

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



RENATO SIMÕES CORDEIRO

**EFEITOS DO ANTI-ANDROGÊNICO FLUTAMIDA
SOBRE A PRÓSTATA LATERAL DE COBAIA *Cavia porcellus*
NAS DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Renato Simões Cordeiro e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP 1
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	
T/UNICAMP	
C811e	
V	EX
TOMBO BCI	53488
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD	

BIBID 290730

CM00182584-2

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

C811e

Cordeiro, Renato Simões

Efeitos do anti-androgênico flutamida sobre o lobo lateral da próstata de cobaia *Cavia porcellus* nas diferentes fases do desenvolvimento pós-natal/
Renato Simões Cordeiro. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

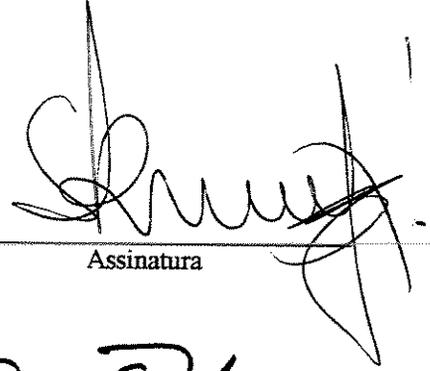
Orientador: Sebastião Roberto Taboga
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

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

Campinas, 23 de Janeiro de 2003.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



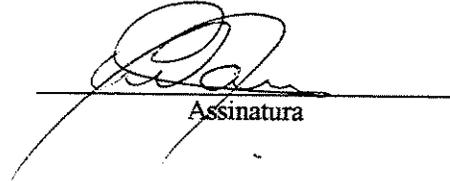
Assinatura

Prof. Dr. José Carlos Mesquita



Assinatura

Profª. Dra. Mônica Vannucci Nunes Lipay



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Assinatura

SÉRGIO

DEDICATÓRIA

A Deus, pela sua onipresença, onipotência e onisciência em minha vida, por ter me capacitado, me dado forças, ânimo e coragem e principalmente pelo Seu eterno amor e graça em minha vida. A Ele seja toda glória, honra e louvores por mais esta vitória.

Aos meus pais José Ap. Cordeiro e Rosemary S. Cordeiro, pelo exemplo de humildade, amor, carinho e dedicação em minha vida. A minha irmã Ana Paula, a minha avó Antônia, a minha tia Jacira e tio Humberto, por terem me apoiado em todos os momentos de minha vida, pelo vosso carinho e companheirismo. A vocês o meu eterno amor e admiração.

A minha esposa Aline, pela sua amizade, companheirismo, dedicação, carinho e amor e principalmente pelas suas eternas orações a meu favor. Obrigado por tudo que recebi de você todos estes anos, esta é mais uma vitória do nosso eterno amor.

*A suprema felicidade da vida
é a convicção de ser amado por aquilo que você é,
ou, mais corretamente, de ser amado apesar daquilo que você é.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por ter me escolhido e me resgatados aos seus braços, pelas ricas bênçãos derramadas sobre mim, pela Sua destra poderosa estar sobre a minha vida, pela vida eterna em Jesus Cristo e pela Sua eterna presença e graça pelo Seu Espírito em todos os momentos. “E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados por seu decreto” Rm 8:28.

Aos meus pais, que em todos os momentos transmitiram segurança e confiaram na minha capacidade de chegar até aqui, sempre com muito amor, carinho, amizade, humildade e principalmente, fé em Deus. A vocês, que muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que realizássemos os nossos... A vocês, que apesar da distância, nos momentos mais difíceis sempre se fizeram presentes... A vocês, esta conquista, afinal, não é só minha, mas nossa.

A minha esposa e companheira Aline pelo seu eterno amor, pelo seu incentivo e preciosas orações que proporcionaram a obter as grandes vitórias em nossas vidas.

A minha irmã Ana Paula, tia Jacira e tio Humberto e a avó Antônia, por sempre estarem ao meu lado, dando apoio e carinho para o crescimento de minha vida.

À minha cunhada Alessandra e seu esposo Jorge, por terem me recebido com carinho e terem me amparado e apoiado em Campinas. Obrigado pelas suas amizades e companheirismo.

Ao amigo, professor e orientador Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela orientação, dedicação, paciência e persistência, nestes anos de aprendizado e luta. A você que apesar das inúmeras dificuldades encontradas, dispôs-se a me ajudar, caminhando por itinerários nunca antes traçados. A você que mais uma vez me aceitou como orientador no doutorado, o meu muito obrigado.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – pela oportunidade de incorporar-me e desenvolver-me, não só profissionalmente, em um dos melhores e mais bem conceituados cursos dessa categoria no país.

Antecipadamente, aos membros da Banca Examinadora Prof. Dr José Carlos Mesquita, Profa. Dra Mônica Vannucci Nunes Lipay e ao Prof. Dr Sérgio Luis Felisbino, pela disponibilidade, análises e sugestões.

Aos docentes do curso e outras instituições, os quais compartilharam humildemente comigo e outros colegas, seus conhecimentos, firmando meu aprimoramento acadêmico-profissional.

Ao Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto, pela permissividade da realização dos meus trabalhos práticos de pós-graduação, assistência docente e participação em atividades.

A Lílíam Alves Senne Panagio, pela amizade, presteza e, principalmente, pela paciência dedicada para o meu entendimento e resolução de problemas de ordem burocrática.

Aos colegas de turma, pela amizade, colaboração e momentos compartilhados... Adelina, Adrian, Débora, Fernanda, Gustavo, Heloísa, Juliana, Laércio, Marla, Miguel, Ricardo, Rodrigo, Wellerson, Sílvia e Uyrá.

Aos antigos e novos amigos de São José do Rio Preto e do Laboratório de Microscopia e Microanálise, pelas inúmeras experiências vividas, momentos de risos, lágrimas, ansiedade, partilha de conhecimentos teórico-práticos específicos, auxílio em muitas atividades, e, sobretudo amigos de aprendizado e luta diária... Ana Maria, Chicão, Alessandra, Fabrício, Wellerson, Silvana, Lara, Cristiane e Fernanda.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia e Microanálise e de Morfologia do Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto, Luís Roberto

F. Júnior e Rosana S. de Souza, pelos ensinamentos, auxílios na execução e aprendizado de técnicas e amizade.

A Profa. Dra Rejane Maira Góes pela orientação durante a iniciação científica e pela contribuição na elaboração deste trabalho.

A Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – e a CAPES, pelo apoio financeiro destinado a esse trabalho e a outros que se fizeram necessários e complementares para meu aprimoramento profissional durante esse período.

Enfim, aqueles por vezes não citados, mas que, de alguma maneira contribuíram para a minha formação, não necessariamente enquanto profissional, mas, sobretudo como ser humano, que particularmente, julgo ser o essencial na vida...

Meu muito obrigado!

*“As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu,
e não subiram ao coração do homem
são as que Deus preparou para os que o amam”*

SUMÁRIO

I.	Resumo.....	9
II.	Abstract.....	11
III.	Introdução.....	13
IV.	Objetivo.....	25
V.	Artigos.....	26
	Artigo 1: Avaliação Histoquímica e Morfométrica do Lobo Lateral da Próstata de Cobaia (<i>Cavia porcellus</i>) sob Efeito da Terapia Anti-androgênica pela Flutamida.....	27
	Artigo 2: Alterações Teciduais no Lobo Lateral da Próstata de Cobaia (<i>Cavia porcellus</i>) após Terapia com o Anti-androgênico Flutamida.....	53
VI.	Conclusões Gerais.....	78
VII.	Referências Bibliográficas.....	79

RESUMO

A próstata é a glândula de maior expressividade funcional no aparelho reprodutor dos mamíferos, sendo responsável pela produção do líquido seminal. O seu desenvolvimento, manutenção e histofisiologia dependem da ação direta de hormônios sexuais androgênicos produzidos principalmente pelos testículos. No homem e em alguns animais de laboratório, este órgão é acometido por várias patologias, devido à baixa na produtividade hormonal ao longo do envelhecimento. A utilização da terapia anti-androgênica têm sido muito indicada no tratamento de lesões prostáticas. Uma das principais drogas utilizadas é o anti-androgênico não esteroideal flutamida, que é biologicamente ativo no bloqueio da ação dos andrógenos nos tecidos alvos, baseado no potencial de competição pelos sítios de receptores androgênicos. Porém, os aspectos que envolvem a relação estroma-epitélio não estão completamente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração do fármaco anti-androgênico flutamida sobre o lobo lateral da próstata de cobaias machos ao longo do desenvolvimento pós-natal, analisando os aspectos estruturais, morfométrico-estereológicos, citoquímicos e ultra-estruturais dos compartimentos estromais e epiteliais do órgão. Foram utilizados 30 cobaias machos divididos em 3 grupos de 10 animais cada de acordo com a fase do desenvolvimento pós-natal (*fase puberal, pós-puberal e adulta*). Dentro de cada grupo elegeu-se aleatoriamente 5 animais para o grupo controle e 5 animais para o grupo tratado, que receberam injeção subcutânea diária de flutamida na dose de 10mg/Kg/dia/animal durante 10 dias. Após o tratamento, as próstatas foram removidas, fixadas e incluídas para a microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Foram feitos testes histoquímicos para fibras colágenas (*Tricrômico de Masson e Picrossírius-Hematoxilina*), fibras do sistema elástico (*Fucsina Resorcina de Weigert*) e fibras reticulares (*Reticulina de Gömori*), além das colorações usuais pela *Hematoxilina-Eosina* para caracterização geral e análise morfométrica-estereológica dos componentes prostáticos e *Azul de Toluidina* para caracterização dos fenótipos nucleares na próstata. Os resultados obtidos permitiram

concluir que o anti-androgênico flutamida provocou alterações na arquitetura glandular prostática nas idades em estudo. As análises histoquímicas e morfométrica-estereológicas revelaram que as unidades acinares dos lobos laterais prostáticos dos animais tratados da fase púbere apresentaram células epiteliais com fenótipos cúbicos seguido de um aumento do diâmetro dos ácinos, promovendo um estreitamento do conjuntivo e da musculatura lisa ao redor dos ácinos, bem como um espessamento e arranjo concêntrico das fibras reticulares entre a musculatura. No lobo lateral da próstata dos animais da fase pós-púbere, notou-se uma diminuição do diâmetro acinar e um pequeno aumento do estroma muscular. Enquanto que, nos animais adultos observou-se uma diminuição do diâmetro acinar causando dobras no epitélio glandular, ocasionando um pequeno aumento na espessura da musculatura lisa e diminuição na espessura com distribuição irregular das fibras reticulares. As fibras colágenas apresentaram-se de certa forma mais finas e de distribuição e concentração irregulares nas três idades, tendo uma maior concentração na base epitelial. Em relação ao sistema elástico, observou-se um aumento das fibras pré-elásticas após o tratamento. As células epiteliais acinares analisadas ultra-estruturalmente apresentaram endomembranas alargadas, principalmente no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi, e uma drástica diminuição das microvilosidades. Estes dados sugerem que a flutamida pode alterar sobremaneira as interações morfológicas e estruturais dos componentes fibrilares e celulares prostáticos ao longo das diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

ABSTRACT

The prostate gland is an organ with the largest functional expressivity in the mammals reproductive system and is responsible for the most seminal fluid production. Its development, maintenance and histofisiology depend on the direct action of androgens, which are produced mainly by the testicles. In the man and some mammals, this organ is a target to several pathologies due a decreasing hormonal productivity with the aging. The use of antiandrogenic therapy in the treatment of prostatic lesions has been very suitable. One of the most used drug is the nonsteroidal antiandrogen flutamide, that is active biologically by blocking the action of the androgens in the target tissue, based on the potential competition for the sites of the androgens receptors. However, the aspects that involve the epithelium-stroma interactions are not completely understood. The aim of this work was to evaluate the administration effect of the antiandrogen flutamide in the male Guinea pig prostate during development, analyzing structural, stereologic-morphometrical, cytochemical and ultrastructural aspects of stromal and epithelium organ compartments. Sixty male guinea pigs were divided in 3 groups of 20 animals, where each group corresponded to the phase of post-natal development (*pubertal*, *post-pubertal* and *adult phase*). Ten animals were chosen aleatorilly as control group and 10 animals as treated group that received for 10 days daily subcutaneous injection of 10mg/Kg flutamide. After the treatment, the lateral prostate were removed, fixed and embedded for light and transmission electron microscopy. Histochemical tests were carried out for collagens fibers (Masson's Trichrome and Picrossirius-Haematoxylin), elastic system fibers (Weigert's Resorcin Fucsin) and reticular fibers (Gömöri's Reticulin), as well as the usual staining methods Haematoxylin-eosin for general characterization and stereologic-morphometrical analysis of the prostatic component and Toluidin Blue staining for characterization of the nuclear phenotypes in the prostate. The results revealed that the antiandrogen flutamide caused some alterations in the prostatic glandular architecture in all ages in study. Histochemical and stereologic-morphometrical analysis showed an increased of the acini

diameter in the pubertal treated animals, promoting a straightness of the connective tissue and smooth muscle cells layer around the acini. The epithelial cells of these acini exhibited cubic phenotype. In addition, was observed rearrangement in the thickness and disposition of reticulin fibers among smooth muscle layer. In the postpuberal phase the alterations were slight, showing a decrease of the acini diameter and increase of the smooth muscle cells around the acini. In the adult animals, was observed a decrease of the acini diameter causing folds in the acinar epithelium. This fact caused an increase in the thick of smooth muscle layer and decrease in the thick of reticular fibers besides irregular distribution. The collagen fibers presented an irregular distribution and concentration in all ages tested, exhibiting a higher concentration in the epithelium basement. The elastic system fibers became dense after the treatment. The ultrastructural evaluation of the acinar secretory cells demonstrated an enlargement of the endomembranes, mainly in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Furthermore, a drastic decrease of the microvilli was observed in all treated group. These results are consistent with the conclusion that flutamide exerts antiandrogenic effects on the prostatic architecture, promoting alterations mainly in the stroma/epithelium morphologic and modifying structural interactions in all ages tested.

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da morfologia prostática

Dentre as glândulas sexuais acessórias do aparelho reprodutor masculino, tais como, a vesícula seminal e glândula coaguladora, a próstata destaca-se como a glândula mais volumosa e de maior expressividade funcional (NETTER, 1965). Esta glândula pode ser encontrada em todos os mamíferos, inclusive nos monotremos (PRICE, 1963), permitindo além dos estudos de natureza anátomo-patológica, estudos de natureza evolutiva.

A principal função da glândula prostática é secretar um líquido fino de aspecto leitoso que aumenta o volume seminal. Esta secreção apresenta propriedades importantes para que o processo de fertilização tenha êxito colaborando assim, com a neutralização do meio e contribuindo sobremaneira para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides (GUYTON, 1984).

A anatomia comparada de alguns mamíferos permitiu a descrição macro e microscópica deste órgão, já na década de 60, em animais como rato, coelho, camundongo, macaco e cão (PRICE, 1963). Mais recentemente, por interesse médico-veterinário e econômico, esta caracterização estendeu-se a animais de maior porte, como o búfalo, do qual foram estudadas a histologia, a ultra-estrutura e a histoquímica da próstata (ABOUELMAGD & WROBEL, 1989).

Outros animais menos comuns nos laboratórios prestaram-se como modelos para a descrição anatômica e histológica da próstata, como por exemplo, o furão (JACOB & PODDAR, 1986) e o roedor *Praomys (Mastomys) natalensis* (GROSS & DIDIO, 1987).

Em roedores, a glândula prostática apresenta-se como uma estrutura complexa composta de três lobos distintos, designados pela localização que cada um deles ocupa em relação à uretra. Assim, são identificados o lobo ventral, no istmo da bexiga, e os lobos dorsal e lateral que circundam, dorsolateralmente, a uretra, a base da bexiga, a vesícula seminal e as glândulas coaguladoras (PRICE, 1963; JESIK *et al.*, 1982; SUGIMURA *et*

al., 1986). Assim como nas zonas da próstata humana, estes lobos diferem no que diz respeito à sua topografia, ao seu tamanho, à sua composição celular e sua organização estrutural, às suas secreções e aos respectivos processos secretórios (JESIK *et al.*, 1982; AUMÜLLER & SEITZ, 1990; COLOMBEL & BUTTYAN, 1995).

Segundo SLAYTER e colaboradores (1994), no que se refere à homologia das porções da próstata humana com os lobos prostáticos de ratos, o lobo ventral da próstata de ratos corresponde à zona transicional da próstata humana e o lobo dorsal corresponde à zona posterior, esta última formada pela fusão dos lobos laterais.

Na próstata ventral de ratos, as células cilíndricas altas apresentam um retículo endoplasmático rugoso extremamente desenvolvido com membranas paralelas limitando cisternas estreitas. O complexo de Golgi é bastante proeminente e localiza-se entre o núcleo, de localização basal, e a borda luminal, em uma área que aparece pouco corada pelo método do Azul de Toluidina. O envoltório nuclear apresenta pregueações, algumas vezes formando sulcos profundos (BRANDES, 1966; DAHL *et al.*, 1973).

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

Histologicamente, a próstata dos mamíferos em geral, constitui-se de glândulas túbulo-alveolares. O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se numa membrana basal que repousa sobre um estroma de natureza conjuntiva, contendo células musculares lisas que circundam os alvéolos e ductos, fibroblastos, macrófagos fixos e células endoteliais dos vasos, cada qual com seu importante e específico papel na viabilidade e função secretora do tecido como um todo (CUNHA *et al.*, 1985 e 1996).

Neste estroma podem ser encontradas terminações nervosas de vários tipos, freqüentemente entre as células musculares lisas (ICHIHARA *et al.*, 1978, FRANKS, 1967 *apud* PRINS *et al.*, 1991) e associadas ao epitélio (PRICE, 1963). O termo estroma é usado para designar, no adulto, o tecido conjuntivo frouxo associado ao epitélio, correspondendo ao componente “não epitelial” de um órgão (CUNHA *et al.*, 1985 e 1996).

As células musculares lisas associam-se intimamente formando um arranjo espiral em várias camadas que envolvem os ductos da glândula em toda sua extensão (ICHIHARA *et al.*, 1978).

Dentre os estudos da glândula prostática da cobaia, podem ser citados os trabalhos de Wong & Tse, 1981, que realizaram um estudo histológico e ultra-estrutural do complexo prostático e, Sugimura *et al.*, 1986, que através de um processo de microdissecção e digestão enzimática estudaram a morfogênese e o desenvolvimento dos ductos do complexo prostático nesta espécie.

Estes estudos preliminares da morfogênese ductal do complexo prostático de cobaia utilizando a técnica de microdissecção revelaram que a morfogênese de ramificação do complexo prostático é completada no nascimento, com nenhum aumento significativo no número de ramificações e de extremidades ductais. O primeiro crescimento dos brotos prostáticos começa com 35 dias de gestação e o processo de desenvolvimento prostático e ramificações continua no decorrer dos próximos 15-20 dias (SUGIMURA *et al.*, 1986).

Já o crescimento pós-natal é acompanhado principalmente por alongação da rede ductal existente com poucas ramificações adicionais, mas com um aumento no tamanho (volume) dos túbulos. A canalização dos túbulos ductais ocorre pré-natalmente em todos os lobos, mas a citodiferenciação funcional pós-natal faz uma ligeira diferença no ritmo de crescimento entre os lobos (SUGIMURA *et al.*, 1986).

Em cobaias (*Cavia porcellus*) o complexo prostático diferencia consideravelmente dos outros roedores. A próstata está dividida em dois lobos: o lateral e o dorsal, e a glândula coaguladora está posicionada ventralmente à bexiga, ao contrário do que ocorre em camundongos e ratos. A próstata ventral não está presente nesta espécie, acredita-se que ao longo da ontogenia deste órgão, algumas fusões ocorreram para a obtenção final da próstata adulta. A arquitetura glandular do lobo lateral de cobaias é homóloga ao lobo ventral de camundongo e ratos e o lobo dorsal é homólogo ao dorsolateral (ZHAO, *et al.*, 1992).

