

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



SÉRGIO MARCELINO DE OLIVEIRA

**A PRÓSTATA VENTRAL DO GERBILO FRENTE
ÀS DIFERENTES FORMAS DE CASTRAÇÃO
E SUBSEQUENTE REPOSIÇÃO HORMONAL
PELA TESTOSTERONA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
SÉRGIO MARCELINO DE OLIVEIRA
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

**BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/VN.amp
	VL43p
V	EX
TOMBO BC/	66496
PROC.	16-8-00086-25
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

B.b Id 374265

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

OL43p

Oliveira, Sérgio Marcelino de

A próstata ventral do gerbilo frente às diferentes formas de castração e subsequente reposição hormonal pela testosterona / Sérgio Marcelino de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Castração. 3. Andrógenos - Antagonistas. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Hormonal replacement by testosterone in ventral prostate of gerbil submitted to different castration forms.

Palavras-chave em inglês: Prostate, Castration, Antiandrogens.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

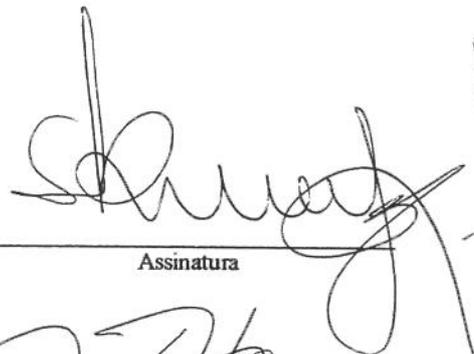
Banca examinadora: Sebastião Roberto Taboga, José Carlos Mesquita, Sérgio Luis Felisbino.

Data da defesa: 09/10/2005.

Campinas, 09 de setembro de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof.Dr. José Carlos Mesquita



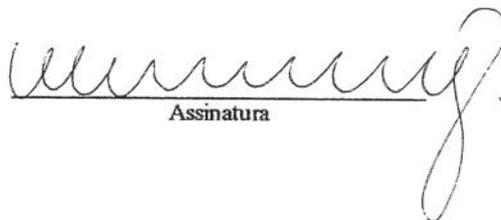
Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Luís Felisbino



Assinatura

Prof.Dr. Wilson de Mello Júnior



Assinatura

Profa.Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni



Assinatura

200528956

DEDICATÓRIA

A Deus, meu guia.

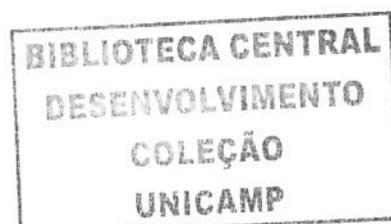
A minha mãe, com certeza a pessoa mais forte que conheço, por ajudar a fazer de mim o que sou hoje e sempre me incentivar, apesar de tudo.

A meu pai, que tanto se sacrificou para ajudar-me a seguir o caminho que escolhi, respeitando e acreditando nessa escolha.

A meu irmão, que mais do que tudo é meu amigo.

**“Quando os ventos da mudança sopram, alguns constroem abrigos,
outros constroem moinhos”.**

Claus Möller



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a Deus, por ser a Luz que me guia pelos percalços da vida, por ter-me aberto as portas para caminhos que possibilitaram o meu crescimento e realização pessoal, e ter-me dado força, sabedoria e obstinação para trilhar esses caminhos, mesmo que para isso fosse preciso fazer escolhas e sacrifícios...

Aos meus pais, Joessy e Adalberto, que, cada um a sua maneira, assistem meu crescimento pessoal com orgulho e alegria, sempre com uma palavra de incentivo e apoio, nunca deixando que o desânimo e a saudade se abatam sobre mim.

Ao meu irmão Márcio, que mesmo a distância sempre foi uma pessoa na qual pude contar nas mais adversas situações, nos momentos alegres e também nas passagens difíceis, as quais não foram poucas...

A toda a minha família, o bem mais importante que possuo, por sempre me incentivar a transpor os percalços da vida.

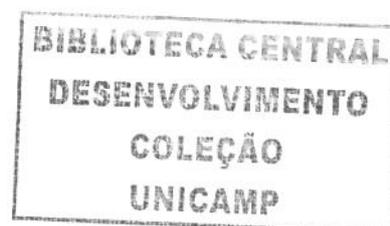
Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, primeiramente por acreditar em meu potencial e conceder-me a chance de fazer parte do seu grupo de pesquisa, oportunidade que sem dúvida foi de crucial importância para o meu crescimento pessoal e acadêmico, e pela paciência e sabedoria com as quais soube guiar-me pelos caminhos do conhecimento. Obrigado.

Ao técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise, mas principalmente, meu amigo, Luiz Roberto Faleiros Jr. pela presteza no auxílio e na execução de todas as tarefas diárias, e claro, pelos momentos de descontração e coleguismo que compartilhamos nestes anos.

À Rosana Silistino de Souza, pelo auxílio prestado na rotina do laboratório e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Carlos Mesquita, Prof. Dr. Sérgio Luiz Felisbino, Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni e Prof. Dr. Wilson de Mello Jr., pela presteza e atenção com que se dispuseram a fazer a correção da tese e pelas sugestões feitas, que com certeza foram de grande valia para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Liliam Alves Senne Penagio, pela amizade, boa vontade e paciência com as quais sempre atendeu a mim e a todos aqueles que a procuram, geralmente, com algum “abacaxi” para ser descascado.



À república Zona Rural e seus integrantes, Barrão, Goiano, Éder e Gervásio, pela acolhida e pelos momentos deliciosos e inesquecíveis que lá passei, momentos esses que ficaram marcados em meu coração e principalmente em meu fígado...

À Ana Amélia e à Mãe, que se tornaram grandes amigas durante os meses de convivência que tivemos em Campinas, e é claro a todos os colegas de turma da Pós: Fernanda Carioca, Juarez, Luciana, Patrick, Tânia, Thalita e Thomaz, pelo convívio que amenizou os momentos de tensão dos seminários.

À Lara pelo carinho e atenção com que sempre me ajudou, principalmente nas correções da tese, à Ana Maria por ser minha “mentora” na Fosfatase Ácida, à Fernanda Alcântara por ajudar-me nas aventuras pelo mundo da estatística, enfim, a todos os companheiros do Laboratório de Microscopia e Microanálise: Claudia Pacheco, Cristiane, Daniele, Daniel, Fernanda Egidio, Guilherme, Mãe, Manoel, Marcela, Renato, Ricardo, Rodrigo, Sabrina, Silvana, Wellerson, pela amizade. Sempre levarei todos em meu coração, seja por onde eu for...

Aos professores do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, pela contribuição essencial ao meu crescimento pessoal e acadêmico. E a aqueles mestres e amigos que até hoje fazem o possível para estender-me a mão em uma eventual necessidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“... essas folhas que tombam na água parada dos tanques e não podem sair viajando pelas correntes do mundo...”

Mário Quintana.

SUMÁRIO

Resumo.....	08
Abstract.....	10
Introdução.....	12
1. Morfologia prostática.....	12
2. Desenvolvimento prostático.....	15
3. Fisiologia prostática.....	17
4. O acetato de ciproterona e a flutamida.....	19
Objetivos.....	23
Artigo:	
Implicações morfofuncionais dos diferentes tipos de castração e as conseqüências da reposição pela testosterona na próstata do gerbilo (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	24
Conclusões gerais.....	55
Referências bibliográficas.....	56

A próstata é uma glândula exócrina túbulo-alveolar composta, do sistema genital masculino, que secreta parte do líquido seminal. Sua diferenciação dá-se no início do desenvolvimento embrionário e termina na puberdade, sendo que a testosterona (T) tem papel fundamental no seu desenvolvimento e em sua manutenção, após sua conversão pela enzima 5 α -redutase para uma isoforma cerca de 10 vezes mais potente, a dihidrotestosterona (DHT). Uma série de doenças podem acometer a próstata, dentre elas o câncer e a Hiperplasia Benigna Prostática (HBP), e a principal forma de controle dessas doenças é a diminuição dos níveis séricos de T, que pode ser conseguida através da castração cirúrgica (orquiectomia) e da administração de antiandrógenos (castração química). Algumas das drogas mais usadas na castração química são a flutamida e o acetato de ciproterona. A primeira é um antiandrógeno não-esteroidal que compete com a T e com a DHT pelo receptor de andrógeno (RA) nas células da próstata, e a segunda é uma droga esteroidal que além de competir pelo RA inibe a produção de Hormônio Luteinizante (LH) pela hipófise, o que por sua vez inibe a produção de T pelos testículos. O objetivo desse trabalho foi avaliar, morfológica e histoquimicamente o comportamento do tecido prostático regredido após 30 dias de ablação de T, tanto pela orquiectomia quanto pela castração química, ambas seguidas de administração de T exógena e suspensão do tratamento, respectivamente. Para tanto foram usados 40 gerbilos (*Meriones unguiculatus*, Criscetidae, Gerbilinae) machos adultos, os quais foram divididos em dois grupos experimentais (G.Ex. 01 e G.Ex. 02) e dois grupos controle (G.C. 01 e G.C. 02). G.Ex. 01 foi constituído por 20 animais os quais sofreram orquiectomia bilateral e após 30 dias receberam doses de cipionato de testosterona (TC) a uma concentração de 25mg/Kg, em intervalos de 48 horas, durante 21 dias, e os animais foram sacrificados após 0, 7, 14 e 21 dias do início do tratamento com TC. G.Ex 02 (20 animais) recebeu doses semanais e alternadas dos antiandrógenos acetato de ciproterona e flutamida (0,3ml/animal/dia numa concentração de 25mg/Kg) diluídos em óleo de milho, durante 30 dias, e após a suspensão do tratamento anti-androgênico os animais foram sacrificados após de 0, 7, 14 e 21 dias. O

G.C. 01 foi constituído por 5 animais adultos não castrados e o G.C. 02 por 5 animais adultos castrados que receberam óleo de milho, o veículo de diluição das drogas. Os resultados demonstraram que, tanto a castração cirúrgica quanto a química provocaram uma drástica regressão do peso do complexo prostático após 30 dias quando comparados com o grupo controle. A dosagem hormonal mostrou uma redução na quantidade de T circulante no caso da castração cirúrgica e na castração química e o L.H. apresentou um aumento durante a castração cirúrgica e uma diminuição durante a castração química. Após 30 dias de castração, em ambos os grupos, houve uma drástica diminuição na altura epitelial, que foi mais intensa em G.Ex 02, que, juntamente com a pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER), caracterizou uma pouca atividade secretora dessas células. As células musculares lisas (CML) apresentaram um fenótipo estrelado e irregular, e houve um pregueamento da membrana basal (MB) acompanhada de uma diminuição na quantidade de vesículas secretoras. Após a reposição hormonal, em G.Ex 01 pôde ser notado um aumento na altura epitelial, acompanhado da presença de numerosas e alargadas cisternas de RER. As CML retomaram seu fenótipo característico, mas passaram a apresentar uma enorme quantidade de RER em seu citoplasma, caracterizando uma modulação de seu fenótipo contrátil para um fenótipo secretor. A suspensão do tratamento antiandrogênico em G.Ex 02 promoveu a retomada da altura do epitélio e um aumento na quantidade de RER, e estas células passaram a apresentar uma grande quantidade de vesículas lipídicas em seu citoplasma basal. Como em G.Ex 01 as CML retomaram seu fenótipo característico, e também apresentaram um aumento na quantidade de RER. Assim, estes dados nos permitem assumir que o tecido prostático apresentou uma notável capacidade de involução após supressão androgênica e uma capacidade de reorganização após reposição hormonal, e os eventos decorrentes da orquiectomia e da subsequente administração de T mostraram mais intensos para o tecido prostático.

The prostate is an exocrine gland of the male genital system, which secretes part of seminal liquid. Its differentiation initiates in the beginning of the embryonic development and finishes during the puberty. Testosterone (T) plays an essential role in prostate maintenance, after transformation, by 5 α -reductase enzyme, to dehydrotestosterone (DHT) an more potent isoform. As Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) and cancer may attack prostate gland, the down regulation of T levels by surgical castration (orchietomy) or by the administration of anti-androgens drugs, such as flutamide and cyproterone acetate (chemical castration) have been the principal therapies to control these disease. The non-steroidal antiandrogen flutamide acts by competitive inhibition of the androgen receptors (AR) in the prostate cells. The cyproterone acetate is a steroidal drug besides competing for the AR inhibits Luteinizing Hormone (LH) production on the pituitary gland that themselves inhibit T production by testis. The aim of this work was to evaluate morphologically and histochemically the behavior of prostatic tissue regression after 30 days of T ablation by orchietomy and by chemical castration, both followed by T administration and suspension of treatment, respectively. Two experimental groups (Ex.G. 01 and Ex.G. 02) of 20 adult gerbil (*Meriones unguiculatus*) each were employed. In the Ex.G.01 the animals underwent bilateral orchietomy and after 30 days they received testosterone cipionate (TC) doses (25mm/Kg) during 21 days every 48 hours. They were sacrificed at 0, 7, 14 and 21 days of the TC treatment beginning. Ex.G. 02 received alternates doses of cyproterone acetate and flutamide (0,3ml/animal/day, at 25mg/Kg) dissolved in corn oil, during 30 days weekly. They were sacrificed at 0, 7, 14 and 21 days after treatment interruption. As control group 5 animals not castrated (C.G.01) and 5 castrated animals (C.G.02) received corn oil, the drug dilution vehicle. Results showed that after 30 days of both surgical and chemical castration a drastic regression in the prostate weight occurred. Hormonal dosages reveled serum T level reduction in both surgical and chemical castration, while serum LH level increased during surgical castration and decreased during chemical castration. After 30 days of castration in both groups there were

intense decreases of epithelium height, more intensive in Ex.G. 02, and notable small amount of rugous endoplasmatic reticulum (RER), which characterized a low secretory activity of those cells. Some smooth muscle cells (SMC) showed a spinous and irregular phenotype along with infolding basal membrane and decrease of secretory vesicle amount. After hormonal replacement in Ex.G. 01 were noted an increase in epithelial height and a greater RER quantity. Those altered SMC recovered its normal pattern and the considerable number of RER observed in the cytoplasm suggests a modulation of these cells from contractile to secretory phenotype. In Ex.G. 02 the treatment interruption promoted an increase in epithelial height and in the amount of RER, besides lots of lipid vesicles at basal cytoplasm. Like in Ex.G. 01 SMC retook its normal phenotype, but showed an increase of RER amount to. These data leads to conclude that prostatic tissue showed a high capacity of involution after androgenic ablation and a capacity or reorganization after hormonal replacement, but the events promoted by orchiectomy and T administration appear to be more aggressive to the tissue.

1. Morfologia prostática

A próstata apresenta o maior volume e a maior expressividade funcional dentre as glândulas sexuais acessórias do aparelho reprodutor masculino (NETTER, 1965), pesando, em humanos, entre 30 e 50g. Localizada logo abaixo da bexiga urinária, envolvendo a uretra, é encontrada em todos os mamíferos, inclusive nos monotremos (PRICE, 1963), permitindo além de estudos de natureza anátomo-patológica, estudos de natureza evolutiva. Segundo McNeal (1981), em humanos a próstata, mesmo sendo compacta, pode ser dividida em três conjuntos glandulares: glândulas da zona periférica; glândulas da zona de transição; e glândulas da zona central, todas envolvidas por um amplo estroma fibromuscular.

Com a função de secretar o líquido seminal, um líquido fino, de aspecto leitoso, a próstata contribui para um aumento no volume seminal. Sua secreção favorece a neutralização do meio onde ocorre o processo de fertilização, contribuindo para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (GUYTON, 1984).

