

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Ana Maria Galvan Custódio

EXPRESSÃO DA FOSFATASE ÁCIDA NA PRÓSTATA DURANTE  
O ENVELHECIMENTO DE *Meriones unguiculatus* (MURIDAE,  
GERBILINAE): COMPARAÇÃO ENTRE MACHOS E FÊMEAS

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Ana Maria Galvan Custódio  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof.Dr. Sebastião Roberto Taboga

2003/01/15

UNIDADE	02
Nº CHAMADA	
	<i>IL Unicamp</i>
	<i>C 969e</i>
V	EX
TOMBO BCI	<i>55126</i>
PROC.	<i>16-124103</i>
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<i>R\$ 11,00</i>
DATA	<i>07/08/03</i>
Nº CPD	

CM00187296-4

*Bib id 297792*

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

**C969e**

**Custódio, Ana Maria Galvan**

Expressão da fosfatase ácida na próstata durante o envelhecimento de *Meriones unguiculatus* (Muridae, Gerbilinae): comparação entre machos e fêmeas/ Ana Maria Galvan Custódio. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

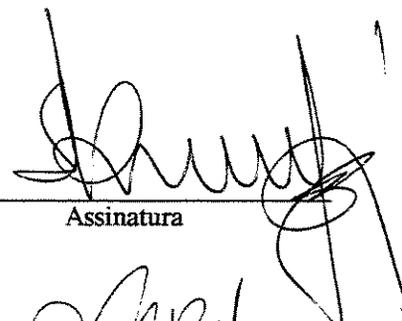
Instituto de Biologia

1.Prostata. 2.Fosfatase acida. 3.Citoquímica. I.Custódio, Ana Maria Galvan.  
II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

**Campinas, 24 de Janeiro de 2003.**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



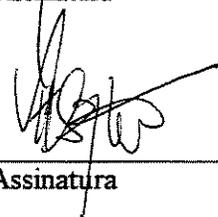
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Reis Ferreira



Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Assinatura

Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira pelo carinho, atenção, dedicação não só como professor, mas como tutor do Programa Especial de Treinamento-PET, de onde adquiri base profissional e ética...

À Ana Paula Oliveira e ao Robson Carvalho (Botucatu) pela amizade e contribuição inicial ao meu trabalho de mestrado...

À Maria Astrid Saad Corradi pelo exemplo de ser humano, carinho, atenção, disponibilidade em auxiliar no momento necessário...

Aos professores da Graduação e Pós-Graduação pela arte de ensinar...

À querida Lílíam Panagio pela paciência, disposição, carinho, simpatia com que sempre nos trata... cuidando para que tudo seja resolvido da melhor forma...

Aos membros da banca pela atenção e sugestões fornecidas para o aprimoramento do trabalho...

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

**Em especial, sou grata**

Aos meus pais, Wilson e Velmira, pelo amor, oportunidades oferecidas... e tudo aquilo que contribuiu e ainda contribui para a formação e enriquecimento de minha essência...

Aos meus irmãos, Wilson (Manão) e Wilton (~~Maninho~~) pelo amor que nos faz torcer um pelo outro, carinho, incentivo...

Às minhas cunhadas: Regina, pelo ombro amigo que sempre me acolhe e sensatez com que me mostra a vida; à Carla pela tranquilidade e carinho de nosso convívio...

Aos meus sobrinhos, Gustavo: pela torcida e interesse em minha vida profissional, à Nayá e ao Gabriel, pelo carinho de cada momento...

Ao meu namorado Paulo, não só pelo sentimento verdadeiro que nos une, mas pelo exemplo de determinação, apoiando-me sempre. E a sua família pelo carinho...

À minha Madrinha Sandra e sua família, pelo colo amigo e afetuoso e pela torcida.... Ao meu Padrinho Robson e sua família, pelo incentivo... Ao meu Tio Idevaldo, Tia Cida e primos pelo afeto... À minha Prima Rosana e família pela estima...

Aos meus grandes amigos, Analice Teixeira da Costa Silva (Ninon), Antônio Márcio Rodrigues de Fácio (De Márcio) e Francisco de Paula Athayde Fº (Xikão) pelo carinho, dedicação, apoio transmitido através desta sincera amizade. Obrigada pelo total incentivo e ombro amigo nos momentos mais oportunos...

A Deus pelo Dom da vida ! E pela Luz que orienta o dia a dia ...

