland. *Invest. Urol* **17**: 83-9.
- VENABLE JH & COGGESHALL R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**:407-408.
- WATSON ML. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**: 475-478.

LEGENDAS

Figuras 1A e B – Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias da idade pré-púbere incluídos em historresina. **(A)** – Detalhe do epitélio glandular (ep) de animal do grupo controle mostrando um arranjo colunar alto, com núcleos ovalados e a região do Golgi (cabeça de seta) mais clara. O epitélio nessa fase encontra-se praticamente apoiado sobre a camada muscular (smc). Azul de toluidina. 725X. **(B)** – Detalhe do epitélio de um animal do grupo tratado mostrando um arranjo colunar baixo, com núcleos arredondados e com padrão de distribuição cromatínica irregular (seta). Logo abaixo do epitélio observa-se a presença do estroma fibromuscular (st). Azul de toluidina. 725X.

Figuras 2A e B - Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias da idade púbere. **(A)** - Detalhe do epitélio glandular de um animal controle mostrando um arranjo colunar baixo e a região bem evidente do Golgi (cabeça de seta). O epitélio forma pregas onde se insere um feixe conjuntivo vascular (seta) circundado por uma camada concêntrica de células musculares lisas (smc). Hematoxilina-eosina. 580X. **(B)** – Detalhe do epitélio glandular de um animal tratado mostrando um padrão de estratificação identificado como cribriforme das neoplasias intraepiteliais focais (nip) observadas após o tratamento. Em destaque, células em apoptose (cabeça de seta), células hipertróficas de citoplasma claro (seta) e o estroma fibromuscular (st) subjacente ao epitélio. Hematoxilina-eosina. 464X.