XUE L. et al (1997) *apud* ROY-BURMAN et al (2004), demonstraram que, em roedores a próstata não é compacta sendo dividida em três pares de lobos: lobos anteriores, ou glândula de coagulação; lobos dorsolaterais; e lobos ventrais.

A próstata humana é uma glândula túbulo-alveolar composta, constituída por epitélio colunar pseudo-estratificado envolto por espesso estroma fibromuscular (McNEAL 1983, CUNHA et al., 1987), com a atividade secretora ligada principalmente à sua parte alveolar. Entretanto, os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (REESE et al., 1986). Entremendo as partes glandulares existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com esparsas fibras conjuntivas e células musculares lisas que têm papel contrátil durante a ejaculação (ROSS et al., 1993). Neste tecido estromal também estão presentes nervos e terminações nervosas. Envolvendo este órgão tem-se uma fina cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas aos órgãos nos diversos mamíferos já estudados.

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

O gerbilo (*Meriones unguiculatus*) tem demonstrado ser um excelente modelo experimental devido à facilidade com que pode ser manuseado no biotério, além de ser um animal extremamente dócil e de fácil adaptação ao cativeiro. O interesse biológico em relação à próstata de *Meriones unguiculatus* se justifica devido a algumas semelhanças morfológicas e histológicas existentes em relação à próstata humana.

Histologicamente a próstata do Gerbilo apresenta um epitélio prismático simples composto por células secretoras. Entremeando as partes glandulares há um estroma conjuntivo vascularizado e com abundante musculatura lisa e uma relativa escassez de fibras colágenas e elásticas entremeando a musculatura lisa (ZANETONI, 2002). Essas células são alongadas e delgadas, dispostas paralelamente à membrana basal. As células basais têm sido identificadas como sendo proliferativas, e normalmente se dividem e se diferenciam em células secretoras.

A próstata do gerbilo é composta por: próstata anterior (glândula coaguladora); próstata dorsal; e próstata ventral. Estando anatomicamente separadas, mesmo que parcialmente fundidas (Fig. 01).

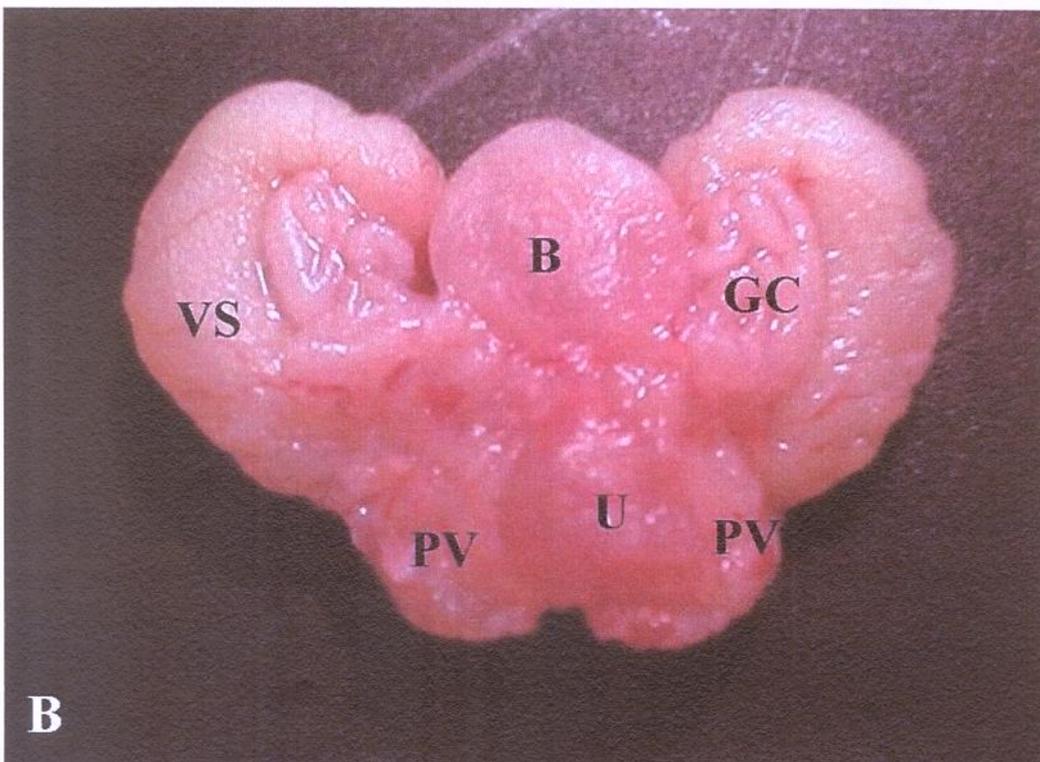
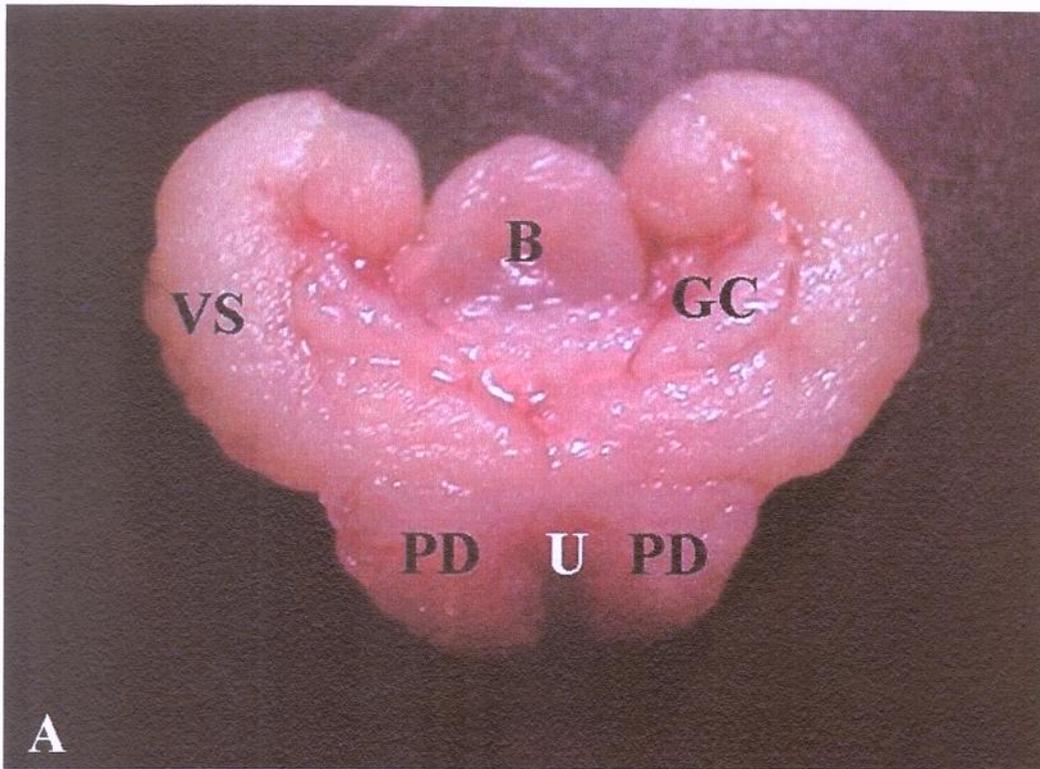


Fig. 01: Visão anatômica da próstata do gerbilo. A: Ventral; B: Dorsal. (Fotos S.R. Taboga)

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Em próstatas de animais adultos, o principal componente do estroma em íntima associação com o epitélio são as fibras musculares lisas. Os fibroblastos e a matriz extracelular que circunda os ductos epiteliais. Em próstatas de ratos e camundongos as células musculares lisas formam uma camada que circunda os ductos epiteliais. A próstata humana também contém uma considerável quantidade de músculo liso, o qual é largamente distribuído em todo o compartimento estromal. Essas células musculares lisas que estão em íntimo contato com os ductos epiteliais são responsáveis por expelir a secreção prostática durante sua contração (HAYWARD *et al*, 1996).

Em termos de homologia entre as partes da próstata de rato e da humana, nota-se que a próstata anterior de rato corresponde ao lobo medial da próstata humana, a próstata dorsal do rato à parte dorsal ou lobo posterior da próstata humana e a próstata ventral do rato ao lobo anterior da próstata humana (SLAYTER *et al*, 1994). Partindo dessas homologias morfo-funcionais pré-estabelecidas pode-se buscar situações experimentais onde a observação das respostas do epitélio e dos componentes do estroma em relação aos agentes químicos (carcinógenos), endógenos (hormonais), ou mecânicos (injúrias tissulares), possam ser feitas através de análises morfológicas ou morfométricas. Então extrapolam-se os resultados para o ser humano.

A vantagem em se estudar o complexo prostático do Gerbilo se dá no fato destes órgãos apresentarem-se bastante compactos e com fusão parcial dos seus lobos, ou seja, consideravelmente semelhante à próstata humana.

2. Desenvolvimento prostático

O crescimento e a diferenciação da próstata têm início durante a vida embrionária e se completa na maturidade sexual. Ela se desenvolve a partir do seio urogenital, uma subdivisão da cloaca, formado por uma camada epitelial derivada do endoderma e circundado por uma camada mesenquimal derivada do mesoderma, que se localiza junto à parte caudal da base da bexiga urinária. O evento inicial da morfogênese prostática é o aparecimento de brotos do epitélio do seio urogenital, formando os ductos, que são, geralmente, sem ramificações até o nascimento, mas após o nascimento esses ductos se

elongam a partir do seio urogenital mesenquimatoso, bifurcam-se e lançam ramificações, dando origem a três lobos distintos com simetria bilateral: próstata anterior (também chamada glândula coaguladora); a próstata dorsolateral; e a próstata ventral (MARKER *et al*, 2003).

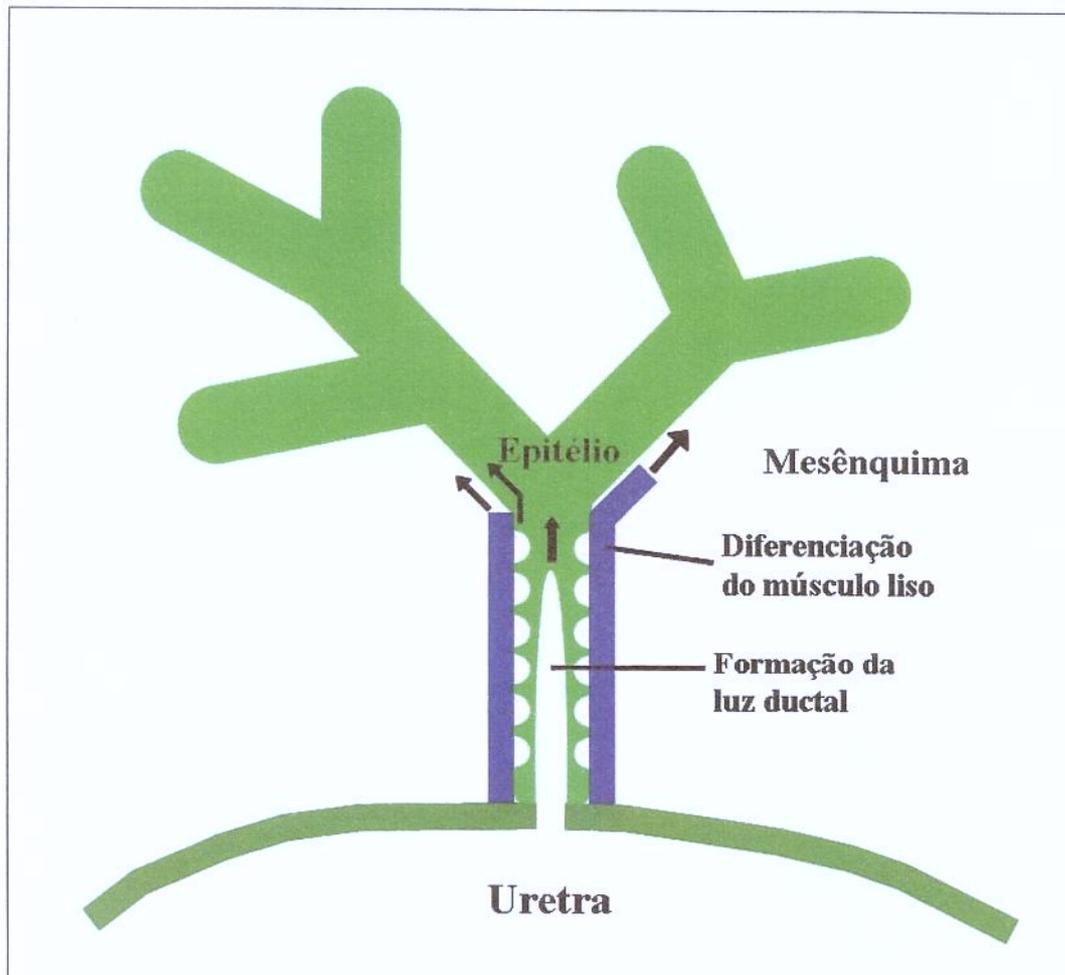


Fig. 02: Desenvolvimento prostático (MARKER *et al*, 2003. Modificado)

Durante a canalização do epitélio do seio urogenital ocorre a segregação de duas populações celulares distintas: as células epiteliais basais, que se localizam ao longo da membrana basal e formam uma camada descontínua de células que expressam citoqueratinas 5 e 14, e p63; ao mesmo tempo, uma parede de células colunares luminiais, que expressam citoqueratinas 8 e 18, se diferenciam e revestem a luz ductal. Enquanto isso,

o mesênquima/estroma prostático se diferencia em uma camada de músculo liso que circunda os ductos prostáticos (MARKER *et al*, 2003) (Fig.02).

Em camundongos, a ramificação do tecido prostático está praticamente completa depois de duas semanas (SUGIMURA *et al*, 1986a) após o nascimento enquanto os níveis de testosterona e o aumento do peso prostático são modestos durante esse período. Já na puberdade, os níveis de testosterona, o peso prostático e a quantidade de DNA aumentam significativa e rapidamente (DONJACOUR & CUNHA, 1988).

Na maturidade funcional, a próstata de roedores é uma glândula multilobular organizada ao redor da uretra na base da bexiga. Devido às diferenças lóbulo-específicas nos padrões da ramificação, o formato de cada lóbulo prostático é único e cada um tem características histológicas distintas, com diferentes níveis de ramificação: alta na próstata anterior, média na dorsolateral e baixa ramificação na próstata ventral.

Ductos prostáticos maduros contêm dois tipos principais de células: as epiteliais luminais secretoras; e as musculares lisas do estroma. Outros tipos celulares menos comuns incluem células neuroendócrinas e as raras células basais que são consideradas fortes candidatas a células tronco (WANG *et al* 2001, *apud* MARKER *et al*, 2003).

3. Fisiologia prostática

A ação dos hormônios masculinos produzidos pelos testículos do feto durante o desenvolvimento embrionário é necessária para que ocorra a morfogênese das estruturas ambissexuais, até então fenotipicamente semelhantes (PRICE & ORTIZ, 1965 *apud* CUNHA, 1976; CUNHA *et al.*, 1996), que no caso do seio urogenital dará origem a próstata. Em mamíferos, no final do período fetal e início do período pós-natal, estes hormônios parecem agir de forma indireta na morfogênese epitelial, aparentemente via mesênquima, uma vez que os brotos prostáticos e o seio urogenital não apresentam receptores para andrógenos em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do seio urogenital e da próstata em formação apresentam grandes quantidades destes receptores (DOUJACOUR & CUNHA, 1988; COOKE *et al.*, 1991; THOMSON *et al.*, 1997).