**Dedico:**

À memória de meu avô Gustavo  
que, com todo zelo contribuiu para a  
formação do meu caráter.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Chaplin

## Sumário

Resumo .....	10
Abstract .....	11
Introdução .....	12
1. Características gerais da próstata .....	12
2. A glândula prostática do gerbilo .....	14
3. Características da enzima fosfatase ácida .....	15
Objetivo .....	18
Artigo .....	19
1. Atividade fosfatásica ácida na próstata do gerbilo ( <i>Meriones unguiculatus</i> ): estudo comparativo em machos e fêmeas durante o desenvolvimento pós- natal .....	
Conclusões gerais .....	43
Referências bibliográficas .....	44

---

---

## RESUMO

---

---

A glândula prostática não é um órgão exclusivo do aparelho reprodutor masculino. Inicialmente conhecida como glândula de Skene, estudos demonstraram que a próstata feminina está presente em várias espécies de roedores e em humanos. Evidências embriológicas e histoquímicas comprovaram a homologia entre os dois órgãos. Em ambos os sexos, a próstata é composta por elementos epiteliais, estromais e neuroendócrinos cuja diferenciação e cujo desenvolvimento estão sob a regulação hormonal. Muitas alterações fisiopatológicas do complexo prostático masculino podem se manifestar no órgão feminino. As fosfatases ácidas são enzimas difundidas na natureza podendo ser encontradas em animais e plantas. Pertencentes à classe das hidrolases apresentam habilidade de catalisar, em condições ácidas, a hidrólise de monoésteres ortofosfato. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a expressão da fosfatase ácida nas próstatas femininas e masculinas de *Meriones unguiculatus* durante as fases do desenvolvimento pós-natal. Para isso, as próstatas de 18 animais foram removidas, congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas em criostato e submetidas à incubação com o substrato sintético  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. O controle da reação foi obtido incubando o material sem o substrato e com o inibidor NaF (fluoreto de sódio) adicionado a este. Após a reação citoquímica, as lâminas foram contra coradas com Metil-Green para a análise à microscopia de luz. A verificação ultra-estrutural da atividade enzimática nos compartimentos celulares também foi realizada. A intensidade da atividade fosfatásica ácida permitiu distinguir quatro categorias de marcações nas próstatas de ambos os sexos: ácinos com marcação forte, intermediária, fraca e ausente. Nossos resultados apontaram atividade fosfatásica ácida em todas as idades do desenvolvimento pós-natal. A próstata feminina apresentou maturidade biológica e funcional anterior à masculina. Em ambos os sexos, ao longo do desenvolvimento pós-natal do animal, foram verificados a dependência da atividade fosfatásica ácida aos níveis de testosterona.

---

---

## ABSTRACT

---

---

The prostate gland is not an exclusive organ of the male reproductive system. Initially known as Skene's gland, studies have demonstrated that the female prostate is present in several rodents and in human specie. Embryological and histochemical evidences have been proposed by the homology between these organs. Secretory epithelium, connective stroma, smooth muscle cells and neuroendocrine elements compose the female and male prostate gland. Androgen levels regulate the differentiation, development and maintenance of these structures. Some pathological alterations in the prostate gland may occur in the both male and female, however the existence of this organ in the female has been neglected. Acid phosphatase is a family of enzymes that are widespread in nature, and can be found in many animal and plant species. By Gömöri's method, the use of the  $\beta$ -glycerophosphate was employed to analyze the acid phosphatasic activity in the female and male prostates of *Meriones unguiculatus* gerbil during the postnatal development. Eighteen animals were employed and their prostates, immediately after the removal, were frozen at liquid nitrogen, sectioned in Leica cryostat and incubated in sodium  $\beta$ -glycerophosphate substrate. The controls of the reaction were obtained by incubation without the substrate and with the inhibitor sodium fluoride added at the incubation media. After the reaction, the material was stained by methyl green. The ultrastructural analyses of the acid phosphatase activity were employed. In the both sexes, the acid phosphatase reaction intensity was classified in four categories: acini with high, intermediate, low and absent acinar demarcation. Ours results revealed that the maturation of the female prostate occurs previously to the male prostate. These data reinforce the dependence, in both sexes, of the acid phosphatase activity and of the androgen levels during the postnatal development. In addition, our results demonstrate that the female prostate is a gland functionally active in the female organism.

