

**Patricia Simone Leite Vilamaior**

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

**Estudo de alguns componentes  
macromoleculares do estroma da próstata  
ventral de ratos: efeitos da orquiectomia**

**UNICAMP  
Campinas - SP  
1998**

**V712e**

**34894/BC**

Patricia Simone Leite Vilamaior

# Estudo de alguns componentes macromoleculares do estroma da próstata ventral de ratos: efeitos da orquiectomia

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Patricia Simone Leite Vilamaior e aprovada pela Comissão Julgadora

28/10/98  
H. Faustino de Carvalho

Campinas - SP  
1998



UNIVERSIDADE	BC
CHAMADA:	Unicamp
712 e	
MB: 34894	
CC: 395198	
	X
R\$ 11,00	
01/05/98	
CPD	

CM-00115554-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

2) **Vilamaior, Patricia Simone Leite**  
M712e Estudo de alguns componentes macromoleculares do  
estroma da próstata ventral de ratos:efeitos da orquiectomia/  
Patricia Simone Leite Vilamaior.--Campinas,SP.[s.n.], 1998.  
61f.:ilus.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1.Próstata<sup>PRV</sup> ventral. 2.Matriz extracelular<sup>X</sup>. 3.Rato. I.Carvalho,  
Hernandes Faustino de. II.Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia. III. Título.

Local e data: Campinas, / /1998.

Banca Examinadora:

TITULARES:

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

(orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

  
Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon-Quitete

  
Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

..... À minha pequena grande família:  
Aparecida minha MÃE e Cláudia minha IRMÃ  
DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pelo incentivo, pela confiança, pelo respeito e pelo exemplo de seriedade e competência profissionais.

Aos Profs. Drs. Edson Rosa Pimentel, Sérgio Roberto Peres Line e Valéria Helena Alves Cagnon-Quitete pela prontidão na leitura e análise prévia do trabalho e por suas valiosas sugestões para a versão definitiva.

Ao professor do Departamento de Letras Vernáculas do IBILCE/UNESP Sebastião Carlos Leite Gonçalves ou simplesmente tio Carlinho por apostar em mim, pela convivência e pelas sugestões na correção gramatical dos manuscritos, sendo que os erros que persistiram por certo são meus.

Aos amigos do Laboratório, Sérgio, Dani e Sílvia pelo convívio e por todos os "socorros" prestados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular pela convivência e pela contribuição à minha formação profissional.

À Universidade Paulista (UNIP), na pessoa do Prof. Marcelo Ferreira Lourenço, pelo incentivo e pelas facilidades concedidas para a conclusão deste trabalho e à Prof. Patrícia Cristina de Souza pela compreensão e pela amizade.

Aos amigos do curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pelo incentivo, pela confiança e por seu entusiasmo, o qual me despertou o gosto para o maravilhoso mundo da Biologia.

Ao meu fiel escudeiro Sebaka pelo companheirismo, pelo amor e por sua dedicação.

A todos os meus verdadeiros amigos, Nic e Lu, Sérgio, Sílvia Pimentel, Chopes, Pat Aline, João, Nazário, Júlio, Pat Dourado e Klélia pela amizade.

À minha família pela confiança, pelo carinho e pelo incentivo constantes.

Às "Elzas" Dani, Gabi e Silvy pela acolhida, amizade e muitas risadas.

Aos Centros de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu e do Instituto de Biologia da UNICAMP pelas facilidades para a realização das análises ultra-estruturais.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A Deus pela vida.

Os meus sinceros agradecimentos.

# SUMÁRIO

<b>I – INTRODUÇÃO</b>	
1. Aspectos gerais da morfologia prostática.....	1
2. Desenvolvimento e fisiologia da próstata.....	5
3. Objetivos.....	8
<b>II – MATERIAL E MÉTODOS</b>	
1. Material.....	9
2. Métodos.....	9
2.1. Microscopia de luz.....	9
2.1.1. Coloração pela hematoxilina–eosina.....	10
2.1.2. Coloração pelo azul de toluidina.....	10
2.1.3. Coloração pelo tricrômico de Masson.....	10
2.1.4. Coloração pelo método do picrossírius–hematoxilina.....	11
2.1.5. Coloração pela fucsina–resorcina de Weigert.....	11
2.1.6. Impregnação pela prata para reticulina.....	11
2.1.7. Imunohistoquímica para condroitim sulfato e queratam sulfato....	12
2.1.8. Análise e documentação fotográfica.....	12
2.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	13
2.2.1. Identificação ultra–estrutural do colágeno VI .....	13
<b>III – RESULTADOS</b>	
1. Análise biométrica.....	15
2. Análise histológica e ultra–estrutural .....	15
2.1. O sistema elástico.....	16
2.2. As fibras de colágeno.....	17
3. Identificação imunohistoquímica dos glicosaminoglicanos.....	18
<b>IV – DISCUSSÃO</b>	
1. Considerações gerais.....	33
2. Alterações no estroma e suas interações com o epitélio.....	34
2.1. As células musculares lisas.....	35
2.2. O sistema elástico.....	37
2.3. As fibras colágenas.....	39
2.4. Os proteoglicanos.....	40
3. Considerações finais.....	43
<b>V – CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>VI – RESUMO.....</b>	<b>47</b>
<b>VII – ABSTRACT.....</b>	<b>49</b>
<b>VIII – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

---

# INTRODUÇÃO

## **1. Aspectos gerais da morfologia prostática**

Dentre as estruturas acessórias do aparelho reprodutor masculino, a próstata apresenta-se como a glândula mais volumosa e a de maior expressividade funcional (NETTER, 1965). A próstata secreta um líquido fino de aspecto leitoso que aumenta o volume do sêmen. A secreção prostática apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito; colaborando com a neutralização do meio e contribuindo sobremaneira para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides (GUYTON, 1984).

No homem, a próstata tem o tamanho e a forma aproximados aos de uma castanha e envolve a uretra bem próximo à bexiga. Num adulto normal, pesa pouco mais que 20 gramas. (CORMACK, 1991; ROSAI, 1996).

Histologicamente, a próstata constitui-se de glândulas túbulo-alveolares. O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se numa membrana basal que repousa sobre um estroma conjuntivo, contendo fibras musculares lisas que circundam os alvéolos e ductos, e inúmeros vasos. No estroma podem ser encontradas terminações nervosas de vários tipos, freqüentemente entre as células musculares lisas (ICHIHARA *et al*, 1978) e associadas ao epitélio, (PRICE, 1963). No homem, as unidades glandulares dispõem-se em três camadas de forma concêntrica ao redor da uretra prostática, onde se abrem os ductos individuais. Periféricamente, uma fina cápsula fibroelástica rica em células musculares lisas envolve a próstata, enviando septos que penetram na glândula (CORMACK, 1991; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

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 mediana da próstata humana e o lobo dorsal corresponde à zona posterior.

O epitélio das unidades secretoras e seus ductos são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas - as células epiteliais luminais - e entre as bases destas podem estar distribuídas células menores, achatadas ou arredondadas - as células epiteliais basais (ICHIHARA *et al.*, 1978). A distinção entre células basais e luminais é possível utilizando-se anticorpos monoclonais contra citoqueratinas específicas. As células luminais expressam as citoqueratinas 8, 18 e 19, e as células basais, as citoqueratinas 5, 14 e 19. No rato, as células basais expressam ainda a citoqueratina 7 (PRINS, *et al.*, 1991; HAYWARD *et al.*, 1996b; HAYWARD *et al.*, 1996c).

As unidades secretoras, além de produzirem a secreção prostática, também podem armazená-la devido ao extenso pregueamento do epitélio secretor (CORMACK, 1991).

Na próstata ventral, 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 à microscopia de luz. O envoltório nuclear apresenta pregueações, algumas vezes formando sulcos profundos (BRANDES, 1966; DAHL *et al.*, 1973).

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

O sistema de ductos pode ser dividido em três regiões morfológica e funcionalmente distintas, no que diz respeito às células epiteliais que o revestem (LEE *et al.*, 1990). Em linhas gerais, pode-se dizer que a extremidade distal caracteriza-se por apresentar células colunares altas com núcleo na porção apical (LEE *et al.*, 1994), a região intermediária também é revestida por células colunares altas e diferenciadas que secretam proteínas prostáticas específicas. As células epiteliais da região proximal são cubóides baixas, muitas delas sofrendo morte celular programada para manutenção da população epitelial (NEMETH & LEE, 1996).

Na porção conjuntiva da próstata podem ser observadas células musculares lisas, fibroblastos, macrófagos fixos e células endoteliais dos vasos, cada qual com seu importante e específico papel na viabilidade e função secretora do tecido como um todo (FRANKS, 1967 *apud* PRINS *et al.*, 1991). O termo estroma é usado para designar, no adulto, o tecido conjuntivo frouxo associado ao epitélio, correspondendo ao componente “não epitelial” de um órgão. O estroma no adulto é equivalente ao mesênquima, o qual é definido como tecido conjuntivo frouxo embrionário (CUNHA *et al.*, 1985 e 1996).

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

Os estudos de NEMETH e LEE (1996) demonstraram a existência de diferenças regionais na distribuição da musculatura lisa e do tecido fibroso ao longo do sistema de ductos prostáticos. A musculatura lisa parece ser mais esparsa que o tecido fibroso nos ductos da porção distal, mas torna-se mais abundante nas regiões intermediária e proximal. Esta variação na organização das células estromais ao longo do sistema de ductos, considerando-se a variação regional das células epiteliais que o revestem, sugere uma relação entre os arranjos assumidos pelas células do estroma e o fenótipo exibido pelas células epiteliais (NEMETH e LEE, 1996).

A próstata é a única glândula acessória do aparelho reprodutor masculino encontrada em todos os mamíferos, inclusive nos monotremos (PRICE, 1963),

permitindo além dos estudos de natureza anatomo-patológica, estudos de natureza evolutiva.

Glândulas homólogas à próstata são encontradas em fêmeas adultas em várias ordens de mamíferos (PRICE, 1963). A ocorrência de próstata em fêmeas de *Praomys (Mastomys) natalensis* foi estudada por GROSS e DIDIO (1987), que confirmaram existir uma homologia, do ponto de vista anatômico e histológico, com o lobo ventral da próstata do macho.

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 (ABOU-ELMAGD e 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 e PODAR, 1986) e o roedor *Praomys (Mastomys) natalensis* (GROSS e DIDIO, 1986).

Devido à grande importância da próstata para o funcionamento do trato reprodutor dos mamíferos machos, muitos trabalhos sobre efeitos experimentais vêm sendo desenvolvidos. SIKORSKI e KMIEC (1982) estudaram a próstata ventral em ratos após a remoção das glândulas bulbouretrais e da vesícula seminal, verificando as modificações na estrutura de seus ácinos e no conteúdo do parênquima, além de modificações na enzimologia do epitélio glandular.

Uma análise ultra-estrutural do efeito do alcoolismo crônico sobre a próstata ventral de ratos, foi realizada por MARTINEZ e colaboradores (1993). Neste estudo foram observadas modificações como um marcado decréscimo na altura das células epiteliais glandulares, redução da atividade secretora, modificações na morfologia do retículo endoplasmático rugoso e do núcleo. Em casos de exposição mais prolongada ao etanol, algumas células epiteliais apresentaram picnose nuclear, indicando degeneração celular.

## **2. Desenvolvimento e fisiologia da próstata**

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). 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 e 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 e CUNHA, 1988); 70 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 esteróide, que inibe, porém não suprime completamente, o desenvolvimento da próstata (LUCAS *et al.*, 1997).

Já a administração de doses baixas de estradiol em fetos de camundongos machos resulta em aumento do número de glândulas prostáticas (a exposição

durante a vida fetal tem efeitos permanentes). Em adultos, o mesmo tratamento resulta em um tamanho aumentado da próstata, e em um aumento do número de receptores de andrógenos. Porém, os efeitos sobre a diferenciação prostática, quando são administradas altas doses de estradiol, natural ou não, são opostos aos efeitos causados por doses baixas (von SAAL *et al.*, 1997).

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

O estágio adulto é um período em que os andrógenos mantêm 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).

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

A depleção de andrógenos, experimental (por castração ou pela administração de anti-andrógenos) ou fisiológica, após a próstata ter atingido o seu tamanho final, causa a atrofia do órgão (CORMACK, 1991). Este processo de redução em tamanho e redução ou perda de função é chamado de involução.

Durante o processo de involução da próstata são observadas mudanças dramáticas. 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 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). A castração na idade adulta leva à morte, predominantemente, das células epiteliais luminiais (HAYWARD *et al.*, 1996b).

Outros tipos de alterações ocorridas nas células epiteliais glandulares da próstata têm sido abordados. Mais recentemente, aspectos relativos aos componentes nucleares destas células mediante o efeito da testosterona foram estudados. Dentre as modificações observadas, destacam-se o decréscimo do volume nuclear (66%) e nucleolar, deformação dos núcleos das células epiteliais por grandes invaginações do envoltório nuclear, abundância de cromatina condensada, pequena quantidade de fibrilas pericromatínicas e diminuição da fração do volume nuclear ocupado pelas fibrilas ribonucleoprotéicas não nucleolares (ECHEVERRIA *et al.*, 1991).

HOLTERHUS e colaboradores (1993) estudaram as modificações ocorridas na glândula coaguladora após a privação de andrógenos e após o tratamento com estrógeno. A alteração morfológica mais marcante que observaram foi a redução do lume glandular, acompanhada por um aumento no tecido estromal, principalmente na lâmina própria, sendo que estas modificações ocorreram mais rapidamente nos animais castrados que naqueles tratados com estrógeno.

Enquanto os eventos associados às modificações alcançadas pelas células epiteliais da porção glandular foram intensamente investigados, as modificações morfológicas e bioquímicas que ocorrem no estroma prostático ainda necessitam de maiores investigações, principalmente frente à tentativa de melhor compreensão das relações epitélio-estroma.

### **3. Objetivos**

Tendo em vista a dinâmica da matriz extracelular frente a fenômenos de remodelagem tecidual, o relativo desconhecimento da composição do estroma prostático e os seus possíveis papéis regulatórios, o presente estudo teve como objetivo a análise morfológica, ultra-estrutural e histoquímica de alguns componentes do estroma da próstata ventral de ratos adultos, procurando criar parâmetros que caracterizem as modificações sofridas após a privação de hormônios androgênicos.

---

## MATERIAL E MÉTODOS

## **1. MATERIAL**

Para o estudo do efeito da castração na próstata, foram utilizados 30 ratos (*Rattus rattus norvegicus*) de 90 dias de idade (sendo 5 animais para cada situação experimental), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram submetidos à orquiectomia por meio de incisão escrotal sob anestesia com éter. A próstata ventral foi removida aos 7, 14 e 21 dias após a castração. O mesmo órgão foi também analisado em ratos controles nos dias zero e 21. O peso relativo dos órgãos foi determinado durante a sua involução.

O cálculo do peso relativo (**PR**) é efetuado da seguinte maneira:

$$\text{PR} = \frac{\text{Peso da próstata}}{\text{Peso total do animal}}$$

O maior valor encontrado para **PR** foi tomado como 100% e os demais valores foram expressos em função deste.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Microscopia de luz**

As próstatas ventrais removidas foram fixadas por imersão em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M), lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em Paraplast e seccionadas a 8 µm em micrótomo rotativo manual.

Parte do material foi fixada em paraformaldeído a 4%, levadas ao álcool 70%, incluídas em historresina JB4 e seccionadas a 2µm em micrótomo rotativo

manual.

### **2.1.1. Coloração pela hematoxilina-eosina (HE)**

Depois de desparafinizados e hidratados, os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por cinco minutos, diferenciados em álcool ácido (nove partes de álcool 70% e uma parte de ácido clorídrico 1N) e lavados em água corrente, por 10 minutos. Posteriormente, passaram por um rápido banho em álcool 80% e foram contracorados em solução de eosina-floxina (10:1-V/V) por 2 minutos, desidratados, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (BEHMER *et al.*, 1976).

### **2.1.2. Coloração pelo Azul de Toluidina**

A secções de 2 $\mu$ m da próstata ventral incluída em historresina foram coradas pelo azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4,0, por 15 minutos, lavadas em água, secadas ao ar e montadas em bálsamo do Canadá (Mello e Vidal, 1980).

### **2.1.3. Coloração pelo Tricrômico de Masson**

Depois de desparafinizados e hidratados, os cortes foram corados pelo Tricrômico de Masson (BEHMER *et al.*, 1976), tratados pela hematoxilina de Harris por 6 minutos e diferenciados em álcool ácido (nove partes de álcool 70% e uma parte de ácido clorídrico). Foram, então, levados à solução de fucsina ácida escarlate de Biebrich (10% de solução aquosa de fucsina ácida a 1%, 90% de solução aquosa de escarlate Biebrich a 1% e 1% de ácido acético) por 5 minutos. Depois, foram lavados em água por 10 minutos e tratados em solução de ácido fosfotúngstico a 5% e ácido fosfomolibdico a 5%, 1:1, durante 10 minutos. Em seguida foram corados pelo azul de anilina acética por 10 minutos, lavados em solução de ácido acético, lavados em água destilada, e então, desidratados, clarificados e montados em bálsamo do Canadá.