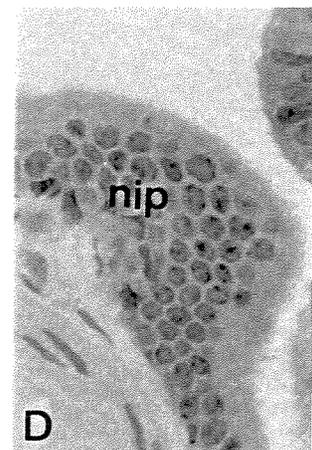
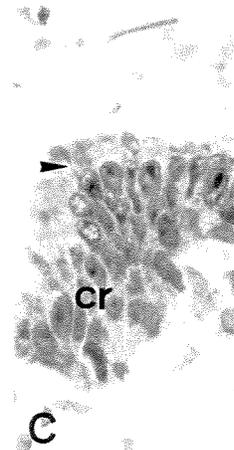
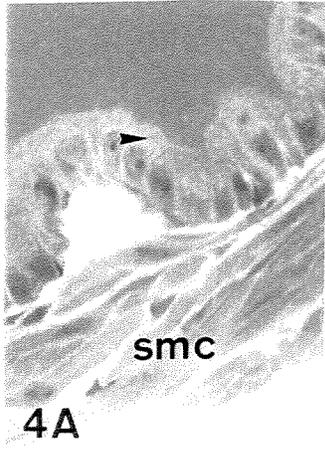
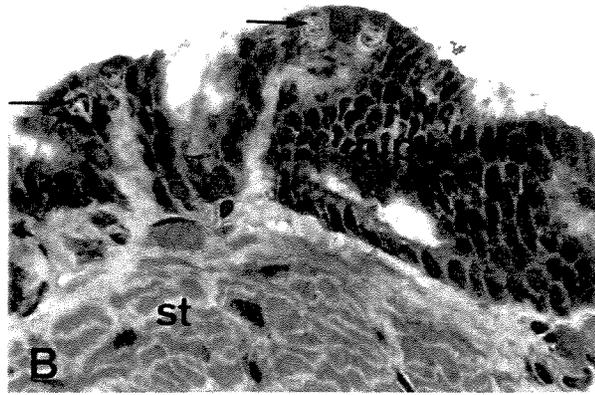
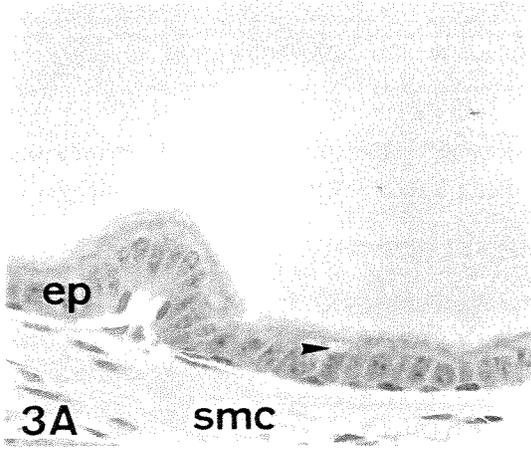
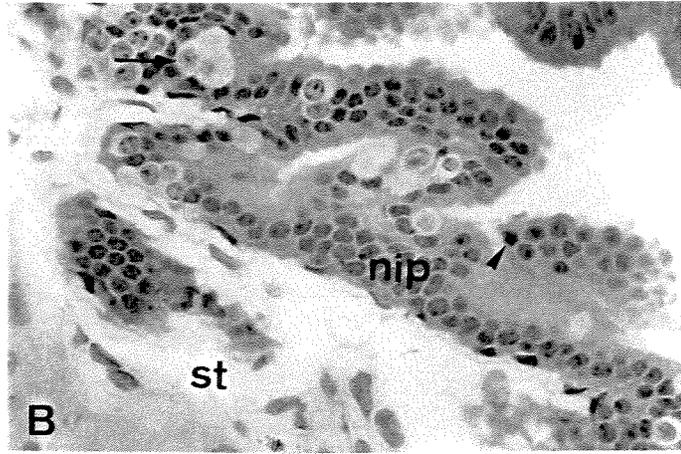
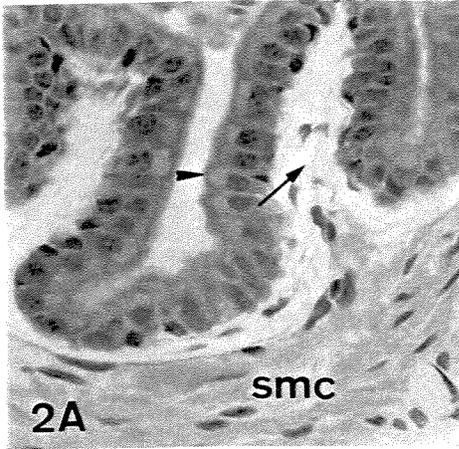
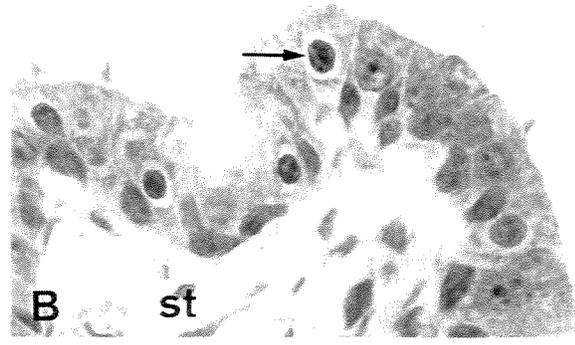
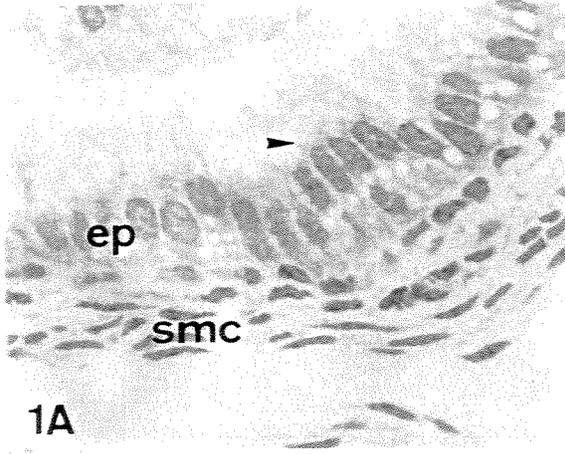
Figuras 3A e B - Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias da idade pós-púbere. **(A)** – Detalhe do epitélio glandular (ep) de um animal controle mostrando o arranjo colunar e a área clara definida como a área do Golgi (cabeça de seta). Hematoxilina-eosina. 464X. **(B)** – Detalhe do epitélio glandular de um animal tratado mostrando o arranjo epitelial de uma neoplasia intraepitelial prostática focal (nip), onde observa-se núcleos proeminentes (seta) com padrão de distribuição cromatínica irregular, supostamente apoptóticos e o estroma de sustentação (st) logo abaixo. Hematoxilina-eosina. 580X.