O principal hormônio responsável pelo desenvolvimento e manutenção da próstata é a testosterona (T), que é em grande parte (cerca de 95%) produzida pelos testículos, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) da hipófise. Os outros 5% são sintetizados nas glândulas adrenais ou supra-renais sob a ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise e liberado principalmente na forma de androestenediona, que é periféricamente convertida em testosterona (TAPLIN & HO, 2001).

A organogênese da próstata é dependente da interação epitélio-estroma de modo que a morfogênese e a diferenciação do epitélio e do mesênquima são ineficientes se os dois tecidos estão crescendo separados.

A ação dos andrógenos sobre as células prostáticas é mediada via receptor nuclear, mas nem todos os tipos celulares prostáticos possuem receptor para andrógenos, sugerindo que somente certos tipos celulares podem ser considerados alvos diretos da ação de andrógenos (PRINS *et al.*, 1991).

Já nas células basais e estromais da próstata, a T é convertida em dihidrotestosterona (DHT), que é cerca de 10 vezes mais potente que a testosterona, pela enzima 5- α -redutase, que se apresenta em duas isoformas (tipo I e tipo II), sendo a 5- α -redutase tipo I encontrada preferencialmente na pele e no fígado, e a do tipo II, principalmente nos tecidos que possuem dependência à andrógenos. A DHT então chega às células epiteliais, onde se liga aos receptores de andrógenos (RA) e é transportada para o núcleo, onde o dímero dihidrotestosterona-RA atua como um fator de transcrição de RNAm o qual será traduzido em proteínas que promoverão a manutenção do tecido prostático (WILLIAM DS, 2001).

Apesar de a T e a DHT se ligarem ao mesmo receptor, cada um desses hormônios exerce efeitos biológicos distintos sobre os tecidos alvos, como por exemplo, no desenvolvimento prostático, quando há o bloqueio da conversão de T em DHT, ocorre a diferenciação do seio urogenital em tecido prostático, mas o crescimento e desenvolvimento glandular são reduzidos drasticamente. (MARKER *et al.* 2003).

THOMPSON et al. (2002) propuseram que os andrógenos são capazes de regular a espessura da camada muscular lisa, compreendendo parte de um mecanismo da regulação da indução prostática, durante a embriogênese. Os autores demonstraram que o mesênquima é estimulado por andrógenos a diferenciar-se em células musculares lisas e a produzirem fatores que estimulam a diferenciação do epitélio, tanto em machos, como em fêmeas.

O desenvolvimento prostático é também muito sensível a níveis de estrógenos. Embriões de rato machos que se desenvolvem entre duas fêmeas apresentam altos níveis de estradiol, baixos níveis de testosterona, um aumento na expressão de RA na próstata, e conseqüentemente, próstatas maiores, que derivam de um desenvolvimento mais extenso. Resultados similares são obtidos quando fetos machos são expostos a baixos níveis de componentes estrogênicos. Em contrapartida, quando fetos machos são expostos a altos níveis de estrógenos ocorre uma redução no crescimento prostático e alterações na arquitetura glandular (MARKER et al, 2003).

A necessidade de se estudar as respostas desta glândula aos hormônios masculinos, sob várias condições, deve-se ao fato da glândula prostática, em humanos, ser 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 prostática benigna. Os hormônios, entre outros fatores, exercem papel importante na etiologia destas lesões. Além disso, essas lesões, malignas ou não, podem ser tratadas através de estratégias hormonais, incluindo a remoção de andrógenos (PRICE, 1963, COLOMBEL & BUTTYAN, 1995, DROLLER, 1997; RAUCH *et al.*, 1997).

4. O Acetato de Ciproterona e a Flutamida

O bloqueio androgênico tem sido um dos principais métodos utilizados no tratamento de doenças de metástase desde 1940 (GALBRAITH & DUCHESNE, 1997), sendo esse bloqueio feito através da orquiectomia (castração cirúrgica) e da administração de antiandrógenos (castração fisiológica). Durante esses processos, ocorre a atrofia do órgão, podendo ser notado uma grande redução no tamanho e no peso da próstata, que é

decorrente de uma diminuição do fluxo sanguíneo e da diminuição da síntese protéica. Nota-se também uma diminuição na altura e no número das células epiteliais (devido a ocorrência da apoptose), o que resulta em lóbulos reduzidos e com pouca atividade secretora, podendo observar-se um aumento do estroma glandular (CARVALHO *et al.*, 1997, VILAMAIOR *et al.*, 2000.)

Apesar de após a orquiectomia os níveis intracelulares de T diminuírem 90%, os níveis de DHT diminuem somente 75%. Existem evidências de que pequenas quantidades de andrógenos podem estimular o crescimento da próstata, e tem sido determinado que a produção de andrógenos adrenais contribui com aproximadamente 25% dos níveis de DHT presentes na próstata. Além disso, os aspectos psicológicos relacionados à castração, fazem com que os tratamentos utilizando antiandrógenos seja cada vez mais utilizados (DONJACOUR & CUNHA, 1988).

Durante a castração química, a atividade dos compostos androgênicos é inibida pela competição entre o antiandrógeno e a DHT pelo sítio de ligação do RA. A ação dos antiandrogênicos diminui também a síntese e/ou liberação de hormônios hipotalâmicos e seus fatores de liberação e de hormônios da hipófise anterior que atuam diretamente sobre as gônadas, inibindo assim a biossíntese ou secreção de andrógenos (NEUMANN & TOPERT, 1986, McLEOD & COVEMBAG, 1996). Assim, a castração química parece bloquear mais eficientemente toda a demanda androgênica do organismo.

O acetato de ciproterona (AC) é um antiandrógeno sintético esteroidal, derivado da progesterona, que tem capacidade de bloquear a ação androgênica nos tecidos alvos (Fig. 03) e sua atuação dá-se através da inibição competitiva da formação do complexo andrógeno-receptor, pois ele ocupa o sítio de ligação do RA, impedindo a ligação da DHT (HUANG *et al.*, 1985). Esse antiandrógeno foi introduzido no tratamento médico a mais de 25 anos e desde então vem sendo usado no tratamento de hirsutismo, acne, aumento das glândulas sebáceas e seborréia. Recentemente, foi autorizado o uso do acetato de ciproterona em combinação com estrógenos na reposição hormonal em mulheres. Em homens o acetato de ciproterona é usado em altas doses no tratamento de carcinoma prostático e outros males da próstata (KASPER, 2001).

receptor-DHT, e também pelo bloqueio de translocação do complexo receptor-DHT para o interior do núcleo, inibindo assim, a síntese de DNA prostático estimulada pela testosterona (BURTON & TRACHTENBERG, 1986).

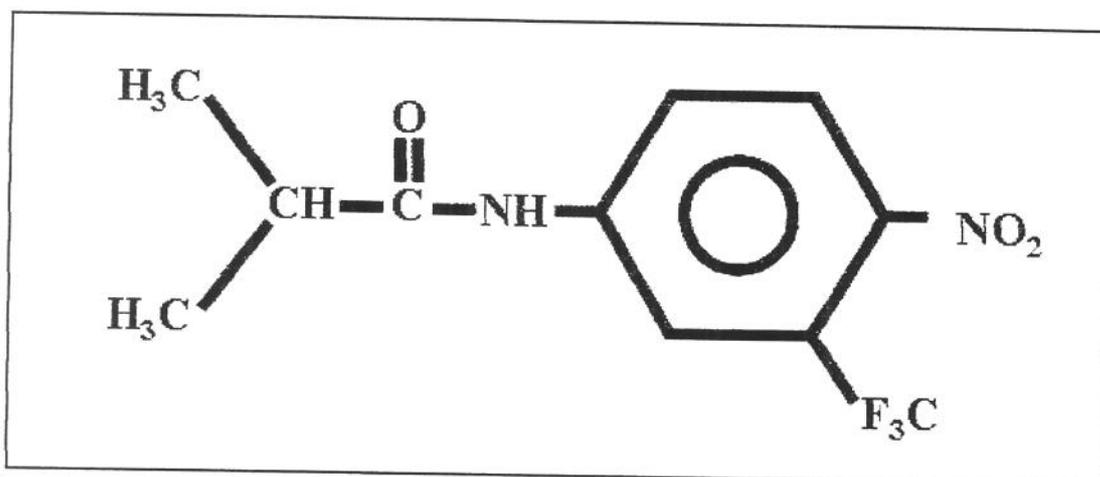


Fig. 04: Estrutura química da Flutamida (NERI, 1989).

A flutamida é rapidamente metabolizada por hidroxilação de sua cadeia lateral para o metabólito chamado de SCH16423 (3 α -trifluoro-e-metil-4'-nitro-m-lactotoluidide). Estudos de NERI, 1989, demonstraram que a concentração de flutamida foi relativamente baixa em tecidos de animais tratados com a droga, enquanto seu metabólito foi encontrado em concentrações 70 vezes mais altas, após 6 horas da dosagem. O metabólito foi encontrado concentrado na próstata ventral e na vesícula seminal de ratos, o que indica serem esses os órgãos alvos da atividade farmacológica da flutamida.

Embora muitos sejam os dados obtidos na literatura sobre os efeitos da castração cirúrgica e química, em relação ao tecido prostático, pouco se sabe sobre o efeito da recuperação deste processo após a reposição hormonal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, histológica e ultra-estruturalmente, por métodos morfométricos e histoquímicos, os efeitos da administração da testosterona após 30 dias de ablação hormonal por orquiectomia bilateral em comparação à castração química pelo acetato de ciproterona e flutamida seguida da supressão do tratamento antiandrogênico.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, histológica e ultra-estruturalmente, por métodos morfométricos e histoquímicos, os efeitos da administração da testosterona após 30 dias de ablação hormonal por orquiectomia bilateral em comparação à castração química pelo acetato de ciproterona e flutamida seguida da supressão do tratamento antiandrogênico.

O presente trabalho gerou um artigo que deverá ser vertido à língua inglesa e posteriormente submetido à publicação em periódico internacional.

IMPLICAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DOS DIFERENTES TIPOS DE CASTRAÇÃO E CONSEQÜÊNCIAS DA REPOSIÇÃO PELA TESTOSTERONA NA PRÓSTATA DO GERBILO (*Meriones unguiculatus*).

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar, estrutural, ultra-estrutural e histoquimicamente o comportamento do tecido prostático após 30 dias de ablação de T, tanto pela orquiectomia quanto pela castração química, ambas seguidas de administração de T exógena e suspensão do tratamento, respectivamente. Para tanto foram usados 40 gerbilos (*Meriones unguiculatus*, Criscetidae, Gerbilinae), os quais foram divididos em dois grupos experimentais (G.Ex. 01 e G.Ex. 02) e dois grupos controle (G.C. 01 e G.C. 02). G.Ex. 01 foi constituído por 20 animais os quais sofreram orquiectomia bilateral e após 30 dias receberam doses de cipionato de testosterona (TC) a uma concentração de 25mg/Kg, por um período de 48 horas, durante 21 dias, e os animais foram sacrificados após 0, 7, 14 e 21 dias do início do tratamento com TC. G.Ex. 02 (20 animais) recebeu doses semanais e alternadas dos antiandrógenos acetato de ciproterona e flutamida(0,3ml/animal/dia numa concentração de 25mg/Kg) diluídos em óleo de milho, durante 30 dias, e após o tratamento anti-androgênico foi suspenso e os animais foram sacrificados após 0, 7, 14 e 21 dias. O G.C. 01 foi constituído por 5 animais adultos não castrados e o G.C. 02 por 5 animais adultos castrados que receberam óleo de milho, o veículo de diluição das drogas. Uma intensa redução do peso do complexo prostático foi notada tanto após a castração cirúrgica quanto após a química quando comparados com o grupo controle. A dosagem hormonal mostrou uma redução na quantidade de T circulante no caso da castração cirúrgica e na castração química e o L.H. apresentou um aumento durante a castração cirúrgica e uma diminuição durante a castração química. Uma redução da altura epitelial razoavelmente mais intensa foi notada em G.Ex. 02, em comparação com G.Ex. 01 e as células epiteliais de ambos os grupos apresentaram poucas vesículas secretórias e uma pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER). As células musculares lisas (CML) apresentaram um aspecto estrelado após 30 dias de tratamento e a membrana basal apresentou-se intensamente pregueada, em ambos os grupos, mas a pregueação da membrana basal foi mais intensa em G.Ex. 01. Após a reposição hormonal, em G.Ex. 01 pôde ser notada uma retomada na altura epitelial, acompanhada da presença de numerosas e alargadas cisternas de RER. As CML apresentaram seu fenótipo característico, mas uma

enorme quantidade de RER foi encontrada em seu citoplasma, caracterizando uma modulação de seu fenótipo contrátil para um fenótipo secretor. A suspensão do tratamento antiandrogênico em G.Ex 02 promoveu um aumento da altura do epitélio e na quantidade de RER, e estas células passaram a apresentar uma grande quantidade de vesículas lipídicas em seu citoplasma basal. Como em G.Ex 01 as CML retomaram seu fenótipo característico, e também apresentaram um aumento na quantidade de RER. O tecido prostático apresentou uma notável capacidade de involução após supressão androgênica e uma capacidade de reorganização após reposição hormonal, mas os eventos decorrentes da orquiectomia e da subsequente administração de T mostraram mais intensos para o tecido prostático.

INTRODUÇÃO

Histologicamente, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta, com a atividade secretora principalmente ligada à sua porção alveolar. Entremeando as partes glandulares, existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com esparsas fibras conjuntivas (CARVALHO et al., 1996) e células musculares lisas (CML) que têm papel contráctil durante a ejaculação (ROSS et al., 1993). Nesse tecido estromal, também estão presentes gânglios, nervos e terminações nervosas. Envolvendo este órgão, tem-se uma fina cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas ao órgão nos diversos mamíferos já estudados (PRICE, 1963). O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se numa membrana basal que repousa sobre um estroma de natureza conjuntiva, onde são encontradas CML, as quais circundam os alvéolos e ductos, fibroblastos, células endoteliais dos vasos, macrófagos fixos, cada qual com papel específico na viabilidade e função secretora do tecido como um todo (CUNHA *et al.*, 1985 e 1996).

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

Histologicamente a próstata do Gerbilo apresenta um epitélio prismático simples composto por células secretoras. Entremeando as partes glandulares há um estroma conjuntivo vascularizado e com abundante musculatura lisa e uma relativa pobreza de fibras colágenas e elásticas entremeando a musculatura lisa (ZANETONI, 2002).

A glândula prostática é derivada de brotos epiteliais do seio urogenital da endoderme. O brotamento contínuo leva ao desenvolvimento das várias zonas prostáticas. Como os brotos em ambos os lados do *verumontanum* invadem o mesênquima, eles formam uma zona interna e uma zona externa. A perda de mesênquima é gradualmente substituída por tecido muscular liso organizado concêntricamente em volta do ácino prostático. No adulto, a uretra divide a próstata em uma região fibromuscular anterior compreendendo as regiões central e transicional, e uma região posterior, uma porção mais

glandular. A região central é associada aos ductos ejaculatórios. Seus ácinos são grandes e irregulares, e suas células contêm um citoplasma granular (DROLLER, 1997).

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

A diferenciação e o desenvolvimento do tecido prostático durante a embriogênese e a sua manutenção durante a vida adulta dependem da ação de andrógenos, os quais regulam o esses processos (CUNHA & CHUNG, 1981; CUNHA *et al.*, 1996).

NEMETH e LEE (1996) e SUGIMURA e colaboradores (1986a) sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais. A ação dos andrógenos se dá por intermédio de um receptor nuclear, que está presente somente em alguns tipos celulares prostáticos, o que leva a conclusão de que nem todas as células prostáticas são alvos diretos da ação de andrógenos (PRINS *et al.*, 1991).