#### **2.1.4. Coloração pelo método do *Picrossírius-hematoxilina***

Os cortes, depois de desparafinizados e hidratados, foram corados pela solução de picrossírius (sirius red F3B200 a 0,1% em solução saturada de ácido pícrico), por 60 minutos, lavados rapidamente em água destilada, corados pela hematoxilina de Harris por 8 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). Em seguida, foram desidratados em série alcoólica, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

#### **2.1.5. Coloração pela *fucsina-resorcina de Weigert***

Os cortes desparafinizados e hidratados foram levados ao álcool 70% e 90% e foram posteriormente corados pela fucsina resorcina de Weigert, por uma hora. Depois de lavados em álcool 70% e 90%, os cortes foram levados até a água e contracorados em solução aquosa saturada de ácido pícrico, por 2 minutos. Então foram desidratados, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá. Alguns cortes sofreram oxidação prévia pelo ácido peracético ou oxona (GOLDFISCHER *et al.*, 1983).

#### **2.1.6. Impregnação pela prata para *reticulina***

Os cortes, depois de desparafinizados e hidratados, foram oxidados em solução de permanganato de potássio a 1%, por 2 minutos. Depois de lavados em água destilada, os cortes foram tratados pela solução de ácido oxálico a 3%, por 1 minuto, e lavados em água destilada. Foram então tratados pelo alúmen de ferro a 1%, por 2 minutos, lavados em água destilada e submetidos à impregnação pela prata amoniacal, por 2 minutos. Posteriormente, foram cuidadosamente lavados em água destilada, por 2 minutos, tratados por solução de formalina a 10%, por 3 minutos, lavados em água e, então, tratados por solução de cloreto de ouro a 0,2%, por 5 minutos, e lavados em água destilada. Depois de tratados por solução de hipossulfito de sódio a 2%, por 2 minutos, e

lavados em água destilada, os cortes foram desidratados, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá (BEHMER *et al.*, 1976).

### **2.1.7. Imunohistoquímica para Condroitim Sulfato e Queratam Sulfato**

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e levados até solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,3; foram então tratados com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 15 minutos, com a finalidade de bloquear as peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio de sítios de interações inespecíficas com proteínas por tratamento com soro fetal bovino a 10% em PBS, por uma hora, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo monoclonal, CS56 (Sigma) (diluído 1:1000), para detecção de condroitim sulfato e, MST1<sup>(1)</sup> (ALVES *et al.*, 1995), para queratam sulfato, por 15 horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo de coelho anti-poli-Ig de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), numa diluição de 1:500, por duas horas. Depois, a atividade da peroxidase foi revelada através de tratamento dos cortes, previamente lavados com PBS, com diaminobenzidina (DAB) (50 mg de DAB em 100 ml de tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,2, em cuja solução adiciona-se 17 µl de peróxido de hidrogênio a 3% em água). A reação é acompanhada visualmente ao microscópio e interrompida com o uso de água destilada. Os cortes foram contracorados com verde de metila, lavados em água destilada, desidratados, clarificados e montados em bálsamo do Canadá. Em procedimento controle, o anticorpo primário foi omitido.

### **2.1.8. Análise e documentação fotográfica**

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Axioskop Zeiss, em objetivas planacromáticas de 20x, 40x e 100x, usando-se

---

<sup>1</sup> O anticorpo monoclonal MST1 foi produzido por imunização de camundongos com PGs de cartilagem de tubarão martelo e foi gentilmente cedido pela Dra. Yára M. Michelacci (UNIFESP).

filmes Kodacolor 135 mm, ASA 100.

## **2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os fragmentos de tecido foram fixados em ácido tânico a 0,25% e glutaraldeído 3% em tampão Millonig, pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão Millonig, pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavados brevemente em solução tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em Epon-812, segundo COTTA-PEREIRA e colaboradores (1976).

Os cortes ultra-finos, de aproximadamente 30 a 50 nm de espessura, foram obtidos em ultra-micrótomo automático LKB, com navalha de diamante. Estes cortes foram colhidos em telas de cobre de 200 "mesh", contrastados em solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1% por 5 minutos (BLOOM e AGHAJANIAN, 1968) e posteriormente contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 30 minutos (WATSON, 1958). Depois de rápida lavagem em água bidestilada e secagem, os cortes foram colocados na superfície de uma gota de citrato de chumbo a 2%, em solução 1N de hidróxido de sódio (VENABLE e COGGESHALL, 1965, modificado), por 2 minutos, à temperatura ambiente. Depois de rápida e cuidadosa lavagem em água bidestilada, as telas foram secadas ao ar. As observações e obtenção dos negativos micrográficos foram feitas em microscópios eletrônicos de transmissão Phillips 301 ou CM 100 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu (SP). O filme utilizado para a documentação foi Kodak , ASA 100, 135 mm.

### **2.2.1. Identificação ultra-estrutural do colágeno VI**

Os fragmentos de 1mm<sup>3</sup> da próstata foram incubados em 20 mMoles/L de adenosina trifosfato (ATP) (Riedel) em PBS durante 2 horas a 37°C . Os

fragmentos utilizados como controle foram incubados em PBS nas mesmas condições (BRUNS *et al.*, 1986).

Após a incubação, o material foi lavado com PBS e processado para microscopia de transmissão como já descrito na seção anterior.

---

# RESULTADOS

## **1. Análise biométrica**

Após a remoção dos andrógenos, foi possível observar macroscopicamente uma redução no tamanho das glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino, inclusive na próstata ventral. Para a verificação desta redução e do peso do órgão durante os 21 dias após a orquiectomia, foram realizadas medidas de peso relativo. Estas medidas constam no gráfico apresentado na figura 1.

Sete dias após a castração, o peso relativo foi reduzido à cerca de 55% e, após 21 dias, para até 11%, comparando-se com os controles de 21 dias.

## **2. Análise histológica e ultra-estrutural**

A morfologia da próstata ventral dos animais do grupo controle não sofreu modificações ao longo do experimento, isto é, não foram observadas diferenças entre a próstata do dia zero e dia 21, sendo por isso, a partir de então, chamadas simplesmente de grupo controle, sem que se faça distinção entre os dois grupos.

Na próstata do grupo controle, o lume glandular apresenta-se amplo e cheio de secreção; as células que revestem o epitélio são colunares altas; e, o estroma apresenta uma baixa densidade de células e demais componentes da matriz extracelular (Figuras 2a, b e 3a, b).

Nos animais castrados, é possível observar, ao longo dos 21 dias de privação de andrógenos, uma redução progressiva do lume glandular, bem como da altura das células epiteliais. Esta redução na altura das células epiteliais é bastante nítida, especialmente se observarmos a diminuição da área ocupada pelo complexo de Golgi, uma área pouco corada que se situa na região entre o núcleo e a borda luminal da célula (Figura 3). O estroma da glândula destes animais apresenta um aumento da densidade de células e elementos fibrilares (Figuras 2c-e e 3c-h). Estes resultados correspondem às descrições da literatura e demonstram que os mesmos aspectos observados por outros autores (ORTIZ, 1953; BRANDES, 1966, YAMASHITA *et al.*, 1996) foram reproduzidos neste

estudo.

A camada de musculatura lisa situada sob o epitélio sofre um espessamento e um aparente aumento no número de camadas (Figura 4).

### ***2.1. O sistema elástico***

Em animais do grupo controle, o sistema elástico da próstata ventral está representado por fibras finas, arranjadas em uma trama delicada e que se distribuem pela cápsula, estroma e base do epitélio glandular. Fibras elásticas maduras não foram encontradas na próstata controle (Figura 5 a, b).

Com a castração, o aspecto dos componentes do sistema elástico é modificado, ocorrendo um aumento no número de camadas e na espessura das fibras (Figura 5c-i). Estas fibras podem também ser observadas ao redor dos vasos sangüíneos.

Em nível ultra-estrutural, o que se pode observar é que as microfibrilas estão distribuídas numa ampla rede, conectando fibras de colágeno em todo o estroma e ao redor de vasos, e em íntima associação com membrana basal. As fibras elásticas da próstata controle apresentaram-se muito finas e curtas, situadas na base das células epiteliais e em íntima associação com as células musculares lisas (Figura 10).

Após a castração, observou-se uma alta freqüência de fibras elásticas finas, porém mais longas. Camadas espessas de elastina puderam ser observadas na base do epitélio dos lóbulos em involução, mas a maioria delas foi encontrada também em íntima associação com as células musculares lisas (Figura 11a).

Elementos fibrilares com deposição moderada de elastina, as chamadas fibras elaunínicas, também foram detectados com freqüência além da associação destes com as células musculares lisas (Figura 12).

## **2.2. As fibras de colágeno**

O estroma da próstata de animais em condições hormonais normais é pobre em fibras colágenas; entretanto, aquelas que estão presentes são finas e curtas (Figuras 4a, b; 6a, b; 7a, b). Após a privação de hormônios, há um aumento progressivo destas fibras no estroma glandular (Figura 4c, d, e; 6c-h, 7). As fibras colágenas podem ser claramente vistas entremeadas com as células musculares lisas (Figura 4).

Este aumento é verificado também quando se observa as fibras de colágeno sob a luz polarizada, onde o aumento da intensidade da birrefringência e uma mudança das cores de interferência de verde para vermelho são bastante evidentes (Figura 6).

A análise dos cortes submetidos à impregnação pela prata também revelou as modificações que ocorrem com as fibras de colágeno do tipo I; após a castração, elas passam a ocupar uma área maior do estroma. Estas modificações foram também acompanhadas por modificações nas fibras de reticulina.

Na próstata controle, as fibras de colágeno do tipo III (ou fibras reticulares) dispõem-se em uma ou duas camadas de fibras finas e distendidas abaixo do epitélio. Estas fibras tornam-se espessadas e bastante onduladas e arranjam-se em maior número de camadas, quando a glândula é privada da ação dos hormônios (Figura 7). Alguns destes aspectos foram também observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Figura 11b).

A identificação ultra-estrutural das microfibrilas do estroma, como sendo microfibrilas de colágeno do tipo VI, foi efetuada usando-se o tratamento com ATP, o qual produz sua agregação e torna mais visível a periodicidade axial exibida por estas microfibrilas.

Os agregados de colágeno do tipo VI ocupam áreas relativamente amplas do estroma (Figura 13c). Porém, são encontrados com grande freqüência em íntima associação com as fibrilas de colágeno do tipo I (Figuras 13 d, 14a).

Na figura 14b, de maneira semelhante ao que foi apresentado na figura 13, as microfibrilas apresentam-se dispersas pelo estroma e associadas às fibrilas de

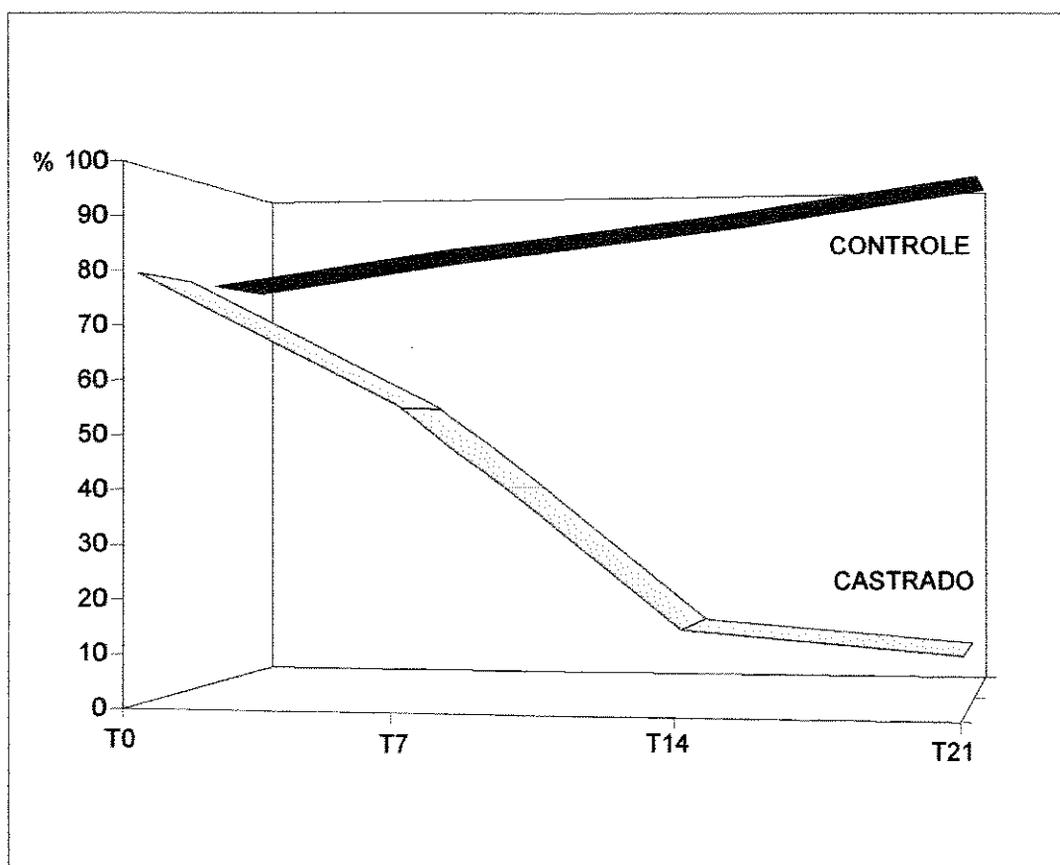
colágeno, porém sem que haja a formação dos agregados típicos do colágeno VI.

Estas microfibrilas, agregadas pelo tratamento com ATP, e aquelas que se associam à elastina são comumente encontradas próximas uma das outras. A figura 14d exibe uma célula muscular lisa junto da qual pode-se observar microfibrilas associadas a depósitos de elastina. Estas microfibrilas estendem-se até áreas ocupadas por colágeno do tipo VI.

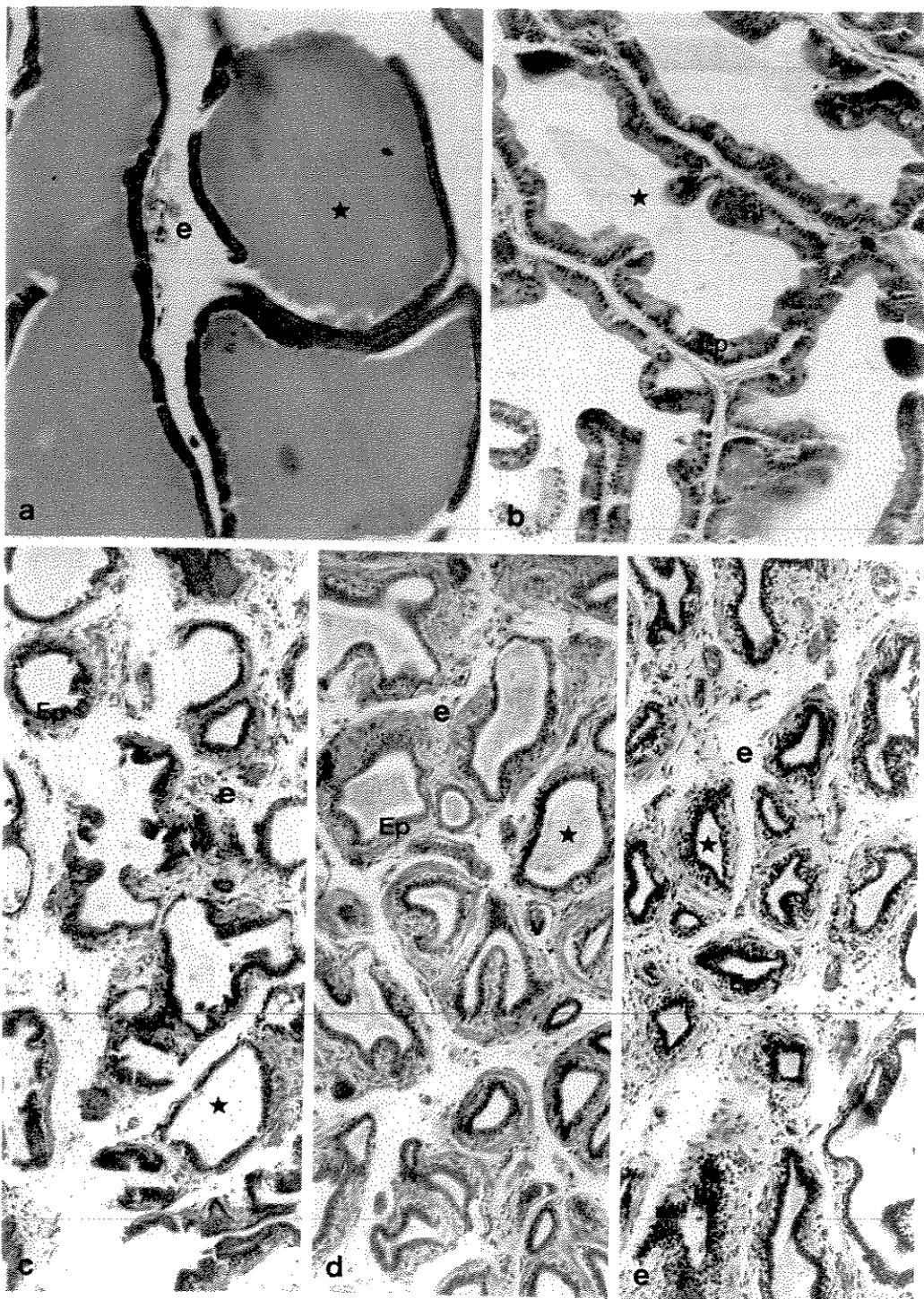
### ***3. Identificação imunohistoquímica dos glicosaminoglicanos***

O condroitim sulfato (CS) apresenta-se amplamente distribuído pelo estroma glandular, mostrando associação com os elementos fibrilares do estroma e com a base do epitélio. Pela comparação do grupo controle com o castrado, não foi possível observar modificações significativas na distribuição deste glicosaminoglicano. Entretanto, a análise dos preparados do grupo controle revelou a presença do CS na secreção e na membrana apical das células epiteliais (Figura 8), de onde desaparece com a castração.