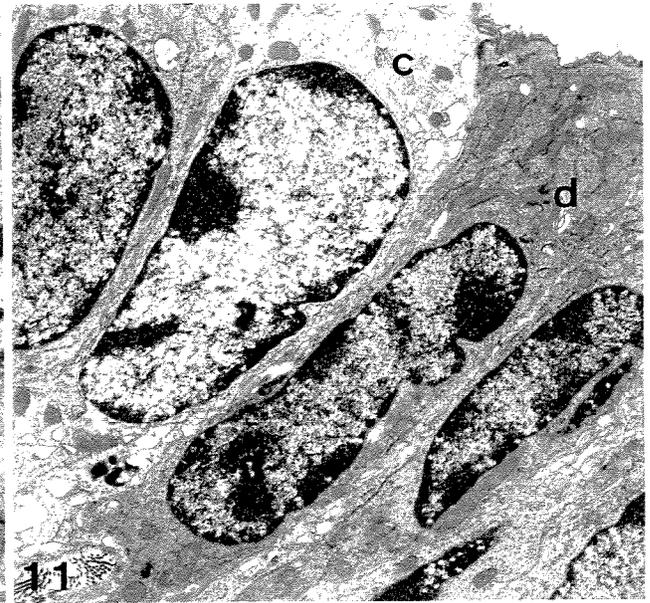
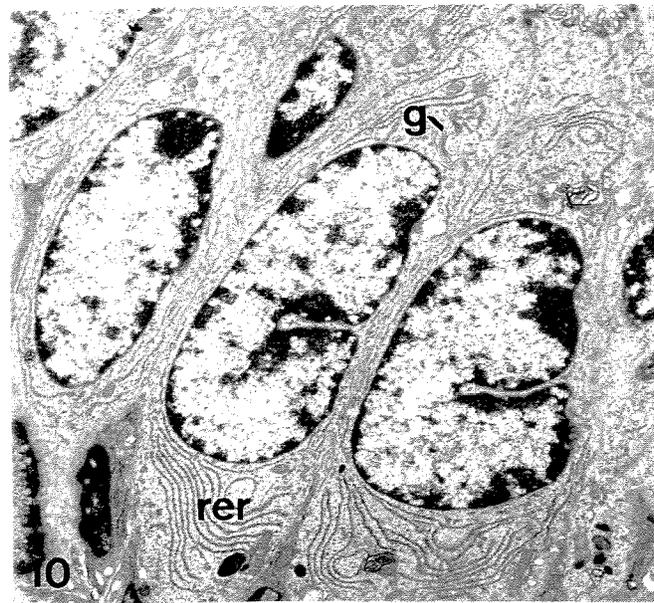
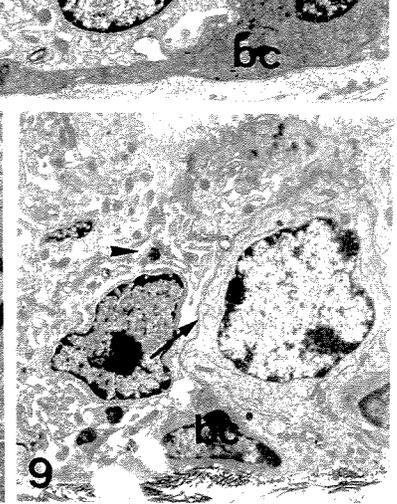
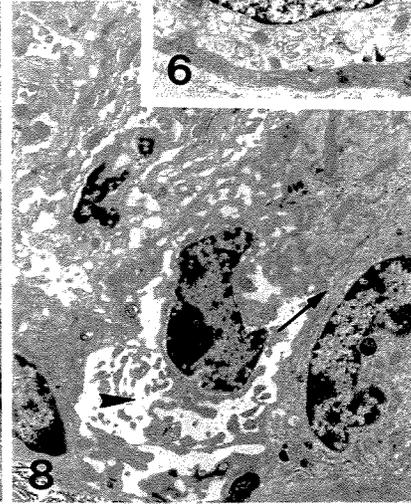
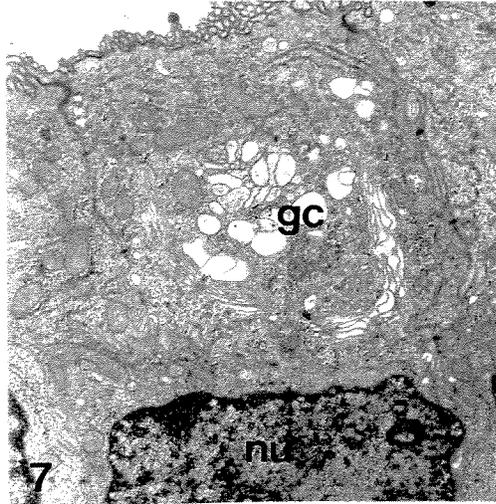
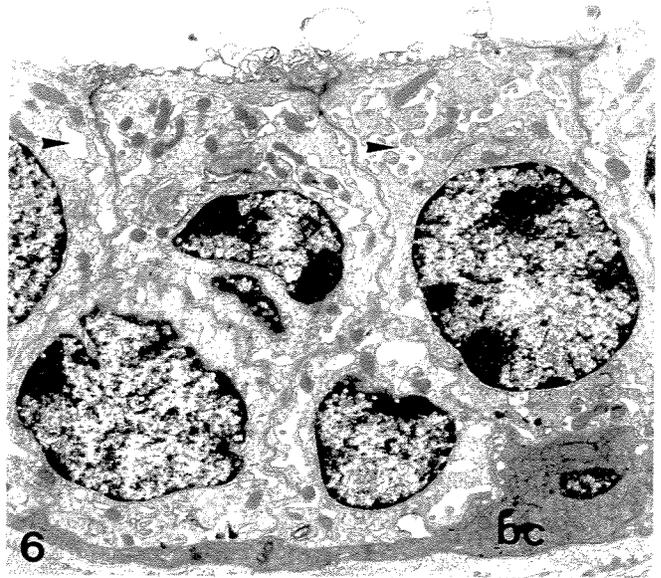
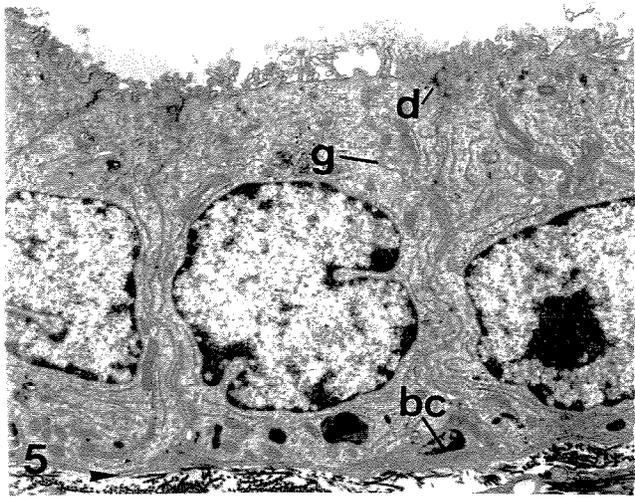
Figuras 4A a D - Cortes histológicos de fragmentos da próstata lateral de cobaias da idade adulta. **(A)** – Detalhe do epitélio glandular de um animal controle mostrando o arranjo colunar