Devido à grande importância da próstata para o funcionamento do aparelho reprodutor dos mamíferos machos, muitos trabalhos sobre efeitos experimentais vêm sendo desenvolvidos, dentre os quais destacam-se os ensaios envolvendo respostas á drogas anti-

androgênicas esteroidais (acetato de ciproterona e acetato de megestrol) e não esteroidais (flutamida, bicalutamida e nilutamida) em roedores e humanos (McLEOD *et al.*, 1993 e 1996) ambas associadas à castração cirúrgica, como um modelo de bloqueio androgênico total no tratamento do câncer de próstata (REID, *et al.*, 1999).

Desenvolvimento e fisiologia da próstata

Em mamíferos a próstata origina-se a partir do epitélio do sino urogenital, servindo como glândula sexual e como glândula uretral (CUNHA, 1976).

Para que ocorra a morfogênese das estruturas ambissexuais, assim chamadas devido ao fenótipo que exibem no início do desenvolvimento embriológico, são necessários hormônios masculinos produzidos pelos testículos do feto (PRICE & ORTIZ, 1965 *apud* CUNHA, 1976, CUNHA *et al.*, 1996).

Em mamíferos estes hormônios, no final do período fetal e início do período pós-natal, parecem agir de forma indireta na morfogênese epitelial, aparentemente através de uma ação via mesênquima, uma vez que os brotos prostáticos e o sino urogenital não apresentam receptores para andrógenos em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do sino urogenital e da próstata em formação apresentam grandes quantidades destes receptores (DOUNJACOUR & CUNHA, 1988, COOKE *et al.*, 1991; THOMSON *et al.*, 1997).

Durante a vida fetal, existe um período em que a dependência de andrógenos é absoluta, sendo que sua remoção neste período suprime a formação da próstata (WELLS, 1954). Entretanto, o início do desenvolvimento pós-natal da próstata parece não ser estritamente dependente de hormônios, ou é minimamente dependente de hormônios; o seu crescimento e a ramificação dos sistemas de ductos prosseguem nos primeiros 15 dias, mesmo após a castração neonatal (WELLS 1954, DOUNJACOUR & CUNHA, 1988). Setenta por cento dos pontos de ramificação do órgão adulto formam-se antes dos 15 dias de idade, quando os níveis de andrógenos são ainda muito baixos (SUGIMURA *et al.*, 1986).

Um comportamento semelhante, frente à privação de hormônios, também foi observado em marsupiais na fase de desenvolvimento fetal intra-marsúpio tratados com flutamida, um anti-andrógeno não esterooidal, que inibe, porém não suprime completamente, o desenvolvimento da próstata (LUCAS *et al.*, 1997).

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

O crescimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade funcional (secretora) e estrutural da próstata e dos demais órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos e pelas adrenais e ocorrem através de interações recíprocas entre o estroma e epitélio (PRICE 1963, PRICE & ORTIZ 1965 *apud* CUNHA 1976, DOUNJACOUR & CUNHA 1988, AUMÜLLER & SEITZ 1990, COOKE *et al.* 1991, CUNHA *et al.* 1996, ROSAI, 1996, HAYWARD *et al.* 1997, THOMSON *et al.*, 1997).

Os andrógenos desempenham um importante papel durante a diferenciação e o desenvolvimento da próstata normal, mas também são responsáveis pela iniciação e manutenção da hiperplasia benigna e do câncer prostático (MEIKLE, 1995).

Desses andrógenos, 95% correspondem à testosterona sintetizada pelas células de Leydig dos testículos sob estimulação do hormônio luteinizante (LH) da hipófise, que por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do hipotálamo. Os outros 5% de andrógenos são sintetizados nas adrenais sob a ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise e liderados principalmente na forma de androestenediona, que é periféricamente convertida nos tecidos prostáticos em testosterona (TAPLIN & HO, 2001).

A prolactina e o hormônio de crescimento (GH) também estimulam a produção de andrógenos, tanto nos testículos como nas adrenais, tendo a primeira um efeito mitogênico direto adicional sobre as células epiteliais da próstata (Figura 1) (GALBRAITH & DUCHESNE, 1997).

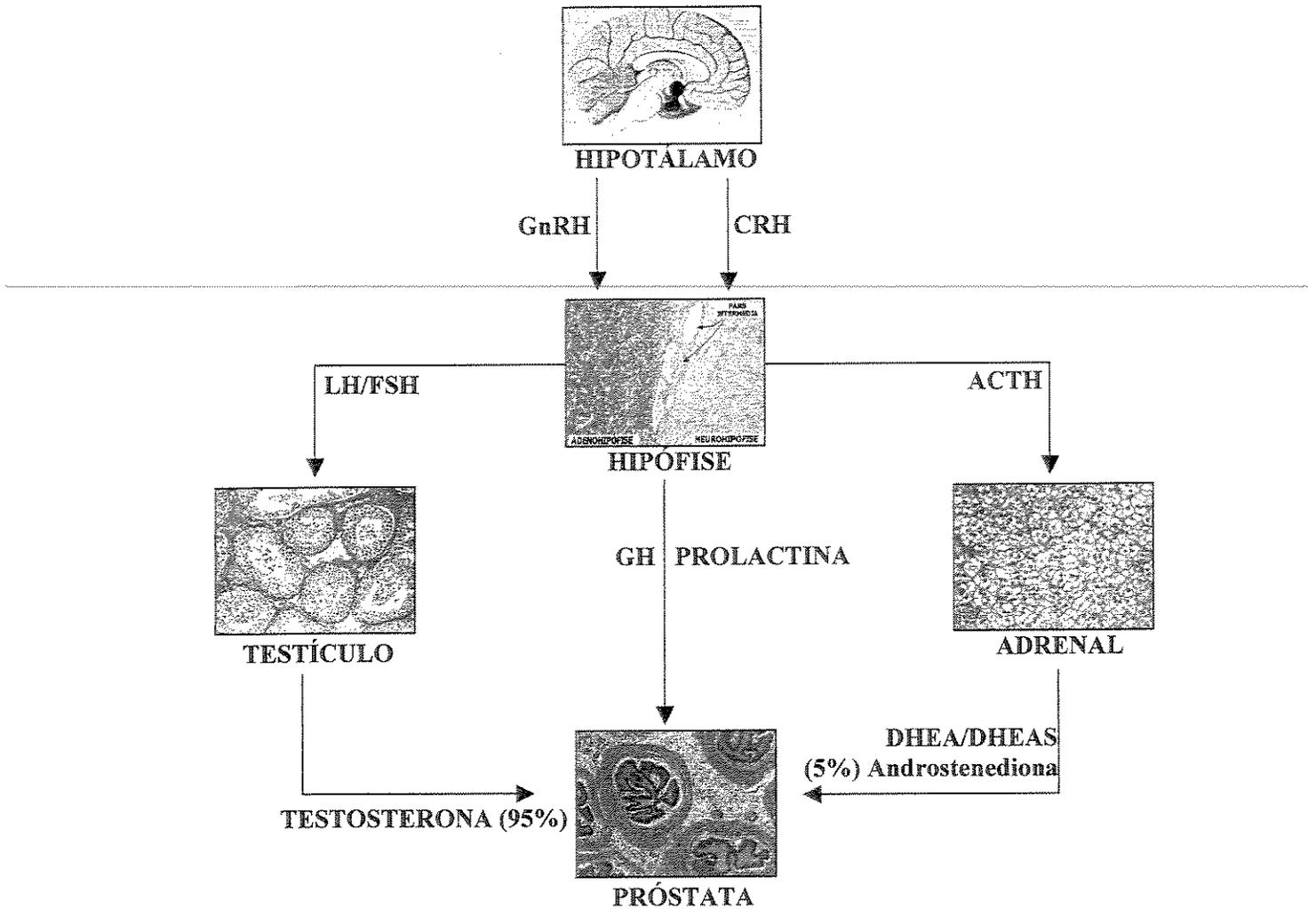


Figura 1: Hormônios envolvidos na regulação da glândula prostática. GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina; GH: Hormônio de Crescimento; CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina; DHEA/DHEAS: Deidroepiandrosterona; FSH: Hormônio Folículo-Estimulante; LH: Hormônio Luteinizante; ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico.

A testosterona na corrente sanguínea liga-se à globulina e é transportada para a glândula prostática e demais tecidos do aparelho reprodutor masculino e estruturas axenas. Este andrógeno difunde-se através das membranas das células epiteliais e estromais prostáticas, onde então é convertida pela ação da enzima 5- α redutase ao metabólito ativo, a diidrotestosterona (DHT), que se une ao seu complexo receptor-androgênico e é transportado para núcleo da célula. No núcleo o complexo DHT-receptor liga-se à região promotora do DNA, onde favorece a síntese de DNA e RNA, estimulando a função e a proliferação das células prostáticas (BURTON & TRACHTENBERG, 1986).

O sistema de interação hormonal entre as células epiteliais e estromais durante o desenvolvimento, crescimento, função e patologias da glândula prostática, é a mais nova área da pesquisa biomédica (BALK, 2002).

A necessidade de se estudar as respostas deste órgão aos hormônios, sob várias condições e o efeito do bloqueio destes, deve-se ao fato de ser a glândula prostática, em humanos, o sítio de um grande número de doenças relacionadas à idade, sendo que as de maior importância médica são o câncer prostático e a hiperplasia nodular, esta última conhecida também como HPB (Hiperplasia prostática benigna) (RAUCH *et al.*, 1997, TAPLIN & HO, 2001).

Os hormônios, entre outros fatores, exercem papel na etiologia destas lesões. Além disso, estas lesões, malignas ou não, podem ser tratadas por estratégias de bloqueios androgênicos (PRICE, 1963; COLOMBEL e BUTTYAN, 1995; DROLLER, 1997, RAUCH *et al.*, 1997).

As doenças benignas da próstata humana são de etiologia bastante complexa e compreendem modificações histopatológicas como a hiperplasia glandular e estromal, atrofia glandular, fibrose e processos inflamatórios (prostatites). Devido à complexidade da HPB, estudos visando esclarecer os processos etiológicos e patogênicos são de suma importância (SCARANO & TABOGA, 2002).

A maior dificuldade em realizar tais estudos está no número limitado de modelos animais que mostram alterações histopatológicas semelhantes às humanas. Rotineiramente, o cão é relatado como um dos poucos animais não-primatas que desenvolvem espontaneamente hiperplasia prostática com o avançar da idade cronológica.

(MOORE et al., 1979). No entanto, HORSFALL *et al.*, 1994 através de estudos correlacionando às alterações prostáticas à idade, em cobaias *Cavia porcellus* e o homem, propuseram ser este animal um bom modelo para os estudos relacionados com o desenvolvimento prostático, principalmente do estroma, com relação a alterações de cunho histopatológico.

Ação Anti-androgênica da Flutamida

A remoção ou a redução de andrógenos de origem gonadal pode ser obtida por castração cirúrgica, administração de estrógeno ou inibição da síntese e liberação de LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo-Estimulante) por bloqueio na liberação de gonadotrofina. O bloqueio androgênico tem sido o principal método utilizado no tratamento de doenças de metástase, desde 1940 (GALBRAITH & DUCHESNE, 1997) esse bloqueio é realizado principalmente via cirúrgica.

A orquiectomia é uma cirurgia com poucas complicações e leva a uma queda rápida (24h) dos níveis de testosterona (T) circulantes, o que faz com que seja atrativa em pacientes debilitados, com sintomas compressivos e risco de paralisia iminente por doença metastática (LABRIE et al. 1989, SROUGI, 1992).

Mas após uma orquiectomia, os níveis intracelulares de T diminuem 90%, enquanto os níveis intracelulares de DHT diminuem somente 75% obtendo uma resposta biológica na síntese de andrógeno, com o conseqüente crescimento do epitélio prostático. Além disso, os aspectos psicológicos relacionados à castração, no entanto, fazem com que a procura por outros métodos de tratamento continue (DONJACOUR & CUNHA, 1988, NARAYAN, *et al.*, 1996, SROUGI, 1992).

Existem evidências de que pequenas quantidades de andrógenos podem estimular o crescimento da próstata. Também tem sido determinado que a produção de andrógenos adrenais contribui com aproximadamente 25% dos níveis de DHT presentes na próstata. Ainda mais, o bloqueio da síntese dos andrógenos adrenais pode levar a algumas respostas em pacientes com recorrências após uma orquiectomia. Isso justifica o emprego

de agentes anti-androgênicos no tratamento do câncer de próstata (SOGANI, *et al.*, 1984, SROUGI, 1992, BALK, 2002.).

A utilização de agentes anti-androgênicos é chamada de castração fisiológica ou química, e a ação combinada de drogas anti-androgênicas esteroidais e não esteroidais parece ser mais eficiente que a castração cirúrgica (orquiectomia), pois mesmo após a depleção hormonal pela orquiectomia a glândula adrenal produz ainda cerca de 5% de hormônios androgênicos (NEUMANN & TOPERT, 1986, BURTON & TRACHTENBERG, 1986).

Os anti-androgênicos inibem os androgênicos de expressarem suas atividade nos tecidos alvos baseado no potencial de competição pelos sítios dos receptores de andrógenos. Eles diminuem a síntese e/ou a liberação de hormônios hipotalâmicos e seus fatores de liberação e de hormônios da hipófise anterior (gonadotrofinas) que atuam diretamente sobre as gônadas, inibindo assim a biosíntese ou a secreção de andrógenos (NEUMANN & TOPERT, 1986, McLEOD & KOLVENBAG *et al.*, 1996). Assim, a castração química parece bloquear mais eficientemente toda a demanda androgênica do organismo, e um dos principais agentes utilizados é a flutamida (SUFKIN & COFFEY, 1975, GORDON *et al.*, 1984, NARAYAN *et al.*, 1996).

A flutamida é um agente anti-androgênico não esteroide (Figura 2) que possui a capacidade de bloquear a ação androgênica nos tecidos alvos (MARCHETTI & LABRIE, 1988, KASSIM *et al.*, 1997, LUCAS *et al.*, 1997) sendo biologicamente ativo no bloqueio da ação do metabólito testosterona-diidrotestosterona, sobre os receptores androgênicos nos tecidos prostáticos (SUFKIN & COFFEY, 1975, GORDON, *et al.*, 1984).

Este anti-androgênico atua principalmente em nível citoplasmático por inibição competitiva de ligação da DHT para seu receptor, interferência com ligação receptor-receptor-DHT, bem como possível bloqueio de translocação do complexo receptor-DHT para interior do núcleo inibindo assim, a síntese de DNA prostático estimulada pela testosterona (BURTON & TRACHTENBERG, 1986).

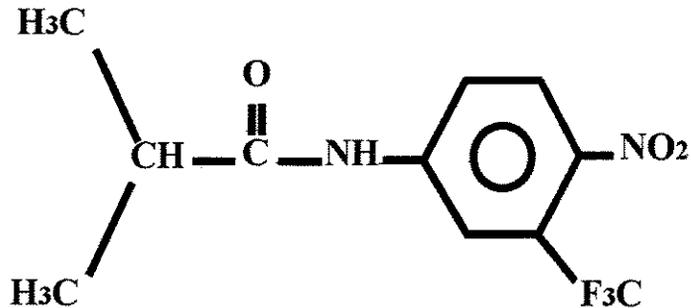


Figura 2: Estrutura Química da Flutamida: 3α,3-trifluoro-2-metil-1-(4'-nitro-m-propionotoluidide) (SUFRIIN & COFFEY, 1975).

A Flutamida é rapidamente metabolizada por hidroxilação de sua cadeia lateral para o metabólito chamado de SCH16423 (3α-trifluoro-e-metil-4'-nitro-m-lactotoluidide). A distribuição da flutamida nos tecidos foi examinada em ratos machos dando uma dose de ¹⁴C-flutamida a 5 mg/kg. Enquanto a concentração da flutamida foi geralmente baixa em todos os tecidos examinados, o seu metabólito foi encontrado em concentrações altas de 70 vezes o conteúdo de flutamida, após 6 horas da dosagem. O metabólito foi relativamente concentrado no lobo ventral prostático e na vesícula seminal de ratos, previamente demonstrando serem os órgãos alvos da atividade farmacológica da flutamida (NERI, 1989).

Vários trabalhos e ensaios experimentais demonstram que a administração diária de flutamida, em doses variando entre 1 a 50 mg/Kg de peso corporal, reduz consideravelmente o peso e volume da próstata e vesículas seminais de ratos sem alterar a potência sexual (NERI, 1989).

Nos pacientes tratados com flutamida os níveis séricos de testosterona costumam ser normais ou elevados, já que existe liberação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Repostas clínicas com o uso de flutamida (250mg, 3 vezes ao dia via oral) oscilam entre 54% e 90% com pacientes não tratados previamente e entre 14% e 39% nos pacientes com escape a tratamento endócrino anterior (SOGANI, *et al.*, 1984, SROUGI, 1992). Narayan e colaboradores, 1996, estudando 372 pacientes durante dois anos,

demonstraram que 250mg de flutamida foi suficiente para reduzir de 14% a 29% o volume prostático.

O emprego clínico da flutamida apresenta 2 vantagens: este composto não aumenta os riscos de acidentes cardíco-vasculares e cerca de 70% dos pacientes preservaram sua função sexual. Seu maior inconveniente relaciona-se com os custos do tratamento, bastante elevados (SROUGI, 1992). Ademais, podem surgir disfunção hepática e diarreia em alguns pacientes e ginecomastia na maioria dos casos (NARAYAN *et al.*, 1996).

A depleção de andrógenos por castração cirúrgica ou a combinação com anti-androgênicos, após a próstata ter atingido o seu tamanho final, pode causar atrofia do órgão (CORMACK, 1991).

Este processo de redução em tamanho e perda de função é chamado de involução, onde são observadas mudanças dramáticas na glândula prostática de ratos. A notável redução do tamanho e do peso do órgão é atribuída a uma seqüência de eventos, inicialmente caracterizados por uma parada na síntese e uma acelerada liberação da secreção luminal, seguida pela diminuição do tamanho das células epiteliais por processos apoptóticos e degeneração celular, resultando em lóbulos reduzidos e células epiteliais baixas (ORTIZ, 1953; BRANDES, 1966).

São observados ainda um declínio na síntese de DNA e de proteínas, no conteúdo e na complexidade do RNA e uma diminuição dos receptores de andrógenos (AUMÜLLER & SEITZ, 1990). A castração na idade adulta leva a apoptose, predominantemente, das células epiteliais luminais (HAYWARD *et al.*, 1996).

Entretanto, as informações mais consistentes da literatura são de natureza bioquímica e fisiológica, tratando apenas dos aspectos funcionais dos órgãos em estudo (MARCHETTI & LABRIE, 1988), tendo-se informações restritas sobre os efeitos de anti-androgênicos na próstata de cobaias durante o desenvolvimento pós-natal, principalmente enfocando estudos de natureza microscópica.

Outros tipos de alterações morfológicas, citoquímicas e ultra-estruturais ocorridas nas células epiteliais glandulares da próstata têm sido abordados após o processo experimental de castração cirúrgica de ratos jovens adultos, tais como, aumento de fibras

do sistema elástico, modificações no fenótipo de células musculares lisas e alterações em alguns colágenos microfibrilares e membrana basal (VILAMAIOR, 1998; CARVALHO *et al.*, 1997a, b).

Embora os eventos associados às modificações sofridas pelas células epiteliais da porção glandular e no estroma foram intensamente investigados em ratos após a castração cirúrgica por VILAMAIOR, 1998, CARVALHO *et al.*, 1997a,b, e CARVALHO e LINE, 1996, as modificações morfológicas e ultra-estruturais que ocorrem no estroma prostático de cobaias ainda necessitam de maiores investigações após efeito de aplicação de anti-androgênicos, principalmente frente à tentativa de melhor compreensão das relações epitélio-estroma.