O principal hormônio responsável pela diferenciação da próstata é a testosterona (T), que é produzida pelo testículo fetal e convertida em di-hidro-testosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase. A resposta celular aos andrógenos sistêmicos é mediada por um receptor de andrógenos (RA) que é ativado pela T e pela DHT.

A supressão dos andrógenos produzidos pelos testículos é o método de tratamento melhor estabelecido para o tratamento da maioria dos pacientes com câncer de próstata. Esse bloqueio androgênico pode ser obtido através da orquiectomia (castração cirúrgica) ou através do tratamento antiandrogênico (castração química). A orquiectomia promove uma rápida e drástica involução da próstata para um estado de atrofia que é mantido até que andrógenos sejam novamente administrados (BUTLER & SCHADE, 1958).

A castração em ratos adultos promove uma intensa regressão do tecido prostático em associação com a indução de apoptose em um grande número de células epiteliais e uma significativa redução na quantidade de vasos sanguíneos (SHABISGH *et al.*, 1999).

Apesar de após a orquiectomia os níveis intracelulares de T diminuírem 90%, os níveis de DHT diminuem somente 75%. Existem evidências de que pequenas quantidades

de andrógenos podem estimular o crescimento da próstata, e tem sido determinado que a produção de andrógenos adrenais contribui com aproximadamente 25% dos níveis de DHT presentes na próstata. Além disso, os aspectos psicológicos relacionados à castração, fazem com que os tratamentos utilizando antiandrógenos seja cada vez mais utilizados.

A castração química é feita com a utilização de drogas antiandrogênicas, as quais atuam intracelularmente, através da competição pelo sítio de ativação do RA impedindo sua ativação. A flutamida é um dos mais bem conhecidos antiandrógenos utilizados nesse tipo de tratamento. Este é um antiandrógeno não-esteroidal, que é um inibidor competitivo pelo receptor de T e DHT (NOLDUS et al, 1996).

Sua ação antiandrogênica se dá principalmente em nível citoplasmático por inibição competitiva de ligação da DHT com seu receptor, interferência com ligação receptor-receptor-DHT, e também pelo bloqueio de translocação do complexo receptor-DHT para o interior do núcleo, inibindo assim, a síntese de DNA prostático estimulada pela testosterona (BURTON & TRACHTENBERG, 1986).

O acetato de ciproterona (AC) é um antiandrógeno sintético esteroidal que tem capacidade de bloquear ação androgênica nos tecidos alvos e sua atuação se dá através da inibição competitiva da formação do complexo andrógeno-receptor, pois ele ocupa o sítio de ligação do RA, impedindo a ligação da DHT (HUANG *et al.*, 1985). Esse antiandrógeno foi introduzido no tratamento médico a mais de 25 anos e desde então vem sendo usado no tratamento de hirsutismo, acne, aumento das glândulas sebáceas e seborréia. Recentemente, foi autorizado o uso do acetato de ciproterona em combinação com estrógenos na reposição hormonal em mulheres. Em homens o acetato de ciproterona é usado em altas doses no tratamento de carcinoma prostático (KASPER, 2001).

NEUMANN (1994) afirma ser o uso do acetato de ciproterona superior a qualquer outro método de inibição androgênica na terapia de carcinoma prostático por duas razões: a baixa ocorrência de efeitos colaterais se comparados com estrógenos e a habilidade de eliminar os efeitos de andrógenos produzidos pelos testículos e pela supra-renal. Ele afirma também que, devido ao acetato de ciproterona ser uma potente progesterona, ele inibe a secreção de gonadotrofinas, promovendo assim o bloqueio na produção de andrógenos pelos testículos.

Embora muitos sejam os dados obtidos na literatura sobre os efeitos da castração cirúrgica e química, em relação ao tecido prostático, pouco se sabe sobre o efeito da recuperação deste processo após a reposição hormonal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, histológica e ultra-estruturalmente, por métodos morfométricos e histoquímicos, os efeitos da administração da testosterona após 30 dias de ablação hormonal por orquiectomia bilateral em comparação à castração química pelo acetato de ciproterona e flutamida seguida da supressão do tratamento antiandrogênico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 gerbilos machos adultos, com idade superior a 90 dias de nascimento. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UNESP (Botucatu-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP, em gaiolas plásticas opacas, com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha de pinho, contento cinco animais cada. A temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), a umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) e o período de 12/12 horas claro/escuro foram controladas durante todo o experimento. Todos os animais receberam água e ração comercial Nuvilab-CR1 (Nuvital, PR) *ad libitum*. A avaliação clínica, o peso corpóreo e o consumo de ração e água dos animais foram feitos, uma vez por semana.

Após a fase de aclimação, os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 2 grupos experimentais (G.Ex. 01 e G.Ex. 02) e 2 grupos controles (G.C. 01 e G.C. 02).

O grupo experimental foi constituído por 40 animais, dos quais 20 sofreram orquiectomia bilateral [G.Ex. 01] e 20 receberam alternadamente, por cinco semanas, os anti-andrógenos acetato de ciproterona e flutamida [G.Ex. 02]¹.

Após 5 semanas os grupos experimentais sofreram o seguinte tratamento:

¹ Durante as 5 semanas do experimento, os animais receberam alternadamente uma dose semanal de acetato de ciproterona e flutamida (0,3ml/animal/dia numa concentração de 1mg/Kg). Desta forma o G.Ex. 02 recebeu 3 doses de acetato de ciproterona e 2 doses de flutamida. A utilização do referido tratamento se deve ao fato das drogas terem ação anti-androgênica distintas (NEUMANN & TOPERT, 1986).

O G.Ex. 01 recebeu, por 21 dias 0,25ml de cipionato de testosterona a uma concentração de 1mg/Kg, em intervalos de 48 horas, segundo adaptação de POLLARD & LUCKERT (1987). Os animais foram sacrificados em intervalos de 0, 7, 14 e 21 dias.

O G.Ex. 02 teve o tratamento anti-androgênico suspenso e os animais foram sacrificados em intervalos de 0, 7, 14 e 21 dias à semelhança do G.Ex. 01.

Os Grupos controles (G.C.) foram estabelecidos da seguinte maneira: G.C. 01 – foi constituído por animais adultos não castrados (cinco animais); G.C. 02 – foi composto por animais castrados cirurgicamente que receberam 0,25 ml de óleo de milho - o veículo de diluição da testosterona (cinco animais).

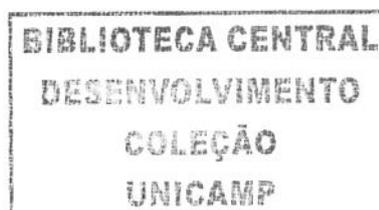
Após o sacrifício realizado por injeção única intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg de p.c.), foi feita incisão na face ventral do animal ao longo da linha média, da região púbica até o processo xifóide. Os músculos do abdome e pelve foram rebatidos lateralmente e a próstata de cada animal foi exposta. No momento da necropsia, as próstatas foram pesadas, fragmentadas e imersas em fixador por 24 horas.

Dosagem Hormonal

Amostras sanguíneas foram coletadas de todos os animais por decapitação. A quantificação sérica dos hormônios T e LH foi feita usando o Analisador Modular para Imunoensaio de Quimiluminescência ECI (Johnson & Johnson) de acordo com Weeks & Woodhead (1984). Para cada intervalo de tratamento foram utilizadas amostras de no mínimo, 3 animais. Em cada uma dessas amostras o teste foi feito em triplicata.

Microscopia de luz

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



Os cortes histológicos foram submetidos às seguintes colorações histológicas e técnicas histoquímicas para estudos dos componentes teciduais prostáticos: hematoxilina-eosina para estudos morfológicos gerais da próstata (BEHMER et al., 1976) e impregnação pela prata para reticulina para estudos das fibras reticulares no estroma prostático (BEHMER et al., 1976).

Detecção citoquímica da atividade fosfatásica ácida

Após o sacrifício fragmentos da próstata foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para fixação. Usando-se criostato Leica CM1850 foram obtidos cortes do material congelado, que então foi processado pelo método modificado de GÖMÖRI (1950) para demonstração da atividade fosfatase ácida prostática. Cortes de 10µm de espessura foram fixados por 5 min em formalina cálcio 10% e incubados por 110 minutos a 37° C em substrato com β-glicerofostato de sódio. O controle da reação histoquímica foi obtido através do uso meio de incubação não contendo o substrato ou o meio de incubação contendo fluoreto de sódio 0,01 M, que é um inibidor enzimático. Após a incubação os cortes foram lavados com tampão acetato 0,05 M em pH 5,0, tratados com sulfito de amônia 1% durante 3 minutos, lavados em água destilada e contracorados com Methyl-Green 0,1% durante 5 minutos.

Análise em Microscopia de luz e documentação fotomicrográfica

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX-60 e as imagens foram capturadas em sistema de análise de imagens *Image Pro Plus* ©Media Cybernetics acoplado a este microscópio.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos de tecido foram fixados em ácido tânico a 0,25% e glutaraldeído 3% em tampão Millonig pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em

tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão Millonig pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavados brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em etanol e acetona e incluídos em araldite, segundo COTTA-PEREIRA e colaboradores (1976).

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 50-70 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático LKB, com navalha de diamante. Estes cortes foram colhidos em telas de cobre de 200 "mesh", contrastados em solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1% por 5 minutos (BLOOM e AGHAJANIAN, 1968) e posteriormente contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958).

Depois de rápida lavagem em água bidestilada e secagem, os cortes foram colocados na superfície de uma gota de citrato de chumbo a 2%, em solução 1N de hidróxido de sódio (VENABLE e COGGESHALL, 1965, modificado), por 2 minutos, à temperatura ambiente. Depois de rápida e cuidadosa lavagem em água bidestilada, as telas foram secadas ao ar.

As observações e obtenção dos negativos micrográficos foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss – Modelo EM 910 do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, Campus de São José do Rio Preto (SP). O filme utilizado para a documentação foi Kodak Electron microscopy film, ASA 32.

Análise Morfométrico-estereológica

As frações volumétricas dos compartimentos prostáticos: epitélio, lume e estroma foram determinadas morfométrico-estereologicamente utilizando o Sistema Teste de Weibel, contendo 168 pontos e 84 linhas de acordo com HUTTUNEN e colaboradores (1981). Pelo menos 1000 pontos foram tomados para análise em cada situação do experimento. Dados de medida de altura do epitélio foram capturados pelo sistema de análise de imagens.

Análise Estatística

Os dados de todos os parâmetros avaliados foram comparados entre os grupos propostos. Dados de peso corpóreo e da próstata (absoluto e relativo) e dados morfométrico-estereológicos foram comparados utilizando-se os testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis e/ou Mann-Whitney), na dependência da distribuição dos dados. O nível de significância estatística adotada para os testes foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Microscopia de luz

A castração cirúrgica prolongada (G.Ex. 01) provocou uma intensa redução no peso do complexo prostático chegando a 0,079g ($\pm 0,04$) após 30 dias de castração cirúrgica (G.Ex. 01 I), quando comparado ao grupo controle (C.G.), que era de 0,51g ($\pm 0,28$). Durante a administração de testosterona (T) observou-se uma recuperação do peso do complexo prostático, sendo que após 21 dias de tratamento (G.Ex. 01 IV) seu peso foi de 1,03g ($\pm 0,18$) (Tab. 01).

Dosagens hormonais demonstraram que os níveis de T regrediram a 0,86 ng/ml ($\pm 0,90$) após 30 dias de castração cirúrgica, se comparados ao grupo controle, que apresentou 4,82 ng/ml ($\pm 0,33$) e ao mesmo tempo os níveis do hormônio luteinizante (LH) aumentaram para 1,33 U/L ($\pm 0,37$) quando comparado com o grupo controle que apresentou 0,4 U/L ($\pm 0,09$). Os níveis de T após a administração exógena de testosterona subiram para 23,15 ng/ml ($\pm 7,12$) após 21 dias de tratamento e os níveis de LH decaíram para 0,13 U/L ($\pm 0,09$) (Tab. 01).

Análises de amostras teciduais da próstata dos animais do grupo G.Ex. 01 corados pela técnica Hematoxilina-Heosina demonstraram que a castração cirúrgica provocou uma intensa redução da altura epitelial, que chegou ao valor de 8,79 μm ($\pm 1,79$), acompanhada

de uma notável redução do volume absoluto do lúmen e do estroma prostáticos, respectivamente, de 19,87mg ($\pm 4,18$) para 2,83mg ($\pm 0,76$) e de 19,96mg ($\pm 5,30$) para 4,46mg ($\pm 0,61$) (Tab. 01). Pôde-se notar que, após 30 dias de castração cirúrgica, o epitélio secretor apresentou pequeno número de vesículas secretoras na região apical de suas células, o que caracterizou a baixa atividade secretora do tecido prostático em contraste com o grupo controle (Fig. 1C e 1A-B). No estroma prostático pôde ser notado, após 30 dias de castração que as CML passaram a apresentar um fenótipo espinhoso, também houve um aumento na quantidade de colágeno, acompanhado de um espessamento das fibras reticulares (Fig. 1C e 2C). Após a administração de T pôde ser notado a presença de brotos epiteliais (Fig. 1F), que revelou uma intensa proliferação celular, devido a ativação do receptor de andrógeno (AR) pela T, e uma gradual retomada da altura do epitélio secretor, que chegou a atingir 32,01 μ m ($\pm 7,31$) após 30 dias de administração do hormônio acompanhado de um aumento do volume luminal absoluto que chegou a 36,18mg ($\pm 10,54$) e do volume estromal absoluto até o valor de 3,02mg ($\pm 10,30$) (Tab. 01).

Após 30 dias de tratamento anti-androgênico (G.Ex. 02 I), o complexo prostático também apresentou uma expressiva redução de peso, chegando a 0,085g ($\pm 0,03$), enquanto no grupo controle apresentou o peso de 0,51g ($\pm 0,28$). A suspensão do tratamento levou a uma gradual recuperação do peso do complexo prostático, que apresentou o peso de 0,52g ($\pm 0,12$) após 21 dias (Tab. 01).

No grupo G.Ex. 02 a dosagem hormonal demonstrou uma redução na quantidade circulante de T de 4,82 ng/ml ($\pm 0,4$) (grupo controle) para 0,83 ng/ml ($\pm 0,11$) e uma redução da quantidade de LH de 0,4 U/L ($\pm 0,09$) para 0,24 U/L ($\pm 0,24$) após 30 dias de tratamento anti-androgênico. Após a suspensão do tratamento androgênico o nível de T sofreu um aumento, chegando a 1,77 ng/ml ($\pm 0,89$) e houve um aumento no nível de LH para 0,51 U/L ($\pm 0,2$) (Tab. 01).

Fragmentos deste grupo analisados à microscopia de luz mostraram que a altura do epitélio secretor dos ácinos prostáticos sofreu uma grande redução, chegando a 7,96 μ m ($\pm 1,42$), enquanto que no grupo controle esse valor era de 14,66 μ m ($\pm 3,61$) e uma notável redução no volume do lúmen e estroma prostáticos, que apresentaram, respectivamente, de 19,87mg ($\pm 4,18$) e 19,96mg ($\pm 5,3$) para 1,20mg ($\pm 0,76$) e 5,22mg (0,59) (Tab 01). Aqui

também pode ser notada uma diminuição das vesículas de secreção na região apical das células epiteliais, o que demonstra uma baixa atividade secretora dessas células, as CML apresentaram um aspecto espinhoso, como visto em G.Ex 01 (Fig. 1D) e verificou-se um aumento na quantidade de colágeno no estroma prostático, e um espessamento das fibras reticulares que permeiam os ácinos (Fig. 2D). Após a suspensão do tratamento antiandrogênico, observou-se uma recuperação da altura do epitélio secretor, chegando ao valor de $14,45\mu\text{m} (\pm 0,39)$ (Tab. 01), bem como a presença de vesículas de secreção na região apical das células (Fig. 1E). Notou-se um aumento na taxa de proliferação celular, que pode ser visto através da presença de brotos epiteliais (Fig. 1J), o que se deve a um gradual aumento da ativação do RA pela T, que antes era ocupado pelo antiandrógeno.