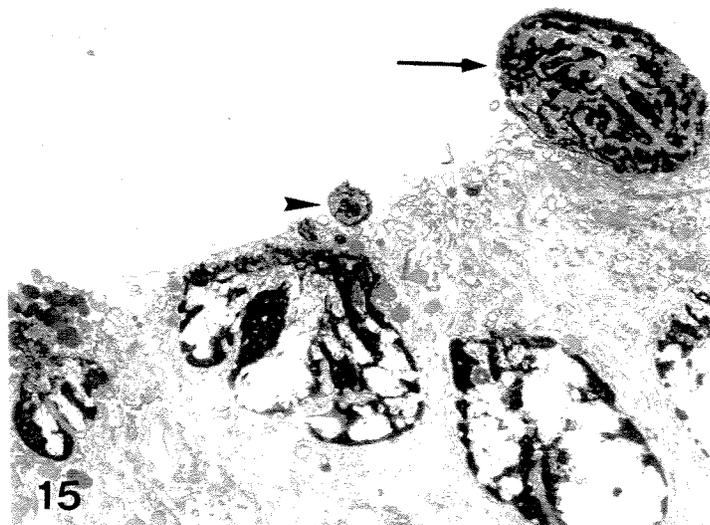
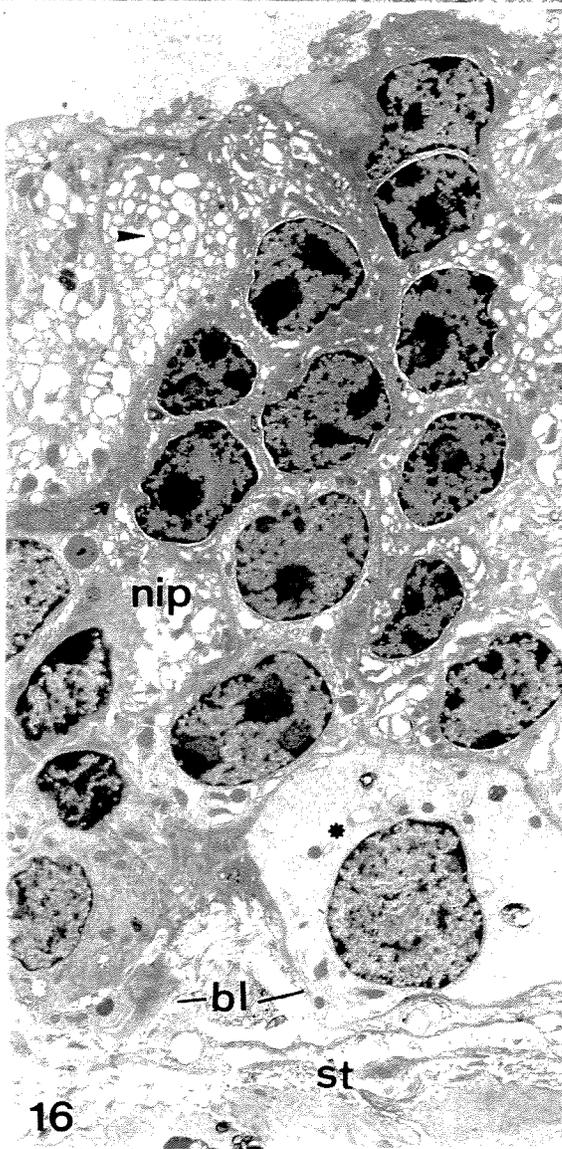
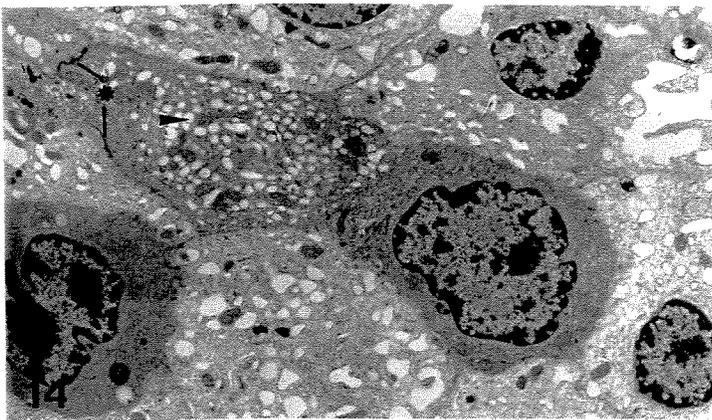
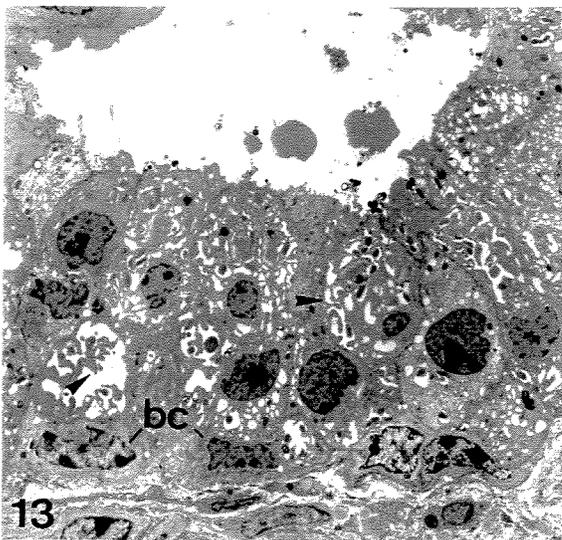
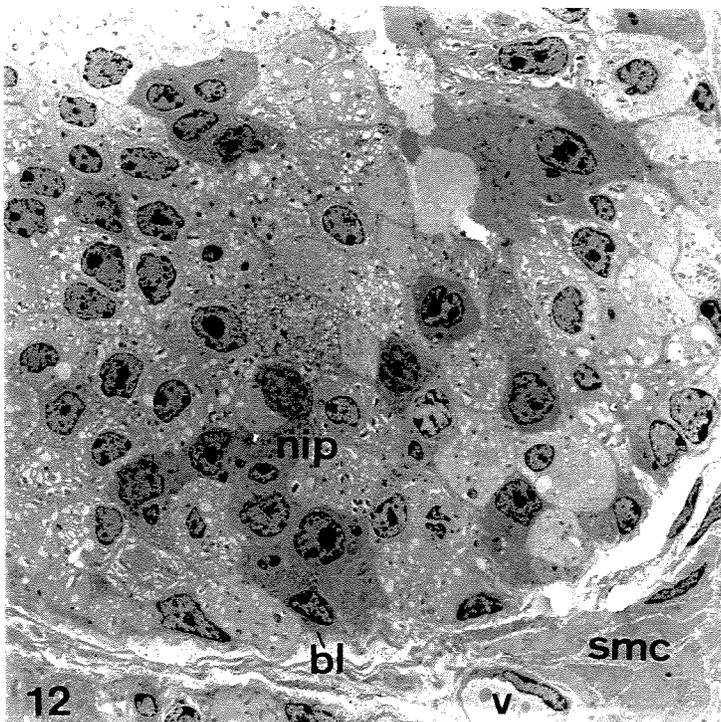
e a área clara definida como a área do Golgi (cabeça de seta). Notar que o epitélio está praticamente sobre a camada de células musculares lisas (smc). Hematoxilina-eosina. 580X. **(B)** – Detalhe de um ácino prostático de um animal controle mostrando diferentes fenótipos celulares, as células claras (c) e as células escuras (d). Observar a presença de grânulos de extrusão (cabeça de seta) partindo desse epitélio secretor. Hematoxilina-eosina. 290X. **(C)** – Detalhe do epitélio prostático de um animal tratado mostrando o padrão cribriforme (cr) de estratificação. Notar a distribuição das áreas claras nas células epiteliais (cabeça de seta). Azul de toluidina. 725X. **(D)** – Detalhe do epitélio prostático de um animal tratado mostrando uma região de neoplasia intraepitelial prostática (nip). Hematoxilina-eosina. 580X.