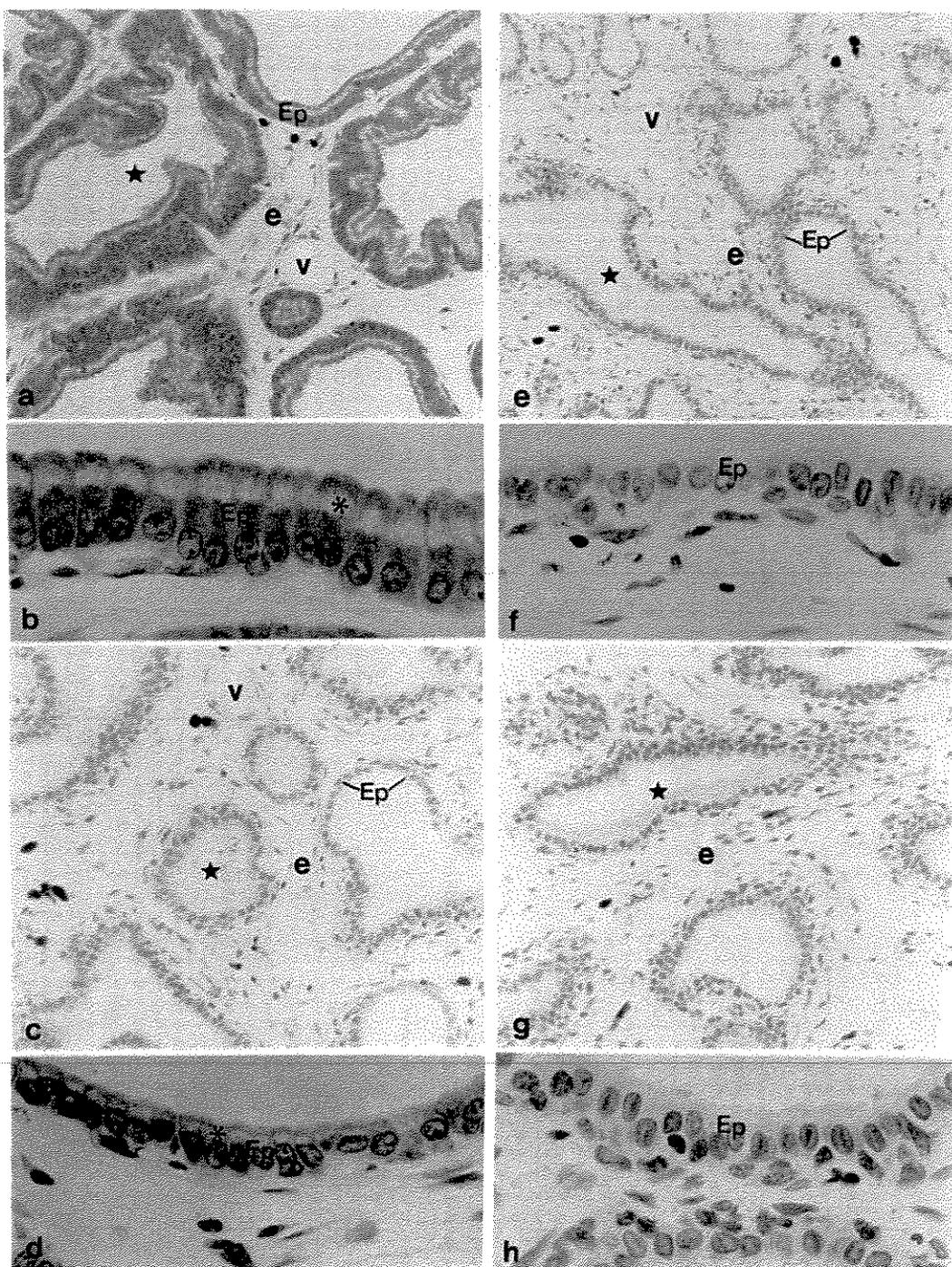
A análise da distribuição do queratam sulfato (QS) revelou a modificação da expressão deste componente na próstata ventral seguindo a privação de hormônios. O QS não foi detectado no estroma da glândula de animais do grupo controle, enquanto foi evidente nos grupos castrados, mostrando distribuição semelhante àquela do CS.



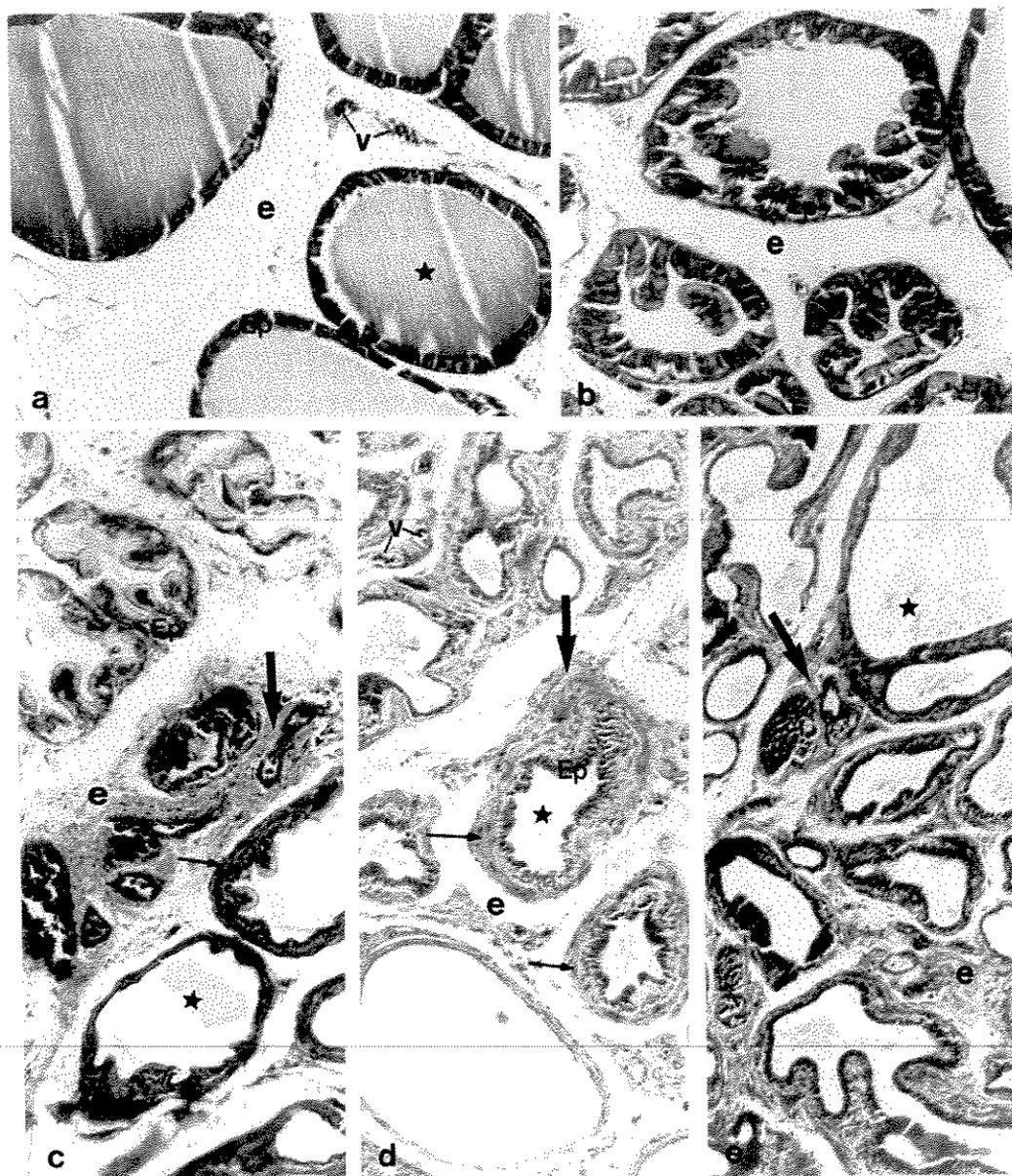
**Figura 1:** Involução prostática após a castração. O peso relativo da próstata ventral foi determinado aos 7, 14 e 21 dias após a orquiectomia. Após 7 dias de privação de andrógenos o peso relativo foi reduzido para 55% e após 21 dias para 11%. Cada ponto corresponde à média obtida para três animais.



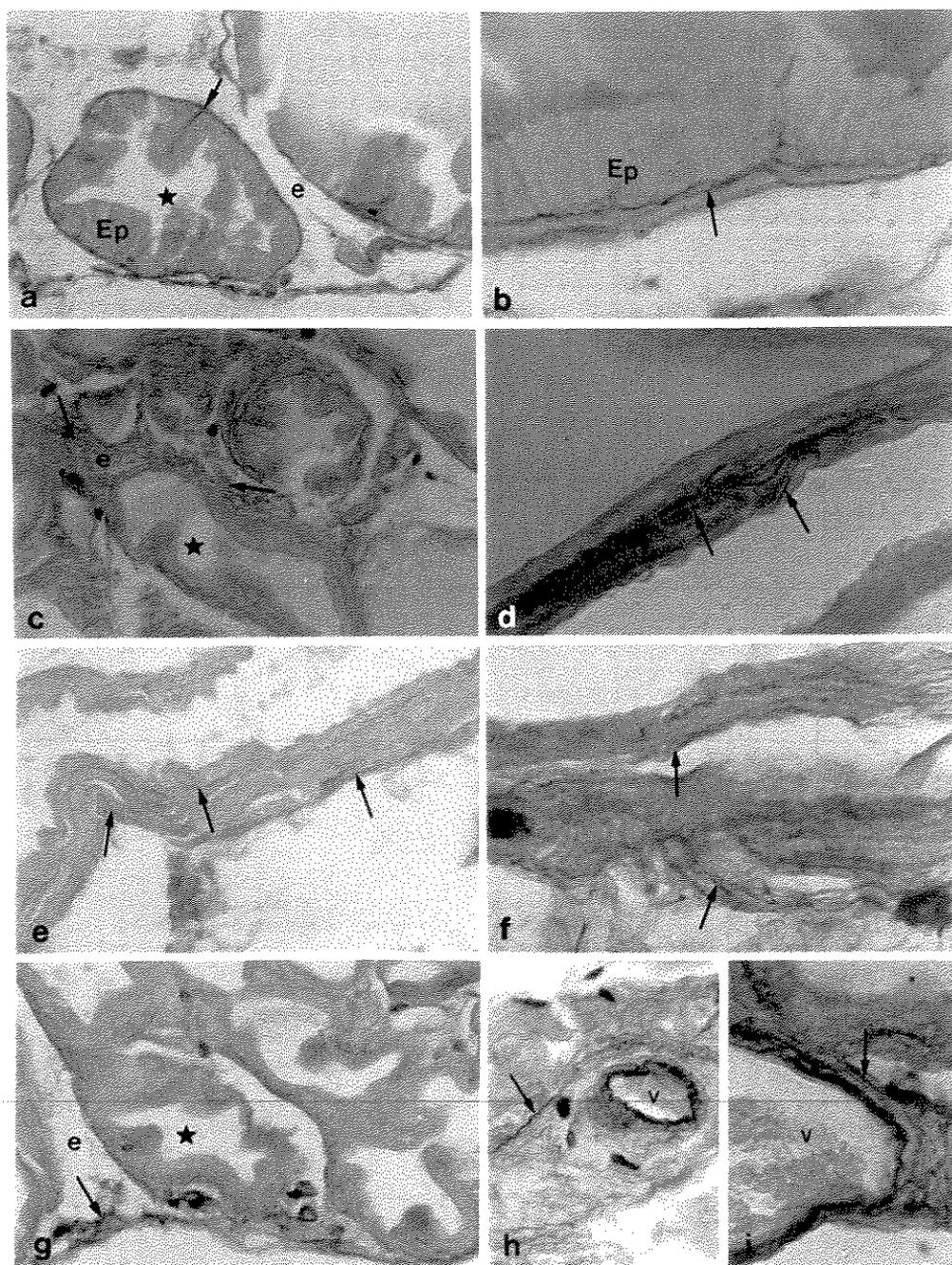
**Figura 2:** Secções da próstata de animais controle (a, b) e castrados (c, d, e) coradas pela hematoxilina-eosina. As figuras a e b representam controles de zero e 21 dias, respectivamente e as figuras c, d, e representam os castrados de 7, 14 e 21 dias, respectivamente. O efeito da castração pode ser visto pela diminuição drástica da porção glandular e aumento dos componentes do estroma (e). Ep: epitélio; ★: lume glandular; v: vasos. Aumento: 170x.



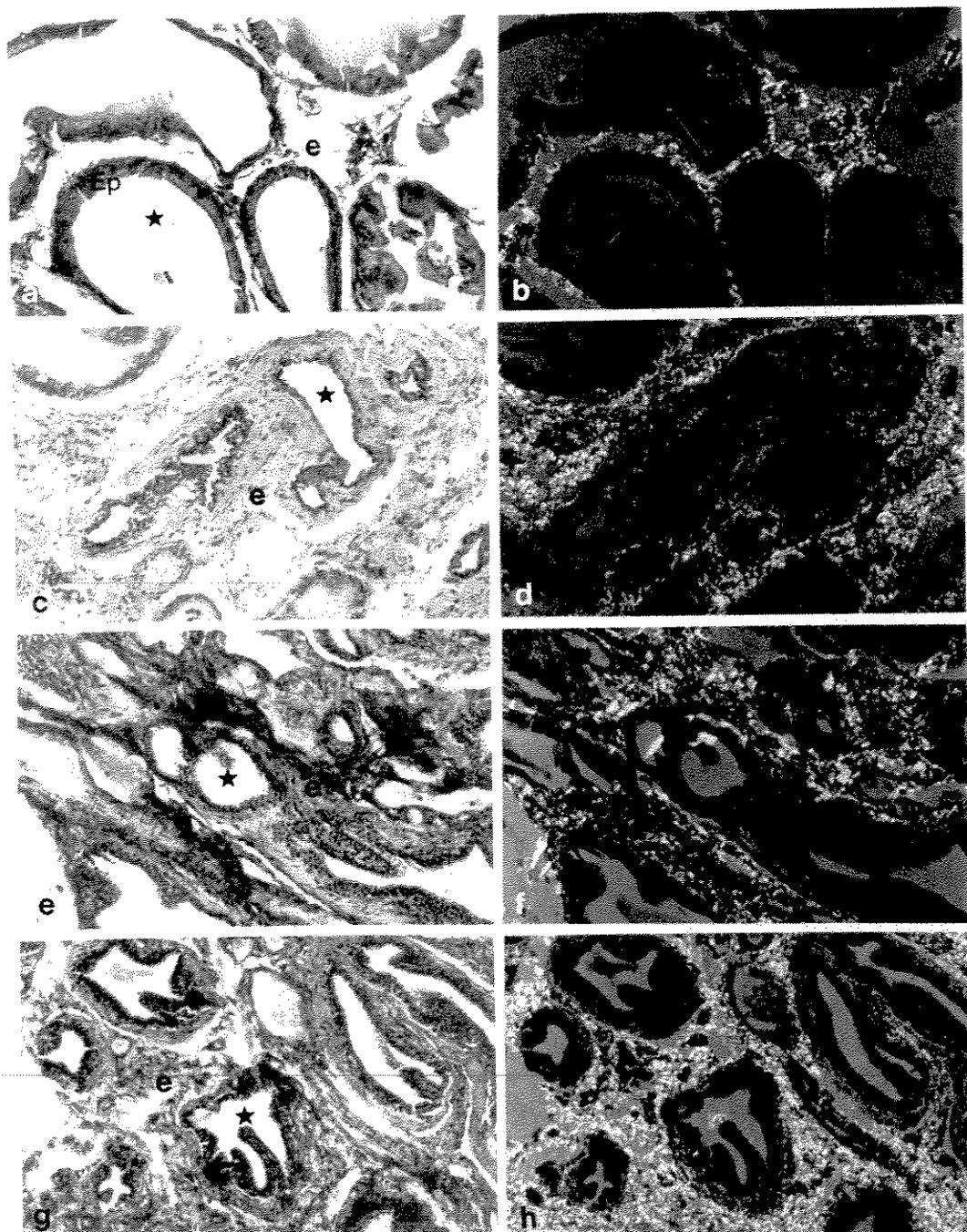
**Figura 3:** Cortes histológicas da próstata ventral de ratos incluída em historresina e corados pelo azul de toluidina. O lume glandular (★) da próstata dos animais do grupo controle (a, b) apresenta-se amplo e cheio de secreção. As células epiteliais (Ep) são colunares altas e o estroma (e) apresenta células e demais componentes da matriz extracelular esparsos. Nos animais castrados (figuras c-h), é possível observar uma redução progressiva do lume glandular (★), bem como da altura das células epiteliais, nitidamente visível pela diminuição da área clara (\*) que corresponde à região ocupada pelo complexo de Golgi. O estroma prostático dos animais castrados apresenta uma quantidade aumentada de células e fibras. A morfologia glandular é apresentada numa visão geral em a, c, e, g, e os detalhes das modificações no epitélio são mostrados em b, d, f, h. v: vasos. Aumentos: a, c, e, g: 170x; b, d, f, h: 700x.