OBJETIVO

Tendo em vista a escassez de informações de natureza microscópica e ultra-estruturais sobre os componentes estruturais prostáticos, durante o desenvolvimento pós-natal após a castração química por drogas anti-androgênicas, e acreditando ser a cobaia um bom modelo experimental para o estudo dos aspectos que envolvem as relações estruturais estroma-epitélio, o presente trabalho teve por objetivo, a caracterização morfológica, citoquímica e ultra-estrutural dos efeitos de um agente anti-androgênico não esteroidal, a flutamida, sobre a porção estromal e epitelial do lobo lateral da próstata de cobaias machos *Cavia porcellus* em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

ARTIGOS

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

Artigo 1: AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO LOBO LATERAL DA PRÓSTATA DE COBAIA (*Cavia porcellus*) SOB EFEITO DA TERAPIA ANTI-ANDROGÊNICA PELA FLUTAMIDA

* (A ser submetido para a Revista *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*)

Artigo 2: ALTERAÇÕES TECIDUAIS NO LOBO LATERAL DA PRÓSTATA DE COBAIA (*Cavia porcellus*) APÓS TERAPIA COM O ANTI-ANDROGÊNICO FLUTAMIDA.

* (A ser submetido para a Revista *BioCell*)

AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DO LOBO LATERAL DA PRÓSTATA DE COBAIA (*Cavia porcellus*) SOB EFEITO DA TERAPIA ANTI-ANDROGÊNICA PELA FLUTAMIDA

(Histochemical and Morphometrical Evaluation in Guinea Pig Lateral Prostate Following Antiandrogen Flutamide Therapy)

Renato Simões Cordeiro¹ e Sebastião Roberto Taboga²

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

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

Título resumido: Histoquímica e Morfometria do Lobo Lateral da Próstata de Cobaia após Terapia pela Flutamida.

Palavras-chave: Cobaia, Próstata, Flutamida, Matriz Extracelular.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da CAPES e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n.º 00/06146-7).

Endereço para correspondência

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP

Departamento de Biologia

Rua Cristóvão Colombo, 2265

Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

CEP: 15054-000

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar os efeitos da ação do anti-androgênico não esteroidal flutamida sobre os componentes epiteliais e estromais do lobo lateral prostático da cobaia *Cavia porcellus*. Para isso foram utilizados 30 cobaias machos divididos em 3 grupos de 10 animais cada, correspondendo à fase do desenvolvimento pós-natal: fase púbere do 30^o ao 40^o dia, fase pós-púbere do 85^o ao 95^o dia e fase adulta do 235^o ao 245^o dia. Os animais do grupo tratado receberam injeção subcutânea diária de flutamida na dose de 10mg/Kg/dia/animal durante 10 dias. Após o tratamento, as próstatas foram removidas, e processadas para a microscopia de luz, realizando-se testes histoquímicos para os componentes fibrilares estromais e análises morfométrico-estereológicas dos componentes epiteliais e estromais. Os resultados revelaram alterações significativas no lobo lateral prostático da cobaia após o tratamento. Os testes histoquímicos associados às análises morfométrico-estereológicas evidenciaram um aumento do diâmetro dos ácinos nos animais púberes, promovendo um estreitamento do conjuntivo e da musculatura lisa ao redor dos ácinos e um espessamento com arranjo concêntrico das fibras reticulares entre a musculatura. Os lobos laterais dos animais da fase pós-púbere apresentaram diminuição do diâmetro acinar e pequeno aumento do estroma muscular. Nos animais adultos, a flutamida promoveu diminuição do diâmetro acinar ocasionando dobras no epitélio, bem como pequeno aumento na espessura da musculatura lisa e diminuição na espessura com distribuição irregular das fibras reticulares. As fibras colágenas apresentaram-se de certa forma mais finas e de distribuição e concentração irregulares nas três idades, tendo uma maior concentração na base epitelial. Em relação ao sistema elástico, observou-se um aumento das fibras pré-elásticas após o tratamento. Assim, pode-se assumir que o bloqueio anti-androgênico pela flutamida reduz o crescimento da glândula prostática, provocando alterações nas interações morfológicas e estruturais entre estroma/epitélio, levando em conta as diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

INTRODUÇÃO

A utilização de medicamentos anti-androgênicos no tratamento de lesões prostáticas, caracteriza a castração fisiológica ou química, e tem sido indicada principalmente nas lesões proliferativas adenocarcinomas que apresentam primariamente dependência de hormônios androgênicos produzidos principalmente pelos testículos (BROOKS *et al.*, 1991, GORDON *et al.*, 1984).

A ação das drogas anti-androgênicas diminui a síntese de hormônios hipotalâmicos e seus fatores de liberação e de hormônios da hipófise anterior (Gonadotrofinas), inibindo assim a biosíntese ou a secreção de andrógenos fundamentais para o desenvolvimento e manutenção de todo o sistema reprodutor masculino e das estruturas sexuais acessórias (NEUMANN & TOPERT, 1986).

Os efeitos da associação de drogas anti-androgênicas com análogos do LH durante a castração química pode ser comparado à castração cirúrgica, podendo bloquear eficientemente toda a demanda androgênica do organismo, e uma das principais drogas utilizadas é a flutamida (NEUMANN & TOPERT, 1986, NARAYAN, *et al.*, 1996).

A flutamida é um anti-androgênico não esteroide que possui a capacidade de inibir a ação androgênica endógena e exógena, por competição com os receptores androgênicos nos tecidos alvos (SUFKIN & COFFEY, 1975).

Esta droga atua principalmente em nível citoplasmático por inibição competitiva de ligação da diidrotestosterona (DHT) para com seus receptores, por interferência na ligação aceptor-receptor-DHT, e possível bloqueio na translocação do complexo receptor-DHT para interior do núcleo, inibindo assim, a síntese de DNA prostático estimulada pela testosterona, (BURTON & TRACHTENBERG, 1986, KASSIM *et al.*, 1997, MARCHETTI & LABRIE, 1988).

Durante o bloqueio androgênico por castração química ou cirúrgica são observadas mudanças importantes na glândula prostática; como uma notável redução do tamanho e do peso do órgão, atribuída a uma seqüência de eventos inicialmente caracterizados por uma parada no processo de síntese e uma acelerada liberação da

secreção luminal, seguida pela diminuição do tamanho das células epiteliais por processos de morte e degeneração celular, resultando em lóbulos reduzidos e células epiteliais baixas (ORTIZ, 1953; BRANDES, 1966). São observados ainda um declínio na síntese de DNA e de proteínas, no conteúdo e na complexidade do RNA e uma diminuição dos receptores de andrógenos (AUMÜLLER & SEITZ, 1990, HAYWARD *et al.*, 1996).

Assim, pelo fato da próstata 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 nodular, e os hormônios, entre outros fatores, exercendo papel na etiologia destas lesões, faz-se necessário, desenvolver métodos precisos e modelos experimentais de análises para melhor avaliação das respostas às variações hormonais, sob várias condições ao longo do desenvolvimento pós-natal e do efeito ao bloqueio hormonal por drogas anti-androgênicas.

As modificações morfo-funcionais e estruturais dos compartimentos epiteliais e estromais após efeito de aplicação de anti-androgênicos, ainda necessitam de investigações, principalmente frente à tentativa de compreender as relações hormonais estabelecidas entre epitélio-estroma prostático.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Delineamento Experimental

Foram utilizados 30 cobaias machos *Cavia porcellus*, mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, no biotério do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP – Campus de São José do Rio Preto.

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10 animais cada, sendo que os grupos correspondiam à fase do desenvolvimento pós-natal: grupo 1- *fase puberal* (entre 15 e 60 dias após o nascimento), grupo 2 - *fase pós-puberal* (entre 60 e 120 dias após o nascimento) e grupo 3 - *fase adulta* (entre 120 e 360 dias após o nascimento). Dentro de cada grupo elegeram-se aleatoriamente 5 animais para o grupo controle e 5 animais para o grupo experimental. Os períodos de tratamento e a morte dos animais foram baseados na divisão por faixa etária proposta por HORSFALL e colaboradores (1994).

Os animais do grupo experimental receberam injeção subcutânea diária de 10mg/Kg de flutamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluída em 1% de gelatina e 0,9% de NaCl, na dose de 0,5 ml/dia/animal durante 10 dias (MARCHETTI & LABRIE, 1988), enquanto que, os animais do grupo controle receberam injeção subcutânea diária do veículo farmacológico (1% de gelatina e 0,9% de NaCl) na dose de 0,5 ml/dia/animal durante 10 dias. Os dias de administração do anti-androgênico e do veículo farmacológico corresponderam ao período central de cada fase do desenvolvimento: fase púbere do 30º ao 40º dia, fase pós-púbere do 85º ao 95º dia e fase adulta do 235º ao 245º dia.

Após os 10 dias de tratamento, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical.

- Processamento Histológico

As próstatas foram removidas e fixadas em Bouin, sendo em seguida lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em Paraplast e seccionadas a 5 µm em micrótomo rotativo semi-automático. Depois de desparafinizados e hidratados, os cortes foram submetidos às colorações pelo *Tricrômico de Masson* (segundo BEHMER *et al.*, 1976) e *Picrossírius-Hematoxilina* (segundo JUNQUEIRA *et al.*, 1979) para estudos do estroma prostático.

Parte do material foi fixado em Karnovsky, e levado ao álcool 70%, sendo em seguida incluído em historresina Leica-historesin embedding kit e seccionado a 2µm de espessura em micrótomo rotativo semi-automático.

As técnicas de colorações utilizadas foram a *Hematoxilina-Eosina (HE)* (segundo BEHMER *et al.*, 1976) para estudos morfométrico-estereológicos dos componentes da próstata, a *Fucsina Resorcina de Weigert* (segundo GOLDFISCHER *et al.*, 1983) para estudos das fibras do sistema elástico e a *impregnação pela prata para reticulina* (segundo GÖMÖRI, 1937) para estudos das fibras reticulares no estroma prostático.

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenamed, utilizando filmes Kodacolor 35mm, ASA 100.

- Estudo Morfométrico-Estereológico

Utilizando o sistema analisador digital *Image Pro-Plus (Media Cybernetics)* com auxílio de *Câmera CCD-IRIS (Sony)*, acoplados ao *Microscópio Olympus*, foram capturadas imagens de 30 campos histológicos corados com HE de cada grupo experimental nas três idades avaliadas. Foram avaliadas 5 lâminas por grupo experimental (uma por animal), das quais foram coletadas 6 imagens de cada uma delas.

As frações volumétricas dos compartimentos prostáticos: epitélio, lúmen, estroma muscular (camada muscular lisa delineando os ácinos) e estroma não-muscular (espaço conjuntivo entre o epitélio e a camada muscular e espaço conjuntivo interacinar); foram determinadas utilizando o sistema-teste de arranjo triangular M168, segundo Weibel (1978), contendo 168 pontos e 84 linhas (HUTTUNEN *et al.* 1981).

A análise estatística de todos os dados coletados foi realizada em planilhas e gráficos do Software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). O teste de hipótese utilizado para averiguação da significância foi o de Anova (Análise de Variância), sendo que o nível de significância adotado foi de $p < 0,05000$.

RESULTADOS

- Análise Histoquímica

Os resultados das análises dos materiais corados pelas técnicas do Tricrômico de Masson e Picrossírius-Hematoxilina revelaram que os lobos laterais prostáticos de cobaias machos são constituídos de unidades acinares formadas por um epitélio simples com limite luminal, que pode formar dobramentos de acordo com a idade avaliada. Os ácinos são delimitados por tecido conjuntivo, dito estroma não-muscular na base do epitélio, e por camadas de fibras musculares lisas (estroma muscular), as quais se associam intimamente formando um arranjo concêntrico que envolve os ductos e ácinos da glândula em toda sua extensão (Figs.: 1, 3, 7, 9 e 11).

Analisando a região do estroma muscular foi possível observar diferenças em relação à concentração e distribuição das fibras musculares nos tecidos dos animais. O lobo lateral dos animais púberes é constituído de ácinos pequenos com numerosos dobramentos epiteliais e delimitados por uma camada regular e espessa de fibras musculares lisas concêntricas (Figs.: 1 e 7). Os lobos laterais dos animais pós-púberes e adultos caracterizaram-se por apresentarem ácinos dilatados com estreitamento da camada muscular (Figs.: 9, 11 e 12). Entremeando as fibras musculares lisas detectou-se delgadas fibras colágenas e reticulares, que se encontraram em maior concentração na região do estroma não muscular. (Figs.: 3, 5, 7, 9, 11, 14, 16 e 18).

Pela técnica da Reticulina de Gömöri foi possível detectar outro elemento da matriz estromal, as fibras reticulares, as quais têm um papel na manutenção do arcabouço extracelular e nas propriedades de resistência dos tecidos.

Estas fibras estão presentes no arcabouço do estroma muscular ao redor dos ácinos glandulares e na base epitelial na região da membrana basal. Nos animais adultos notou-se uma concentração e um arranjo regular bem maior das fibras reticulares (Figs.:

18) em relação à próstata dos animais púberes e pós-púberes, que aparentemente apresentaram fibras reticulares finas e de distribuição irregular (Figs.: 14 e 16).

A técnica da Fucsina Resorcina de Weigert para estudos das fibras do sistema elástico, revelou que as próstatas dos animais controle nas três idades foram caracterizadas por possuírem pouca quantidade de fibras elásticas em seu estroma. Estas fibras apresentaram-se mais espessas e estando em maior concentração principalmente no estroma não muscular, quando comparadas com as próstatas dos animais tratados (Figs.: 21, 22, 25, 26 e 29).

Nos grupos de animais submetidos ao tratamento pela flutamida, principalmente nos animais púberes, observou-se uma dilatação dos ácinos com poucas dobras epiteliais e um estreitamento das fibras musculares lisas intimamente associadas ao redor dos ácinos (Figs.: 2 e 8). Nas fases pós-púbere e adulta, a flutamida promoveu um pequeno aumento na espessura da camada de musculatura lisa e uma diminuição do diâmetro acinar principalmente na fase adulta. (Figs.: 10 e 13).

As fibras colágenas que formam o arcabouço epitelial apresentaram-se de certa forma mais finas e em menor quantidade e concentrando-se principalmente nas pregas e nas bases epiteliais (Figs.: 2, 8, 4, 10, 6 e 13). Em relação às fibras reticulares observou-se um espessamento com arranjo concêntrico entre as fibras musculares, tendo uma maior concentração na base epitelial nas próstatas dos animais púberes e pós-púberes (Figs.: 15 e 17) enquanto que, nos animais da fase adulta, as fibras reticulares tornaram-se finas com distribuição irregular junto a fibras musculares lisas (Figs.: 19 e 20).

Em relação ao sistema elástico, observou-se um pequeno aumento das fibras pré-elásticas após o tratamento com distribuição e concentração irregulares nas três idades (Figs.: 23, 24, 27, 28, 30 e 31). É importante ressaltar que, dos componentes avaliados, o sistema elástico é o minoritário.

- Análise da Freqüência Relativa dos Componentes Teciduais da Próstata

Analisando-se os cortes pelo método de HE associado a estereologia foi realizada uma análise exploratória e estatística da freqüência relativa dos componentes teciduais do lobo lateral prostático nas diferentes fases do desenvolvimento nos animais controle e submetidos ao tratamento pelo anti-androgênico não esteroideal flutamida.

As análises morfométrico-estereológicas revelaram que as proporções de estroma muscular (EM) ao redor dos ácinos e do estroma não muscular (ENM), principalmente entre a camada muscular e a base epitelial, são maiores durante a puberdade (fase púbere – Fig.: 32A e Tabela 1). Após este período, há um declínio na proporção do EM e ENM (período de adolescência-fase pós-púbere - Fig.: 32B e Tabela 1) com dilatação dos ductos até a fase adulta (Fig.: 32C e Tabela 1).

Na próstata normal das três idades estudadas, o componente tecidual que demonstrou uma maior freqüência foi o estroma muscular da fase púbere, que ocupou uma fração de volume médio de 46,9%, mínimo de 26,7% e máximo de 72,3%, com desvio padrão de 10% e como consequência disso, apresentou um lúmen como tendo a menor freqüência, ocupando um valor médio de 7,4%, mínimo de 0,0% e máximo de 18%, com desvio padrão de 4,3% (Fig.: 32A e Tabela 1).

Com o avançar da idade, notou-se um aparente aumento do diâmetro dos ácinos e túbulos da próstata nesta espécie. Em animais intactos adultos observamos que o aumento no diâmetro luminal dos ácinos promoveu um pequeno estreitamento dos estromas muscular e não muscular. Dessa forma, o componente tecidual que demonstrou uma maior freqüência na fase adulta foi lúmen, que ocupou uma fração de volume médio de 36,9%, mínimo de 15,4% e máximo de 78%, com desvio padrão de 14,5% (Fig.: 32C e Tabela 1).

Na fase transitória pós-púbere, o componente tecidual que demonstrou uma maior freqüência foi lúmen, ocupando um valor médio de 33%, mínimo de 2,9% e máximo de 82,3%, com desvio padrão de 18,1% (Fig.: 32B e Tabela 1).

Na próstata dos animais submetidos ao bloqueio androgênico pela flutamida, os animais da fase púbere foram os que apresentaram maiores alterações significativas. Observou-se uma drástica diminuição do estroma muscular e não muscular com

conseqüente dilatação luminal, o qual a área de ocupação alcançou um valor médio de 40,6%, mínimo de 19% e máximo de 74%, com desvio padrão de 14,9%.

Na fase adulta, ocorreu o processo inverso, apresentando um aumento da área epitelial, do estroma muscular e do lúmen, que apresentou a maior freqüência, com um volume médio de 33,6%, mínimo de 4,7%, máximo de 60% e com desvio padrão de 13,7%. As alterações na próstata dos animais pós-púberes foram consideradas estatisticamente intermediárias entre as outras idades, com o estroma muscular tendo a maior freqüência, com um valor médio de 32,8%, mínimo de 10,7% e máximo de 67%, com desvio padrão de 13,4% (Figs.: 32 A, B e C e Tabela 1).

A análise de variância (Anova) revelou que as alterações sofridas pelos compartimentos do EM e ENM e lúmen na fase púbere, durante o período de tratamento com flutamida foram altamente significativas, com $p = 0,05000$, e que somente o componente epitelial da fase adulta também apresentou alterações significativas. Os dados relativos aos testes de significância aplicados podem ser observados na Tabela 1.

Todos os componentes analisados na fase pós-púbere não sofreram modificações estatisticamente significativas durante todo o período de tratamento, mantendo sua fração de volume pouquíssimo alterada. A análise de variância revelou $p = 0,05000$ e utilizando-se o teste da mediana o valor de p para o epitélio = 0,281, lúmen = 0,855, EM = 0,687 e ENM = 0,546, o que comprovou a não significância das alterações sofridas por estes componentes teciduais durante o período de tratamento. O mesmo ocorreu com os componentes epitelial ($p = 0,885$) da fase púbere, e lúmen ($p = 0,362$), EM ($p = 0,917$) e ENM ($p = 0,493$) da fase adulta, apresentando alterações não significativas ao tratamento pela flutamida. O comportamento dos componentes teciduais durante o experimento está ilustrado na figura 32 A, B e C.

Na Tabela 1 também estão representados os dados numéricos referentes à mediana de cada um dos componentes analisados nos grupos controle e tratado em cada fase do desenvolvimento pós-natal. Na amostragem utilizada, observou-se que ocorreu uma distribuição simétrica dos dados, onde os valores das medianas aproximam-se das médias. Desse modo, a mediana representou um dado importante para análise exploratória e estatística da freqüência relativa dos componentes prostáticos, pois além de fornecer um

valor numérico próximo à média, ela não é influenciada pelos valores extremos da amostragem.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento da glândula prostática nos mamíferos envolve muitos processos, tais como proliferação celular, formação e canalização do cordão epitelial, morfogênese das ramificações ductais e citodiferenciação secretória. A ocorrência destes processos na próstata e em todo o sistema reprodutor masculino são dependentes dos níveis de andrógenos nestes tecidos, produzidos pelos testículos do feto e pela adrenal (PRICE & ORTIZ, 1965 *apud* CUNHA 1976, DOUNJACOUR & CUNHA, 1988, COOKE *et al.*, 1991, CUNHA *et al.*, 1996, THOMSON *et al.*, 1997).