FIGURAS 5-16 – Cortes ultra-finos de próstatas observados à microscopia eletrônica de transmissão. **5** – Epitélio glandular normal de um animal púbere controle mostrando parte de uma célula basal (bc) disposta sobre a lâmina basal (cabeça de seta) e o epitélio secretor suprajacente onde pode-se observar a presença do Complexo de Golgi (g). Notar a presença de desmossomos (d) evidenciando a adesão celular. 6.969X. **6** – Epitélio glandular de animal púbere tratado onde nota-se a dilatação das membranas internas (cabeça de seta) e hipertrofia da célula basal (bc). 6.969X. **7** – Detalhe de uma célula epitelial acinar de um animal pós-púbere tratado onde observa-se um alargamento das cisternas do Complexo de Golgi (gc) acima do núcleo (nu). 10.075X. **8** – Detalhe do epitélio glandular de um animal pós-púbere tratado onde observa-se a dilatação das membranas internas (cabeça de seta) e núcleos de diferentes formas. Notar a transição de uma célula alterada para uma célula normal (seta). 5.390X. **9** – Detalhe do epitélio glandular de um animal pré-púbere tratado, mostrando a transição do epitélio normal para o alterado (seta) onde observa-se a dilatação das membranas interna (cabeça de seta). Observar os diferentes fenótipos nucleares e a presença de células basais (bc). 4.676X. **10** – Epitélio glandular normal de um animal adulto controle. Observar o arranjo do retículo endoplasmático granular ou rugoso (rer) ao redor do núcleo e o complexo de Golgi (g). 7.800X. **11** – Epitélio glandular de um animal adulto tratado mostrando dois tipos de células secretoras, a célula “clara” (c) e a célula “escura” (d). 7.800X. **12** – Visão geral do epitélio glandular de um animal púbere tratado onde há a ocorrência de Neoplasia Intraepitelial Prostática (nip). Observa-se a heterogeneidade no padrão de eletrodensidade dos tipos