Os volumes absolutos dos compartimentos prostáticos mostraram um aumento, sendo que o lúmen chegou a $19,17\text{mg} (\pm 5,11)$ e o estroma a $19,96\text{mg} (\pm 5)$ (Tab. 01).

Atividade fosfatásica ácida

Os material processado para demonstração da atividade fosfatase ácida prostática (FAP) revelou um comportamento padrão de tal enzima durante os dois experimentos.

No grupo G.Ex 01, após 30 dias de castração, o tecido analisado apresentou uma baixíssima atividade FAP, se comparada ao grupo controle (Fig. 3C e 3A-B). Logo aos 7 dias de tratamento com T houve um acentuado aumento das marcações que evidenciam a atividade da enzima, que se manteve alta durante o restante do tratamento até 21 dias, mas sua presença se deu nas CML não sendo detectável no epitélio (Fig. 3E e F).

Resultado semelhante foi visto no grupo G.Ex 02, após 30 dias de tratamento antiandrogênico, onde uma baixa atividade da enzima foi detectada (Fig. 3D). A diferença entre os grupos se deu após a suspensão do tratamento, pois o aumento da atividade da FAP foi gradual, sendo média após 7 dias e alta após 21 dias de suspensão do tratamento (Fig. 3H e I), mas também nas CML, e não no epitélio. O controle da reação se deu pela incubação de alguns dos cortes histológicos sem a presença do substrato β -glicerofosfato de sódio, o que ocasiona uma marcação negativa (Fig. 3G e 3J).

Ultra-estrutura

A análise das micrografias eletrônicas de G.Ex 01 confirmou a grande diminuição na altura do epitélio prostático secretor após 30 dias de castração em comparação com o grupo controle, acompanhada de pequena quantidade de vesículas secretoras caracterizando baixa atividade secretora (Fig. 4A e D). Outra característica notada, que também levou a uma caracterização de baixa atividade secretora do epitélio foi a pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER) visto nas micrografias eletrônicas (Fig. 4D), enquanto que no grupo controle essa organela está presente em abundância (Fig. 4B).

No estroma prostático, após 30 dias de castração observou-se um aumento do número de fibras de colágeno e as células musculares lisas mostraram-se com o contorno espinhoso e disforme. A membrana basal desse grupo experimental apresentou-se intensamente pregueada, apresentando reentrâncias em direção ao estroma nas quais, muitas vezes, estavam localizadas células epiteliais basais (Fig. 4D e E). Ainda após 30 dias de castração cirúrgica pôde ser visto no estroma um intenso acúmulo de resíduos de membrana basal a qual sofreu degradação durante a regressão tecidual (Fig. 4E).

Após a administração de T, foi observado, a recuperação da altura do epitélio prostático característico e a presença de numerosas vesículas de secreção, e no citoplasma das células pôde ser notada a presença de grande quantidade de RER que apresentou um alargamento de suas cisternas (Fig. 5A), o que caracteriza alta atividade de síntese protéica. Logo após 7 dias de tratamento com T foi notado a presença de numerosas vilosidade na membrana apical das células epiteliais (Fig. 5A). Ainda na parte apical do citoplasma das células epiteliais pôde ser notada a presença de “blebs” (protuberâncias apicais), que continham em seu interior a numerosas cisternas do RER (Fig. 5B). No estroma, pôde ser visto que as células musculares lisas retomaram sua morfologia característica, mas durante a reposição hormonal com T ainda pôde ser notado a modulação dessas células de um fenótipo contrátil para um fenótipo secretor, que aconteceu durante a castração, o que pôde ser verificado devido a presença de razoável quantidade de RER em seu citoplasma (Fig. 5C, D e G). Houve também, uma diminuição na quantidade de colágeno no estroma

prostático após a reposição hormonal, mas a presença de fibroses ainda pôde ser notada juntamente com os resíduos de membrana basal (Fig. 5D).

A análise ultraestrutural do grupo G.Ex 02, também mostrou a intensa redução do epitélio prostático após 30 dias de tratamento antiandrogênico em comparação com o grupo controle e uma pequena quantidade de vesículas secretoras (Fig. 4G). O RER foi encontrado em pequena quantidade nas células epiteliais, o que indica que também nesse grupo estas células apresentam baixa atividade de síntese e de secreção (Fig. 4G). Houve um considerável aumento nas fibras colagênicas no estroma prostático do grupo em questão, onde foi localizada a presença de fibroses (Fig. 4I). Foi visto ainda que as células musculares lisas apresentaram uma morfologia disforme, com um aspecto espinhoso (Fig. 4J), a membrana basal apresentou-se pregueada, invaginando-se em direção ao estroma (Fig. 4I), mas com uma intensidade menor do que visto no grupo G.Ex 01 após 30 dias de castração e foi visto a presença de resíduos de membrana basal, a qual sofreu degradação durante a regressão prostática (Fig. 4H).

A suspensão do tratamento antiandrogênico promoveu a retomada da altura e da atividade secretora do epitélio prostático (Fig. 6A), o que pode ser notado pela presença de grande quantidade de RER, com suas cisternas alargadas (Fig. 6B e G), um acentuado número de vesículas secretoras acompanhadas por numerosas “blebs”, que continham em seu interior cisternas de RER, como visto em G.Ex 01 (Fig. 6C). Um menor número de vilosidades foi visto na região apical das células epiteliais, em comparação com G.Ex 01 (Fig. 6F). Notou-se também um acúmulo de gotículas de lipídeos na região basal das células epiteliais (Fig. 6E). No estroma prostático, já após 7 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico, observou-se que as células musculares lisas retomaram sua forma característica, com uma membrana uniforme (Fig. 6D), mas após 21 dias foi encontrada grande quantidade de RER e presença de grânulos de lipofucina no citoplasma dessas células (Fig. 6H), o que sugere uma modulação dessas células de um fenótipo contrátil para um fenótipo sintético. E também após 21 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico pôde-se notar uma diminuição na quantidade de colágeno, mas ainda notou-se a presença de fibrose como visto no grupo G.Ex 01 após 21 dias de tratamento com T (Fig. 6D), acompanhada da presença de resíduos de membrana basal (Fig. 6H).

DISCUSSÃO

A próstata mostrou-se extremamente dependente dos níveis séricos de T, pois a castração (tanto a cirúrgica, quanto a química) provocou uma intensa involução tecidual, acompanhada da perda da atividade secretora das células epiteliais. Já após a reposição hormonal pôde ser notada a recuperação da morfologia e das funções prostáticas.

Segundo LIAO e colaboradores (1974) a flutamida e o acetato de ciproterona são efetivamente equivalentes na resposta tecidual, no que tange à regressão do peso da próstata, quando administrados em doses diárias de 1 a 50mg/kg. Em doses semanais de 1mg/kg, a combinação dos dois anti-andrógenos foi menos efetiva que a castração cirúrgica na regressão do peso do complexo prostático. Já a reorganização do complexo prostático mostrou-se mais gradativa e natural em G.Ex 01, pois após 21 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico o peso do complexo mostrou-se equivalente ao grupo controle, enquanto que em G.Ex 02, logo após 14 dias de tratamento com T o peso do complexo do grupo controle foi ultrapassado, chegando a mais que o dobro aos 21 dias.

O tratamento com antiandrógenos mostrou-se levemente mais eficaz na redução de T circulante, em relação à castração prolongada, o que pode se relacionado ao fato de o acetato de ciproterona bloquear a produção de LH pela hipófise, o que por sua vez provoca a diminuição na produção de T pelos testículos (NEUMAN, 1994).

Houve um aumento no nível de LH circulante em G.Ex 01 após 30 dias de castração cirúrgica, o que se explica pelo baixo nível de T, provocada pela retirada dos testículos, o que promoveu um estímulo da hipófise, aumentando a produção do LH em uma tentativa de estimular os testículos a produzirem uma maior quantidade de T. Após a administração exógena de T, esse hormônio inibiu a produção de LH pela hipófise que teve um decréscimo em seus níveis sanguíneos.

Já em G.Ex 02, houve uma diminuição nos níveis de LH após 30 dias de tratamento antiandrogênico, pois, como já foi dito, o acetato de ciproterona inibe a produção desse hormônio pela glândula hipófise. Já após a suspensão do tratamento, os níveis de LH voltam a subir, equiparando-se aos níveis normais.

Como descrito por SUGIMURA e colaboradores (1986b), o tecido prostático é altamente dependente dos níveis séricos de T, e tanto a castração química quanto a castração cirúrgica promovem a redução dos volumes dos compartimentos prostáticos. Isso foi confirmado em nosso trabalho, pois ambas as castrações promoveram a redução dos volumes absolutos de todos os compartimentos prostáticos. O tratamento antiandrogênico mostrou-se mais eficaz do que a castração cirúrgica na redução do volume absoluto de todos os compartimentos, exceto na redução do volume absoluto do estroma muscular. Já a reorganização tecidual mostrou-se mais natural e gradativa durante a suspensão do tratamento antiandrogênico, pois ao fim de 21 dias de suspensão, os volumes absolutos dos compartimentos apresentaram-se equivalentes aos volumes absolutos dos compartimentos do grupo controle, enquanto que durante a administração de T no grupo G.Ex 01 os volumes absolutos dos compartimentos epiteliais, luminiais e do estroma muscular do grupo controle já haviam sido ultrapassados logo aos 14 dias de tratamento.

A diminuição na altura do epitélio prostático se mostrou razoavelmente mais eficaz no tratamento antiandrogênico em comparação com a castração cirúrgica, pois como descrito por (NEUMAN, 1994; NOLDUS et al, 1996) os antiandrógenos promovem o bloqueio da ação de toda e qualquer T produzida pelo organismo, e o acetato de ciproterona ainda promove diminuição de LH pela glândula hipófise, o que por sua vez implica em uma diminuição da produção de T pelos testículos (NEUMAN, 1994).

A presença de inúmeros brotos epiteliais demonstra a proliferação epitelial a qual contribuirá para a formação dos ductos prostáticos durante o desenvolvimento prostático e durante a reorganização do tecido epitelial (MARKER *et al*, 2003; VILLAMAIOR *et al*, 2005b), como aconteceu no caso da reposição hormonal após castração cirúrgica e da suspensão do tratamento antiandrogênico.

A enzima FAP, que é produzida pelas células epiteliais acinares da próstata é encontrada em lisossomos e vesículas secretórias, e participa na hidrólise de fosforilcolina no líquido seminal e também é considerado um marcador de desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas. Segundo Tenniswood *et al*. (1976), a síntese dessa enzima é dependente de andrógenos. Isso explica o padrão comportamental da FAP durante os tratamentos, onde seus níveis caem quando há uma deficiência sérica de T e

aumentam após a reposição hormonal. Mas a reposição de T após a castração cirúrgica provoca uma resposta mais brusca da atividade da FAP, que se mostra alta logo após 7 dias de tratamento, enquanto que na suspensão do tratamento antiandrogênico o aumento da atividade enzimática foi gradual, atingindo um nível comparado ao controle somente após 21 dias. E surpreendentemente, após a reposição hormonal em ambos os grupos, a atividade da FAP mostrou-se presente nas CML e não detectável no epitélio, como no grupo controle. Isso pode estar relacionado com a atividade lisossomal destas células, durante o processo de recuperação à castração. Isto pôde ser detectado quando da avaliação destas células à MET, que apresentaram grandes quantidades de inclusões citoplasmáticas com lipofuscina e corpos residuais.

Como descrito por Carvalho & Line (1996), pôde ser notado, em ambos os grupos, após 30 dias de castração inúmeras dobras na membrana basal das células epiteliais, as quais se projetam em direção ao estroma. Mas essas dobras foram mais intensas no grupo G.Ex 01 após 30 dias de castração, o que sugere que tal tratamento é mais agressivo que a administração de antiandrógenos.

Durante a regressão do tecido prostático, as metaloproteinases atuam na degradação dos componentes da membrana basal (JUSTULIN et al, 2005b), mas em ambos os grupos, após 30 dias de castração ocorre a presença de resíduos da membrana basal, conforme descrito por Justulin et al (2005a), os quais persistem após a reposição hormonal. A castração cirúrgica, mostrou-se mais agressiva nesse ponto, pois quando os dois grupos são comparados o G.Ex 01 após 30 dias de castração mostra uma reorganização tecidual mais forçada, o que é evidenciado pela maior intensidade das dobras da membrana basal, um maior acúmulo de fibrilas de colágeno e resíduos de membrana basal.

Vilamaior *et al.* (2005a) demonstraram que as células musculares lisas do estroma da próstata ventral de rato sofrem uma modulação de um fenótipo contrátil para um fenótipo sintético após castração cirúrgica o que ainda pôde se visto durante a reposição de T nos dois grupos experimentais.

Os dados observados demonstram uma capacidade de involução e regressão do tecido prostático, mediante a diminuição da disponibilidade de T causada pela castração cirúrgica ou química, bem como sua capacidade de reorganização após reposição hormonal. Praticamente todas as funções prostáticas são retomadas após a reposição hormonal: a atividade secretora, a altura do epitélio secretor, a quantidade de organelas secretoras. Mas no estroma prostático algumas alterações decorrentes da supressão do T persistem após a reposição hormonal: em G.Ex 02 a quantidade de colágeno diminui mas ainda pode ser notada a presença de focos de fibrose após 21 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico e houve uma modulação do fenótipo contrátil das células musculares lisas para um fenótipo secretor.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais ao técnico de Centro de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Luiz Roberto Faleiros Jr. pelo auxílio nas técnicas laboratoriais, à técnica do Laboratório de Morfologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Rosana Silistino de Souza, pela confecção dos cortes ultra-finos, e à Fapesp e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

FIGURAS

Fig. 01: Cortes de próstata ventral corados em HE. **A e B)** Controle. Lúmen (L), epitélio (epi) e célula muscular lisa (cml). **C)** Orquiectomia 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml), membrana basal pregueada (cabeça de seta), célula muscular lisa estrelada (seta). **D)** Castração química 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml), membrana basal pregueada (cabeça de seta), célula muscular lisa estrelada (seta). **E)** Sete dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml), vaso sanguíneo (vs). **F)** Sete dias T. Broto epitelial (asterisco). **G)** 14 dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml). **H)** 21 dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml). **I)** Sete dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Epitélio (epi), célula muscular lisa (cml). **J)** Sete dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Broto epitelial (asterisco). **K)** 14 dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Epitélio (epi), célula muscular lisa (cml). **L)** 21 dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), epitélio (epi), célula muscular lisa (cml).