Há um período durante a vida fetal em que a dependência de andrógenos é absoluta, sendo que sua remoção neste período suprime a formação da próstata. Entretanto, as primeiras semanas do desenvolvimento pós-natal da próstata parecem não ser estritamente dependente de hormônios, ou é minimamente dependente. (WELLS, 1954, DOUNJACOUR & CUNHA, 1988, SUGIMURA *et al.*, 1986).

O bloqueio androgênico pela flutamida provocou alterações morfológicas e estruturais distintas em alguns componentes teciduais da próstata lateral de cobaias machos levando em conta a fase do desenvolvimento pós-natal. Esta ação diferenciada da flutamida nas várias fases do desenvolvimento pós-natal parece estar diretamente ligada à influência hormonal ora absoluta (na fase pós-puberal e adulta) ora relativa ou quase inexistente (na fase puberal), (DOUNJACOUR & CUNHA, 1988).

Assim, em função dos baixos níveis de andrógenos atuantes na fase puberal (ZHAO *et al.* 1993, HORSFALL *et al.* 1994), a quantidade de flutamida administrada foi suficiente para promover o bloqueio da secreção celular, causando alterações morfológicas e estruturais marcantes na arquitetura glandular. Observando-se nesta fase uma diminuição na espessura da camada muscular lisa ao redor dos ácinos e do estroma não muscular na

base epitelial, com dilatação acinar. Estas alterações foram altamente significativas nas análises das frequências relativas dos componentes teciduais realizadas através dos estudos morfométrico-estereológicos.

Já o estágio adulto é um período em que o andrógeno mantém a morfologia e a função no tecido prostático, havendo uma taxa de proliferação extremamente baixa, que se equilibra com a morte celular (CUNHA *et al.*, 1996). Sendo assim, a dose de flutamida administrada nesta fase foi suficiente para inibir a ação dos andrógenos sobre a próstata, e, portanto, bloquear do processo de síntese protéica e secreção celular, provocando uma diminuição no diâmetro dos ácinos causando dobras no epitélio acinar e espessamento e arranjo concêntrico da musculatura lisa que os circundam.

Na fase transitória pós-púbere os andrógenos estão em grande quantidade, sendo fundamentais para o desenvolvimento morfológico e funcional do tecido prostático (ZHAO *et al.* 1993, HORSFALL *et al.* 1994).

Desse modo, como o anti-androgênico flutamida é uma droga não esteroideal, e que, portanto, não bloqueia a liberação de LH pela hipófise, os resultados mostraram que os prováveis níveis de testosterona nesta fase foram suficientes para promover um bloqueio maior da ação da flutamida, resultando em um efeito moderado e não significativo, quando comparado com as demais idades. Portanto, houve um pequeno aumento da musculatura ao redor dos ácinos e do estroma não muscular, na base epitelial e no espaço interacinar.

Algumas das alterações ocorridas na próstata ventral de ratos após poucos dias de castração cirúrgica (MOORE *et al.*, 1979) podem ser comparadas com as que ocorreram na próstata lateral de cobaias na fase pós-púbere do desenvolvimento pós-natal após a castração química pela flutamida. Estas alterações morfo-estruturais podem ser descritas como uma diminuição do epitélio prostático e do diâmetro acinar e aumento na proporção do estroma em relação aos ácinos.

Outros tipos de alterações morfológicas e citoquímicas ocorridas nas células epiteliais glandulares da próstata têm sido abordados após o processo experimental de castração cirúrgica de ratos jovens adultos, tais como, aumento de fibras do sistema elástico, modificações no fenótipo de células musculares lisas e alterações em alguns

colágenos microfibrilares e membrana basal (CARVALHO & LINE, 1996, CARVALHO *et al.*, 1997a, b, VILAMAIOR, *et al.*, 2000).

A presença marcante de fibras do sistema elástico no estroma prostático de ratos têm sido atribuída à função coadjuvante deste sistema à musculatura lisa durante a liberação do produto glandular (CARVALHO *et al.*, 1997a).

Nossos resultados demonstraram que estas fibras são pouco numerosas nas diferentes fases do desenvolvimento da cobaia e não se alteram com a castração química. Isto se explica devido ao fato de existir um arcabouço concêntrico e organizado ao redor das unidades acinares, formado pelo arranjo das fibras musculares lisas associadas a delgadas fibras reticulares e colágenas em todas as fases do desenvolvimento pós-natal. Essa disposição provavelmente otimiza a secreção acinar e diminui assim a demanda de fibras do sistema elástico.

Na próstata dos animais púberes e pós-púberes submetidos ao tratamento, os resultados histoquímicos demonstraram uma pequena diminuição da espessura e concentração das fibras colágenas na base do epitélio e entre as fibras musculares, associado a um aumento na espessura das fibras reticulares na base epitelial, bem como distribuição irregular das fibras do sistema elástico. Nos animais adultos notou-se uma diminuição das fibras de colágeno e reticulares e espessamento das fibras elásticas. Um comportamento semelhante, frente à privação de hormônios, também foi observado em marsupiais na fase de desenvolvimento fetal intra-marsúpio tratados com flutamida (LUCAS *et al.*, 1997).

A distribuição do colágeno em feixes espessos no estroma prostático dos animais intactos, leva a assumirmos que as microfibrilas tenham papel estrutural, estabelecendo uma malha flexível que garante a integridade do tecido quando sob deformação causada por contração das fibras musculares lisas durante a ejaculação. Arranjo semelhante foi observado por ZAIA *et al.*, 1996 durante processo de atrofia induzida em glândulas submandibulares de camundongos e por VILAMAIOR, 1998, na próstata ventral de ratos, após orquiectomia.

De acordo com a idade do animal, os ácinos apresentaram diferenciação arquitetural, conferindo maior ou menor diâmetro e estrutura luminal. A análise

morfométrico-estereológica revelou que a proporção de estroma muscular e não muscular é maior durante a fase puberal em função da baixa taxa de andrógeno atuante, e que após este período há uma progressiva diminuição. Este declínio está relacionado provavelmente com a distensão do epitélio e dilatação do lúmen para atividade secretória durante as fases pós-púbere e adulta. Após este período, há um progressivo aumento na proporção estromal até alcançar a idade senil.

O valor na proporção estromal parece estar relacionado à extensa proliferação do compartimento celular epitelial acinar secretório durante a maturidade sexual. Estes dados estão de acordo com as análises promovidas por Horsfall *et al.*, (1984) em trabalhos prévios; os quais mesmo não fazendo análises morfométricas descrevem este fenômeno.

Em contraste com outros roedores de laboratório, o compartimento estromal da próstata lateral da cobaia é bastante organizado, facilitando estudos envolvendo componentes estromais conforme relatado por Horsfall *et al.*, 1994. Já em ratos, por exemplo, apesar da próstata ventral possuir um estroma volumoso, as fibras musculares são esparsas e de superfície irregular segundo os trabalhos de Carvalho *et al.* (1997a e b).

As análises quantitativas dos compartimentos prostáticos após a castração cirúrgica ou química têm sido importantes para o entendimento das alterações que ocorrem em função das variações dos níveis hormonais ao longo do desenvolvimento, principalmente das interações e das funções epiteliais-estromais na diferenciação e no crescimento das próstatas normais e do câncer de próstata (HUTTUNEN *et al.*, 1981).

A maioria dos receptores de andrógenos estão presentes na porção epitelial, enquanto que no estroma predominam receptores de estrógeno (TILLEY *et al.*, 1985). Esta diferença na distribuição de receptores para andrógenos sugere que o epitélio glandular deva ser mais sensível a este hormônio, e que, portanto seja alvo primário da ação de anti-androgênicos, comprometendo os demais compartimentos teciduais prostáticos.

ORTIZ (1953) e BRANDES (1966), observaram em roedores durante o bloqueio androgênico por castração química ou cirúrgica mudanças dramáticas na glândula prostática; como uma notável redução do tamanho e do peso do órgão, atribuída a uma seqüência de eventos, inicialmente caracterizados por uma parada na síntese e uma acelerada liberação da secreção luminal, seguida pela diminuição do tamanho das células

epiteliais por processos de morte e degeneração celular, resultando em lóbulos reduzidos e células epiteliais baixas.

Nos estudos concernentes à morfogênese, o crescimento e a função prostática estavam concentrados exclusivamente sobre a regulação androgênica das células epiteliais. Contudo, estudos recentes indicam que pelo menos algumas destas respostas das células epiteliais sobre estímulo hormonal não estão diretamente relacionadas a estas células, mas ao invés disso, as respostas podem ser consequência dos fatores de crescimento produzidos ao nascimento pelas células estromais (LASNITZKI & MIZUNO, 1980).

Cunha *et al.* (1996) demonstraram que o mesênquima do *sinus* urogenital controla o desenvolvimento epitelial prostático nas fases embriológica e neonatal de roedores. Já a manutenção da morfogênese e da diferenciação epitelial em ratos adultos podem ser dependentes das interações epitélio-estroma, sugerindo que esta interação pode estar envolvida na diferenciação epitelial anormal na próstata. Devido à importância potencial das interações epitélio-estroma durante o desenvolvimento prostático, a investigação da regulação hormonal dos componentes estromais podem levar a um melhor entendimento das doenças e dos processos de crescimento anormal prostático, bem como dos possíveis métodos de controle hormonal destas patologias (TILLEY *et al.*, 1985)

Com base nas análises morfométrico-estereológicas e nos testes histoquímicos dos componentes fibrilares, podemos assumir que o crescimento normal e a manutenção da integridade funcional secretora e estrutural da próstata nas idades avaliadas são dependentes de níveis constantes de andrógenos atuantes em cada fase do desenvolvimento e das interações recíprocas entre o compartimento estromal e o epitelial. Nossos dados, aqui apresentados, nos permitem concluir, que as respostas das interações estroma-epitélio frente à terapia pela flutamida são diferenciais nas idades estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUMÜLLER G, SEITZ J, 1990 Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
- BEHMER OA; TOLOSA EMC, FREITAS-NETO AG, 1976. *Manual para histologia normal e patológica*. Edart-Edusp, São Paulo, 225p.
- BRANDES D, 1966. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol* **20**: 207-276.
-
- BROOKS JR, BERMAN C, NGUYEN H, PRAHALADA S, PRIMKA RL, RASMUSSEN GH, SLATER EE, 1991. Effect of castration, DES, Flutamide, and 5-alpha-reductase inhibitor, MK-906, on the growth of the Dunning rat prostatic carcinoma, R-3327. *Prostate* **18(3)**: 215-227.
- BURTON S, TRACHTENBERG J, 1986. Effectiveness of Antiandrogens in the Rat. *The Journal of Urology* **136**: 932-935.
- CARVALHO HF, LINE SRP, 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, **20**: 809-819.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997a. Elastic system fibers of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* **32**:27-34.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997b. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibrils network of the prostatic stroma. *Tissue Cell* **29**: 163-170.
- COOKE PS, YOUNG P, CUNHA GR, 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* **128**: 2867-2873.
- 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.

- GOLDFISCHER S; COLTOFF-SCHILLER B; SCHWARTZ E, BLUMENFELD OO, 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J Histochem Cytochem* **31**: 382-390.
- GÖMÖRI, G, 1937. Silver impregnation for reticulin in paraffin sections. *Am. J. Pathol.*, **13**: 993-1002
- GORDON AS, SUSAN JA, RICHARD GM, 1984. A Pilot study of flutamide. *Med. J. Aust* **140**: 219-221.
- HAYWARD SW, BASKIN LS, HAUGHNEY PC, CUNHA AR, FOSTER BA, DAHIYA R, PRINS GS, CUNHA GR, 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.*, **155**: 81-93.
- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Fase-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- HUTTUNEN E, ROMPPNEN T, HELMINEN HJ, 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J. Anatomy*, **3**: 357-370.
- JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI R, 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem* **11**: 447-455.
- KASSIM NM, McDONALD SW, REID O, BENNETT NK, GILMORE DP, PAYNE AP, 1997. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* **190(4)**: 577-588.
- LASNITZKI I, MIZUNO T, 1980. prostatic induction: interaction of epithelium and mesenchyme from normal wild-type mice and androgen-insensitive mice with testicular feminization. *J. Endocr.* **85**: 423-428.
- LUCAS JC, RENFREE MB, SHAW G, BUTLER CM, 1997. The influence of anti-androgen flutamide on early sexual differentiation of the marsupial male. *J Reprod Fertil* **109**: 205-212.
- MARCHETTI B, LABRIE F, 1988. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. *J Steroid Biochem* **29(6)**: 691-698.

- MOORE RJ, GAZAC JM, QUEBBEMAN JF, WILSON JD, 1979. Concentration of dihydrotestosterone and 3-alfa-androstenediol in naturally occurring and androgen-induced prostatic hyperplasia in the dog. *Clin. Invest.* **64**: 1003-10.
- NARAYAN P, TRACHTENBERG J, LEPOR H, DEDRUYNE EMJ, TEWARI A, STONE N, DAS SAKTI, CRUZ-JIMENEZ JE, SHEARER R, KLIMBERG I, SCHELLHAMMER PF, COSTELLO AJ, 1996. A dose-response study of the effect of flutamide on benign prostatic hyperplasia: Results of multicenter study. *Urology*, **47(4)**: 497-504.
- NEUMANN F, TOPERT M, 1986. Pharmacology of Antiandrogenics. *J. Steroid Biochem.* **25**: 885-895.
- ORTIZ E, 1953. The effects of castration on the reproductive system of the golden hamster. *Bull Zool Lab.*, Univ. Chicago, 65-95.
- 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.
- SUFRIN G, COFFEY DS, 1975. Flutamide: Mechanism of Action of a New Nonsteroidal Antiandrogenic. *Investigate Urology* **13**: 429-434.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.
- TILLEY WD, HORSFALL DJ, McGEE MA, HENDERSON DW & MARSHALL VR, 1985. Distribution of oestrogen and receptors between the stroma and epithelium of the Guinea pig prostate, *J. Steroid Biochem.*, **22**: 713-719.
- 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.
- VILAMAIOR PSL, 1998. Estudo de alguns dos componentes macromoleculares do estroma de próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia. **Tese de Mestrado**, IB, UNICAMP, Campinas, SP. 75p.

- 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.
- WEIBEL ER, 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation* **12**: 131-155.
- WELLS LJ, CAVANAUGH MW, MAXWELL EL, 1954. Genital abnormalities in castrated rats and their prevention by means of testosterone propionate. *Anat Rec* **118**: 109-133
- ZAIA AA, COLETTA RD, ALMEIDA OP, LINE SRP, 1996. Expression of collagen and elastic fibers in duct-liganted submandibular glands of mice. *Eur. J, Oral Sci.*, **104**: 627-629.
- ZHAO CY, TAM CC, WONG YC, 1993. Morphogenesis and ductal development of the prostatic complex of the guinea pig. *J. of Morphol.* **217**: 219-227.

LEGENDAS DAS FIGURAS

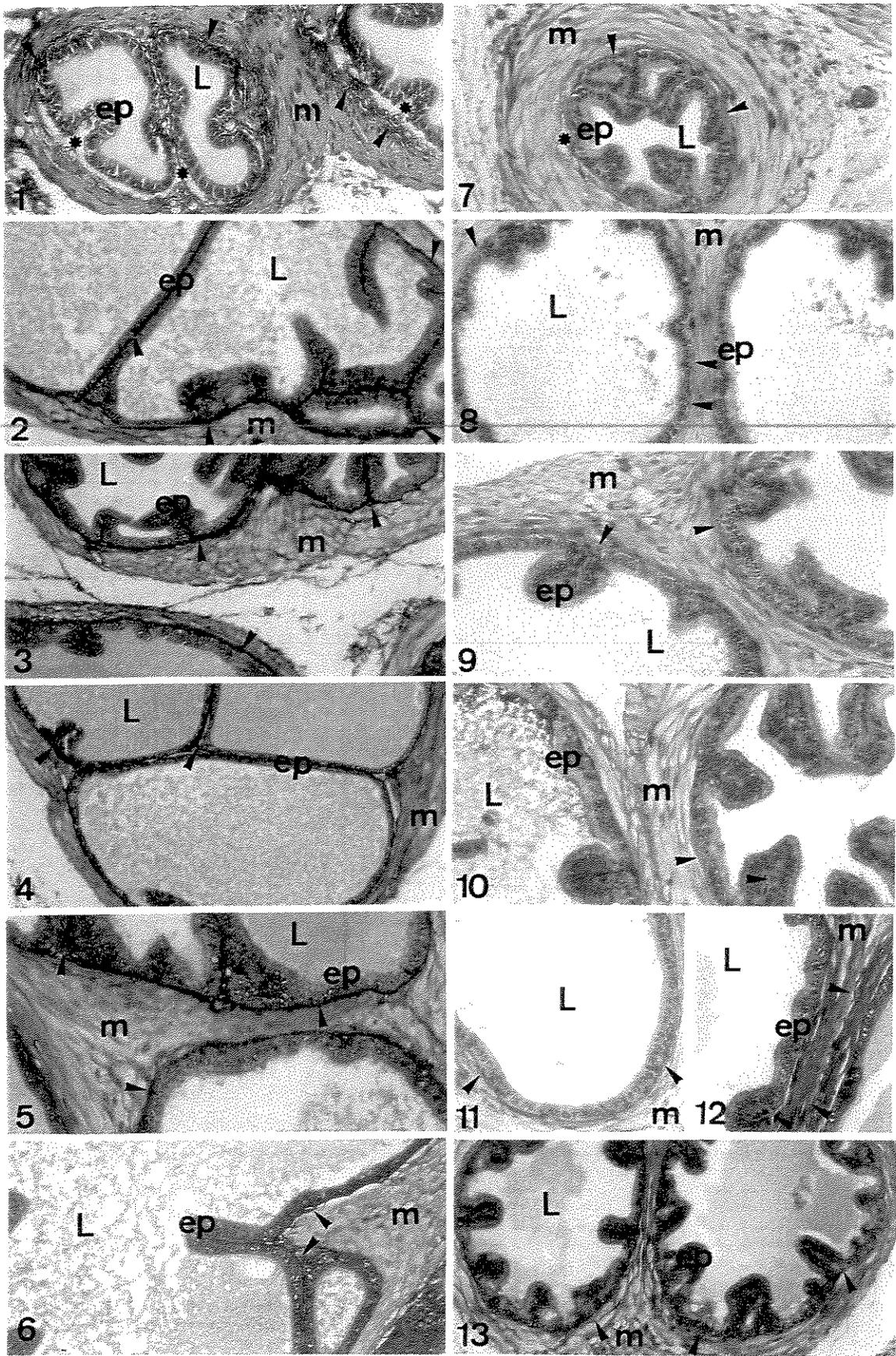
FIGURAS 1 a 6 - Cortes histológicos do lobo lateral prostático de cobaias machos corados pelo Picrossírius-Hematoxilina e **FIGURAS 7 a 13** - corados pelo Tricômico de Masson.