celulares, a forma e o tamanho dos núcleos e o padrão de distribuição cromatínica. Há ocorrência de dilatação nas membranas internas e a presença de células musculares lisas (smc) e vasos sanguíneos (v) abaixo da lâmina basal (bl). 1.300X. **13** – Epitélio glandular de um animal púbere tratado onde observa-se hipertrofia de células basais (bc) e a dilatação das membranas internas (cabeça de seta). 1.700X. **14** – Detalhe de uma célula epitelial de um animal pós-púbere tratado onde nota-se a dilatação das membranas internas (cabeça de seta) e a presença de junções de aderência (*). Notar a heterogeneidade celular. 4.732X. **15** – Detalhe de núcleos de células epiteliais glandulares de um animal pós-púbere tratado onde observa-se padrões de distribuição cromatínica irregulares e células em processo de apoptose (seta) e corpos apoptóticos (cabeça de seta). 7.800X. **16** – Detalhe do padrão cribriforme de estratificação epitelial de uma neoplasia intraepitelial (nip) de um animal adulto tratado onde nota-se heterogeneidade celular, núcleos de diferentes tamanhos, em diferentes alturas e com padrões de distribuição cromatínica irregulares. Observa-se também a dilatação das membranas internas (cabeça de seta), uma célula hipertrófica clara com poucas organelas (*) e presença da lâmina basal (bl) sobre o estroma fibromuscular (st). 3.841X.