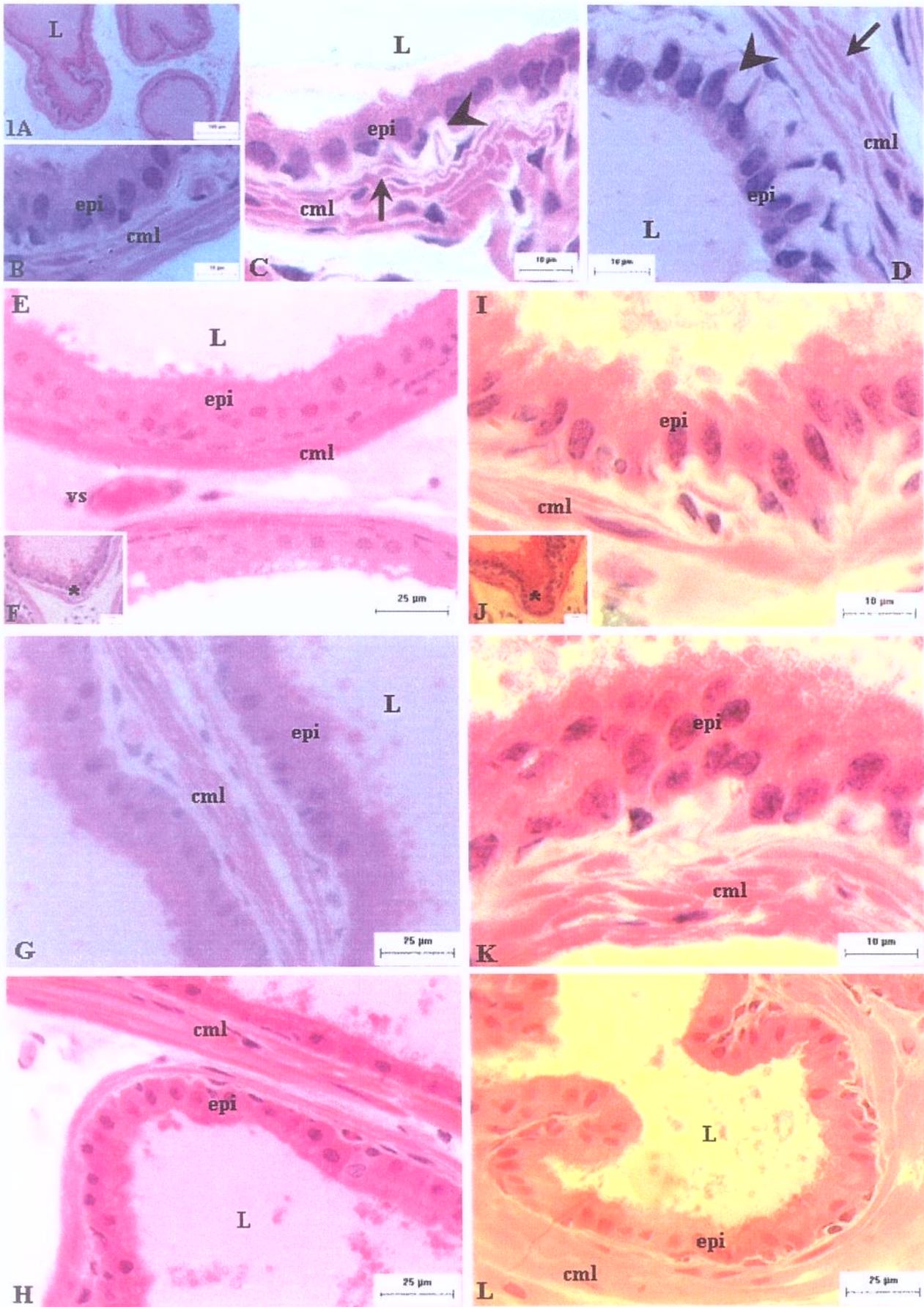


Fig. 02: Cortes de próstata ventral corados pela Reticulina de Gömori. **A e B)** Controle. Lúmen (L), epitélio (epi), fibra reticular (seta). **C)** Orquiectomia 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), colágeno (Co), fibra reticular (seta). **D)** Castração química 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), colágeno (Co), fibra reticular (seta). **E)** Sete dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), colágeno (Co), fibra reticular (seta). **F)** 14 dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), fibra reticular (seta). **G)** 21 dias T. Lúmen (L), epitélio (epi), fibra reticular (seta). **H)** Sete dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), epitélio (epi), colágeno (Co), fibra reticular (seta), broto epitelial (asterisco). **I)** 14 dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), epitélio (epi), fibra reticular (seta). **J)** 21 dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), epitélio (epi), fibra reticular (seta).

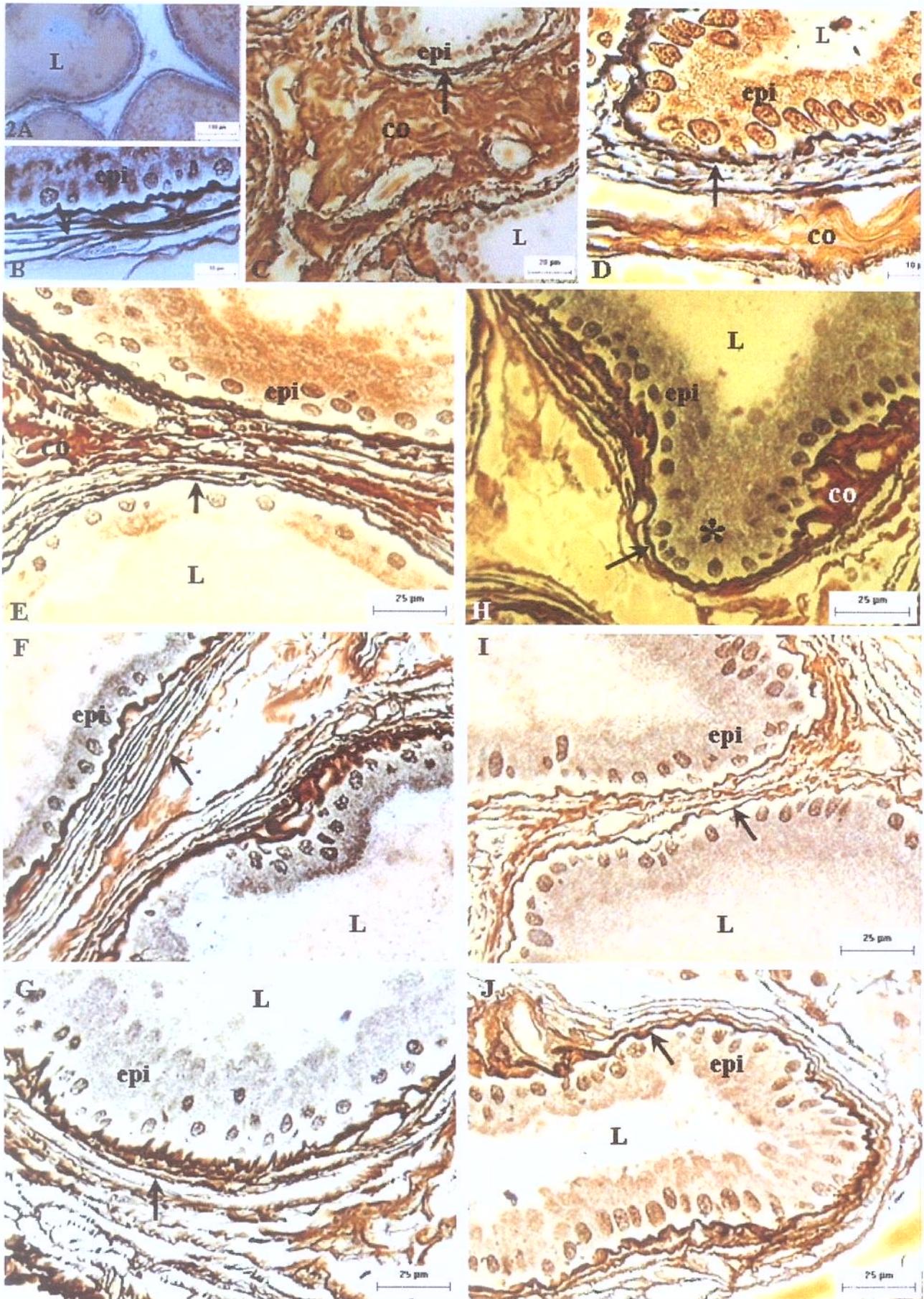
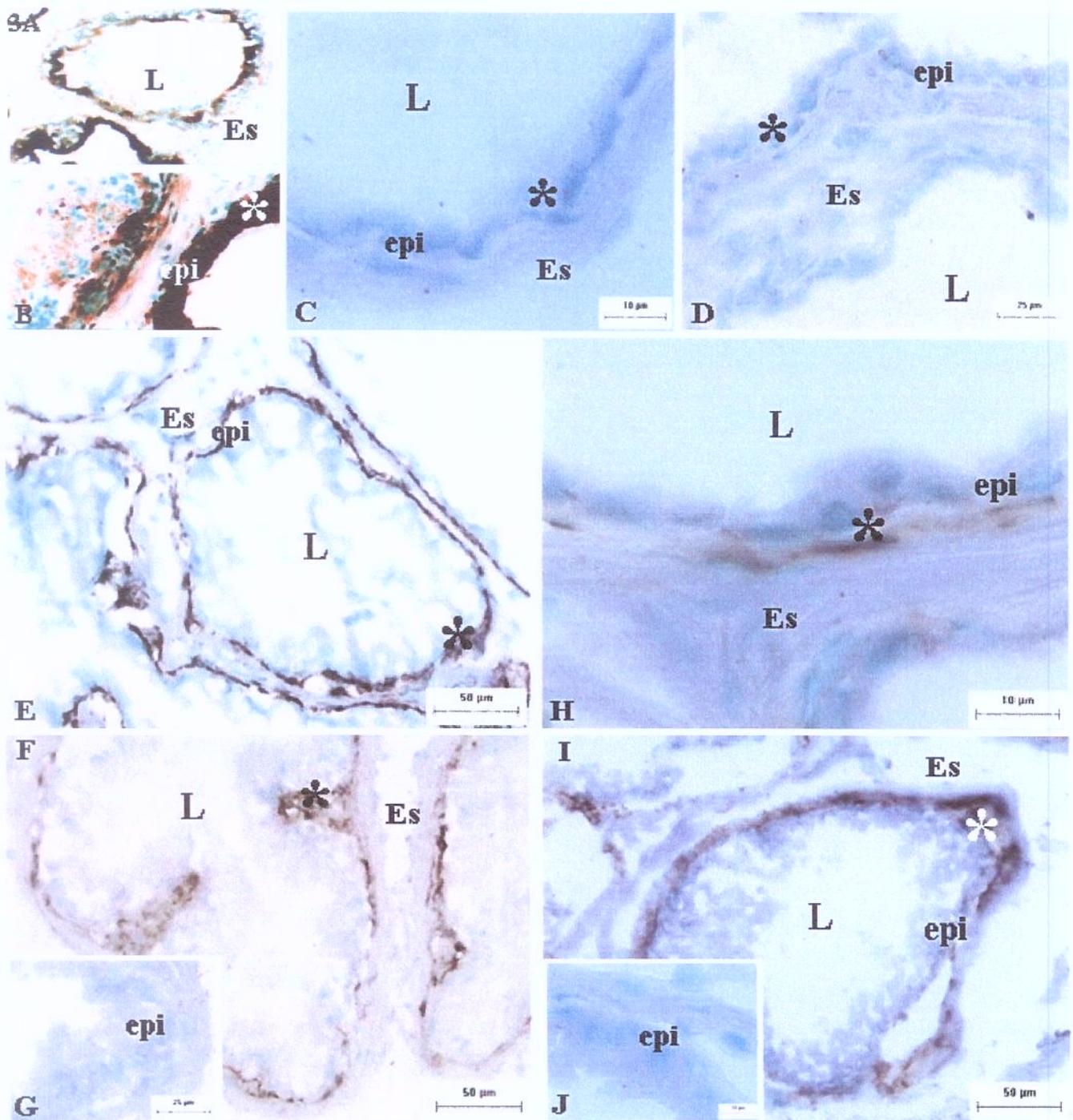


Fig. 03: Reação para enzima fosfatase ácida em cortes de próstata ventral. **A e B)** Animais controle. Lúmen (L), estroma (Es), epitélio (epi), marcação positiva (asterisco). **C)** Orquiectomia 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), estroma (Es) e marcação fraca (asterisco). **D)** Castração química 30 dias. Lúmen (L), epitélio (epi), estroma (Es) e marcação fraca (asterisco). **E)** Sete dias T. Lúmen (L), estroma (Es), epitélio (epi) e marcação positiva (asterisco). **F)** 21 dias T. Lúmen (L), estroma (Es) e marcação positiva (asterisco). **G)** Controle da reação. Epitélio (epi). **H)** Sete dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), estroma (Es), epitélio (epi) e marcação média (asterisco). **I)** 21 dias suspensão do tratamento antiandrogênico. Lúmen (L), epitélio (epi), estroma (Es) e marcação positiva (asterisco). **J)** Controle da reação. Epitélio (epi).



BIBLIOTECA CENTRAL
 DESENVOLVIMENTO
 COLEÇÃO
 UNICAMP

Fig. 04: Micrografias eletrônicas de próstata ventral. **A-C)** Controle. Lúmen (L), epitélio (epi), núcleo (N), colágeno (Co), retículo endoplasmático (asterisco), célula muscular lisa (cml) e membrana basal (seta). **D-F)** Orquiectomia 30 dias. Epitélio (epi), colágeno (Co), célula basal (Cb), célula muscular lisa (cml), membrana basal (seta) e colágeno (asterisco). **G-J)** Castração química 30 dias. Epitélio (epi), colágeno (Co), célula muscular lisa (cml), membrana basal (seta) e resíduo de degradação da membrana basal (asterisco).