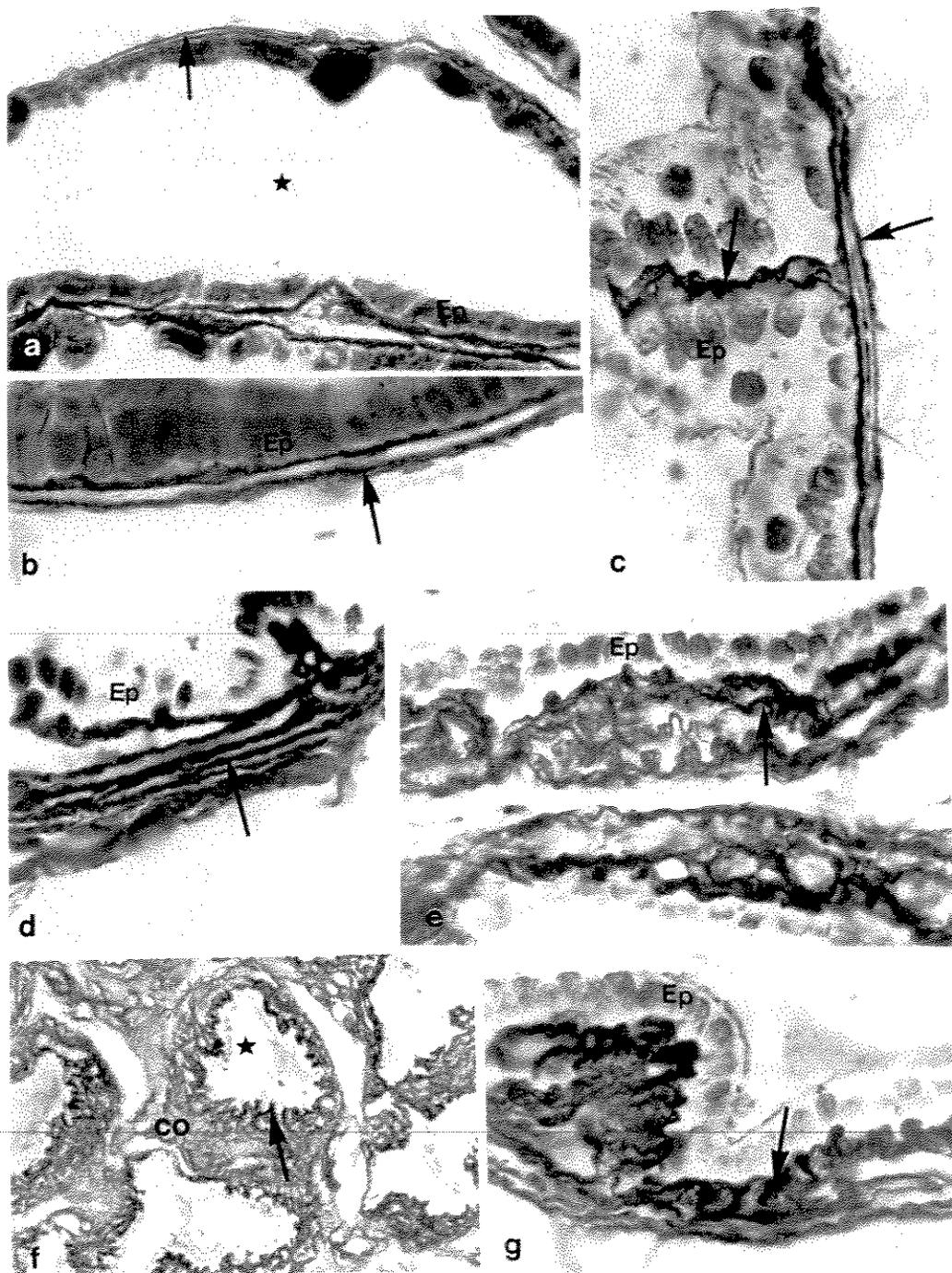
**Figura 4:** Secções da próstata ventral coradas pelo Tricrômico de Masson. Nesta figura são observados aspectos semelhantes aos das figuras 3 e 4, porém tem-se uma visão da distribuição dos componente fibrilares (setas grandes) e da musculatura lisa (setas menores) no estroma (e) prostático, sendo possível observar um aumento da área ocupada por estes componentes nos animais castrados (figuras c, d, e). Há um espessamento na camada de musculatura lisa subjacente ao epitélio e um aumento progressivo na espessura e quantidade das fibras colágenas (setas grandes). **Ep:** epitélio; **v:** vasos; **★** :lume glandular. Aumento: 170x.



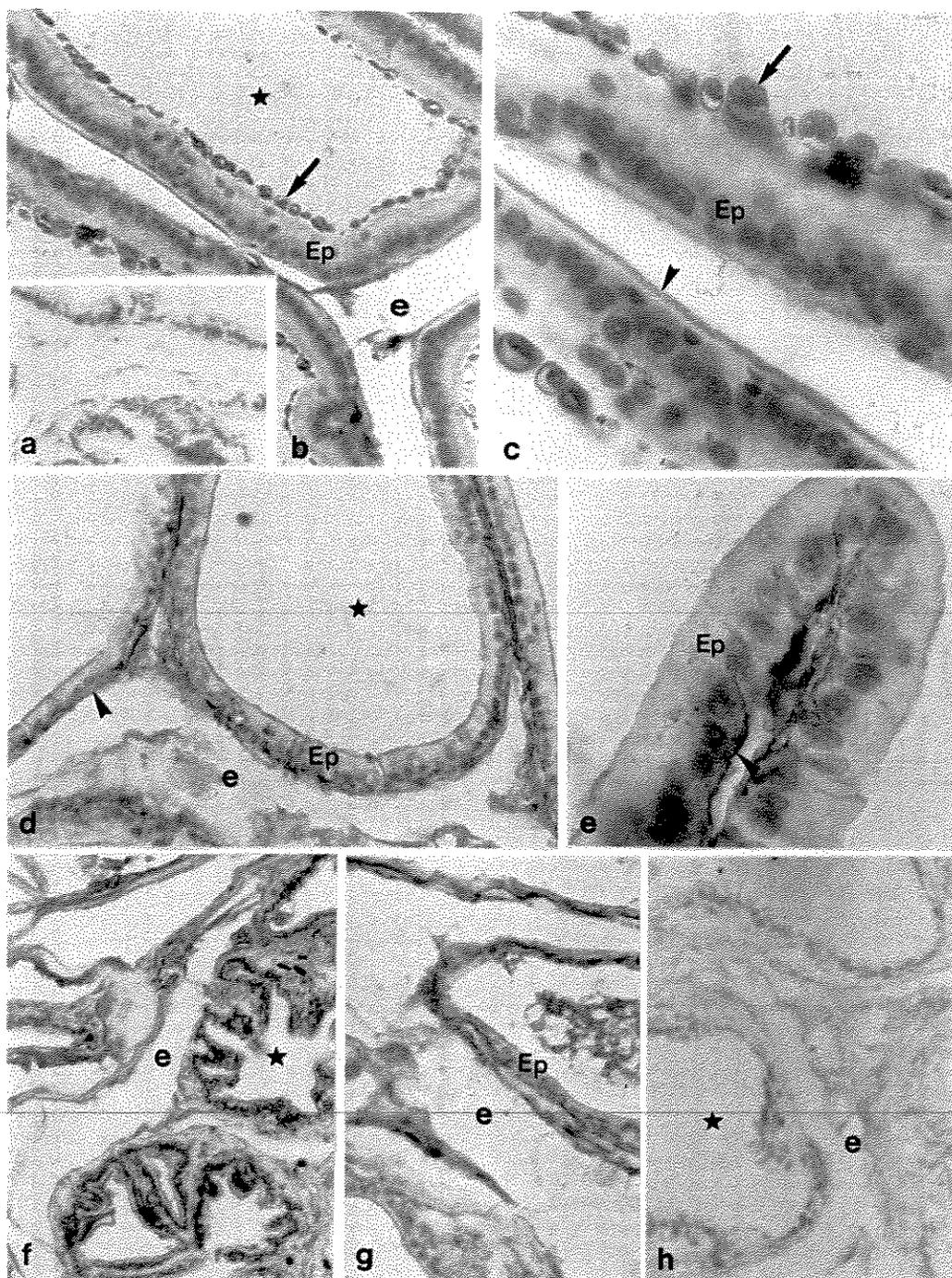
**Figura 5:** Cortes histológicos da próstata ventral submetidos à reação de fucsina-resorcina de Weigert para observação das fibras do sistema elástico. Em cortes de próstata controle (a, b), observa-se a presença de fibras finas do sistema elástico (setas), as quais se distribuem numa trama delicada na cápsula da glândula, pelo estroma (e) e na base do epitélio (Ep). Fibras elásticas maduras não são observadas. Aos sete dias após a orquiectomia, ocorre um aumento no número e na espessura das fibras do sistema elástico (setas) (figuras c, d). Após 14 (figuras e, f) e 21 (figuras g, h, i) dias de privação de andrógenos, é possível a observação de fibras mais espessas, vistas em três ou quatro camadas (setas) ao redor do epitélio (Ep) e pelo estroma (e). v: vasos, ★: lume glandular. Aumentos: a, c, e, g, h: 195x; b, d, f, i: 790x.



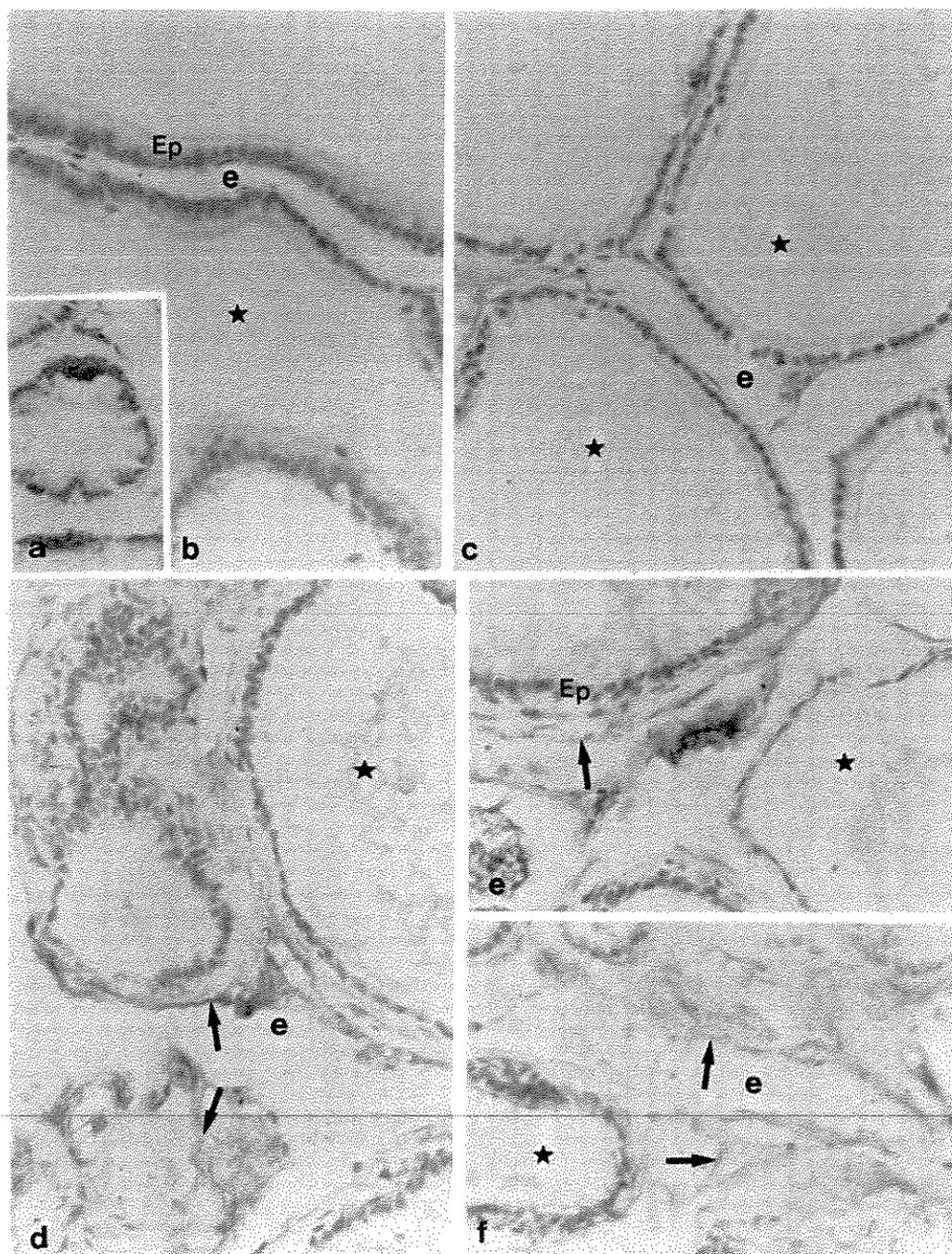
**Figura 6:** A distribuição das fibras de colágeno está apresentada nesta figura pela reação histoquímica de Picrossírius-hematoxilina, observada em microscopia de luz convencional (figuras a, c, e, g) e sob luz polarizada (figuras b, d, f, h). As figuras a e b, representam a próstata controle e as figuras c, e, g representam a próstata de animais castrados aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Em microscopia de luz convencional, observa-se um aumento na deposição de fibras colágenas na próstata de animais castrados (figuras c, d, e) se comparados com o controle (figura a). Sob a luz polarizada, este aumento é observado pelo aumento na intensidade da birrefringência das fibras colágenas no estroma da glândula de animais castrados e por um predomínio das cores de interferência vermelhas (figuras d, f, h). No estroma de animais controle, o volume ocupado por estas fibras é pequeno e a intensidade da birrefringência é menor. **e:** estroma; **Ep:** epitélio; **★:** lume glandular. Aumento:170x.