CONCLUSÕES GERAIS

- 1 – A administração crônica do Benzoato de estradiol promove alterações histopatológicas na próstata das cobaias nas diferentes idades do desenvolvimento pós-natal.

- 2 – O padrão de distribuição e a densidade das fibras e das células musculares lisas do estroma são alterados, bem como a proporção dos componentes prostáticos frente ao tratamento, principalmente nas idades pós-púbere e adulta.

- 3 – Alterações epiteliais pré-neoplásicas e displásicas são incrementadas em todas as idades do desenvolvimento pós-natal quando da administração experimental do estradiol.

- 4 – As alterações ultra-estruturais observadas sob o efeito crônico do Benzoato de Estradiol são principalmente relacionadas aos fenótipos nucleares, distribuição das endomembranas e aumento na quantidade de colágeno e elastina entre as fibras musculares e as demais células do tecido conjuntivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ELMAGD A, WROBEL K, 1989. The periurethral glandular complex in the water buffalo: an ultrastructural, histological and lectin-histochemical study. *Arch Histol Cytol* **52**: 501-512.
- ARAI Y, SUZUKI Y, NISHIZUKA Y, 1977. Hyperplastic and metaplastic lesions in the reproductive tract of male rats induced by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Virchows Arch.* **376**:21-28.
- AUMÜLLER G, SEITZ J, 1990 Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
- BURFEIND P, CHERNICKY CL, RINISLAND F, ILAN J & ILAN J. 1996. Antisense RNA to the type I Insulin-like growth factor receptor supresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells *in vivo*. *PNAS*, **93**:7263-7268.
- CHAN JM, STAMPFER MJ, GIOVANUCCI E, GANN PH, MA J, WILKINSON P, HENNEKENS CH & POLLAK M. 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*, **279**:563-566.
- COLOMBEL MC, BUTTYAN R, 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. In : Schwartz LM, Osborne, BA, eds. *Methods in Cell Biology - Cell Death*. V. 46. Academic Press, New York, p. 369-385.
- CUNHA GR, BIGSBY RM, COOKE PS, SUGIMURA Y, 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ* **17**:137-148.
- CUNHA GR, CHUNG LW, SHANNON JM, TAGUCHI O, FUJII H, 1983. Hormone induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog. Horm. Res.* **39**:559-597.
- CUNHA GR, DONJACOUR AA, COOKE PS, MEE S, BIGSBY RM, HIGGINS SJ & SUGIMURA Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*, **8**:338-362.