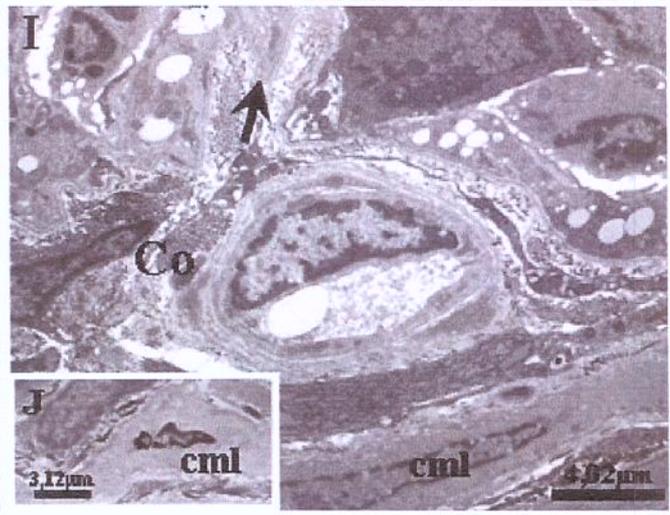
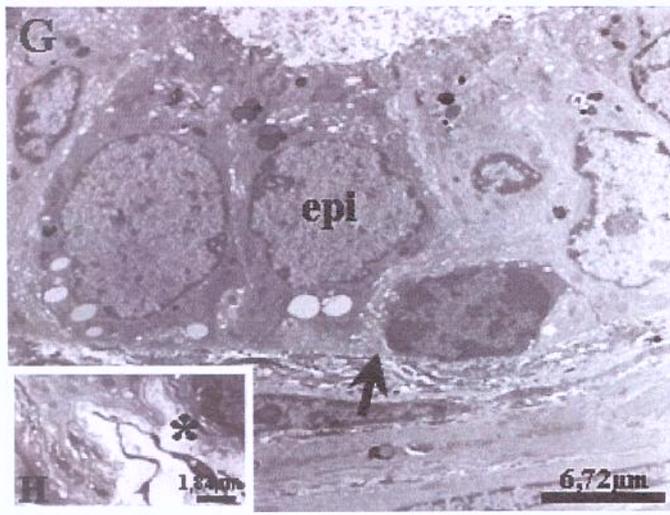
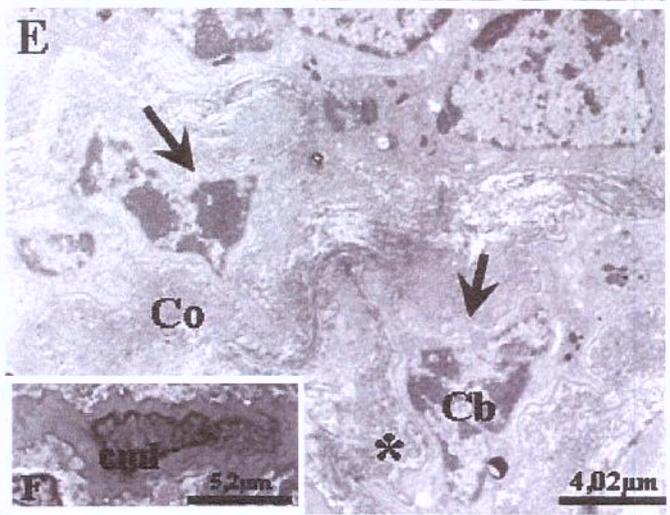
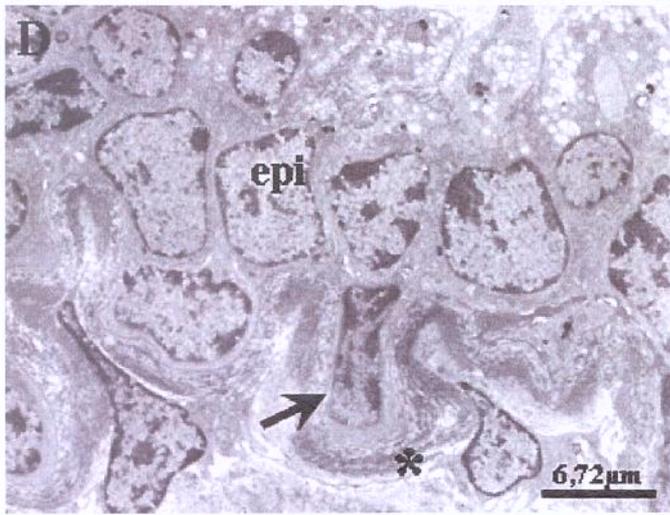
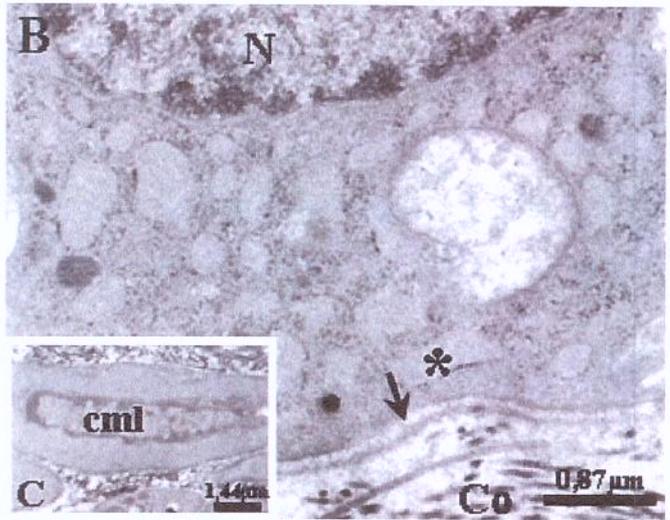
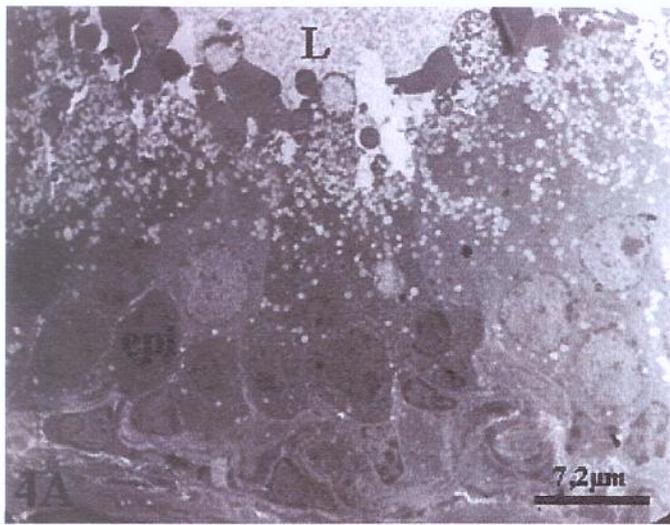


Fig. 5: Micrografias eletrônicas de próstata ventral. **A-D)** 07 dias de T. Lúmen (L), epitélio (epi), retículo endoplasmático rugoso (RER e seta), célula muscular lisa (cml), núcleo (N), membrana basal (mb), colágeno (Co), resíduo de membrana basal (asterisco. **E-H)** 21 dias de T. Lúmen (L), epitélio (epi), retículo endoplasmático rugoso (RER e seta), célula muscular lisa (cml), núcleo (N), membrana basal (mb), colágeno (Co), resíduo de membrana basal (asterisco), complexo de golgi (G) e vesículas de secreção (V).

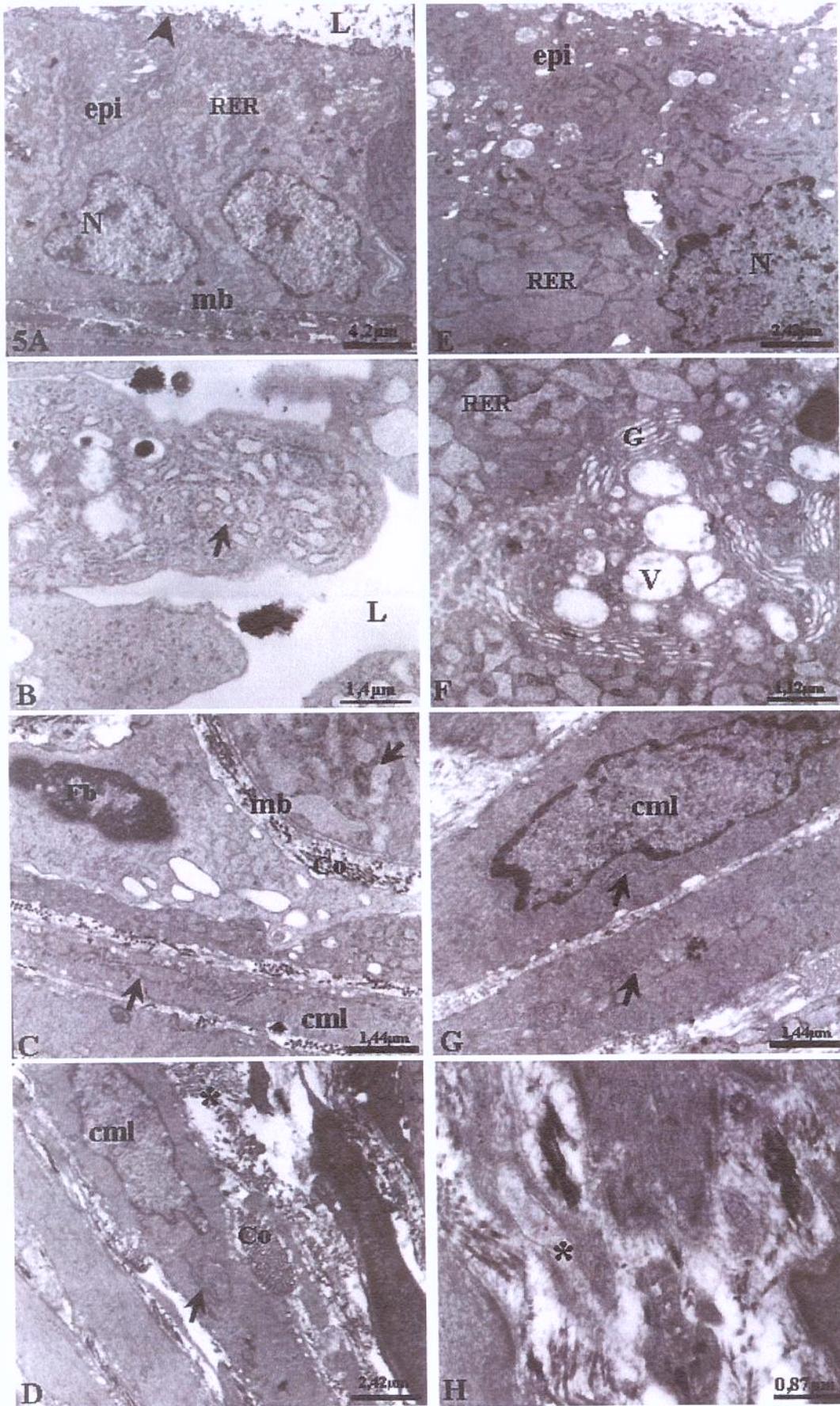


Fig. 6: Micrografias eletrônicas de próstata ventral. **A-D)** 07 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico. Epitélio (epi), núcleo (N), membrana basal (mb), célula muscular lisa (cml), retículo endoplasmático rugoso (RER), colágeno (Co) e vesículas de secreção (V). **E-H)** 21 dias de suspensão do tratamento antiandrogênico. Epitélio (epi), núcleo (N), membrana basal (mb), célula muscular lisa (cml), retículo endoplasmático rugoso (RER), colágeno (Co), membrana apical (seta), resíduo de membrana basal (asterisco) e grânulo de lipofucina (cabeça de seta).

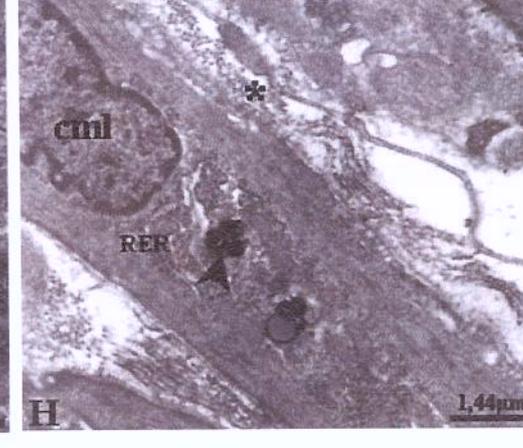
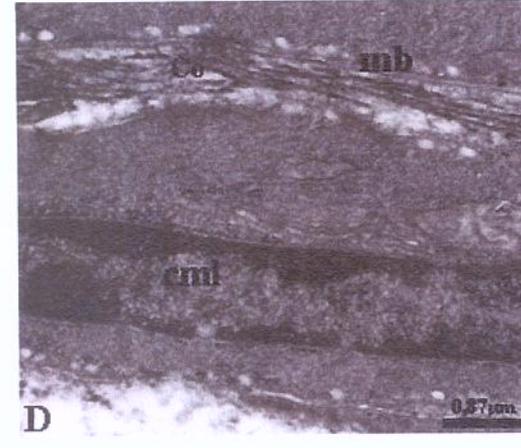
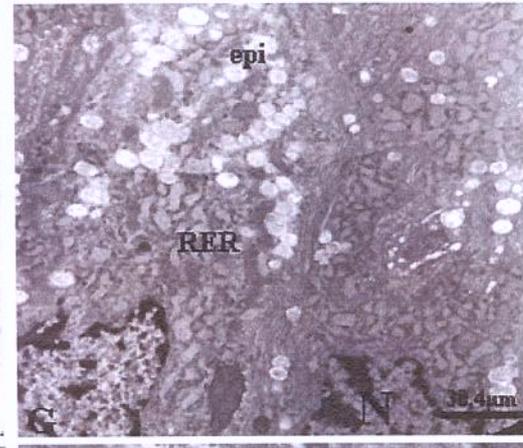
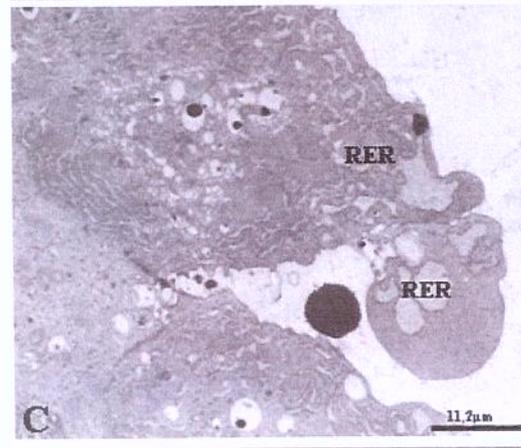
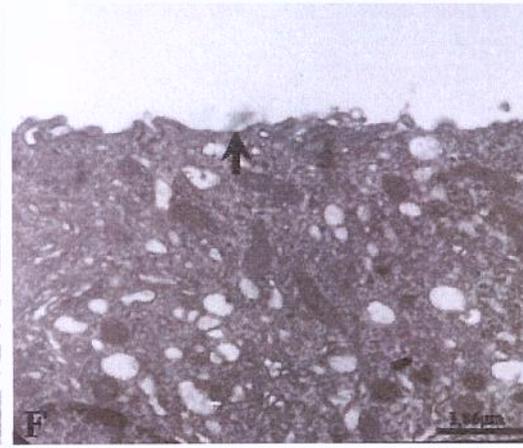
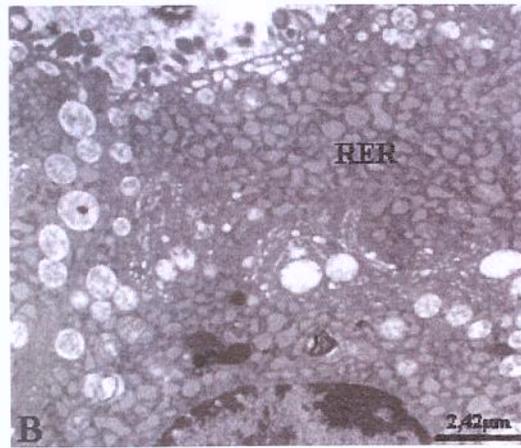
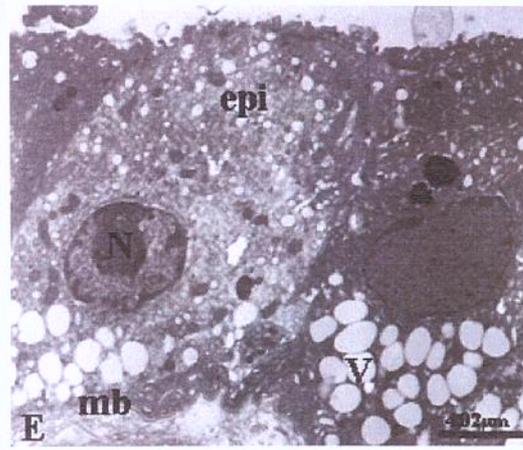
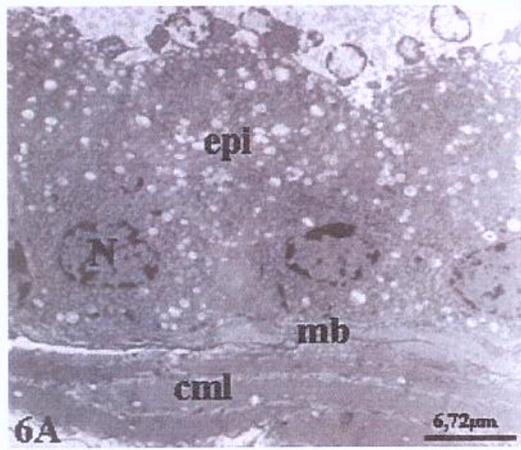


Tabela 01: Valores relativos às análises estereológicas, morfométricas e sorológicas (MEAN ±SD) referentes aos grupos controle, G.Ex. 01 (castração cirúrgica seguida de administração de T) e G.Ex. 02 (castração química seguida de suspensão do tratamento). CONT: controle; LH: Hormônio Luteinizante; TESTO: Testosterona; a, b, c, d, e: superíndices distintos indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