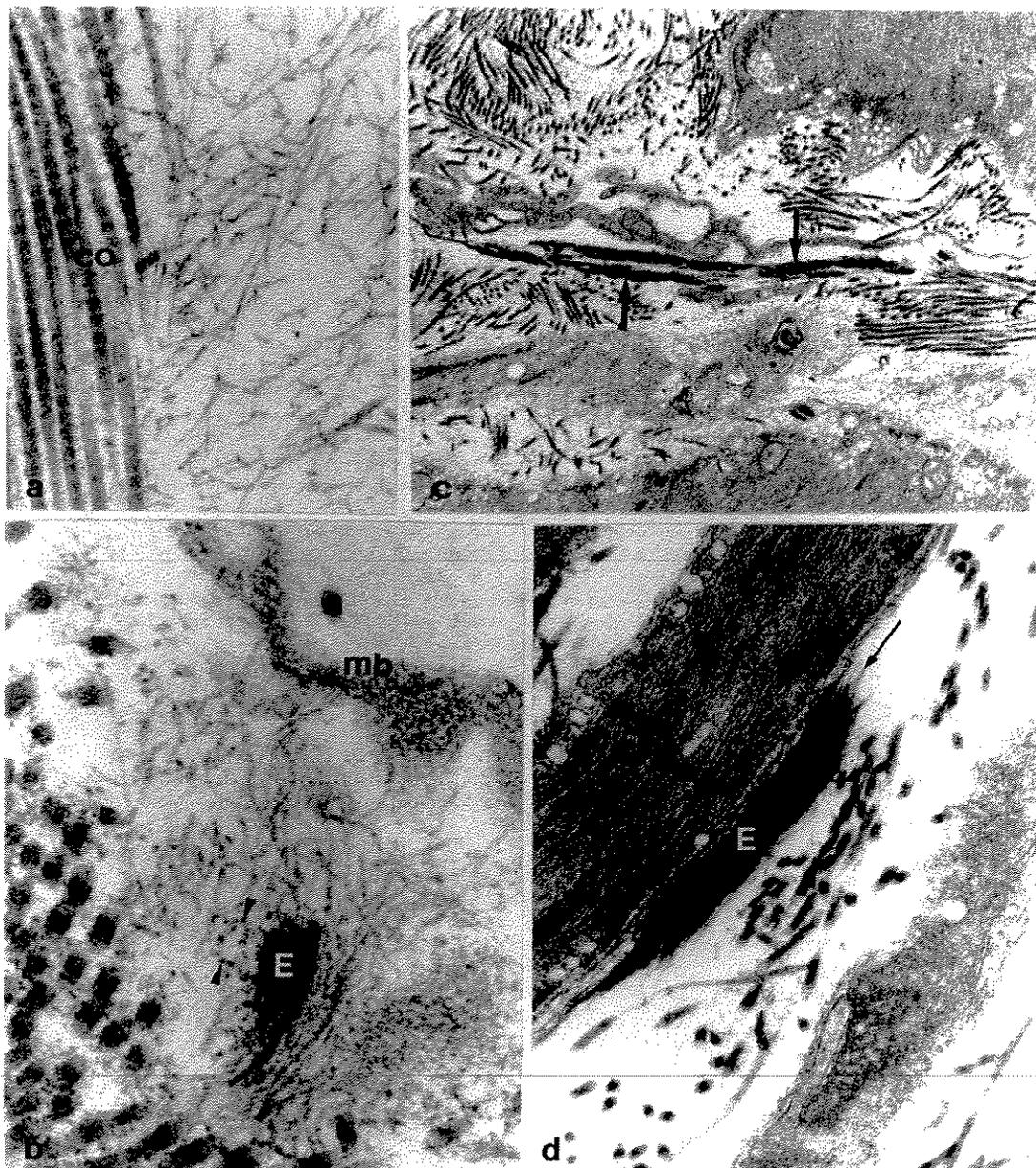
**Figura 7:** Cortes histológicos da próstata ventral de ratos submetidos à impregnação pela prata para observação da distribuição das fibras reticulares (setas). Os cortes da próstata de animais controle (figuras a, b) mostram que as fibras reticulares dispõem-se em uma ou duas camadas de fibras finas e distendidas abaixo do epitélio (Ep). Após a castração, as fibras reticulares aparecem espessadas e bastante onduladas, arranjadas num maior número de camadas. Nesta figura é possível ainda, a observação das fibras de colágeno do tipo I (co) que concentra-se ocupando grande parte do estroma em condições de privação de hormônios. ★: lume glandular. Aumentos: a: 165x; b, c, d: 985x; e, g: 1000x; f: 390x.



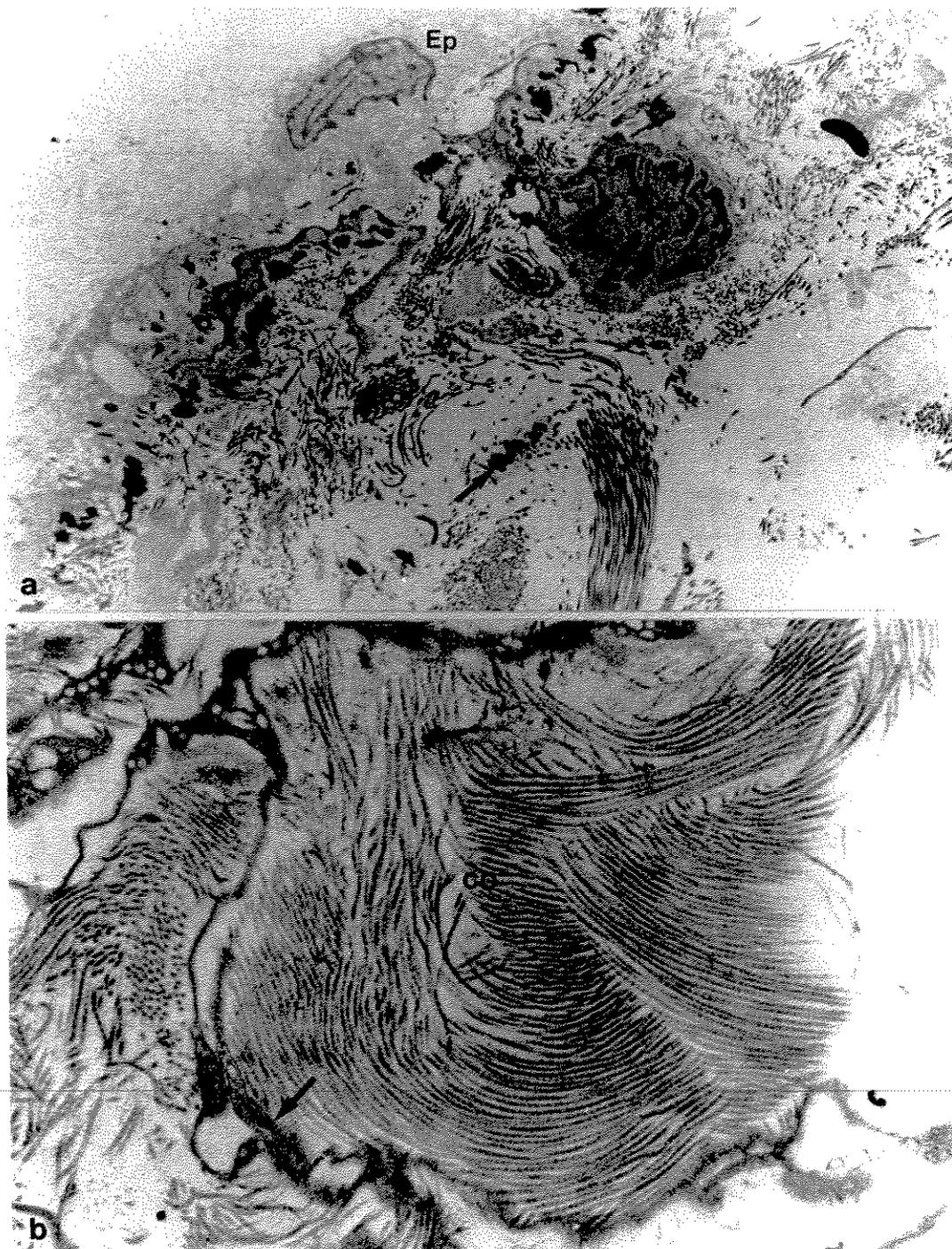
**Figura 8:** Reação imunocitoquímica para identificação do condroitim sulfato (CS). Tanto na próstata dos animais controle (figuras b, c, d, e) como na dos animais castrados (figuras f, g, h), o condroitim sulfato apresenta-se amplamente distribuído pelo estroma, principalmente associado aos elementos fibrilares (cabeças de seta), na base do epitélio (Ep) e na parede dos vasos. Na próstata controle, observa-se reação na secreção e membrana apical das células epiteliais (setas) (figuras b,c). a: controle de reação. Aumentos: a: 150x; b, d, f, g, h: 315x; c, e: 790x.



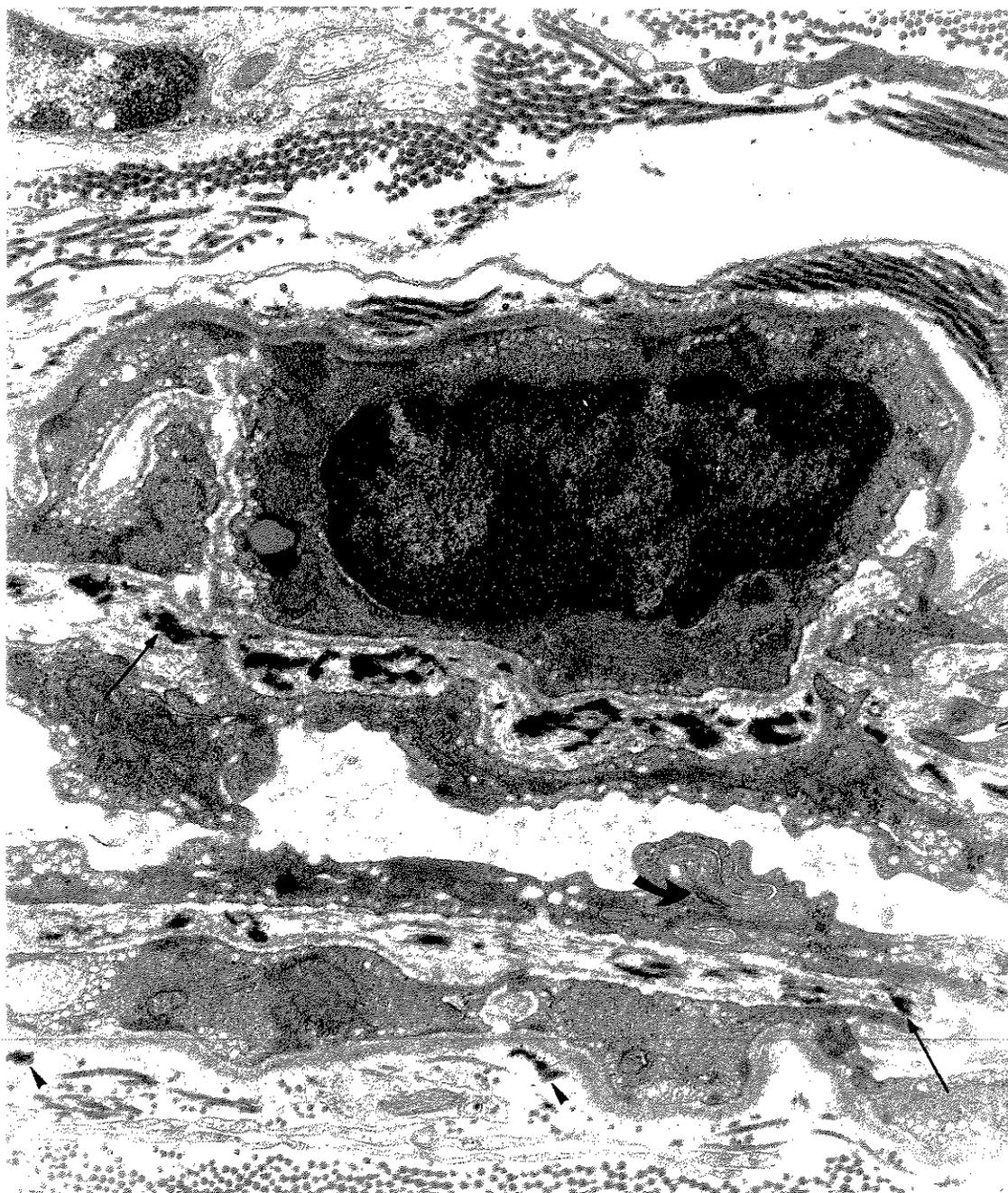
**Figura 9:** Reação imunocitoquímica para identificação do queratam sulfato. A figura mostra que na próstata dos animais controle houve uma reação muito sutil apenas em alguns pontos isolados (figura c). Nos animais castrados, aos 7, 14 e 21 dias (figuras. d, e, f, respectivamente), é possível observar a marcação para queratam sulfato, principalmente associado aos elementos fibrilares (setas) no estroma (e) prostático. a: controle de reação. **Ep:** epitélio; **★:** lume glandular. Aumentos: a: 150x; b-f: 315x.



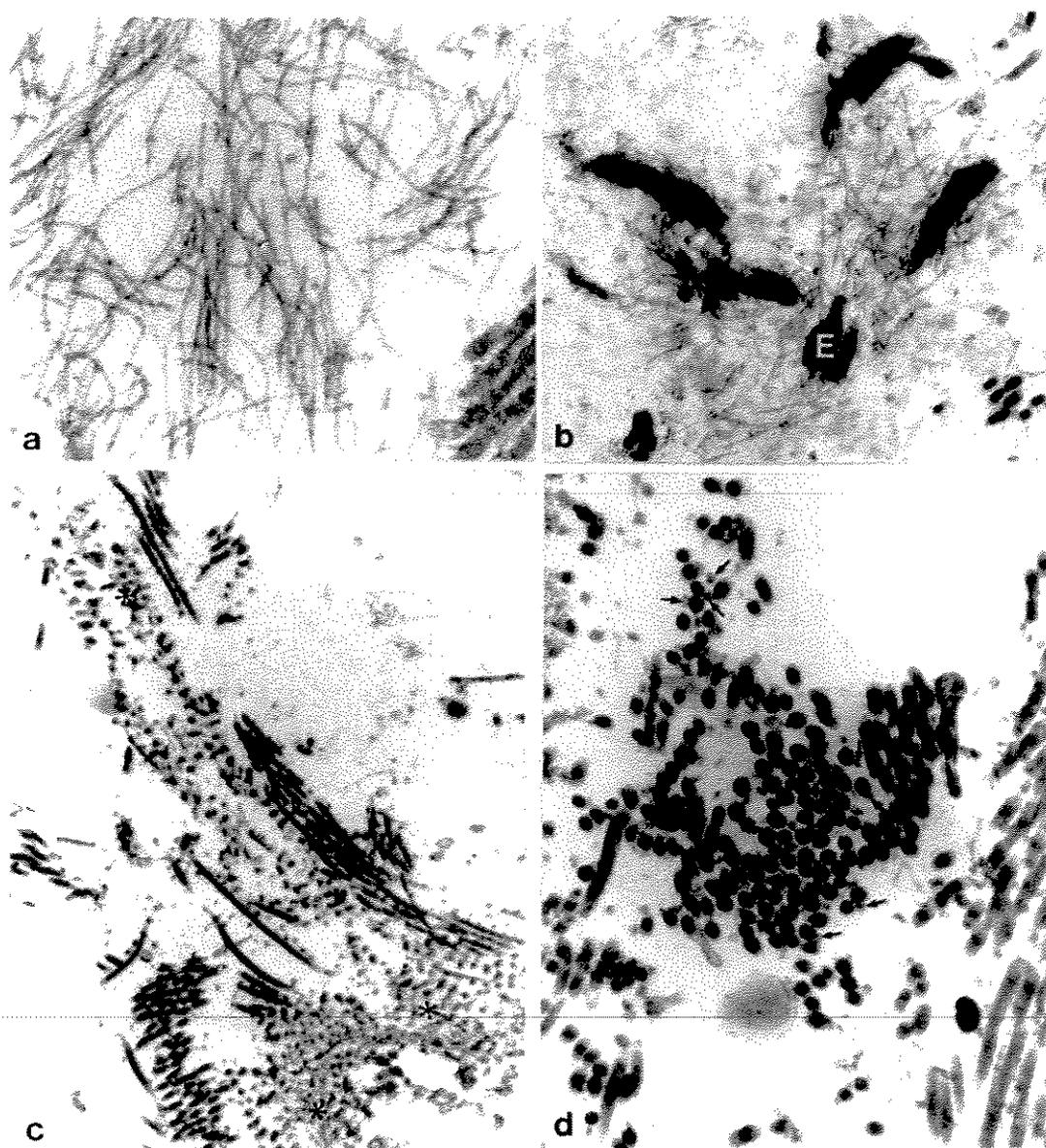
**Figura 10:** Microscopia eletrônica do estroma prostático de ratos controle (a, b) e aos 21 dias após a castração (c, d). Nas figuras a e b, observa-se que as microfibrilas formam uma ampla rede por todo o estroma, mostrando a íntima associação com as fibrilas de colágeno (co) em a, e com a membrana basal (mb), em b. Em algumas áreas, na figura b, as microfibrilas (cabeças de seta) parecem fazer parte de um estágio inicial de deposição de elastina (E). Em c, as setas indicam fibras elásticas bem finas, onde a deposição de elastina parece incompleta ao longo do feixe de microfibrilas. Estas fibras apresentam um contato íntimo com processos celulares e com outros componentes da matriz extracelular. A estreita associação entre uma fibra elástica (E) muito curta e uma célula muscular lisa (\*) pode ser observada na figura d. A seta aponta para os locais de deposição de elastina (E) na superfície das microfibrilas. Aumentos: a: 41.500x; b: 53.000x; c:13.860; d: 22.400x.