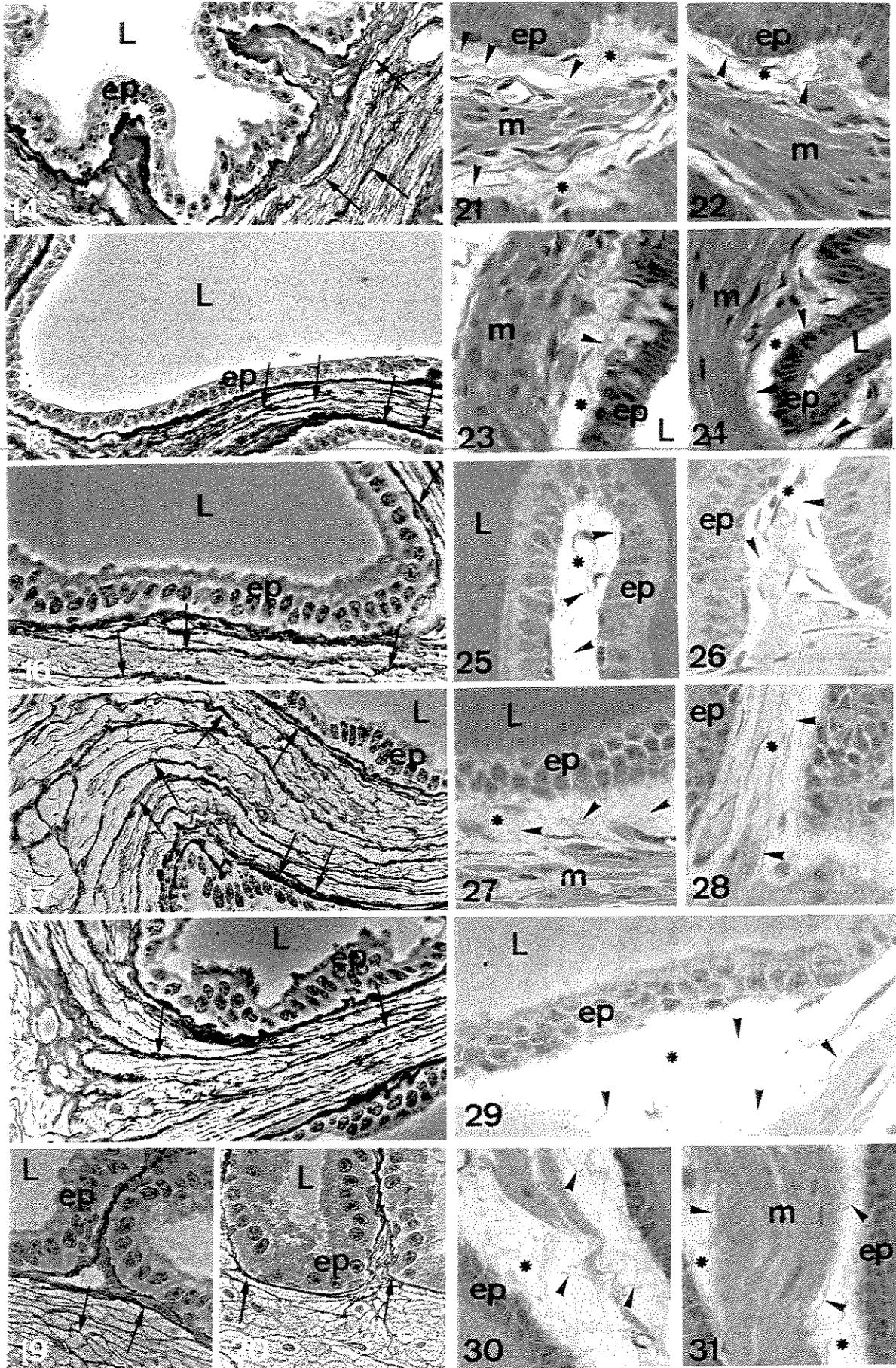
Figs. 1 e 7, 3 e 9, 5, 11 e 12 – Detalhe das unidades acinares dos animais controle. Os ácinos da fase púbere (figs.: 1 e 7) são constituídos por um epitélio colunar simples (ep) que forma várias dobras e envolvidos por tecido conjuntivo na base epitelial (*) e por uma camada de fibras musculares lisas concêntrica e espessa (m). Nas fases pós-púbere (figs.: 3 e 9) e adulta (figs.: 5, 11 e 12) nota-se ácinos glandulares largos constituídos por um epitélio simples com poucas dobras (L). Entremeando as fibras musculares lisas e principalmente na base epitelial, há grande concentração de fibras de colágeno (setas) nas três idades. **Figs. 2 e 8, 4 e 10, 6 e 13** – Lobo lateral dos animais tratados. Nos animais da fase púbere (figs.: 2 e 8) ocorre dilatação luminal e diminuição da camada muscular. Nos animais pós-púberes (figs.: 4 e 10) e adultos (figs.: 6 e 13) nota-se uma pequena diminuição do diâmetro acinar formando pregas epiteliais, seguido do espessamento da camada muscular lisa. Nas três idades avaliadas observou-se uma diminuição na espessura e na quantidade das fibras colágenas (setas), estando em maior concentração na base e nas pregas epiteliais. Figs.: 1 a 13 = 145X.

FIGURAS 14 a 20 - Cortes histológicos do lobo lateral prostático de cobaias machos corados pelo método de Gömöri para fibras reticulares. **Figs. 14, 16, e 18** – Aspecto do arcabouço reticular estromal delineando o epitélio glandular simples (ep) dos animais controle. No estroma prostático dos animais púberes (fig.:14) e pós-púberes (fig.:16) as fibras reticulares são finas e irregulares (setas), enquanto que, nos animais adultos elas são espessas e concêntricas (fig.:18). Lúmen (L). **Figs. 15, 17, 19 e 20** – Próstata dos animais tratados. Nos animais púberes (fig.:15) e pós-púberes (fig.:17) ocorreu em espessamento das fibras reticulares entre as fibras musculares lisas (setas). Na próstata da fase adulta observou-se um estreitamento das fibras reticulares entre a musculatura, concentrando-se na base do epitélio (figs.: 19 e 20). Figs.: 14 a 20 = 580X.

FIGURAS 21 a 31 - Cortes histológicos do lobo lateral prostático de cobaias machos corados pela Fucsina Resorcina de Weigert. **Figs. 21 e 22, 25 e 26 e 29**. – A próstata dos animais controle caracterizou-se por apresentar poucas quantidades de fibras elásticas (cabeças de seta) no estroma não muscular (*) nas idades púbere (figs.: 21 e 22), pós-púbere (figs.: 25 e 26) e adulta (fig.: 29). **Figs. 23 e 24, 27 e 28, 30 e 31** – Próstata dos animais tratados. Observou-se um aumento das fibras pré-elásticas com distribuição e concentração irregulares nas idades púbere (figs.: 23 e 24), pós-púbere (figs.: 27 e 28) e adulta (figs.: 30 e 31). Lúmen (L). Camada muscular lisa (m). Epitélio glandular (ep) Figs.: 21 a 31 = 580X.

FIGURA 32 – Representação gráfica em Box Plot de medianas da frequência relativa dos componentes teciduais do lobo lateral prostático dos animais controle e tratado nas idades púbere (32A), pós-púbere (32B) e adulta (32C). As plotagens referem-se aos 30 campos prostáticos capturados em cada grupo experimental em cada idade. As frações volumétricas dos compartimentos prostáticos estudados foram: epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não-muscular. O nível de significância adotado para este teste foi de $p < 0,05000$.





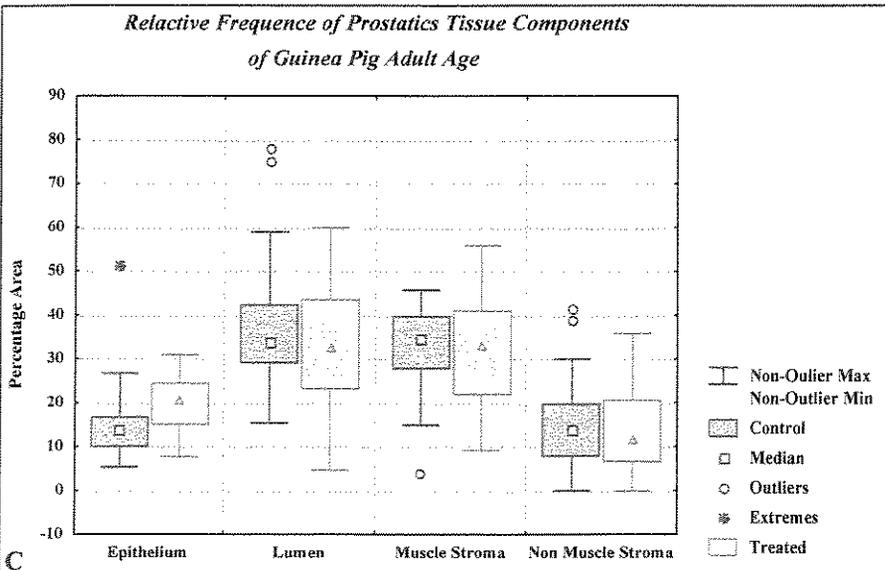
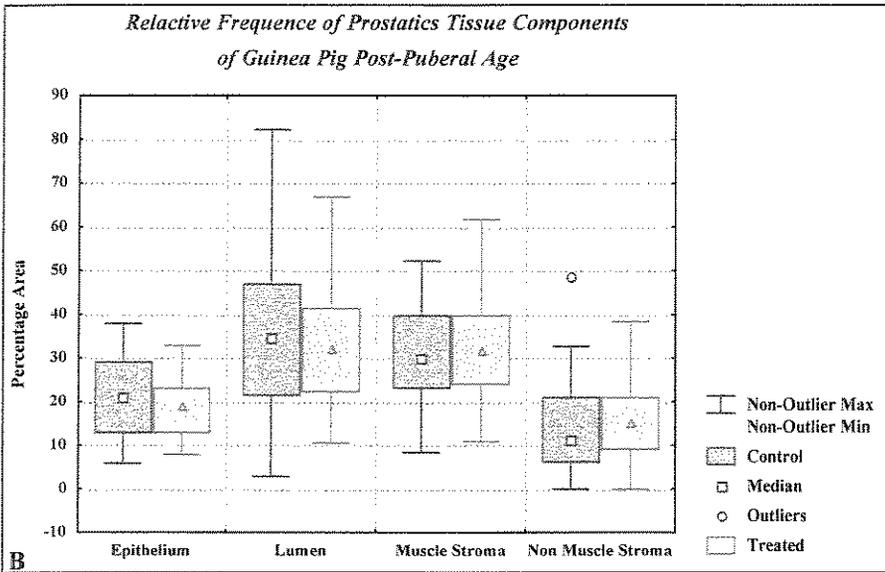
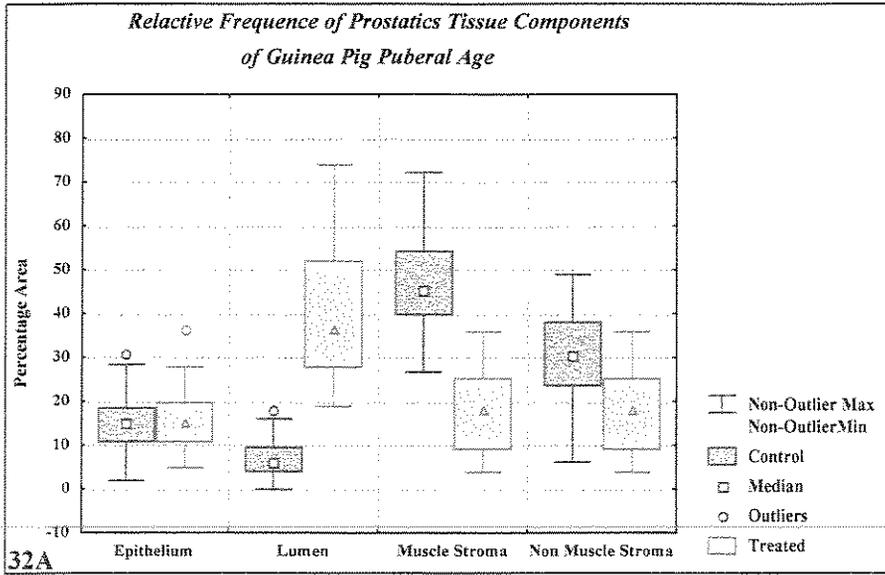


Tabela 1. Dados da estatística descritiva referente à frequência relativa dos compartimentos teciduais do lobo lateral prostático de cobaias machos do longo do desenvolvimento pós-natal. EP: Epitélio. LU: Lúmen. EM: Estroma muscular. ENM: Estroma não muscular.

* Alterações altamente significativas com $p < 0,05000$.

		Fase Puberal		Fase Pós-Puberal		Fase Adulta	
		Controle	Flutamida	Controle	Flutamida	Controle	Flutamida
Média	EP	15,5	15,7	21,2	19,0	15,1	19,8
	LU	7,4	40,6	33,0	32,3	36,9	33,6
	EM	46,9	25,5	31,5	32,8	32,8	33,1
	ENM	30,2	18,2	14,3	15,9	15,2	13,4
Mediana	EP	15,1	14,9	21,3	18,8	13,7	20,6
	LU	6,1	36,3	34,5	32,3	34,0	32,6
	EM	45,4	25,2	30,2	31,8	34,8	33,0
	ENM	30,5	18,0	11,4	15,2	14,0	11,8
Mínimo	EP	2,0	5,0	6,0	8,0	5,4	7,7
	LU	0,0	19,0	2,9	10,7	15,4	4,7
	EM	26,7	9,0	8,5	11,0	4,0	9,2
	ENM	6,2	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Máximo	EP	31,0	36,3	38,0	33,0	51,1	30,9
	LU	18,0	74,0	82,3	67,0	78,0	60,0
	EM	72,3	43,0	52,3	61,9	45,8	55,9
	ENM	49,0	36,0	48,8	38,5	41,5	36,0
Desvio Padrão	EP	6,3	6,8	9,0	6,2	8,8	6,6
	LU	4,3	14,9	18,1	13,4	14,5	13,7
	EM	10,0	7,3	12,2	13,3	9,6	13,0
	ENM	10,6	10,0	11,2	8,8	10,4	9,1
Erro Padrão	EP	1,2	1,2	1,6	1,1	1,6	1,2
	LU	0,8	2,7	3,3	2,4	2,6	2,5
	EM	1,8	1,3	2,2	2,4	1,7	2,4
	ENM	1,9	1,8	2,0	1,6	1,9	1,7
Análise de Variância $P < 0,05000$ (*)	EP	0,885798		0,281289		0,020681 *	
	LU	0,000000 *		0,855465		0,362824	
	EM	0,000000 *		0,687391		0,917760	
	ENM	0,000034 *		0,546106		0,493740	

**ALTERAÇÕES TECIDUAIS NO LOBO LATERAL DA PRÓSTATA DE COBAIA
(*Cavia porcellus*) APÓS TERAPIA COM O ANTI-ANDROGÊNICO FLUTAMIDA.**

(Tissue Alterations in the Guinea Pig Prostate Following Antiandrogen Flutamide Therapy)

Renato Simões Cordeiro¹ e Sebastião Roberto Taboga²

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

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

Título resumido: Efeitos da flutamida sobre a Próstata Lateral de Cobaia.

Palavras-chave: Próstata; Flutamida, Anti-androgênico, Células Secretoras.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da CAPES e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n.º 00/06146-7).

Endereço para correspondência

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE - UNESP
Departamento de Biologia
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil
CEP: 15054-000

RESUMO

A caracterização morfológica e ultra-estrutural dos efeitos do anti-androgênico flutamida sobre os componentes do lobo lateral da próstata de cobaias machos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, foi realizada em 3 grupos de 10 animais nas fases *púbere*, *pós-púbere* e *adulta*. Os animais do grupo tratado receberam injeção subcutânea diária de flutamida na dose de 10mg/Kg/animal durante 10 dias. Após o tratamento, os fragmentos prostáticos foram fixados e incluídos para a microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Nos animais púberes, as células epiteliais assumiram fenótipos cúbicos seguido de um aumento do diâmetro acinar e do estreitamento do estroma muscular e não muscular. Na fase pós-púbere, foi observado um pequeno aumento do diâmetro dos ácinos e da musculatura. Na fase adulta, houve uma diminuição do diâmetro acinar, causando dobras no epitélio e ocasionando um aumento no estroma muscular. Os animais tratados apresentaram células epiteliais com endomembranas alargadas, principalmente no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi, além de uma drástica diminuição das microvilosidades. Alterações nos padrões de distribuição e de densidade dos componentes fibrilares estromais foram também observadas. Os resultados mostraram, que a flutamida promoveu alterações morfológicas e ultra-estruturais no padrão de distribuição e na concentração dos componentes fibrilares e celulares do lobo lateral prostático de cobaias ao longo do desenvolvimento pós-natal.

INTRODUÇÃO

O crescimento normal, a diferenciação e a manutenção da integridade morfo-funcional da próstata e dos demais órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes em cada fase do desenvolvimento e ocorrem através de interações recíprocas entre o mesênquima e o epitélio no embrião e no estroma e epitélio no adulto. (PRICE, 1963; AUMÜLLER & SEITZ, 1990; ROSAI *et al.*, 1996; HAYWARD *et al.*, 1997; THOMSON *et al.*, 1997).

A testosterona é o andrógeno predominante nos machos, sendo produzida pelas células de Leydig do testículo quando estimuladas pelo hormônio luteinizante. A maioria da testosterona produzida é convertida a diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase nos tecidos alvos. Este metabólito (DHT) é então transportado para núcleo, estimulando a produção de andrógenos (STTERS, 2001, BALK, 2002). O desenvolvimento e a maturação da glândula prostática e das características sexuais secundárias de roedores são completadas durante a fase de crescimento puberal, em resposta ao aumento na produção de testosterona (CUNHA *et al.*, 1985).

É sabido que, durante a senescência do indivíduo, muitas alterações histológicas ocorrem na próstata em resposta as descompensações hormonais durante o envelhecimento (ROSAI *et al.*, 1996).

No homem, as principais alterações estão relacionadas com patologias severas que levam à retenção urinária, as conhecidas hiperplasias benignas (DROLLER, 1997). Além disto, podem desenvolver na próstata do idoso lesões malignas como adenocarcinomas, existindo a pré-disposição genética para estas lesões (HAYWARD *et al.*, 1997). Tais lesões, malignas ou não, podem ser tratadas por estratégias de remoção de andrógenos (PRICE, 1963; COLOMBEL e BUTTYAN, 1995; DROLLER, 1997, RAUCH *et al.*, 1997).

A dependência hormonal do câncer de próstata foi estabelecida há quase cinco décadas por Huggins, Stevens & Hodges, a partir de estudos experimentais, onde verificaram que a administração de testosterona estimulava a secreção e o crescimento de

próstata e, conversamente, que a castração ou administração de estrogênio tinha efeitos opostos. Apesar de sucessivas tentativas de se controlar a doença por outros meios, a terapêutica endócrina representa, ainda, o único método eficiente e objetivo para se deter à evolução do câncer de próstata em suas fases mais avançadas (SROUGI, 1992).

A flutamida é um agente anti-androgênico não esteroidal que possui a capacidade de bloquear a ação androgênica nos testículos (KASSIM *et al.*, 1997) e glândulas acessórias (MARCHETTI & LABRIE, 1988, LUCAS *et al.*, 1997), sendo biologicamente ativo no bloqueio da ação do metabólito testosterona-diidrotestosterona, sobre os receptores androgênicos nos tecidos prostáticos (GORDON A. *et al.*, 1984).

Os eventos associados às modificações provocadas nas células epiteliais da porção glandular e no estroma foram intensamente investigados após a castração cirúrgica (CARVALHO & LINE 1996, CARVALHO *et al.*, 1997a,b, VILAMAIOR 1998). Já as modificações morfológicas e ultra-estruturais que ocorrem no epitélio e no estroma prostático, ainda necessitam de maiores investigações após efeito de aplicação de anti-androgênicos, principalmente frente à tentativa de melhor compreensão das relações epitélio-estroma.

Assim, devido à carência de informações microscópicas e ultra-estruturais sistematizadas sobre o efeito das drogas anti-androgênicas nas células epiteliais e no estroma da próstata, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização morfológica e ultra-estrutural dos efeitos do anti-androgênico não esteroidal flutamida, sobre a porção epitelial e estromal da próstata de cobaias machos *Cavia porcellus*, em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.