ESTEREOLOGIA							
Vol. Abs. Do compartimento (g)	CONT		30d C	7d	14d	21d	
EPITÉLIO	10,69 ±3,38 ^a (100%)	G.Ex. 01	VA	2,02 ±0,44 ^b	12,14 ±2,61 ^a	21,32 ±6,02 ^c	24,17 ±8,6 ^d
			%	18,89	113,5	199,43	254,16
		G.Ex. 02	VA	2,08 ±0,56 ^b	8,9 ±1,9 ^a	12,43 ±2,9 ^a	12,42 ±3 ^a
			%	19,45	83,25	115,06	116,18
LUMEM	19,87 ±4,18 ^a (100%)	G.Ex. 01	VA	2,83 ±0,76 ^b	13,57 ±3,82 ^c	30,73 ±9,89 ^d	36,18 ±10,5 ^e
			%	14,24	68,29	154,65	182,08
		G.Ex. 02	VA	1,2 ±0,76 ^b	9,28 ±2,7 ^c	16,12 ±5,2 ^a	19,17 ±5,1 ^a
			%	6,03	46,7	81,12	96,47
ESTROMA MUSCULAR	7,08 ±2,17 ^a (100%)	G.Ex. 01	VA	2,18 ±0,59 ^b	6,8 ±1,6 ^a	15,5 ±4,7 ^c	21,43 ±1,06 ^d
			%	30,79	96,04	218,92	302,68
		G.Ex. 02	VA	2,12 ±0,72 ^b	5,68 ±1,8 ^a	11,65 ±3,22 ^d	9,62 ±2,4 ^a
			%	29,94	80,22	164,54	135,87
ESTROMA NÃO MUSCULAR	12,86 ±4,69 ^a (100%)	G.Ex. 01	VA	2,27 ±0,52 ^b	3,84 ±3,4 ^b	14,46 ±10,1 ^{ac}	17,61 ±8,4 ^c
			%	17,65	29,86	112,44	136,93
		G.Ex. 02	VA	4,87 ±2,3 ^b	4,88 ±0,81 ^b	9,8 ±3,7 ^a	10,3 ±4,43 ^a
			%	37,86	37,94	76,2	80,09
MORFOMETRIA							
Alt. Da camada (µm)							
EPITÉLIO	14,66 ±3,61 ^a	G.Ex. 01	8,78 ±1,79 ^b	15,43 ±3,49 ^a	22,15 ±4,35 ^c	32,01 ±7,31 ^d	
		G.Ex. 02	7,96 ±1,42 ^b	9,37 ±2,41 ^c	11,07 ±3,59 ^d	14,45 ±5,65 ^a	
MUSCULAR	13,81 ±4,79 ^a	G.Ex. 01	8,74 ±4,68 ^b	10,16 ±3,78 ^a	15,36 ±5,38 ^c	10,75 ±4,26 ^d	
		G.Ex. 02	8,88 ±2,27 ^b	10,45 ±3,55 ^c	13,94 ±5,44 ^a	17,17 ±3,71 ^d	
SOROLOGIA							
Dosagem Hormonal							
LH (U/L)	0,4 ±0,09	G.Ex. 01	1,32 ±0,37	0,55 ±0,34	0,2 ±0,07	0,13 ±0,09	
		G.Ex. 02	0,24 ±0,24	0,45 ±0,13	0,61 ±0,22	0,51 ±0,2	
TESTO (Ng/ML)	4,82 ±0,33	G.Ex. 01	0,86 ±0,9	21,52 ±4,47	37,97 ±11,09	23,15 ±7,12	
		G.Ex. 02	0,82 ±0,11	3,18 ±2,02	1,93 ±0,45	1,77 ±0,89	
PESOS DOS COMPLEXOS(g)							
G.Ex. 01	0,51 ±0,28		0,07 ±0,04	0,35 ±0,04	0,82 ±0,07	1,03 ±0,18	
G.Ex. 02	0,51 ±0,28		0,08 ±0,03	0,29 ±0,1	0,50 ±0,29	0,52 ±0,12	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHMER AO, TOLOSA EMC & NETO AGF, 1976. *Manual de práticas para histologia normal e patológica*. EDART-EDUSP, SP.329p.
- BLOOM FE, & AGHAJANIAN GK, 1968. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junction with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruct. Res* **22**: 361-375.
- BURTON S, TRACHTENBERG J. 1986. Effectiveness of antiandrogens in the rat. *The Journal of Urology* **136**: 932-935.
- BUTLER WWS, SCHADE AL, 1958. The effect of castration and androgen replacement on the nuclei acid composition, metabolic and enzymatic capacities of the rat ventral prostate. *Endocrinol* **63**: 271-79.
- CARVALHO, HF. & LINE, S.R.P. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, **20**: 809-819.
- 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, CHUNG LWK, 1981. Stromal-epithelial interactions. I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J. Steroid Biochem* **14**: 1317-1321.
- CUNHA, GR, BIGSBY, RM., COOKE, PS., SUGIMURA, Y. 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differentiation*, **17**:137-148.
- CUNHA GR, HAYWARD SW, DAHIYA R, FOSTER BA, 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta anat* **155**: 63-72.
- DROLLER MJ. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol* **79 (Suppl)**: 42-52.
- GÖMÖRI G. 1950. An improved histochemical technique for acid phosphatase. *Stain Technol* **25**: 81-5.
- HUANG JK, BARTSCH W, VOIGT D, 1985. Interactions of an anti-androgen (cyproterone acetate) with the androgen receptor system and its biological action in the rat ventral prostate. *Acta Endocrinologica* **109**: 569-576.

- HUTTUNEN E, ROMPPANEN T, HELMINEN HJ, 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J. Anat.*, **132(3)**: 357-370.
- JUSTULIN Jr. LA, URESHINO RP, ZANONI M, FELISBINO SL, 2005a. A reorganização do estroma da próstata ventral de ratos castrados submetidos à reposição hormonal. *Cell and Tissue Research*. Submetido.
- JUSTULIN Jr. LA, URESHINO RP, ZANONI M, FELISBINO SL, 2005b. Atividade da MMP-2 e da MMP-9 na próstata ventral de ratos durante a privação androgênica e reposição hormonal. *Cell and Tissue Research*. Submetido.
- KASPER P, 2001. Cyproterone acetate: A genotoxic carcinogen? *Pharmacology & Toxicology* **88**: 223-231.
- LIAO S, HOWELL DK, CHANG TM, 1974. Action of a nonsteroidal antiandrogen, flutamide, on the receptor binding and nuclear retention of 5 α -dihydrotestosterone in rat ventral prostate. *Endo* **94**: 1205-1209.
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA AR, CUNHA GR, 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* **253**: 165-174.
- NEMETH HA & LEE C, 1996. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *Prostate* **25**: 124-128.
- NEUMANN F, 1994. The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Exp Clin Endocrinol* **102**: 1-32.
- NEUMANN F, TOPERT M, 1986. Pharmacology of Antiandrogens. *J. Steroid Biochem.* **25**: 885-895.
- NOLDUS J, FERRARI M, PRESTIGIACOMO A, STAMEY TA, 1996. Effect of flutamide and flutamide plus castration on prostate size in patients with previously untreated prostate cancer. *Urology* **47**: 713-718.
- PRICE, D, 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat. Can. Inst. Monogr.*, **12**: 1-27.
- PRINS GS, BIRCH L, GREENE GL, 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129**: 3187-3199.
- POLLARD, M. & LUCKERT, PH, 1987. Autochthonous prostate adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats: a model system. *Prostate*, **11**: 219-227.

- ROSS MH, REITH, EJ. & ROMRELL, LJ, 1993. *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, RJ., 779p.
- SHABISGH A, TANJI N, D'AGATI V, BURCHARDT M, RUBIN M, GOLUBOFF ET, HEITJAN D, KISS A, BUTTYAN R, 1999. Early Effects of Castration on the Vascular System of the Rat Ventral Prostate Gland. *Endocrinol* **140** (4): 1920-1926.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986a. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONHACOUR AA, 1996b. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in mouse ventral prostate. *Biol Reprod* **34**: 973-983.
- TENNISWOOD M, BIRD CE, CLARK AF. Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can J Biochem* **54**: 350e7.
- WATSON, ML, 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, **4**: 475-478.
- WEEKS I, WOODHEAD JS, 1984. Chemilumiscence Immunoassays. *J Clin Immunoassays* **7**: 82-89.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in elctron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**: 407-408.
- VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, CARVALHO HF, 2005a. Androgen regulation of the smooth muscle cell function in the rat ventral prostate: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition after castration. *Cell Biol Int* **29**: In Press.
- VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, CARVALHO HF, 2005b. Alternating proliferative and secretory activities contribute to the post-natal growth of the rat ventral prostate. *Anat Rec*. Submitted.

CONCLUSÕES GERAIS

A análise dos resultados obtidos nos permite concluir que:

1- O tratamento antiandrogênico mostrou-se mais eficaz na diminuição da altura do epitélio, na quantidade de T sérica e no volume absoluto do lúmen e do estroma muscular da próstata.

2- O tecido prostático possui uma íntima dependência dos níveis séricos de andrógenos, em especial de T e, além disso, os dois tratamentos aqui empregados têm efeitos distintos sobre os níveis séricos de T e LH. A prática da castração química e/ou cirúrgica leva a uma involução frente à diminuição brusca dos níveis androgênicos, bem como uma capacidade de reorganização tecidual após a reposição hormonal.

3- Os efeitos decorrentes da castração cirúrgica seguida de reposição por T se mostraram mais intensos ao tecido prostático, quando comparados à castração química seguida da suspensão do tratamento antiandrogênico.

4- Diante supressão hormonal as células musculares lisas podem sofrer modificações estruturais, como que buscando uma adaptação às novas características do tecido prostático regredido, tais como o aumento da maquinaria de síntese protéica e pregueamento da membrana plasmática. Além disso, após a reposição hormonal essas células retomam suas características estruturais de origem.

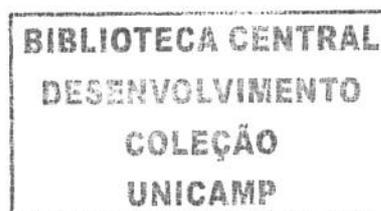
5- A atividade da enzima fosfatase ácida mostrou-se altamente modulável pelos níveis séricos de T, uma vez que após os dois tipos de castração houve uma diminuição da atividade dessa enzima no tecido prostático e além disso, após a reposição hormonal a atividade fosfática mostrou-se detectável somente nas células musculares lisas, não sendo conspícua nas células epiteliais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURTON S, TRACHTENBERG J. 1986. Effectiveness of antiandrogens in the rat. *The Journal of Urology* **136**: 932-935.
- CARVALHO, HF. & LINE, S.R.P. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, **20**: 809-819.
- CARVALHO, HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997. Elastic system fibers of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* **32**: 27-34.
- 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*. V46. *Academic Press*, New York, p. 369-385.
- COOKE OS, YOUNG P, CUNHA GR, 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* **128**: 2867-2873.
- CUNHA GR, DONJACOUR AA, COOKE PS, MEE S, BIGSY RM, HIGGINS SJ, SUGIMURA , 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* **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.
- DOUNJACOUR 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)**: 42-52.
- GALBRAITH SM, DUCHESNE GM, 1997. Androgens and prostate cancer: Biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer* **33**: Nº 4, 545-554.
- GOLDFISCHER S, COLTOFF-SCHILLER B, SCHWARTZ E & BLUMENFELD OO, 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 382-390.
- GORDON AS, SUSAN JA, RICHARD GM. 1984. A pilot study of flutamide. *Med. J. Aust* **140**: 219-221.

- GUYTON AC, 1984. Tratado de Fisiologia Médica. 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 926pp.
- HAYWARD SW, BASKIN LS, HAUGHNEY PC, FOSTER BA, CUNHA AR, DAHIYA R, PRINS GS, CUNHA GR, 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* **155**: 94-103.
- HUANG JK, BARTSCH W, VOIGT D, 1985. Interactions of an anti-androgen (cyproterone acetate) with the androgen receptor system and its biological action in the rat ventral prostate. *Acta Endocrinologica* **109**: 569-576.
- MANN T, 1954. . The biochemistry of semen. Ed. By Peters, R. & Young, F.G., London, Maathuen & Co., 240p.
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA AR, CUNHA GR, 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* **253**: 165-174.
- McLEOD DG, KOLVENBAG GJCM, 1996. Defining a role of antiandrogens in the treatment of prostate cancer. *Urology* **47 (Suppl. 1A)**: 85-89.
- McNEAL JE, 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* **2**:35-49.
- McNEAL JE, 1983. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monographs in Urology* **4**: 3-37.
- NETTER FH, 1965. *Reproductive system – The Ciba collection of medical illustration. 5ed. CIBA, New York, 286p.*
- NERI R, 1989. Pharmacology and pharmacokinetic of flutamide. *Urology* **34(4)**: 46-56.
- NEUMANN F, 1994. The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Exp Clin Endocrinol* **102**: 1-32.
- NEUMANN F, TOPERT M, 1986. Pharmacology of Antiandrogenics. *J. Steroid Biochem.* **25**: 885-895.
- PRICE, D, 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat. Can. Inst. Monogr.*, **12**: 1-27.
- PRICE D., ORTIZ E, 1965. In “organogenesis”. R. L. Dehaan and H. Ursprung, eds. Holt, New York. pp. 629-652. *Apud CUNHA gr*, 1976. Epithelial-stromal interactions in development of the urogenital tract. *Int Rev Cytol* **47**: 137-194.
- PRINS GS, BIRCH L, GREENE GL, 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129**: 3187-3199.

- RAUCH F, POLZAR B, STEPHAN H, ZANOTI S, PADDENBERG R, MANNHERZ HG, 1997. Androgen ablation leads to an unregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol* **137**: 909-923.
- REESE, JH.; McNEAL, JE.; REDWINE, EA.; SAMLOFF, IM. & STAMEY, TA, 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.*, **136**: 1148-1152.
- ROSS MH, REITH, EJ. & ROMRELL, LJ, 1993. *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, RJ., 779p.
- ROY-BURMAN P, WU H, POWELL WC, HAGENKORD J, COHEN MB, 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* **11**: 225-254.
- SLAYTER MV, ANZANO MA, KADOMATSU K, SMITH JM, SPORN MB, 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-wistar rats. A systems for histological scoring and grading. *Cancer Res*, **54**: 1440-1445.
- SUFRIN G, COFFEY DS, 1975. Flutamide: Mechanism of Action or a new nonsteroidal antiandrogen. *Investigate Urology* **13**:(6) 429-434.
- TAPLIN MR, HO SM, 2001. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin Endo. Metab.* **86**(8): 3476-77.
- 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.
- THOMSON AA, TIMMS BG, BARTON L, CUNHA GR, GRACE OC, 2002. The role of smooth muscle in regulation prostatic induction. *Development* **129**: 1905-1912.
- VENABLE JH, & COGGESHALL R, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Bio.* **25**: 407-408.
- VILAMAIOR PSL, FELISBINO SL, TABOGA SR, 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation. A possible role for smooth muscle cell. *Prostate* **45**(3): 253-258.
- XUE L. *et al* (1997) *apud* ROY-BURMAN P, WU H, POWELL WC, HAGENKORD J, COHEN MB, 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* **11**: 225-254.



- WANG *et al*, 2001, *apud* MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA AR, CUNHA GR, 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* **253**: 165–174.
- WILLIAM DS, 2001. 5- α -reductase activity in the prostate. *Urology* **58 (6A)**: 17-24.
- ZANETONI C, 2002. Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*): aspectos estruturais, histoquímicos e ultraestruturais. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 61.