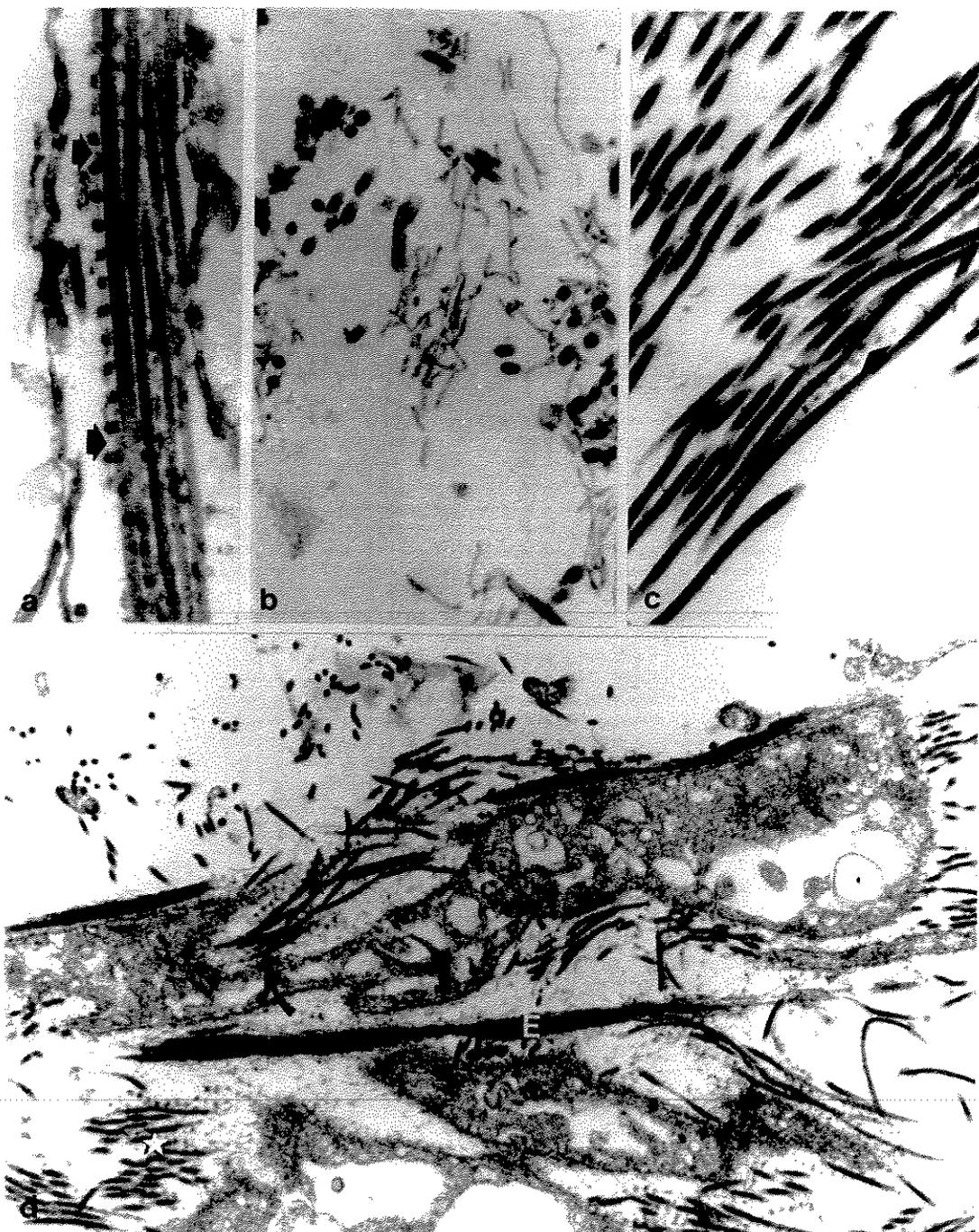
**Figura 11:** Microscopia eletrônica da próstata ventral de ratos após 21 dias de castração. a) Corte ultra-fino em pequeno aumento mostrando o aumento evidente da elastina que forma uma faixa sinuosa abaixo do epitélio involuído. Somente células epiteliais (**Ep**) residuais permanecem revestindo a glândula. No estroma, são vistos outros sítios de deposição de elastina (seta) e uma célula muscular lisa (\*) em corte transversal, a qual parece estender um processo na direção do epitélio. b) Ultra-estrutura do estroma prostático mostrando feixes de fibras colágenas (**co**) em íntimo contato com prolongamentos celulares (seta). Aumento; a: 5.440x; b:14.850.



**Figura 12:** Ultra-estrutura de uma célula muscular lisa do estroma de um rato aos 21 dias após a orquiectomia. Podem ser observados os vários processos celulares e a retração da membrana basal. As setas apontam para dois feixes de microfibrilas extracelulares com deposição moderada de elastina e em íntima associação com a célula muscular lisa. Os prolongamentos desta célula estendem-se pelo estroma e estabelecem contatos com outros prolongamentos através de interdigitações e junções especializadas (seta curva). Outros sítios de deposição de elastina são vistos pelo estroma (cabeças de seta). Aumento: 22.100x.



**Figura 13:** Aspectos ultraestruturais das microfibrilas do estroma da próstata ventral de ratos. As microfibrilas formam uma rede ampla pelo estroma (figura a) e algumas mostram claramente a associação com a elastina (E) (figura b). A identificação do colágeno VI foi possível após o tratamento com o ATP que produz a agregação das microfibrilas com aspecto bandado. Estas microfibrilas ocupam áreas relativamente grandes do estroma (\*) e aparecem entremeadas às fibrilas de colágeno, interconectando diferentes grupos de fibrilas (figura c). A associação do colágeno VI com as fibrilas de colágeno é mostrada em corte transversal na figura d (setas). Aumentos: a: 71.550x; b: 24.600x ; c: 18.000x; d: 34.200x.



**Figura 14:** Ultra-estrutura do estroma da próstata ventral. a) Aspectos dos agregados de colágeno VI associados paralelamente às fibrilas de colágeno. O colágeno do tipo VI exibe estrutura globulares conectadas umas às outras por filamentos finos (setas). Algumas microfibrilas, aparentemente não associadas à elastina, permanecem livres no estroma mesmo após o tratamento com o ATP, sem que haja a formação de agregados (figura b). c) Com exceção de alguns raros locais, especialmente entre as fibrilas de colágeno, os cortes dos fragmentos incubados apenas com PBS (fragmentos controle) não exibiram os agregados típicos do colágeno VI. d) Aspectos da co-distribuição do colágeno do tipo VI, após tratamento pelo ATP, e das microfibrilas associadas à elastina as quais apresentam-se intimamente associadas a uma célula muscular lisa. A seta curva aponta para um prolongamento celular ocupado por fibrilas de colágeno e entre estas observa-se fibrilas de colágeno do tipo VI (★). Na extremidade das fibras de elastina (E), pode-se observar as microfibrilas associadas. Aumentos; a: 44.000x; b: 33.000x; c: 29.700x, d: 17.450x.

---

**DISCUSSÃO**

## **1. Considerações Gerais**

O lobo ventral da próstata de ratos é o mais proeminente, dentre os três lobos prostáticos, podendo pesar até 0,8g no animal adulto. Além disso, este é o lobo que apresenta maior sensibilidade aos hormônios andrógenos (COLOMBEL & BUTTYAN, 1995)., o que o torna bastante adequado para estudos dos efeitos de remoção ou bloqueio destes hormônios

Como mostrado na figura 1, mesmo após um período relativamente longo de privação de andrógenos, a próstata não regride totalmente. Isto ocorre porque, embora a testosterona produzida pelos testículos e secretada na circulação seja a principal fonte de andrógenos do corpo, a manutenção da fisiologia prostática se dá, em parte, pela presença de outros esteróides androgênicos secretados pela glândula adrenal, os quais contribuem com cerca de 5 a 10% do suprimento de andrógenos circulantes (KLOCKER *et al*, 1994; COLOMBEL e BUTTYAN, 1995).

A atrofia total da glândula após a castração é prevenida também pela persistência da 5 $\alpha$ -redutase em algumas células epiteliais, mantendo assim a concentração intraprostática da dihidrotestosterona (MIYAMOTO *et al.*, 1996).

A privação de andrógenos, por castração ou pela administração de anti-andrógenos, leva a profundas modificações na arquitetura de todos os lobos da próstata, podendo-se observar redução no comprimento, no diâmetro e no número de ductos, redução na altura das células epiteliais e um aumento relativo de tecido conjuntivo (YAMASHITA *et al.*, 1996; POWELL *et al.*, 1996).

As alterações ocorridas nas células epiteliais da próstata após a privação de andrógenos estão bem documentadas (BRANDES, 1966; KERR e SEARLE, 1973; GUENETTE e TENNISWOOD, 1994) e foram reproduzidas neste estudo, segundo os aspectos revelados pelas colorações com as hematoxilina e eosina e pelo azul de toluidina.

## **2. Alterações no estroma e suas interações com o epitélio**

A matriz extracelular dos tecidos conjuntivos é composta de fibras insolúveis, microfibrilas e uma grande variedade de proteínas solúveis e glicoproteínas estruturais. A função primária da matriz extracelular é conferir aos tecidos suas propriedades mecânicas e físico-químicas e fornecer um suporte para a fixação e migração de células (BATEMAN *et al.*, 1996). Além disto, a matriz extracelular é uma fonte importante de informações que afetam o comportamento celular (JOHANSSON, 1996), influenciando no desenvolvimento, na proliferação e na diferenciação das células em contato com ela (ALBERTS *et al.*, 1994; BOUDREAU e BISSEL, 1996; REICHENBERGER e OLSEN, 1996).

As proteínas mais abundantes da matriz extracelular, e seguramente do corpo dos vertebrados, são as proteínas da família do colágeno, que formam os principais elementos estruturais nos tecidos conjuntivos. Entretanto, outros importantes constituintes tomam parte na composição da matriz extracelular, como os proteoglicanos, ácido hialurônico, elastina e seus componentes microfibrilares associados, e uma enorme variedade de glicoproteínas, como laminina, tenascina, e outras que podem ser mais ou menos específicas de determinados tecidos (BATEMAN *et al.*, 1996).

No caso dos mamíferos, as fibras colágenas, especialmente as fibrilas que contém colágenos dos tipos I e II, conferem resistência aos tecidos a forças de tensão e compressão (REICHENBERGER e OLSEN, 1996), enquanto a elastina e os proteoglicanos são fundamentais para a elasticidade da matriz extracelular (MONTES, 1992).

Como pode ser observado no presente estudo, a regressão do compartimento epitelial durante a involução da próstata ventral induzida pela castração é acompanhada de um processo de remodelação da matriz extracelular do estroma. Este processo de remodelação acontece através da síntese e/ou degradação de alguns componentes da matriz extracelular, como, por exemplo, o acúmulo de colágeno e elastina nos lobos ventral e dorsolateral da próstata de ratos castrados e tratados com hormônios, como observado por NAKADA e

colaboradores (1994).

Neste estudo, as modificações ocorridas durante o processo de involução foram verificadas através de métodos histoquímicos, imunocitoquímicos e por microscopia eletrônica de transmissão.

De maneira geral, as modificações do estroma após a remoção de andrógenos incluem um aumento na área ocupada pelos elementos da porção estromal, sendo que, para alguns componentes, tais como células musculares lisas, fibras colágenas e fibras do sistema elástico, estas modificações são mais evidentes.

VOOGT e colaboradores (1987) analisaram a próstata humana em condições de bloqueio de andrógenos e verificaram, além de marcada redução dos ácinos, uma marcada predominância de elementos estromais. Diferentemente do que acontece em ratos, o tamanho da glândula não foi reduzido, o que os levou a admitir que após o tratamento com os bloqueadores de andrógenos, as células do estroma haviam proliferado, "ocupando" o lugar do ácino glandular atrófico.

CARVALHO e LINE (1996) demonstraram, em ratos, que dentre as modificações ocorridas na próstata após a castração, pode-se observar um excesso de membrana basal, altamente pregueada abaixo do epitélio glandular regredido. Nestas condições, a membrana basal, embora modificada estruturalmente, ainda apresentava heparan sulfato, colágeno do tipo IV e laminina associados.

DOUNJACOUR e CUNHA (1988) demonstraram que durante o desenvolvimento pós-natal, a castração de camundongos recém nascidos resulta numa composição anormal do tecido estromal da próstata, que parece conter uma quantidade maior de colágeno ou outros materiais da matriz extracelular quando comparado com a próstata normal.



## **2.1. As células musculares lisas**

As modificações sofridas pelas células musculares lisas após a castração relatadas neste estudo são semelhantes às aquelas descritas para a glândula coaguladora de ratos após a castração ou após o tratamento com estrógenos. Nestas situações houve um aumento na quantidade relativa de células musculares lisas, as quais tornaram-se progressivamente atroficas e com perfil irregular, acompanhando um aumento da distância entre elas devido ao grande aumento de fibras do tecido conjuntivo (HOLTERHUS *et al.*, 1993).

HORSFALL e colaboradores (1994) identificaram um aumento da capacidade sintética das células musculares lisas em humanos e em cobaias de idade avançada. No caso de privação de andrógenos em ratos, eventos semelhantes poderiam estar acontecendo, sendo que a ausência de hormônios levaria às alterações das células musculares lisas que tornam-se sinteticamente ativas. O fenótipo sintético das células musculares lisas observado na próstata em involução pode estar associado com a síntese de componentes da matriz extracelular, em especial de componentes do sistema elástico e de colágenos fibrilares. Estes aspectos das células musculares lisas, após a privação de hormônios, já haviam sido descritos por ZHAO e colaboradores (1992).

Segundo HAYWARD e colaboradores (1996a, 1997) e CUNHA e colaboradores (1996), a principal interação do epitélio prostático adulto com o estroma se dá, mais precisamente, com a musculatura lisa que o cerca. Esta afirmação é fundamentada também na proximidade existente entre as células musculares lisas, que possuem receptores de andrógenos, e o epitélio (FLICKINGER, 1972 apud HAYWARD *et al.*, 1997).

As células musculares lisas expressam grande parte dos receptores de andrógenos nos três lobos da próstata de rato (PRINS *et al.* 1991) e, uma vez que estas são as células predominantes ao redor do epitélio dos ductos (ICHIARA *et al.*, 1978), elas estão posicionadas de maneira a favorecer interações parácrinas com o epitélio prostático. No adulto, esta interação é de fato entre o epitélio e as células musculares lisas (CUNHA *et al.*, 1996).

A influência das células musculares lisas sobre a proliferação do epitélio é provavelmente inibitória (NEMETH e LEE 1996), uma vez que diferenciação epitelial e morte celular ocorrem em regiões de maior concentração destas células. Nas regiões onde a concentração de fibroblastos é maior, é possível observar a proliferação do epitélio.

Já na glândula coaguladora, as interações do epitélio com o estroma durante a remodelação do órgão, ocorrem preferencialmente com os fibroblastos, particularmente com os fibroblastos da interface epitélio-estroma, na lâmina própria (HOLTERHUS *et al.*, 1993).

Em ratos, o estroma prostático dos indivíduos jovens adultos é esparsa e com fibras finas e pouco agregadas. Segundo HORSFALL e colaboradores (1994), esta proporção de estroma, quando estudada em humanos e em cobaias, diminui durante a puberdade e o período subsequente da adolescência. Isto parece estar, em grande parte, relacionado ao fato de que, até atingir a maturidade sexual, o compartimento epitelial acinar secretor apresenta uma proliferação intensa.

## **2.2. O sistema elástico**

Dentre os componentes fibrilares da delicada matriz extracelular do estroma prostático, pudemos demonstrar a presença de componentes do sistema elástico.

Na próstata de animais castrados, ocorre uma modificação na organização dos componentes do sistema elástico, com um aumento relativo do número, comprimento, espessura das fibras e no conteúdo de elastina. Este aumento no conteúdo de elastina está de acordo com as análises bioquímicas de NAKADA e colaboradores (1994).

A presença de componentes do sistema elástico está provavelmente associada com a capacidade de deformação do tecido durante a contração das células musculares lisas. A rede de microfibrilas da matriz extracelular desempenharia também um papel na extensibilidade e deformabilidade do órgão, bem como na manutenção da posição de estruturas do tecido tais como fibrilas

de colágeno, nervos, vasos e elementos epiteliais, durante as modificações da forma que ocorrem sob ação da musculatura lisa.

As modificações no sistema elástico após a castração são difíceis de serem interpretadas, especialmente porque se conhece muito pouco sobre a função da matriz extracelular no estroma de muitos órgãos, e, virtualmente nada se conhece sobre as inter-relações entre os diferentes componentes da matriz extracelular nestes órgãos.

Em geral, as fibras elásticas são encontradas em tecidos sujeitos a movimentos de distensão e relaxamento repetitivos ou estiramento e encurtamento passivos, dotando estes tecidos de flexibilidade e extensibilidade elásticas (CLEARY e GIBSON, 1996).

Desta forma, é possível que os componentes do sistema elástico sejam importantes na regressão do tecido, com papel especial na contração da glândula após a perda das células epiteliais. Entretanto, esta sugestão exige maiores investigações.

Alternativamente, as fibras do sistema elástico seriam mais resistentes à degradação que ocorre durante a regressão, ficando, assim, concentradas no estroma. Desta forma as modificações documentadas aqui podem ser transitórias. A estrutura observada no estroma aos 21 dias após a castração podem estar sujeitas a processos regressivos posteriores.