MATERIAIS E MÉTODOS

- Delineamento Experimental

Neste estudo foram utilizados 30 cobaias machos *Cavia porcellus*, provenientes do Biotério Central da Unesp de Botucatu. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Unesp – Campus de São José do Rio Preto, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*”.

Os animais foram divididos em 3 grupos de 10 animais cada, onde cada grupo correspondeu à fase do desenvolvimento pós-natal: grupo 1- *fase puberal* (entre 15 e 60 dias após o nascimento), grupo 2- *fase pós-puberal* (entre 60 e 120 dias após o nascimento) e grupo 3- *fase adulta* (entre 120 e 360 dias após o nascimento). Dentro de cada grupo elegeu-se aleatoriamente 5 animais para o grupo controle e 5 animais para o grupo experimental. Os períodos de tratamento e a morte dos animais foram baseados na divisão por faixa etária proposta por Horsfall e colaboradores (1994).

Os animais do grupo experimental receberam injeção subcutânea diária de 10mg/Kg de flutamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluída em 1% de gelatina e 0,9% de NaCl, na dose de 0,5 ml/dia/animal durante 10 dias (MARCHETTI & LABRIE, 1988), enquanto que, os animais do grupo controle receberam injeção subcutânea diária do veículo farmacológico (1% de gelatina e 0,9% de NaCl) na dose de 0,5 ml/dia/animal durante 10 dias. Os dias de administração do anti-androgênico e do veículo farmacológico corresponderam ao período central de cada fase do desenvolvimento: fase púbere do 30º ao 40º dia, fase pós-púbere do 85º ao 95º dia e fase adulta do 235º ao 245º dia. Após os 10 dias de tratamento, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. As próstatas laterais foram removidas e processadas para a microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

MICROSCOPIA DE LUZ

Os fragmentos de tecido prostático foram fixados por imersão em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sørensen pH 7,2 – 0,1M), levados ao álcool 70% e incluídos em historresina Leica-historesin embedding kit e seccionados a 2µm de espessura em micrótomo rotativo semi-automático.

As técnicas de colorações utilizadas foram a *Hematoxilina-Eosina (HE)* (segundo BEHMER *et al.*, 1976) para estudos morfológicos de ordem geral e *Azul de Toluidina em tampão McIlvaine pH 4,0* (MELLO & VIDAL, 1980) para estudo de ácidos nucléicos.

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenamed, utilizando filmes Kodacolor 35mm, ASA 100.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os fragmentos de tecido prostático foram fixados em glutaraldeído 3% e ácido tânico a 0,25% 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. Depois de lavados brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em araldite segundo Cotta-Pereira e colaboradores (1976).

Os cortes ultrafinos, 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” e posteriormente contrastados pelo acetato de uranila a 2% por 20 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 & COGGESHALL, 1965, modificado), por 8 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 EM-900.

RESULTADOS

Os resultados obtidos dos cortes histológicos revelaram que o lobo lateral prostático de cobaias é constituído por glândulas túbulo-alveolares compostas, consistindo de ácinos delimitados por tecido conjuntivo (estroma não muscular) na base do epitélio e por camadas de fibras musculares lisas (estroma muscular), as quais se associam intimamente formando um arranjo concêntrico que envolve as unidades acinares em toda sua extensão (Figs.: 1, 3 e 5). O espaço interacinar é constituído por um estroma delicado de tecido conjuntivo frouxo contendo fibroblastos e vasos sanguíneos de pequeno calibre (Figs.: 1, 5 e 29).

Além disso, as análises histológicas revelaram que esta glândula é constituída, de acordo com a idade estudada, por três tipos diferentes de diferenciação arquitetural de ácinos, conferindo maior ou menor diâmetro e estrutura luminal.

A glândula prostática dos animais púberes é constituída por ácinos pequenos com um epitélio colunar simples com limite luminal formando numerosos dobramentos. O núcleo é preferencialmente oval em sua forma, acompanhando a altura das células. Os ácinos são rodeados por uma camada espessa de fibras musculares lisas concêntricas e por uma região de estroma não muscular (tecido conjuntivo frouxo) entre o epitélio acinar e a camada de músculo liso (Figs.: 1 e 7).

Na fase adulta os ácinos apresentaram-se aparentemente mais largos e delineados apenas por camada de fibras musculares lisas. As células epiteliais acinares são baixas, onde os núcleos têm sua forma arredondada ocupando uma região maior do citoplasma. Neste caso, o epitélio acinar não apresenta nenhuma forma de dobramento, provavelmente devido à sua distensão pelo acúmulo de secreção (Fig.: 5 e 11).

Nos animais pós-púberes, os ácinos foram caracterizados como sendo uma forma transitória entre os outros dois tipos de ácinos descritos. Nesta fase, os ácinos são constituídos por um epitélio que forma pequenas dobras, sendo formado por células colunares com núcleos acompanhando o formato destas células. Os ácinos secretórios

também são delimitados por uma camada de músculo liso e por uma pequena região de estroma não muscular entre o epitélio acinar e a camada muscular lisa (Figs.: 3 e 9).

As análises ultra-estruturais revelaram um mesmo padrão nos compartimentos epiteliais e estromais em todas as idades avaliadas. O estudo do estroma revelou que na base do epitélio secretor fibras finas de colágeno e elastina podem estar adjacentes à lâmina basal (Figs.: 22, 23, 24 e 30). Nesta matriz colagênica estão inseridas fibroblasto e fibras musculares lisas (Figs.: 28 e 29).

As unidades acinares podem ser constituídas por células epiteliais colunares ou cuboidais. Tais células epiteliais apresentaram o retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi com grânulos secretórios bem desenvolvidos, este último ocupando a região apical do citoplasma, onde à microscopia de luz pelo método do Azul de Toluidina é cromófora. Os núcleos são ovais ou alongados e localizados preferencialmente na região central das células (Figs.: 9, 11, 13, 15, 16 e 17).

O epitélio secretor juntamente com as células basais acinares repousam sobre uma lâmina basal fina e levemente ondulada (Figs.: 22, 23 e 24). Uma característica marcante no citoplasma das células secretoras foi à presença de grande quantidade de microvilosidades de diferentes tamanhos (Figs.: 13 e 14).

A ação anti-androgênica da flutamida provocou alterações importantes nos compartimentos epiteliais secretores e estromais da glândula prostática de cobaias em algumas das fases do desenvolvimento pós-natal.

As células do epitélio secretor parecem responder diferentemente ao anti-androgênico flutamida, ou seja, em um mesmo ácino puderam ser encontradas células responsivas ao lado de células refratárias ao anti-androgênico (Fig.: 18). Tais células epiteliais responsivas apresentaram endomembranas alargadas, principalmente o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi, e uma drástica diminuição das microvilosidades em altura e número (Figs.: 18, 19, 20 e 21).

No citoplasma apical das células secretoras há numerosos grânulos de secreção de diferentes tamanhos, alguns provavelmente representando os vacúolos de condensação originados do complexo de Golgi. Estes grânulos secretórios eventualmente liberam seu conteúdo no lúmen acinar (Fig.: 18).

O bloqueio androgênico também provocou alterações nos padrões de distribuição e densidade dos componentes fibrilares que compõem o conjuntivo onde repousam os ácinos prostáticos. Os resultados mostraram uma distribuição irregular e uma aparente diminuição na concentração das fibras colágenas, tanto na base do epitélio (Figs.: 25, 26 e 27) quanto entre as células musculares lisas que circundam os ácinos (Figs.: 31, 32 e 33). Já em relação ao sistema elástico, observou-se um aumento das fibras pré-elásticas com distribuição e concentração irregular após o tratamento (Figs.: 34).

As análises morfológicas dos lobos laterais prostáticos dos animais púberes tratados demonstraram que, as células epiteliais acinares assumiram fenótipos cúbicos, sendo mais baixas em comparação com as células do grupo controle. O núcleo passou a ocupar quase todo o espaço citoplasmático, seguido de um aparente aumento significativo do diâmetro dos ácinos, promovendo um estreitamento do conjuntivo e também dos feixes de musculatura lisa que os circundam (Figs.: 2 e 8).

Na fase pós-púbere houve um pequeno aumento do diâmetro dos ácinos e da musculatura ao redor, ocorrendo também dobras ao longo do epitélio acinar. Aparentemente houve uma redução da altura das células epiteliais, apresentando núcleos ocupando quase toda a célula com diminuição da provável área ocupada pelo complexo de Golgi (Figs.: 4 e 10).

Na fase adulta, observou-se uma aparente diminuição do diâmetro dos ácinos causando dobras no epitélio acinar, ocasionando um aumento na espessura da musculatura lisa. Além disso, as células epiteliais apresentaram-se de certa forma mais altas, com núcleos basais, destacando a área ocupada pelo complexo de Golgi e aumento da basofilia citoplasmática (Figs.: 6 e 12).

DISCUSSÃO

A integridade funcional e morfológica da glândula prostática e dos demais órgãos reprodutores masculinos dependem de estímulos hormonais androgênicos ligados aos receptores nos tecidos.

O andrógeno mais abundante nos machos é a testosterona e para que ocorra a sua ação, ela deve ser convertida para o seu metabólito ativo, a diidrotestosterona (DHT), pela enzima 5 α -redutase presente nas células basais e no estroma prostático, sendo a DHT, a resposta primária para o desenvolvimento da próstata e também a responsável pelas doenças que surgem com o avanço da idade (CHOATE & RESKO, 1996, SUFRIN & COFFEY, 1975).

A flutamida tem sido um potente agente anti-androgênico funcionalmente específico para estruturas sexuais acessórias dependentes de andrógenos, como é o caso da glândula prostática.

Assim, a administração de 10mg/Kg de flutamida no presente estudo, promoveu pequenas alterações morfológicas e ultra-estruturais no padrão de distribuição e na concentração dos componentes fibrilares (fibras colágenas, reticulares e elásticas) e celulares no lobo lateral da próstata de cobaia considerando-se diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

Após o tratamento, as células epiteliais acinares apresentaram-se com fenótipos diferentes em cada fase do desenvolvimento. Na fase púbere, na qual a quantidade de andrógenos atuando sobre a próstata é pequena (ZHAO *et al.* 1993, HORSFALL *et al.* 1994), o epitélio glandular apresentou-se com células cúbicas com núcleo ocupando quase toda célula e área luminal dilatada. Neste caso, em função dos baixos níveis de andrógenos atuantes, a quantidade de flutamida administrada foi suficiente para promover as alterações morfológicas e estruturais na arquitetura glandular prostática dos animais nesta fase.

No estágio adulto, os andrógenos mantêm a morfologia e a função no tecido prostático, com uma taxa de proliferação extremamente baixa, que se equilibra com a

morte celular (CUNHA *et al.*, 1996). Com o avançar da idade há uma certa queda nos níveis hormonais no organismo, principalmente de testosterona produzidas pelos testículos.

Neste caso, os níveis de andrógenos que estão atuando sobre este órgão, estão em quantidades tais, para manter e garantir a integridade morfológica e secretória da glândula prostática, ou seja, a flutamida foi capaz de inibir eficientemente a ação dos andrógenos que atuam em concentrações limitadas nesta idade. Dessa forma, epitélio glandular prostático apresentou-se com alterações significativas, formando dobras e constituindo-se de células altas com núcleos basais e lúmen reduzido com espessamento da musculatura lisa.

Na fase pós-púbere, onde os níveis de andrógenos circulantes são altos (ZHAO *et al.* 1993, HORSFALL *et al.* 1994), aparentemente houve uma maior competição com a flutamida pelos receptores androgênicos na próstata a ponto de suprimir a ação anti-androgênica apresentando, portanto, um efeito moderado nos compartimentos teciduais prostáticos (próximo aos animais controle) quando comparado com as demais idades, ou seja, ácinos constituídos de células epiteliais colunares ao longo do epitélio glandular, lúmen sofrendo pouca dilatação e com pequenas dobras e um aumento não significativo da camada muscular lisa.

Sugimura *et al.*, (1986) utilizando-se da técnica de microdissecção da glândula prostática, realizou estudos preliminares da morfogênese ductal do complexo prostático de cobaia. Esta técnica revelou que a morfogênese da ramificação do complexo prostática de cobaia é completada no nascimento, com nenhum aumento significativo no número de ramificações e de extremidades ductais. O crescimento e a morfogênese ductal decai em duas fases: a pré-natal e a pós-natal. O primeiro crescimento dos brotos prostáticos começa com 35 dias de gestação e o crescimento prostático e ramificação continua no decorrer dos próximos 15-20 dias.

Já o crescimento pós-natal é acompanhado principalmente por alongação da rede ductal existente (fase púbere) com poucas ramificações adicionais (fase pós-púbere), mas com um aumento no tamanho (volume) dos túbulos (fase adulta). A canalização dos túbulos ductais ocorre pré-natalmente em todos os lobos, mas a citodiferenciação funcional pós-natal faz uma ligeira diferença no ritmo de crescimento entre os lobos, além disso, o

número de ductos formados pré-natalmente permanece mais ou menos inalterados até idade adulta, embora o crescimento e diâmetro dos ductos continuem aumentando.

Estas pequenas modificações nas estruturas da rede ductal de cobaia após o desenvolvimento pós-natal, estão diretamente ligadas à dependência deste órgão aos níveis de andrógenos circulantes e atuantes em cada fase do desenvolvimento, e em função desta variação na concentração androgênica em cada fase, pode-se fazer a descrição morfológica detalhada dos três tipos diferentes de ácinos encontrados na próstata de cobaias macho ao longo do desenvolvimento pós-natal.

A morfogênese ductal da glândula prostática de cobaias difere significativamente do tempo de desenvolvimento da próstata de outros roedores, no qual o desenvolvimento da rede de ductos prostáticos ocorre principalmente no período pós-natal (ZHAO *et al.*, 1992, DOUNJACOUR & CUNHA 1988), além disso, o compartimento estromal da próstata da cobaia é bastante organizado, facilitando estudos envolvendo componentes estromais conforme relatado por Horsfall *et al.*, 1994. Já em ratos, por exemplo, apesar da próstata ventral possuir um estroma volumoso, as fibras musculares são esparsas e de superfície irregular segundo os trabalhos de Carvalho *et al.* 1997a e b.

Além disso, as análises morfológicas e ultra-estruturais demonstraram que o bloqueio androgênico provocou uma diminuição na concentração e espessura das fibras colágenas e um pequeno aumento das fibras pré-elásticas entre as fibras musculares principalmente na base epitelial, sugerindo que estas modificações estejam relacionadas com a contração do tecido e a manutenção da estrutura de outros componentes da matriz extracelular durante o processo de bloqueio hormonal pela flutamida.

Cordeiro & Taboga, 2002, realizando uma análise morfométrico-estereológica da frequência relativa dos componentes teciduais prostáticos após a administração de 10 mg/Kg/animal de flutamida em cobaias macho, demonstrou que a proporção de estroma é maior durante a puberdade, onde com o avançar da idade, nota-se um aparente aumento do diâmetro dos ácinos e túbulos da próstata nesta espécie. Em animais controles observou-se que o aumento no diâmetro luminal dos ácinos promove um estreitamento do conjuntivo e também dos feixes de musculatura lisa que os circundam.

Dessa forma, nas idades onde a concentração de andrógenos é pequena (fase puberal) e onde sua concentração é fundamental para manter a integridade funcional e secretora prostática em níveis normais (fase adulta), a flutamida atuou eficientemente por competição inibitória com os níveis hormonais androgênicos, promovendo alterações marcantes nas células epiteliais acinares e nos elementos estromais. Um processo oposto pode ser observado na próstata dos animais pós-púberes onde a concentração de andrógenos é maior, e, portanto houve um menor bloqueio hormonal nos tecidos pela flutamida.

A ação diferenciada da flutamida nas várias fases do desenvolvimento pós-natal parece estar diretamente ligada à influência hormonal ora absoluta (na fase adulta e pós-puberal) ora relativa ou quase inexistente (na fase puberal), (DOUNJACOUR & CUNHA 1988).

Os receptores de andrógenos estão distribuídos de forma heterogênea no cérebro e outros tecidos de cobaias. Estes receptores são encontrados em concentrações diferentes ocupando o núcleo e/ou o citoplasma das células dos tecidos dependentes de andrógenos (GALBRAITH & DUCHESNE, 1997), fazendo com que haja respostas diferentes destas células à ação androgênica.

Assim, em função da competição da flutamida com a testosterona pelos receptores androgênicos prostáticos e da distribuição heterogênea dos receptores androgênicos no epitélio e estroma de cobaias, as células secretoras responderam diferentemente ao tratamento, apresentando características ultra-estruturais normais intercalando com células que sofreram o bloqueio hormonal pela flutamida.

Tais células apresentaram alargamento das membranas do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi, influenciando diretamente no processo secretório prostático o que levou a uma diminuição das microvilosidades no ápice celular. Este mecanismo secretório na próstata lateral e de algumas células da próstata dorsal de cobaias é obviamente merócrino, onde os grânulos secretórios se fundem com a superfície da membrana plasmática liberando seu conteúdo (WONG & TSE, 1981).

A presença de um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido nas células acinares secretoras na próstata de cobaias do grupo controle, é provavelmente a

razão para sua propriedade altamente basófila e uma indicação de que estas células têm um alto poder de síntese protéica (WONG & TSE, 1981).

As alterações estruturais e ultra-estruturais na arquitetura prostática de cobaias após o bloqueio androgênico pela flutamida, podem ser explicadas com base em três mecanismos de ação das drogas anti-androgênicas não esteroidais nos tecidos dependentes de andrógenos, propostos por Burton & Trachtenberg, 1986: (1) Diminuição da ligação da DHT com seus receptores por inibição competitiva; (2) Diminuição da concentração dos receptores androgênicos; e (3) Diminuição da atividade da enzima 5α -redutase na conversão da testosterona para DHT.

Estudos *in vivo* têm indicado que a flutamida atua principalmente em nível citoplasmático por inibição competitiva na ligação da DHT com seu receptor, bem como, por uma possível inibição na translocação do complexo receptor-DHT para o interior do núcleo e por interferência na ligação receptor-DHT-aceptor, gerando alterações nos padrões ultra-estruturais prostáticos, principalmente nas endomembranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, que estão diretamente relacionadas com os processos de síntese protéica e secreção celular, respectivamente.

Eventos ultra-estruturais sobre a próstata ventral de ratos castrados associados com a administração de flutamida e de testosterona tem sido estudados (SUFRIN & COFFEY, 1975). As próstatas dos animais castrados e tratados com testosterona apresentavam células colunares altas com extensas microvilosidades e um retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, indicando a capacidade da testosterona exógena em restaurar a próstata de animais castrados. Contudo, nos animais castrados que receberam o anti-androgênico flutamida e testosterona, as células epiteliais da próstata ventral apresentavam-se cuboidais com diminuição de citoplasma e microvilosidades. Estes resultados sugerem que, em nível ultra-estrutural, a flutamida bloqueia a ação da testosterona exógena sobre a próstata dos animais castrados.

Sardaions *et al.*, 1989, sugerem que, dependendo da concentração sérica de andrógenos, eles podem atuar diretamente sobre a hipótlamo, modulando a ação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e com isso regulando a síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. Além disso, demonstraram que a aplicação de

5 mg e 10 mg de flutamida em ratos durante 7 dias (duas vezes ao dia), provocou um aumento considerável dos níveis de LH no soro e conseqüentemente um aumento de testosterona, uma vez que este anti-androgênico não inibe a secreção de gonadotrofinas como ocorre com os anti-androgênicos esteroidais (acetato de ciproterona).

Sendo assim, altos níveis de testosterona podem resultar em uma maior competição com a flutamida pelos receptores de andrógenos ao nível da hipófise, e assim ocorrer um possível bloqueio da ação da flutamida. Este efeito pode ser explicado pela diferença de afinidade da testosterona e da flutamida pelos receptores androgênicos.