- CUNHA GR, HAYWARD SW, DAHIYA R, FOSTER BA, 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta anat* **155**: 63-72.
- DONJACOUR AA, CUNHA GR, 1988. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* **128**: 1-14.
- DROLLER MJ, 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol*, **79 (Suppl.) 2**: 42-52.
- FRANKS LM, 1967. Normal and pathological anatomy and histology of the genital tract of rats and mice. In: Cotchin E, Roe F, eds. *Pathology of laboratory rats and mice*. Blackwell, Oxford, p 469-499 *Apud* PRINS, G.S., BIRCH L, GREENE GL, 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129**: 3187-3199.
- DiGIOVANNI J, KIGUCHI K, FRIJHOFF A, WILKER E, BOL DK, BELTRAN L, MOATS S, RAMIREZ A, JORCANO J, CONTI C, 2000. Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *PNAS*. **97**:3455-3460.
- GUYTON AC, 1994. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 926pp.
- HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA GR, 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 (Suppl.2)**: 18-26.
- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Age-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- HUYNH H, ALPERT L, ALAOUI-JAMALI MA, NG CY, CHAN TWM, 2001. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J. Endocr.* **171**: 109-118.
- ICHIHARA I, KALLIO M, PELLINIEMI LJ, 1978. Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tiss Res* **192**: 381-390.
- ISAACS JT, COFFEY DS, 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate (Suppl)***2**:33-50.
- JESIK C J, HOLLAND J M, LEE C, 1982. An anatomic and histologic study off the rat prostate. *Prostate* **3**: 81-97.

- JUNQUEIRA LCU & CARNEIRO J, 1999. *Histologia Básica*. 8ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro., 433p.
- McNEAL JE, ALROY J, LEAV I, REDWINE EA, FREIHA FS, STAMEY TA, 1988. Immunohistochemical evidence for impaired cell differentiation in the premalignant phase of prostate carcinogenesis. *Am. J. Clin. Pathol.* **90**:23-32.
- MOORE RJ, GAZAC JM, QUEBBEMAN JF, WILSON JD, 1979. Concentration of dihydrotestosterone and 3-alfa-androstanediol in naturally occurring and androgen-induced prostatic hyperplasia in the dog. *Clin. Invest.* **64**:1003-10.
- NETTER FH, 1965. *Reproductive system* - The Ciba collection of medical illustration. 5ed. CIBA., New York, 286p.
- PRICE D, 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst Monogr* **12**: 1-27.
- PRINS GS & BIRCH L. 1995. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, **136**:1303-1314.
- PYLKKÄNEN L, SANTTI R, NEWBOLD RR, McLACHLAN JÁ, 1991. Regional differences in the prostate of the neonatally estrogenized mice. *Prostate* **18**:117-129.
- RAUCH F, POLZAR B, STEPHAN H, ZANOTTI S, PADDENBERG R, MANNHERZ HG, 1997. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J. Cell Biol.*, **137**: 909-923.
- ROSAI J, 1996). Male reproductive system. In: *Ackerman's Surgical Pathology*. 8ed. ROSAI J, eds. Mosby-Year, St. Louis-USA, Vol. I, p.1221-1256.
- SANTTI R, NEWBOLD RR, MÄKELÄ S, PYLKKÄNEN L, McLACHLAN JÁ, 1994. Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate* **24**:67-78.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.
- TAM CC, WONG YC, 1991. Ultrastructural study of the effects of 17 β -Oestradiol on the lateral prostate and seminal vesicle of the castrated Guinea Pig. *Acta anat.* **141**:51-62.

- THOMSON AA, FOSTER BA, CUNHA GR, 1997. Analyses of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development* **124**: 2431-2439.
- WELLS LJ, CAVANAUGH MW, MAXWELL EL, 1954. Genital abnormalities in castrated rats and their prevention by means of testosterone propionate. *Anat Rec* **118**: 109-133.
- WOLK A, MANTZOROS CS, ANDERSON SO, BERGSTROM R, SIGNORELLO LB, LAGIOU P, ADAMI HO & TRICHOPOULOS D. 1998. Insuli-lik growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *Joun. Nation. Cancer Inst.*, **90**:911-915.
- WONG YC, TSE MKW, 1981. Fine estructural and functional study of the prostatic complex of the Guinea Pig. *Acta anat.* **109**:289-312.
- ZHAO CY, TAM CC, WONG YC, 1993. Morphogenesis and ductal development of the prostatic complex of the Guinea Pig. *Journ. Morphol.* **217**:219-227.