Em glândulas submandibulares de camundongos submetidas à atrofia experimental também se observou um aumento, ainda que discreto, das fibras elásticas ao redor dos ductos glandulares (ZAIA *et al.*, 1996)

Um outro exemplo de remodelação do estroma envolvendo as fibras do sistema elástico foi detectado em bexiga urinária de cobaias com obstrução parcial da uretra. Os autores deste trabalho verificaram um aumento na quantidade de elastina e sugeriram que ela tenha como função oferecer um suporte elástico à área com menos musculatura, e este suporte deve ser aumentado, em razão da obstrução, pela síntese da elastina (JI *et al.*, 1995).

### **2.3. As fibras colágenas**

Dentre os colágenos que formam fibrilas, o colágeno do tipo I é o mais abundante e, na maioria dos tecidos onde está presente, representa o principal componente das fibrilas (BATEMAN *et al.*, 1996).

Como observado nos resultados, após a castração ocorre um aumento na densidade de fibras colágenas no estroma, o qual pode ser verificado nos preparados pelo corados pelo Tricrômico de Masson que, embora não seja uma técnica específica para o colágeno, mostra uma seletividade para estas fibras.

Durante a involução prostática, além do aumento na deposição das fibras colágenas, pôde-se também verificar um maior grau de agregação destas fibras, o que foi revelado pelo aumento da birrefringência e pelas diferenças nas cores de interferência quando se analisou o material corado pelo picrossírius sob microscopia de polarização. Evento muito semelhante foi descrito por ZAIA e colaboradores (1996), no estroma de glândulas submandibulares de camundongos durante um processo de atrofia induzido por obstrução experimental do ducto principal.

O colágeno do tipo III é um membro do grupo dos colágenos fibrilares e se apresenta, na maiorias das vezes, co-localizado com o colágeno do tipo I. Embora o colágeno III seja expresso no início do desenvolvimento e durante a embriogênese e morfogênese, sabe-se que ele não é fundamental para estes processos (LIU *et al.*, 1997). No adulto, o colágeno III é o principal componente da matriz extracelular em uma variedade de órgãos internos e na pele (LIU *et al.*, 1997) tendo um papel na manutenção do arcabouço extracelular e das propriedades de resistência de tecidos como as paredes dos vasos e do intestino.

Já o colágeno tipo VI compõe uma classe de microfibrilas que se distribui amplamente na maioria dos tecidos (von der MARK *et al.*, 1984; ENGVALL *et al.*, 1986; BRUNS *et al.*, 1986; KIELTY *et al.*, 1990; van der REST e GARRONE, 1991).

A rede de microfibrilas é encontrada juntamente com as clássicas fibrilas de colágeno, porém, parece ter orientações diferentes (van der REST & GARRONE, 1991). De acordo com a distribuição e associações das microfibrilas de colágeno

tipo VI, sugere-se que elas desempenhem alguma função para integrar ou conectar fibrilas de colágeno em tecidos como córnea, aorta, pulmão, fígado, rim, derme, tendão e cartilagem (von der MARK *et al.*, 1984; AMENTA *et al.*, 1988; NAKAMURA *et al.*, 1994).

Para que seja possível a compreensão dos eventos ocorridos no estroma durante os processos de desenvolvimento e involução, é necessário também que se dê atenção para as possíveis associações e interações entre os componentes da matriz extracelular, como a associação entre o colágeno do tipo VI e os proteoglicanos/glicosaminoglicanos, observada por KOBAYASHI (1995) e NAKAMURA e colaboradores (1994), que sugerem que as interações do colágeno do tipo VI com as fibrilas estriadas de colágeno ou com células aconteçam via proteoglicanos/glicosaminoglicanos.

O colágeno tipo VI é secretado por fibroblastos e células musculares lisas em cultura e promove adesão e espalhamento de algumas células (von der MARK *et al.*, 1984; COLOMBATTI e BONALDO, 1987; AUMAILLEY *et al.*, 1991; DOANE *et al.*, 1992; KIELTY *et al.*, 1992)

A distribuição do colágeno VI no estroma prostático leva a crer que as microfibrilas tenham um papel estrutural, estabelecendo uma malha flexível que garante a integridade do tecido quando sob deformação causada por contração das células musculares lisas durante o funcionamento normal do órgão.

#### **2.4. Os proteoglicanos**

A presença de dois dos glicosaminoglicanos encontrados na próstata ventral de ratos foi analisada neste trabalho nas diferentes condições hormonais e modificações foram constatadas seguindo-se a remoção de andrógenos.

Proteoglicanos (PGs) são macromoléculas complexas, constituídas por um esqueleto protéico ao qual se ligam, covalentemente, uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (MICHELACCI, 1996).

Em tecidos de mamíferos ocorrem seis tipos de glicosaminoglicanos (GAGs): ácido hialurônico, condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (KS), heparam sulfato (HS) e heparina. Todos são polímeros de

natureza ácida, apresentando grupamentos sulfato. O ácido hialurônico consiste em exceção pois, além de não possuir grupamentos sulfato também não se liga covalentemente a proteínas (MICHELACCI, 1996; FOSANG e HARDINGHAM, 1996).

A variedade de proteoglicanos é surpreendente, podendo existir várias populações diferentes num único tecido. Os PGs têm papel importante na organização da matriz extracelular e, embora algumas de suas principais funções sejam estruturais, eles podem exercer múltiplas funções, regulando a difusão e o fluxo de macromoléculas pelo tecido conjuntivo, desempenhando funções biomecânicas e interagindo com fatores de crescimento e com as células propriamente ditas (FOSANG e HARDINGHAM, 1996).

Devido ao caráter polianiónico dos PGs, eles podem ligar-se a outras moléculas, especialmente aminas catiónicas, peptídeos e proteínas, que são essenciais para a regulação da função celular (HEINEGÅRD e PAULSSON, 1984).

Os proteoglicanos controlam o acesso, à superfície celular, de importantes moléculas reguladoras, tais como os fatores de crescimento, os hormônios e os neurotransmissores (GALLAGHER *et al.*, 1986; MASSAGUÉ, 1991).

A expressão do queratam sulfato observada no estroma prostático dos animais castrados pode ser devida à síntese deste glicosaminoglicano, ocorrida após a remoção de andrógenos ou, ainda, pela sua exposição após uma possível degradação de outros componentes da matriz extracelular.

Alguns trabalhos com proteoglicanos e glicosaminoglicanos demonstraram que estes componentes da matriz extracelular também são influenciados por andrógenos, embora com diferenças nos diferentes lobos quando se trata da próstata de ratos (KOFOED *et al.*, 1990; TERRY e CLARK, 1996b).

Segundo KOFOED e colaboradores (1990), após a castração ocorre um aumento acentuado de ácido urônico em todos os lobos da próstata, sendo que no ventral foi observado o aumento de todas as frações de glicosaminoglicanos. Já os resultados de TERRY e CLARK (1996b) demonstraram uma diminuição do conteúdo de glicosaminoglicanos nos três lobos após a castração e um aumento dos mesmos após a reposição de andrógenos, sendo estas modificações mais

rápidas e mais acentuadas no lobo ventral. Segundo estes autores, estas diferenças poderiam ser uma função da heterogeneidade celular entre os lobos.

A lâmina basal e o estroma fibromuscular da próstata de ratos e de humanos mostram marcação evidente para condroitim sulfato (CS) (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996; TERRY e CLARK, 1996a; RICCIARDELLI *et al.*, 1997). A intensidade desta marcação diminui com a castração e aumenta novamente quando da administração hormonal. Essa constatação levou TERRY e CLARK (1996a) a sugerirem que a expressão ou o metabolismo de proteoglicanos de CS é dependente de andrógenos. A quantidade aumentada de GAGs, naquelas condições, pode ser uma resposta à proliferação celular ou uma exigência para a diferenciação celular. Entretanto, a relação entre GAGs e proliferação celular ainda não é uma questão resolvida (TERRY e CLARK, 1996b).

O aumento da imunorreatividade do queratam sulfato e a perda de condroitim sulfato pela membrana apical das células epiteliais após a castração sugerem a existência de alguma relação entre o metabolismo dos glicosaminoglicanos e a presença ou ausência de andrógenos, entretanto estas especulações merecem ainda maiores investigações.

Sugere-se que os PGs de CS, encontrados em quantidade considerável no lobo ventral da próstata de ratos, tenham um importante papel estrutural na manutenção da forma deste lobo devido à posição anatômica que ele ocupa em relação à bexiga (TERRY e CLARK, 1996a).

A proporção dos GAGs difere entre a próstata humana (normal) e a de rato, sendo que nesta última predominam o ácido hialurônico e o condroitim-4-sulfato (KOFOED *et al.*, 1990).

Na próstata humana, observa-se uma forte marcação para o versicam, um PG de CS, na superfície apical das células epiteliais colunares, e uma marcação difusa no tecido conjuntivo frouxo associado a fibras e a lâminas elásticas (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996).

A expressão do versicam associada aos processos de migração e proliferação *in vivo* e as propriedades inibitórias de adesão *in vitro* apontam para um papel potencial deste PG em processos de instalação tumoral e migração nas

metástases (BODE- LESNIEWSKA *et al.*, 1996).

Em ratos, observa-se uma modificação na síntese de condroitim sulfato e dermatam sulfato para heparam sulfato após a castração (CARVALHO, comunicação pessoal).

A modificação da expressão de GAGs parece ter um papel importante na progressão do câncer prostático. RICCIARDELLI e seus colaboradores (1997) propõem que o CS funcione como um marcador do comportamento tumoral, em razão deste GAG exercer influência sobre o crescimento e a proliferação celulares e, conseqüentemente, poder influenciar também na progressão maligna. Os autores demonstraram que, em casos de câncer localizado clinicamente, os níveis elevados de CS estavam associados à progressão da doença.

As alterações dos PG prostáticos, verificadas por KOFOED e colaboradores (1990) os levaram a postular que estas alterações são a causa e não o resultado do crescimento glandular. Eles acreditam que os efeitos dos andrógenos sobre o crescimento prostático dependeriam de uma inter-relação entre o epitélio e o estroma, a qual seria mediada por PGs.

### **3. Considerações finais**

Além dos aspectos já mencionados, há de se considerar ainda a ação de outros fatores que atuam na promoção do crescimento e desenvolvimento prostáticos e na degradação de alguns componentes durante o processo de remodelação da próstata, como os fatores de crescimento (FC) que funcionam como mediadores da ação dos andrógenos nas interações entre o estroma e o epitélio para a manutenção da fisiologia do tecido prostático (ITOH *et al.*, 1998a, b).

Admite-se que a expressão dos FC e seus receptores seja regulada por andrógenos, uma vez que a remoção destes hormônios pode levar a modificações como o aumento ou a diminuição destes fatores. Por exemplo, observou-se um decréscimo do RNAm para o fator de crescimento epidérmico (EGF) na próstata

ventral de ratos após a castração, enquanto outros como fator de crescimento tumoral (TGF-alfa), receptor para EGF, fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), receptor de FGF, TGF-beta1, receptor de TGF-beta tipo II, fator de crescimento de hepatócito (HGF), aumentaram em maior ou menor grau após a castração (NISHI *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 1998a).

Nos processos de degradação de componentes da matriz extracelular pode-se chamar a atenção para as metaloproteinases da matriz (MMP), as quais estão envolvidas em processos de remodelação tecidual, sejam ele fisiológicos ou patológicos (BASSET *et al.*, 1997) e que também têm sua expressão alterada em função das condições hormonais. Por exemplo, a matrilisina tem aumentada a expressão de seu RNAm durante a involução da próstata ventral causada por castração (POWELL, *et al.*, 1997). Este aumento da expressão da matrilisina causaria um rompimento da membrana basal que teria como consequência a cessação da secreção de proteínas prostáticas pelas células epiteliais (POWELL *et al.*, 1997).

NEMETH e LEE (1996) e SUGIMURA e colaboradores (1986) sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais.

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

Com base nos estudos de recombinação de tecidos (mesênquima e epitélio), YAMASHITA e colaboradores (1996) sugerem que os padrões regionais de morfogênese do sistema de ductos e da função secretora sejam induzidas e mantidas pelo componente mesenquimal ou estromal da glândula.

Acredita-se que, na próstata adulta, os andrógenos tenham ação sobre a musculatura lisa a fim de manter a diferenciação epitelial. O epitélio, por sua vez, atua na manutenção da diferenciação da musculatura lisa. Esta interação celular

homeostática entre epitélio e músculo liso é perturbada durante a carcinogênese na próstata e tem como consequência diversas seqüelas para ambos os tecidos (HAYWARD *et al*, 1997).

Certos efeitos do estroma sobre o epitélio podem ser simplesmente uma função da matriz extracelular produzida em grande parte pelas células estromais (EMERMAN e PITELKA, 1977). Os eventos morfogenéticos em órgãos reprodutores adultos, onde os elementos parenquimais e estromais podem ser eliminados e posteriormente regenerados de novo a partir de precursores rudimentares, são muito semelhantes aos primeiros eventos do desenvolvimento que ocorrem no período perinatal. Estas interações a curtas distâncias (parácrinas) entre epitélio e estroma, que são de importância fundamental durante a morfogênese no embrião, estão claramente envolvidas na homeostase do órgão adulto (CUNHA, 1985).

As dificuldades na interpretação dos eventos que ocorrem no estroma prostático durante a involução devem-se ao pouco conhecimento dos seus constituintes e, ao menos em parte, por não haver na próstata a predominância de alguns poucos componentes como ocorre em tendões, onde há predominância de colágeno do tipo I; e também em cartilagens, onde os constituintes mais abundantes são o colágeno do tipo II e os grandes proteoglicanos.

Neste sentido, a caracterização inicial do estroma prostático apresentada neste trabalho mostrou a presença de alguns componentes e suas modificações frente à castração, de modo que o prosseguimento deste estudo parece ser fundamental para a melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na remodelação da próstata.

---

**CONCLUSÕES**

A análise dos resultados apresentados neste trabalho levou-nos a concluir que, durante o processo de involução, o estroma sofre um processo notável de remodelação. Esta remodelação ocorre através da síntese e/ou rearranjo de alguns dos componentes do estroma e consistem principalmente de:

1. Um aumento do número e da espessura das camadas de células musculares lisas e modificação do seu fenótipo contrátil para fenótipo sintético, sugerindo seu envolvimento na síntese de componentes da matriz extracelular.
2. Um aparente aumento da quantidade de fibras do sistema elástico que pode estar associado à redução no tamanho do órgão.
3. Um aumento da quantidade e da compactação das fibras de colágeno.
4. Um aumento na imunorreatividade do queratam sulfato e perda de condroitim sulfato na membrana apical das células epiteliais

Pudemos concluir também que as microfibrilas de colágeno do tipo VI são constituintes importantes da matriz extracelular do estroma da próstata ventral de ratos, onde associa-se com diversos componentes, e que as microfibrilas são relativamente resistentes à castração.

---

**RESUMO**

A próstata é a glândula de maior volume e expressividade funcional anexa ao aparelho reprodutor masculino de mamíferos. Histologicamente é constituída de porções glandulares túbulo-alveolares. Em roedores, a glândula prostática está representada por pares de lobos ventrais, dorsais e laterais. O desenvolvimento embrionário e pós-natal, bem como a manutenção da estrutura e do funcionamento da próstata, são eventos dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes. A remoção destes andrógenos em animais adultos leva a próstata a um processo de involução que inclui uma redução de tamanho e diminuição ou perda da função secretora. O fato de a próstata humana ser o sítio de um grande número de doenças, nas quais os hormônios exercem um papel importante na etiologia, levou à necessidade de se conhecer as respostas deste órgão frente à ação hormonal em diferentes condições fisio-patológicas. O presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos da remoção de andrógenos, por orquiectomia, sobre alguns componentes do estroma da próstata ventral de ratos adultos (*Rattus rattus norvegicus*), uma vez que as alterações decorrentes da castração no compartimento epitelial já são bem conhecidas e ainda pouco se sabe sobre as modificações no compartimento estromal. A identificação de alguns dos componentes da matriz extracelular foi efetuada utilizando-se métodos de rotina: hematoxilina-eosina e azul de toluidina, métodos histoquímicos, resorcina-fucsina de Weigert, para o sistema elástico; tricrômico de Masson e picrossírius-hematoxilina, para fibras colágenas; impregnação pela prata para fibras reticulares; métodos imuno-histoquímicos, para detecção de glicosaminoglicanos(queratam sulfato e condroitim sulfato), e métodos ultra-estruturais. A análise dos efeitos da castração sobre o estroma foi efetuada em próstatas removidas aos 7, 14 e 21 dias após a castração. Os resultados demonstraram que após a castração ocorrem modificações no compartimento estromal, como o aumento da densidade dos componentes celulares e fibrilares tais como células musculares lisas e fibras do sistema elástico e colágenas, respectivamente. Observaram-se ainda um aumento da imunorreatividade do queratam sulfato e perda da imunorreatividade do condroitim sulfato na membrana apical das células epiteliais. Da análise dos componentes fibrilares foi possível observar um aumento na quantidade e espessura das fibras do sistema elástico e um aumento e uma maior agregação das

fibras colágenas após a castração. Além da hiperplasia, observou-se que as células musculares lisas apresentaram fenótipos diferenciados, assumindo características ultra-estruturais de células sinteticamente ativas, nas condições de privação hormonal. Este fato indica que este tipo celular pode estar diretamente envolvido na síntese de alguns componentes macromoleculares do estroma prostático. As interações entre mesênquima e epitélio que ocorrem durante a morfogênese têm sua importância reconhecida, entretanto não se pode negligenciar a importância destas interações nos processos de manutenção e remodelação do estroma no órgão maduro. Neste sentido, o aprofundamento do conhecimento sobre a matriz extracelular, com base nos resultados obtidos neste trabalho, parece ser de grande importância.