Portanto, a administração de 10mg/Kg de flutamida durante 10 dias no presente estudo, poderia resultar no aumento de LH e conseqüentemente dos níveis de testosterona, e assim interferir com a ação anti-androgênica da flutamida ao nível de receptores androgênicos prostáticos, podendo levar às alterações ultra-estruturais observadas.

Em acréscimo aos resultados morfométrico-estereológicos do efeito da flutamida nos compartimentos teciduais prostáticos descritos por Cordeiro & Taboga, (2002), juntamente com as análises morfológicas e ultra-estruturais descritas aqui, concluiu-se que este anti-androgênico possui uma ação eficaz na inibição do crescimento normal, na diferenciação e na manutenção da integridade funcional-secretora e estrutural da próstata, por competição com os receptores androgênicos nas células glandulares, alterando a integridade morfológica e funcional, bem como comprometendo as interações recíprocas entre o estroma e o epitélio desta glândula nas várias fases do desenvolvimento pós-natal de cobaias machos. Tais alterações no compartimento estromal foram encontradas na próstata humana em idade avançada por Horsfall *et al.*, 1994.

Dessa forma, este animal parece ser um ótimo modelo experimental para estudos das várias formas de hiperplasias benignas prostáticas em humanos. Em particular, a próstata de cobaias parecer ser um sistema extremamente útil para as investigações das contribuições das células musculares lisas para o crescimento normal da próstata e das alterações relacionadas com a idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUMÜLLER G, SEITZ J, 1990 Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
- BALK SP, 2002. Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology*, **60(3)**: 132-138.
- BEHMER AO, TOLOSA EMC, FREITAS-NETO AG, 1976. *Manual para histologia normal e patológica*. Edart-Edusp, São Paulo, 225p.
- BURTON S, TRACHTENBERG J, 1986. Effectiveness of Antiandrogens in the Rat. *The Journal of Urology* **136**: 932-935.
- CARVALHO HF, LINE SRP, 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, **20**: 809-819.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR, PSL, TABOGA SR, 1997a. Elastic system fibers of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* **32**: 27-34.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997b. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibrils network of the prostatic stroma. *Tissue Cell* **29**: 163-170.
- COLOMBEL MC, BUTTYAN R, 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. In: Schwartz LM, Osborne, BA, eds. *Methods in Cell Biology - Cell Death*. V. 46. Academic Press, New York, p. 369-385.
- CORDEIRO RS, TABOGA SR, 2002. Avaliação Estrutural e Morfométrica de alguns Tecidos Prostáticos de Cobaia sob Efeito da Terapia Anti-androgênica pela Flutamida. *Em Preparo*.
- 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.
- CHOATE JVA, RESKO JA, 1996. Effects of androgen on brain and pituitary androgen receptors and LH secretion of male guinea pigs. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **59**: 315-322.

- CUNHA GR, BIGSBY RM, COOKE PS, SUGIMURA Y, 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ* **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.
- 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.) 2**: 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.
- GORDON AS, SUSAN JA, RICHARD GM, 1984. A pilot study of flutamide. *Med. J. Aust* **140**: 219-221.
- HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA GR, 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 (Suppl.2)**: 18-26.
- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Age-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- KASSIM NM, McDONALD SW, REID O, BENNETT NK, GILMORE DP, PAYNE AP, 1997. The effects of pre and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* **190(4)**: 577-87.
- LUCAS JC, RENFREE MB, SHAW G, BUTLER CM, 1997. The influence of anti-androgen flutamide on early sexual differentiation of the marsupial male. *J Reprod Fertil* **109**: 205-212.
- MARCHETTI B, LABRIE F, 1988. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. *J Steroid Biochem* **29(6)**: 691-698.
- MELLO MLS, VIDAL BC, 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher-Funcamp, Campinas, 71p.

- PRICE D, 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst Monogr* **12**: 1-27.
- RAUCH F, POLZAR B, STEPHAN H, ZANOTTI S, PADDENBERG R, MANNHERZ HG, 1997. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J. Cell Biol.*, **137**: 909-923.
- ROSAI J, 1996. Male reproductive system. In: *Ackerman's Surgical Pathology*. 8ed. ROSAI J, eds. Mosby-Year, St. Louis-USA, Vol. I, p.1221-1256.
- SARDAÑONS ML, LAS HERAS MA, CALANDRA RS, SOLANO AR, PODESTÁ EJ, 1989. Effect of the antiandrogen flutamide on pituitary LH content and release. *Neuroendocrinology* **50**: 211-216.
- SROUGI M, 1992. Câncer de próstata. *A revista da clínica médica, Nov-Dez. pp.* 3-18.
- STTERS WD, 2001. 5 α -Redutase activity in the prostate. *Urology*, **58**: (6A) 17-24.
- SUFURIN G, COFFEY DS, 1975. Flutamide: Mechanism of Action of a new Nonsteroidal Antiandrogen. *Investigate Urology* **13(6)**: 429-434.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.
- 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.
- VENABLE JH, COGGESHALL R, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* **25**: 407-408.
- VILAMAIOR PSL, 1998. Estudo de alguns dos componentes macromoleculares do estroma de próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia. **Tese de Mestrado**, IB, UNICAMP, Campinas, SP. 75p.
- WATSON ML, 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* **4**: 475-478.
- WONG YC, TSE MKW, 1981. Fine structural and functional study of the prostatic complex of the Guinea Pig. *Acta anat.* **109**: 289-312

- ZHAO GQ, HOLTERHUS PM, DAMEMHÄUSER I, HOFFBAUER G, AUMULLER G, 1992. Estrogen-induced morphological and imunohistochemical changes in the stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* **21**: 183-199.
- ZHAO CY, TAM CC, WONG YC, 1993. Morphogenesis and ductal development of the prostatic complex of the guinea pig. *J. of Morphol.* **217**: 219-227.
-

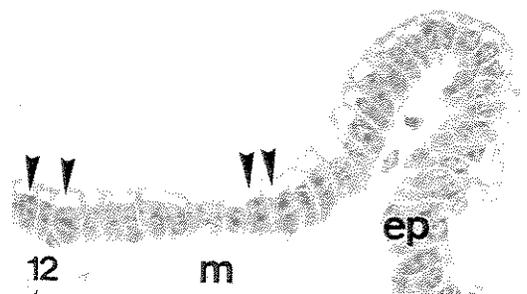
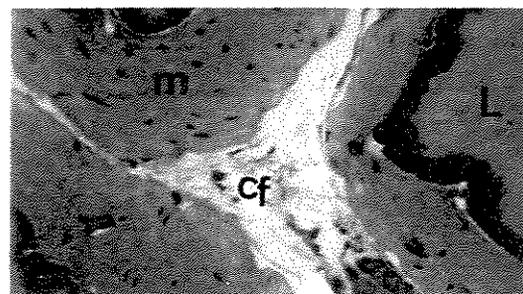
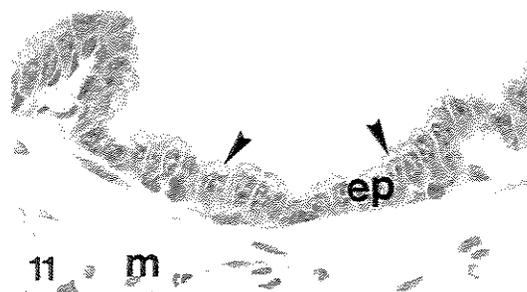
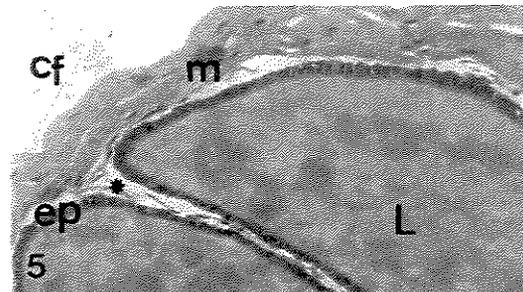
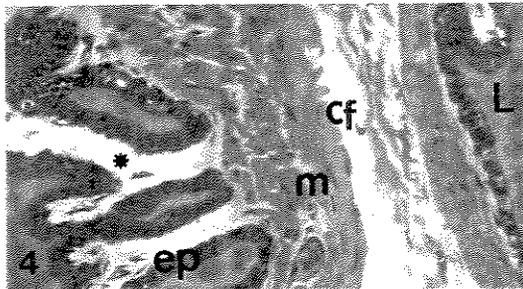
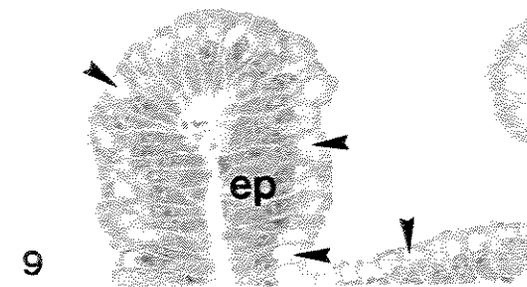
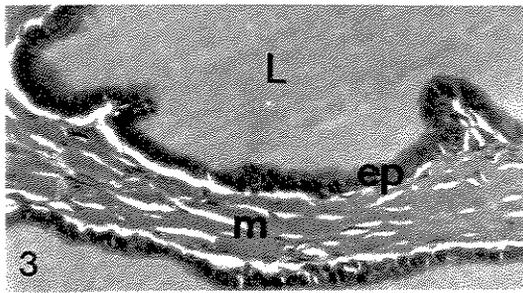
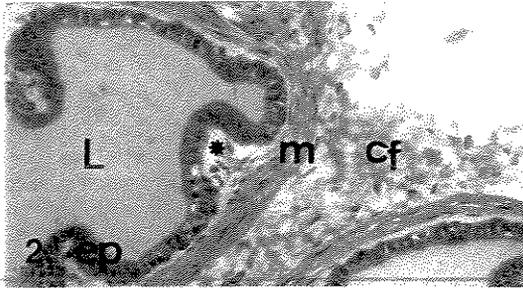
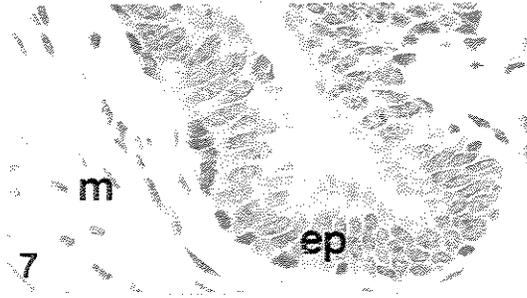
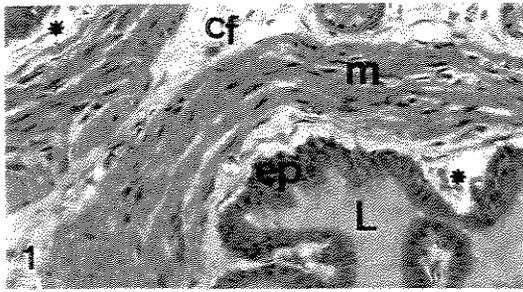
LEGENDA DAS FIGURAS

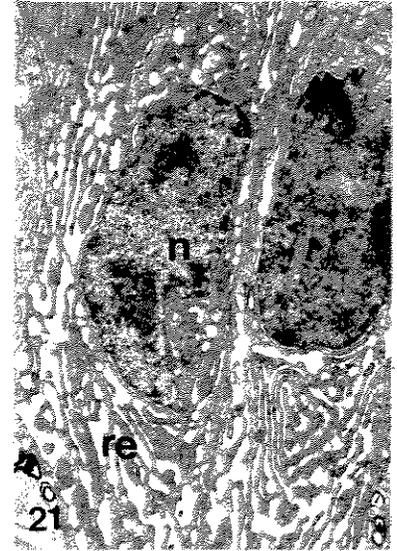
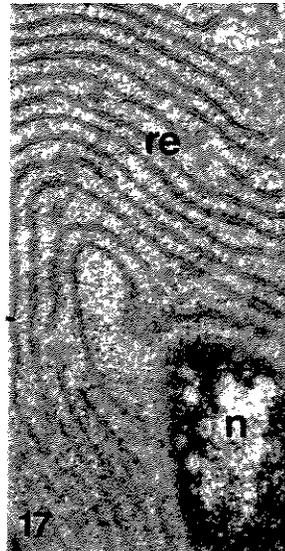
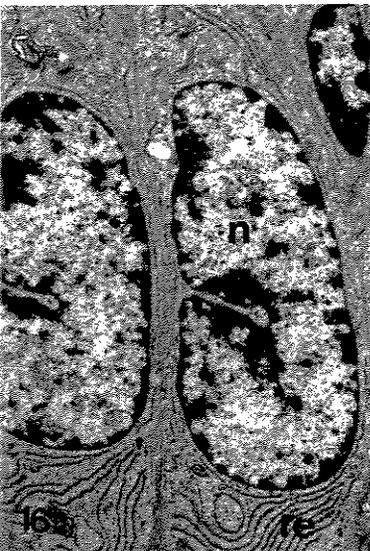
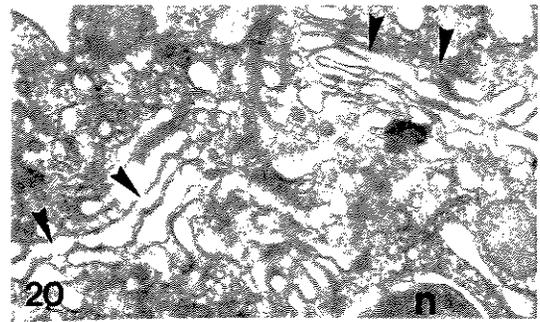
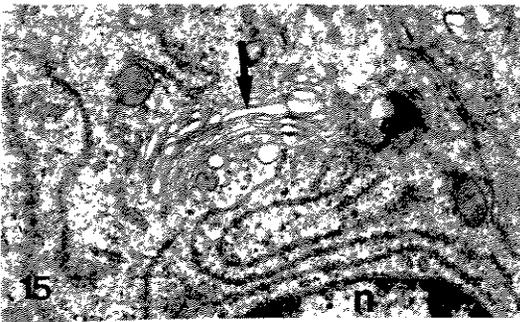
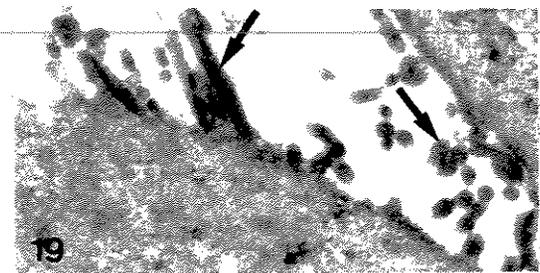
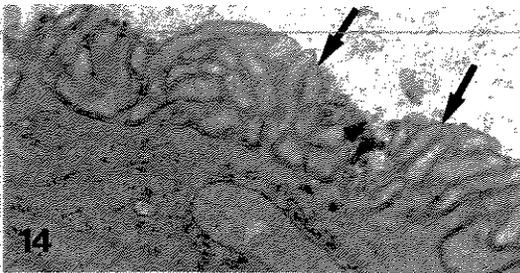
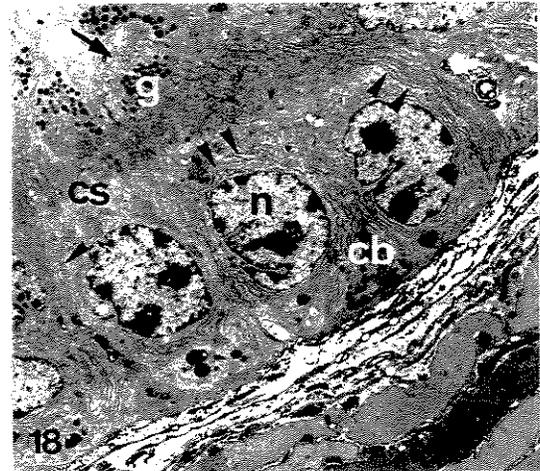
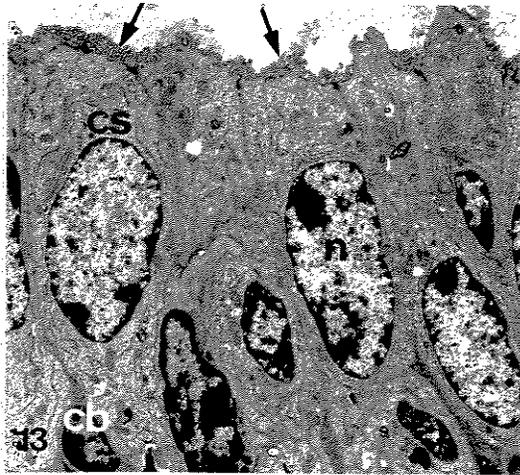
FIGURAS 1 a 12 - Cortes histológicos do lobo lateral prostático de cobaias machos processados para historresina e corados pela Hematoxilina-eosina (Figs.: 1 a 6) e pelo Azul de Toluidina (Figs.: 7 a 12). **Figs.: 1, 3, 5, 7, 9 e 11** – Aspecto da próstata dos animais controle. Visão geral de um ácino prostático dos animais da fase púbere (figs.: 1 e 7) envolvidos por uma camada concêntrica e espessa de fibras musculares lisas (m) e por um estroma não muscular (*) na base do epitélio. Notar o epitélio acinar (ep) com células colunares simples e núcleos basais. Lúmen (L). Figs. 1 = 290X e 7 = 580X. - Fase pós-púbere (figs.: 3 e 9) com ácinos transitórios envolvidos por uma camada de fibras musculares lisas e constituídos por um epitélio colunar com núcleos basais e pequenas dobras. Nota-se a área clara no ápice celular provavelmente ocupada pelo complexo de Golgi (cabeça de seta). Figs. 3 = 290X e 9 = 580X. Os ácinos glandulares nos animais adultos (figs.: 5 e 11) são largos e delineados por uma estreita camada de musculatura lisa e formados por um epitélio simples de células baixas sem nenhuma forma de dobramento com núcleos ocupando quase todo o citoplasma. Entre os ácinos secretórios há um estroma constituído por um tecido conjuntivo fibrovascular frouxo (cf). Figs. 5 = 232x e 9 = 580X. **Figs. 2, 4, 6, 8, 10 e 12** – Próstata dos animais tratados. Nos animais púberes (figs.: 2 e 8) e pós-púberes (figs.: 4 e 10), nota-se uma aparente diminuição na espessura da camada muscular lisa e poucas dobras no epitélio glandular, resultando em um aumento do diâmetro dos ácinos e uma diminuição da altura das células epiteliais apresentando núcleos basais. A provável área do complexo de Golgi é reduzida (cabeça de seta). Figs. 2 e 4 = 290X, 8 e 10 = 580X. Nos animais adultos (figs.: 6 e 12) os ácinos glandulares apresentam-se com um epitélio colunar simples formando algumas dobras, com uma aparente diminuição do diâmetro acinar e um aumento da altura das células epiteliais e da espessura da musculatura lisa. Figs. 6 = 232X e 12 = 580X.

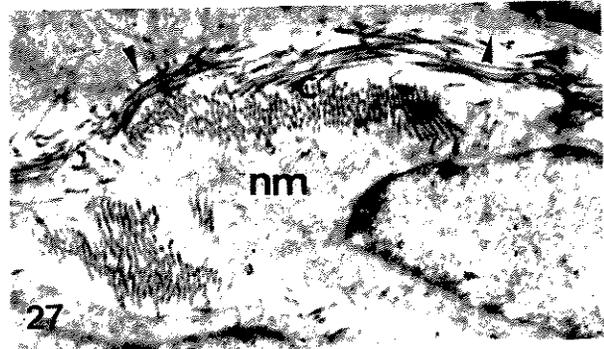
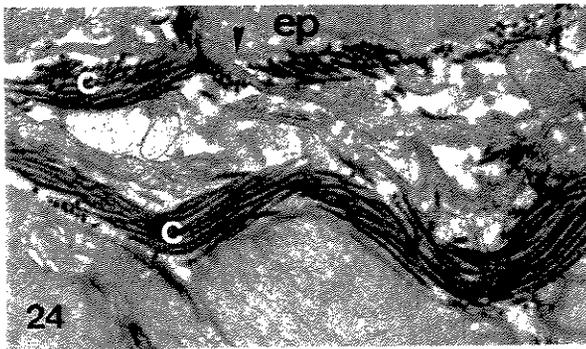
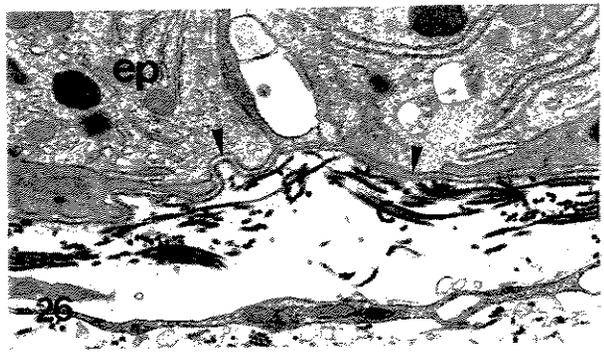
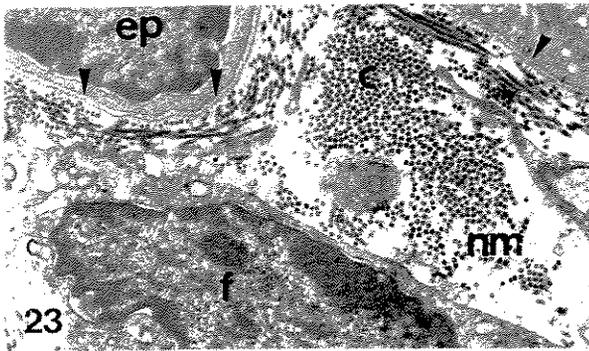
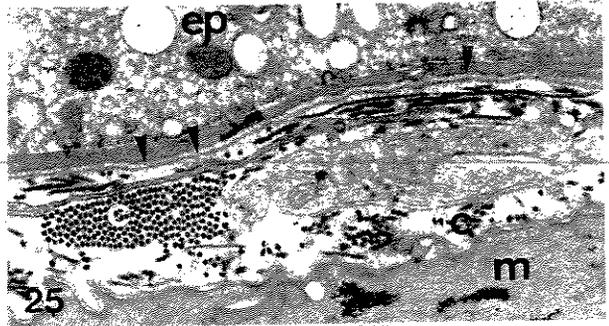
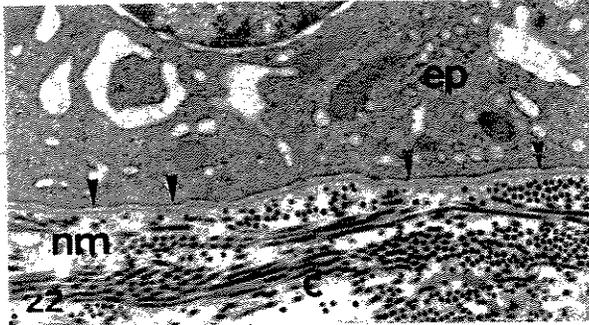
FIGURA 13 a 21 - Cortes ultra-finos do lobo lateral prostático de cobaias machos controle (Figs.: 13 a 17) e tratado (Figs.: 18 a 21). **Figs.: 13** - Visão geral do epitélio, mostrando as células secretoras acinares (cs) com numerosas microvilosidades (seta) 4676X. **Fig.: 18** - Epitélio secretor com endomembranas dilatadas (cabeça de seta) 3018 X. Célula basal (cb). Núcleo da célula epitelial (n). Grânulos secretórios (g). **Figs.: 14 e 19** - Detalhe da superfície celular epitelial, mostrando o arranjo abundante das microvilosidades (setas) nos animais controle e a sua escassez nos animais tratados. Figs.: 14 = 24025X e 19 = 34800X. **Figs.: 15** – Complexo de Golgi (seta) na célula epitelial dos animais controle 22301X. **Fig.: 20** - Notar a dilatação das cisternas do complexo de Golgi acima do núcleo (n), após o tratamento 32325X. **Figs.: 16, 17 e 21** – Citoplasma das células epiteliais mostrando as membranas do retículo endoplasmático rugoso (re) nos animais controle (Figs.: 16 e 17) e sua dilatação após o tratamento (Fig.: 21). Figs.: 16 = 11400X, 17 = 21710X e 21 = 8352X

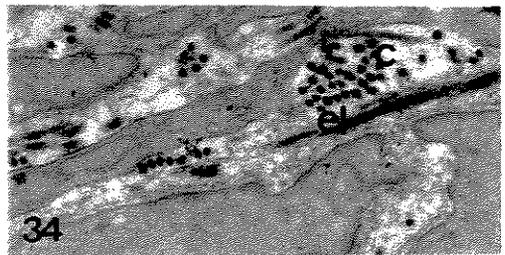
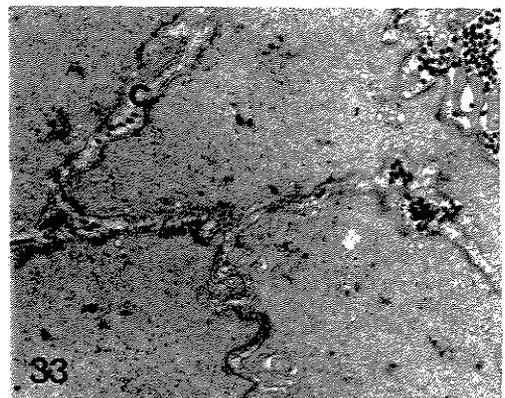
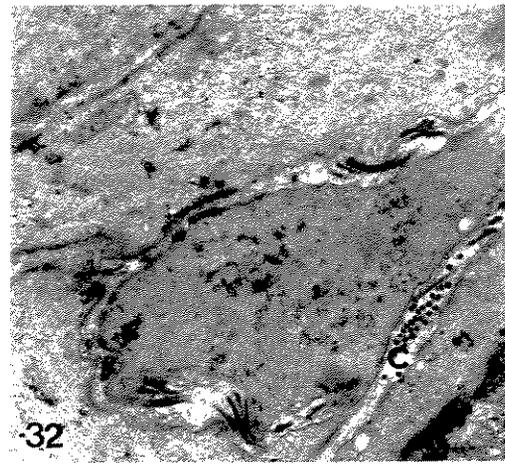
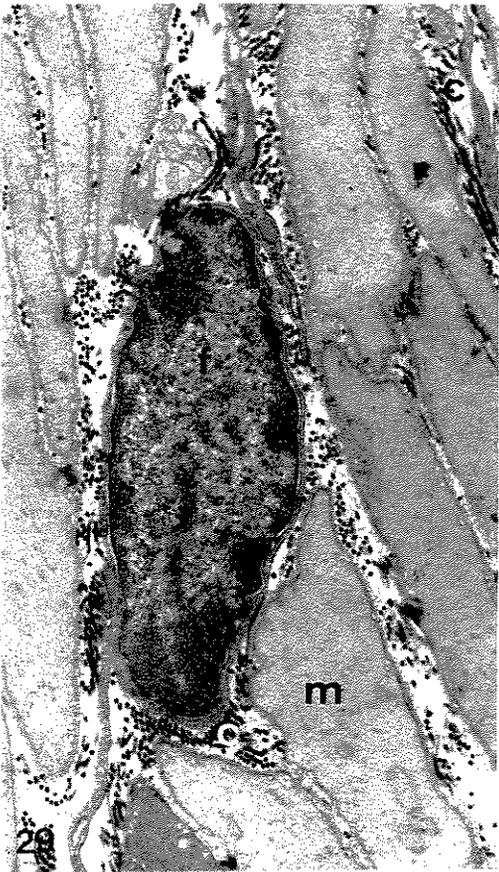
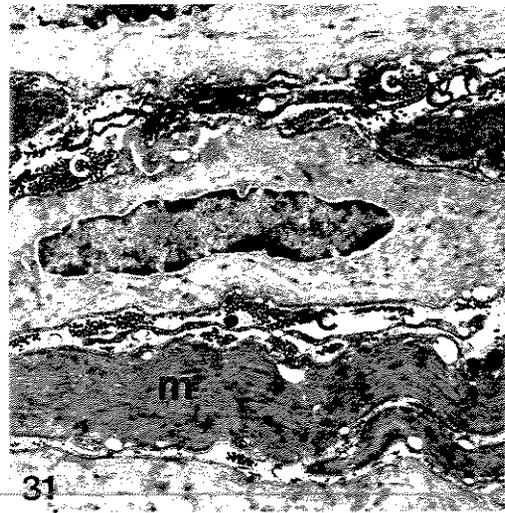
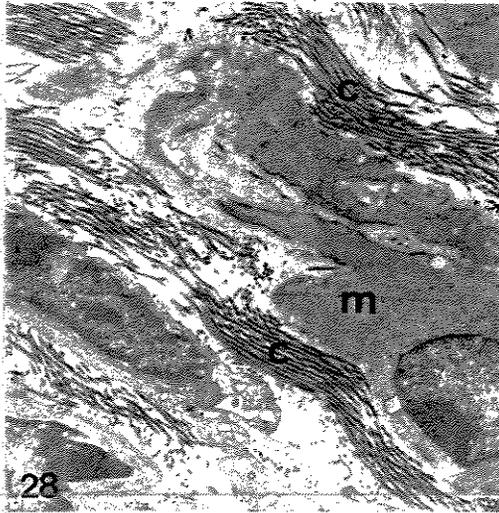
FIGURA 22 a 27 - Cortes ultra-finos do lobo lateral prostático de cobaias machos controle (Figs.: 22,23 e 24) mostrando o estromal não muscular (nm) com grande quantidade de fibras de colágeno (c) ao longo de toda base do epitélio e nos animais tratados (Figs.: 25, 26 e 27) observa-se uma diminuição considerável de fibras de colágeno no estroma não muscular. Epitélio glandular (ep); Membrana basal (cabeças de seta). Fibra muscular lisa (m). Fibroblasto (f). Figs.: 22 = 17400X, 23 = 38000X, 24 = 17000X, 25 = 13800X, 26 = 17654X, 27 = 13308X.

FIGURA 28 a 34 - Cortes ultra-finos do lobo lateral prostático de cobaias machos controle (Figs.: 28, 29 e 30) e tratado (Figs.: 31, 32, 33 e 34) mostrando no estromal interacinar a associação das fibras musculares lisas, colágenas e elásticas. **Figs.: 28, 29 e 30** – Próstata dos animais controle com grandes quantidades de fibras de colágeno (c) entremeadas às fibras musculares lisas (m) e a espessas fibras elásticas (el). Figs.: 28 = 7800X, 29 = 12000X e 30 = 20926X. **Figs.: 31, 32, 33 e 34** - Estroma interacinar prostático dos animais tratados com uma drástica diminuição das fibras de colágeno e das fibras elásticas que se tornam finas (el). Fibroblasto (f). Figs.: 31 = 7913X, 32 = 18000X, 33 = 15000X e 34 = 25050X.









CONCLUSÕES GERAIS

1. A flutamida promoveu alterações significativas e diferenciais nos componentes teciduais do lobo lateral prostático, desestabilizando a interação epitélio-estroma na dependência da fase do desenvolvimento pós-natal.

2. A flutamida promoveu alterações estatisticamente significativas na proporção dos componentes teciduais prostáticos na fase púbere, nos quais os valores morfométrico-estereológicos foram, enquanto que, nas fases pós-púbere e adulta, embora haja fortes indícios morfológicos, os dados não foram estatisticamente significativos.

3. O padrão de distribuição e a concentração dos componentes fibrilares (fibras colágenas, reticulares e elásticas) e dos componentes celulares tanto no estroma muscular quanto no estroma não muscular foram alterados após o tratamento nas três idades estudadas.

4. As alterações ultra-estruturais prostáticas observadas nas três idades sobre o efeito do anti-androgênico flutamida, foram principalmente relacionadas à morfologia das endomembranas, que se tornaram dilatadas na próstata dos animais tratados, e as microvilosidades das células epiteliais que diminuíram consideravelmente frente ao tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ELMAGD A, WROBEL K, 1989. The periurethral glandular complex in the water buffalo: an ultrastructural, histological and lectin-histochemical study. *Arch Histol Cytol* **52**: 501-512.
- AUMÜLLER G, SEITZ J, 1990 Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
- BALK SP, 2002. Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology*, **60(3)**: 132-138.
- BRANDES D, 1966. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol* **20**: 207-276.
- BURTON S, TRACHTENBERG J, 1986. Effectiveness of Antiandrogens in the Rat. *The Journal of Urology* **136**: 932-935.
- CARVALHO HF, LINE SRP, 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.*, **20**: 809-819
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997a. Elastic system fibers of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* **32**:27-34.
- CARVALHO HF, VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997b. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix micro fibrils network of the prostatic stroma. *Tissue Cell* **29**: 163-170.
- COLOMBEL MC, BUTTYAN R, 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. In: Schwartz LM, Osborne, BA, eds. *Methods in Cell Biology - Cell Death*. V. 46. Academic Press, New York, p. 369-385.
- COOKE PS, YOUNG P, CUNHA GR, 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* **128**: 2867-2873.
- CORMACK DH, 1991. *Ham Histologia*. 9ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 570p.
- CUNHA GR, 1976. Epithelial-stromal interactions in development of the urogenital tract. *Int Rev Cytol* **47**: 137-194.

- CUNHA GR, BIGSBY RM, COOKE PS, SUGIMURA Y, 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ* **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.
- DAHL E, KJAERHEIM A, TVETER KJ, 1973. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat. I - Normal structure. *Z Zellforsch* **137**: 345-359.
- 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.) 2**: 42-52.
- FRANKS LM, 1967. Normal and pathological anatomy and histology of the genital tract of rats and mice. In: Cotchin E, Roe F, eds. *Pathology of laboratory rats and mice*. Blackwell, Oxford, p 469-499 *Apud* PRINS, G.S., BIRCH L, GREENE GL, 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129**: 3187-3199.
- GALBRAITH SM, DUCHESNE GM, 1997. Androgens and prostate cancer: Biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer* **33**: No. 4, 545-554.
- GORDON A.S., SUSAN J.A., RICHARD G.M., 1984. A pilot study of flutamide. *Med. J. Aust* **140**: 219-221.
- GROSS SA, DIDIO LJA, 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* **19**:77-84.
- GUYTON AC, 1984. *Tratado de Fisiologia Médica*. 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 926pp.
- HAYWARD SW, BASKIN LS, HAUGHNEY PC, CUNHA AR, FOSTER BA, DAHIYA R, PRINS GS, CUNHA GR 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta anat*, **155**: 81-93.
- HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA GR, 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 (Suppl.2)**: 18-26.

- HORSFALL DJ, MAYNE K, RICCIARDELLI C, RAO M, SKINNER JM, HENDERSON DW, MARSHALL VR, TILLEY WD, 1994. Fase-related in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* **70**: 753- 763.
- ICHIHARA I, KALLIO M, PELLINIEMI LJ, 1978. Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tiss Res* **192**: 381-390.
- JACOB S, PODDAR S, 1986. Morphology and histochemistry of the ferret prostate. *Acta anat* **125**: 268-273.
- JESIK C J, HOLLAND J M, LEE C, 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* **3**: 81-97.
- KASSIM NM, McDONALD SW, REID O, BENNETT NK, GILMORE DP, PAYNE AP, 1997. The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* **190(4)**: 577-588.
- LABRIE F, DUPONT A, CUSAN L, MANHAÈS G, BERGERON N, LACOURCIÈRE Y, PINEAULT S, BÉLANGER A, MONFETTE G, EMOND J, 1989. Combination therapy with castration and flutamide: Today's treatment of choice for prostate cancer. *J. Steroid Biochem* **33(4B)**: 817-821.
- LUCAS JC, RENFREE MB, SHAW G, BUTLER CM, 1997. The influence of antiandrogen flutamide on early sexual differentiation of the marsupial male. *J Reprod Fertil* **109**: 205-212.
- MARCHETTI B, LABRIE F, 1988. Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in rat. *J Steroid Biochem* **29(6)**: 691-698.
- McLEOD DG, 1993. Antiandrogenic drugs. *Cancer* **73 (2 Suppl)**: 1046-9.
- McLEOD DG, KOLVENBAG GJCM, 1996. Defining the role of antiandrogens in the treatment of prostate cancer. *Urology* **47 (Suppl. 1A)**: 85-89
- MEIKLE AW, 1995. Endocrinology of the prostate and of benign prostate hyperplasia. *In Endocrinology, 3rd edition*. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, P. 2459-2473.

- MOORE RJ, GAZAC JM, QUEBBEMAN JF, WILSON JD, 1979. Concentration of dihydrotestosterone and 3- α -androstenediol in naturally occurring and androgen-induced prostatic hyperplasia in the dog. *Clin. Invest.* **64**: 1003-10.
- NARAYAN P, TRACHTENBERG J, LEPOR H, DEDRUYNE EMJ, TEWARI A, STONE N, DAS SAKTI, CRUZ-JIMENEZ JE, SHEARER R, KLIMBERG I, SCHELLHAMMER PF, COSTELLOAJ, 1996. A dose-response study of the effect of flutamide on benign prostatic hyperplasia: Results of multicenter study. *Urology*, **47(4)**: 497-504.
- NERI, R, 1989. Pharmacology and pharmacokinetic of flutamide. *Urology* **34(4)**: 46-56.
-
- NETTER FH, 1965. *Reproductive system* - The Ciba collection of medical illustration. 5ed. CIBA, New York, 286p.
- NEUMANN F, TOPERT M, 1986. Pharmacology of Antiandrogenics. *J. Steroid Biochem.* **25**: 885-895.
- ORTIZ E, 1953. The effects of castration on the reproductive system of the golden hamster. *Bull Zool Lab.*, Univ. Chicago, 65-95.
- PRICE D, 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer 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.
- RAUCH F, POLZAR B, STEPHAN H, ZANOTTI S, PADDENBERG R, MANNHERZ HG, 1997. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J. Cell Biol.*, **137**: 909-923.
- REID P, KANTOFF P, OH W, 1999. Antiandrogens in prostate cancer. *Invest New Drugs* **17(3)**: 271-84.
- ROSAI J, 1996. Male reproductive system. In: *Ackerman's Surgical Pathology*. 8ed. ROSAI J, eds. Mosby-Year, St. Louis-USA, Vol. I, p.1221-1256.

- SCARANO WR, TABOGA SR, 2002. Efeito do estradiol sobre a próstata da cobaia *Cavia porcellus* em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. **Tese de Mestrado**, IB, UNICAMP, Campinas, SP. 15p.
- SLAYTER MV, ANZANO MA, KADOMATSU K, SMITH JM, SPORIN MB, 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res* **54**: 1440-1445.
- SOGANI PC, VAGAIWALAMR, EHITMORE Jr WF, 1984. Experience with flutamide in patients with advanced prostatic cancer without prior endocrine therapy. *Cancer* **54**: 744-750.
-
- SROUGI M, 1992. Câncer de próstata. *A revista da clínica médica*, Nov-Dez. pp. 3-18.
- SUFRIN G, COFFEY DS, 1975. Flutamide: Mechanism of Action of a new Nonsteroidal Antiandrogen. *Investigate Urology* **13**:(6) 429-434.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.
- 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.
- VILAMAIOR PSL, 1998. Estudo de alguns dos componentes macromoleculares do estroma de próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia. **Tese de Mestrado**, IB, UNICAMP, Campinas, SP. 75p.
- WELLS LJ, CAVANAUGH MW, MAXWELL EL, 1954. Genital abnormalities in castrated rats and their prevention by means of testosterone propionate. *Anat Rec* **118**: 109-133
- WONG YC, TSE MKW, 1981. Fine structural and functional study of the prostatic complex of the Guinea Pig. *Acta anat.* **109**: 289-312
- ZHAO GQ, HOLTERHUS PM, DAMEMHÄUSER I, HOFFBAUER G, AUMULLER G, 1992. Estrogen-induced morphological and imunohistochemical changes in the stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* **21**: 183-199.