---

**ABSTRACT**

The prostate is an accessory gland of the mammalian reproductive system with great volume and high functional importance. Histologically, it is a tubuloalveolar gland. In rodents, the prostatic gland is composed of paired ventral, dorsal and lateral lobes. The embryonic and post-natal development, and the maintenance of the prostatic structure and physiology are dependent on stable levels of circulating androgens. The removal of these androgens in adult animals leads to an involution process, characterized by a reduction in size and a decrease or loss of the secretory function. The fact that the human prostate is the site of a number of diseases, which are in many cases also dependent of hormonal regulation, stimulates the investigation on the response of this organ to different hormonal therapies. This study was developed to verify the effects of androgen withdrawal, by orchietomy, on some components of the rat ventral prostate. The identification of some extracellular matrix components was performed using routine procedures such as haematoxylin-eosin and toluidine blue staining; histochemical methods as Weigert's resorcin-fuchsin for elastic system fibers; Masson's trichrome and picrosirius-haematoxylin, for collagen fibers; silver impregnation for reticular fibers; immunohistochemical methods for keratan sulfate and chondroitin sulfate detection and ultrastructural methods. The castration effects on some of the stromal components were examined on prostates removed at the 7, 14 and 21 days after castration. The results showed that castration promotes modifications in the stromal compartment, such as an increased density of cellular (smooth muscle cells) and fibrillar (collagen and elastin) components. It was possible to identify an increase in the amount and thickness of elastic system fibers and an increase in the number and compactness of collagen fiber. The smooth muscle cells presented differentiated phenotypes, attaining ultrastructural features of synthetically active cells. This fact indicates that these cells may be directly involved in the synthesis of some macromolecular components of the prostatic stroma. There is also an increase in keratan sulfate immunoreactivity and loss of reactivity for chondroitin sulfate at the apical membrane of epithelial cells. The mesenchymal-epithelial interactions are important during morphogenesis and they cannot be neglected in the maintenance and remodelling processes of

the adult organ. Thus, continuing studies on the extracellular matrix, based on our studies, seems to be of great importance.

---

## REFERÊNCIAS

- ABOU-ELMAGD A, WROBEL K, 1989. The periurethral glandular complex in the water buffalo: an ultrastructural, histological and lectin-histochemical study. *Arch Histol Cyto* **52**: 501-512.
- ALBERTS B; BRAY D; LEWIS J; RAFF M; ROBERTIS K, WATSON JD, 1994. *Molecular Biology of the cell*. 3ed., Garland Publish.Inc., New York, 1294pp.
- ALVES MLM, STRAUS AH, TAKAHASHI HK, MICHELACCI YM, 1995. Monoclonal antibody directed to shark cartilage proteoglycans that recognizes keratan sulfate chains. *Resumo da XXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. p. 148.
- AMENTA PS, GIL J, MARTINEZ-HERNANDEZ A, 1988. Connective tissue of rat lung II. Ultrastructural localization of collagens types III, IV and VI. *J. Histochem Cytochem* **36**: 1167-1173.
- AUMAILLEY M, SPECKS U, TIMPL, R, 1991. Cell adhesion to type VI collagen. *Biochem Soc Trans* **19**: 843-847.
- AUMÜLLER G, SEITZ J, 1990 Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* **121**: 127-231.
- BASSET P, OKADA A, CHENARD MP, KANNAN R, STOLL I, ANGLARD P, BELLOCQ JP., RIO MC, 1997. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol* **15**: 535-541.
- BATEMAN JF, LAMANDÉ SR, RAMSHAW JAM, 1996. Collagen superfamily. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix - Molecular components and interactions*. Vol. 2. . Harwood, New York.
- BEHMER OA; TOLOSA EMC, FREITAS-NETO AG, 1976. *Manual para histologia normal e patológica*. Edart-Edusp, São Paulo, 225p.
- BLOOM FE., AGHAJANIAN GK, 1968. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junction with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res* **22**: 361-375.

- BODE-LESNIEWSKA B, DOURS-ZIMMERMANN MT, ODERMATT BF, BRINER J, HEITZ PU, ZIMMERMANN DR, 1996. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem* **44**: 303-312.
- BOUDREAU N; BISSEL MS, 1996. Regulation of gene expression by the extracellular matrix. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix - Molecular components and interactions*. Vol. 2. . Harwood, New York.
- BRANDES,D, 1966. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol* **20**: 207-276.
- BRUNS RR, PRESS W, ENGVALL E, TIMPL R, GROSS J, 1986. Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **103**, 393-404.
- CARVALHO, HF, LINE, SRP, 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* **20**: 809-819.
- CLEARY EG, GIBSON, MA, 1996. Elastic tissue, elastin and elastin associated microfibrils. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix - Molecular components and interactions*. Vol. 2. . Harwood, New York.
- COLOMBATTI A, BONALDO P, 1987. Biosynthesis of chick type VI collagen. II. Processing and secretion in fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem* **262**: 14461-14466.
- 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.

- COTTA-PEREIRA G, RODRIGO FG, DAVID-FERREIRA JF, 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* **51**: 7-11.
- CUNHA GR, 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.
- DOANE KJ, YANG L, BIRK D, 1992). Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts. *Exp Cell Res* **200**: 490-499.
- DONJACOUR AA, CUNHA GR, 1988. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* **128**: 1-14.
- DROLLER MJ, 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol*, **79 (Suppl.) 2**: 42-52.
- ECHEVERRÍA O; SANTINI RP, NIN GV, 1991. Effects of testosterone on nuclear ribonucleoprotein components of prostate epithelial cells. *Biol Cell* **72**: 223-229.
- ENGVALL E, HESSLE H, KLIER G, 1986. Molecular assembly, secretion and matrix deposition of type VI collagen. *J Cell Biol* **102**: 703-710.
- EMERMAN JT, PITELKA DR, 1977. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In vitro* **13**: 316-328.

- FLICKINGER CJ, 1972. The fine structure of the interstitial tissue of the rat prostate. *Am J Anat*, **134**: 107-125 *apud* HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA, GR, 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 (Suppl.2)**: 18-26.
- FOSANG AJ, HARDINGHAM TE, 1996. Matrix proteoglycans. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix - Molecular components and interactions*. Vol. 2. . Harwood, New York.
- 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.
- GALLAGHER JT, LYON, M, STEWARD WP, 1986. Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. *Biochem J* **263**: 313-325.
- 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.
- GOLDFICHER S, COLTOFF-SCHILLER B, SCHWARTZ E, BLUMENFELD OO, 1983. Ultrastructure and staining properties of aortic microfibrils (oxytalan). *J Histochem Cytochem* **31**: 382-390.
- GUENETTE RS, TENNISWOOD M, 1994). The role of growth factors in the supression of active cell death in the prostate: an hypothesis. *Biochem Cell Biol* **72**: 553-559.
- GUYTON AC, 1984. *Tratado de Fisiologia Médica*. 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 926pp.
- HAYWARD S.W, BASKIN LS, HAUGHNEY PC, FOSTER, BA, CUNHA AR, DAHIYA R, PRINS GS, CUNHA GR, 1996a. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta anat* **155**: 94-103.

- HAYWARD SW, BASKIN LS, HAUGHNEY PC, CUNHA AR, FOSTER BA, DAHIYA R, PRINS GS, CUNHA GR 1996b. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta anat*, **155**: 81-93.
- HAYWARD SW, BRODY JR, CUNHA GR, 1996c. An edgewise look at basal epithelial cells: three-dimensional views of the rat prostate, mammary gland and salivary gland. *Differentiation* **60**: 219-227.
- HAYWARD SW, ROSEN MA, CUNHA GR, 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79 (Suppl.2)**: 18-26.
- HEINEGÅRD D, PAULSOON M, 1984. Structure and metabolism of proteoglycans. In: PIEZ KA, REDDI, AH, eds. *Extracellular matrix biochemistry*. Elsevier, New York., 473p.
- HOLTERHUS PM, ZHAO GQ, AUMÜLLER G, 1993. Effects of androgen deprivation and estrogen treatment on the structure and protein expression on the rat coagulating gland. *Anat Rec* **235**: 223-232.
- 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.
- 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.
- ITOH N., PATEL U, SKINNER MK, 1998a. Developmental and hormonal regulation of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells. *Endocrinology* **139**: 1369-1377.
- ITOH N, PATEL U, CUPP AS, SKINNER MK, 1998b. Developmental and hormonal regulation of transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1), -2, and -3 gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells: epidermal growth factor and TGFbeta interactions. *Endocrinology* **139**: 1378-1388.
- 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 off the rat prostate. *Prostate* **3**: 81-97.
- JI P, KARIN OMA, BOYD CD, MOSTWIN JL, WARD WS, 1995. Elastin morphology in normal and obstructed guinea-pig bladders: Localization of elastin to the trigone. *Word J Urol* **13**: 191-194.
- JOHANSSON S, 1996. Non-collagenous matrix proteins. In: Wayne Comper, eds. *Extracellular matrix - Molecular components and interactions*. Vol. 2. . Harwood, New York.
- 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.
- JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J, 1995. *Histologia Básica*. 8ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro., 433p.
- KERR JFR, SEARLE J, 1973. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch Abt B Zellpathol* **13**: 87-102.
- KIELTY CM, BOOT-HANDFORD RP, AYAD S, SHUTTLEWORTH CA, GRANT ME, 1990. Molecular composition of type VI collagen. Evidence for chain heterogeneity in mammalian tissues and cultured cells. *Biochem J* **272**: 787-795.
- KIELTY CM, WHITTAKER SP, GRANT ME, SHUTTLEWORTH CA, 1992. Attachment of human vascular smooth muscle cells to intact assemblies of collagen type VI and fibrillin. *J Cell Sci* **103**: 445-451.
- KLOCKER H; CULIG Z; KASPAR F, HOBISCH A; EBERLE J; RESSIGL A, BARTSCH G, 1994. Androgen signal transduction and prostatic carcinoma. *World J. Urol*, **12**: 99-103.
- KOBAYASHI M, 1995. Tissue localization and possible function of type VI collagen. *Acta Anat Niponica* **70**: 298-306.

- KOFOED JA, TUMILASCI OR, CURBELO HM, FERNANDEZ LEMOS SM, ARIAS NH, HOUSSAY AB, 1990. Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. *Prostate* **16**: 93-102.
- LEE C, SENSIBAR JA, DUDEK SM, HIIPAKKA RA, LIAO S, 1990. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* **43**: 1079-1086.
- LEE C, GOOLSBY CL., SENSIBAR J A, 1994. Cell cycle kinetics in rat prostatic epithelia: nuclear migration during G2 phase. *J Urol* **152**:2294-2299.
- LIU X, WU H, BYRNE M, KRANE S, JAENISCH R, 1997. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sc. USA* **94**: 1852-1856.
- 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.
- von der MARK H, AUMAILLEY M, WICK G, FLEISHMAJER R, TIMPL R, 1984. Immunocytochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur J Biochem* **142**: 493-502.
- MARTINEZ FE; GARCIA PJ; PADOVANI CR; CAGNON VHA, MARTINEZ M, 1993. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate* **22**: 327-324.
- MASSAGUÉ J, 1991. A helping hand from proteoglycans. *Curr Op Cell Biol*, **1**: 117-119
- MELLO MLS, VIDAL BC, 1980. *Práticas de biologia celular*. Edgard Blücher-Funcamp, Campinas,. 71p.
- MICHELLACCI YM., 1996. *Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e mucopolissacaridasas bacterianas*. Tese de Livre Docência, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP., p. 1-59.

- MIYAMOTO T, KAGAWA S, KITAGAWA K, FUTAKI S, YOKOI H, TSURUO Y, ISHIMURA K, 1996. Immunocytochemical localization of 5 $\alpha$ -reductase type 1 in the prostate of normal and castrated rats. *Histochem Cell Biol*, **105**: 101-109.
- MONTES GS, 1992 Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibers in tissues. *Ciênc Cult* **44**: 224-233.
- NAKADA T; KUBOTA Y; SASAGAWA I; SUZUKI H; WATANABE M, SUZUKI Y, 1994. The effects of oestradiol-17 beta on connective tissue protein in rat prostate. *Int Urol Nephrol* **26**: 327-335.
- NAKAMURA M, KOBAYASHI M, HIRANO K, KOBAYASHI K, HOSHINO T, AWAYA S, 1994. Glycosaminoglycans and collagen fibrillar interactions in the mouse corneal stroma. *Matrix Biol* **14**: 283-286.
- NEMETH JA, LEE C, 1996. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* **28**: 124-128.
- NETTER FH, 1965. *Reproductive system* - The Ciba collection of medical illustration. 5ed. CIBA,., New York, 286p.
- NISHI N, OYA H, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, MIYANAKA H, WADA F, 1996. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostates. *Prostate* **28**: 139-152.
- ORTIZ E, 1953. The effects of castration on the reproductive system of the golden hamster. *Bull Zool Lab.*, Univ. Chicago, 65-95.
- POWELL WC, DOMMAN FE, MITCHEN JM, MATRISIAN LM, NAGLE RB, BOUDEN GT, 1996. Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* **29**: 159-168.
- 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.

- PRINS GS, BIRCH L, GREENE GL, 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* **129**:3187-3199.
- RAUCH F, POLZAR B, STEPHAN H, 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.
- REICHENBERGER E, OLSEN BR, 1996. Collagens as organizers of extracellular matrix during morphogenesis. *Sem Cell Develop Biol* **7**: 631-638.
- van der REST M, GARRONE R, 1991. Collagen family of proteins. *FASEB J* **5**: 2814-2823.
- RICCIARDELLI C, MAYNE K, SYKES PJ, RAYMOND WA, McCAUL K, MARSHALL VR, TILLEY WD, SKINNER JM, HORSFALL DJ, 1997. Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res* **3**: 983-982.
- 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.
- von SAAL FS, TIMMS BG, MONTANO MM, PALANZA P, THAYER KA, NAGEL SC, DHAR MD, GANJAM VK, PARMIGIANI S, WELSHONS WV, 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Physiology* **94**: 2056-2051.
- SIKORSKY A, KMIEC R, 1982. Late changes in the ventral lobe of the rat prostate after the removal of bulbo-urethral glands or seminal vesicles. *Folia Morphol (Warsz)* **12**: 49-62.
- 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.
- SUGIMURA Y, CUNHA GR, DONJACOUR AA, 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* **34**: 961-971.

- TERRY DE, CLARK AF, 1996a. Influence of testosterone on chondroitin sulphate proteoglycan in the rat prostate. *Biochem Cell Biol* **74**: 645-651.
- TERRY DE, CLARK AF, 1996b. Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. *Biochem Cell Biol* **74**: 653-658.
- 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.
- VOOGT HJ; RAO BR; GELDOLF AA; GOOREN LJG, BOUMAN FG, 1987. Androgen action blockade does not result in reduction in size but changes histology of the human prostate. *Prostate* **11**: 305-311.
- WATSON ML, 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* **4**: 475-478.
- 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
- YAMASHITA A, HAYASHY N, SUGIMURA Y, CUNHA GR, KAWAMURA J, 1996. Influence of diethylstilbestrol, leuprolelin (a luteinizing hormone-releasing hormone analog), finasteride (a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor) and castration on the lobar subdivisions of the rat prostate. *Prostate* **29**:1-14.
- ZAIA AA, COLETTA RD, ALMEIDA OP, LINE SRP, 1996. Expression of collagen and elastic fibers in duct-ligated submandibular glands of mice. *Eur J Oral Sci*, **104**: 627-629.
- ZHAO GQ, HOLTERHUS PM, DAMMSHÄUSER I, HOFFBAUER G, AUMULLER G, 1992. Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in the stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* **21**: 183-199.

---

Parte dos resultados desta tese constam das seguintes publicações:

CARVALHO HF; VILAMAIOR PSL, TABOGA SR, 1997. Elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchietomy. *Prostate* **32**: 27-34.

CARVALHO HF; TABOGA SR, VILAMAIOR PSL, 1997. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue cell* **29** : 163-170.