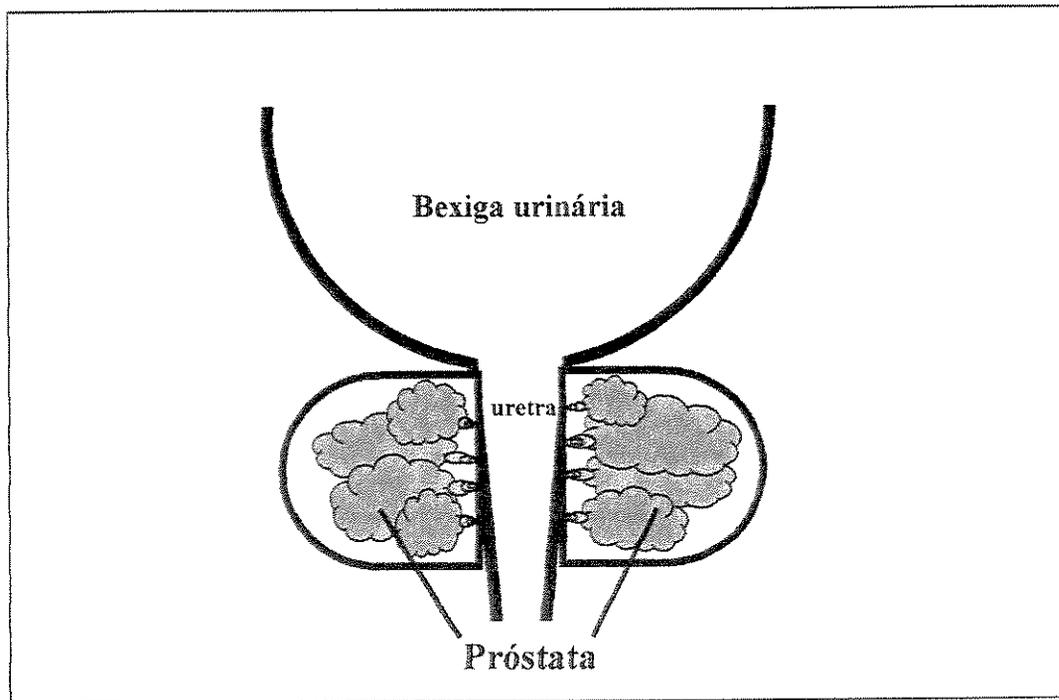
### 1. Características gerais da próstata humana

A próstata humana é um órgão glandular composto por elementos epiteliais, estromais e neuroendócrinos cuja diferenciação e desenvolvimento estão sob a regulação hormonal (Nelson *et al.*, 1998). Presente em várias fêmeas de roedores e também na espécie humana, a próstata não é um órgão exclusivamente masculino. Inicialmente conhecida como glândula de Skene, a próstata feminina é homóloga à masculina com origem embrionária a partir do sino urogenital (Zaviacic, 1999).

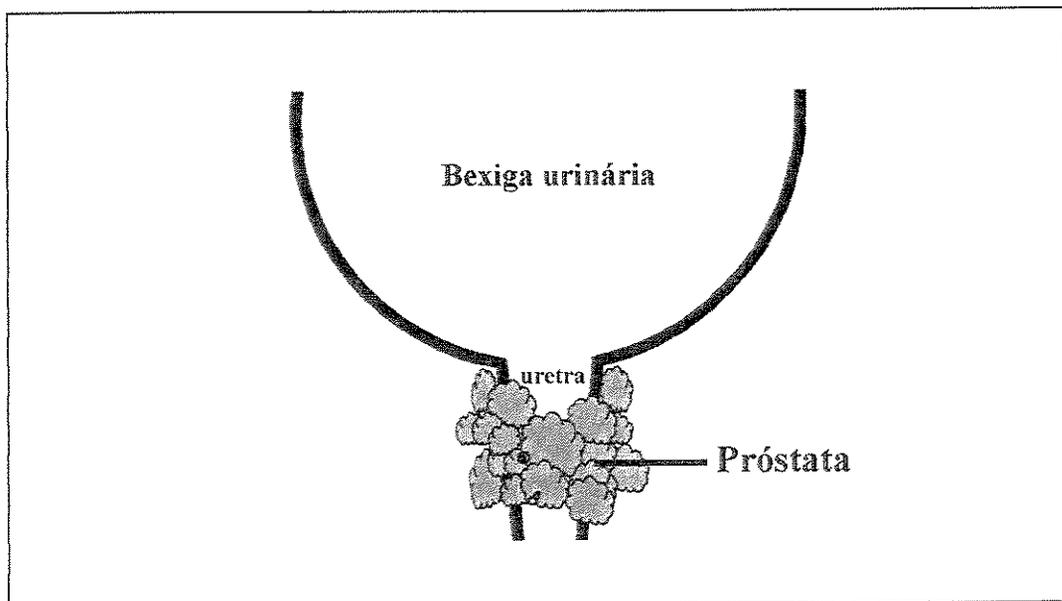
A diferença macroscópica entre a próstata feminina e masculina humana está em sua localização. No macho (Fig. 1a), a próstata situa-se na primeira porção da uretra, sendo esta praticamente o centro do órgão, ao passo que a próstata feminina (Fig. 1b) encontra-se intimamente ligada à parede da uretra. A espessura e o comprimento da uretra feminina limita o tamanho da próstata (Zaviacic, 1999).

A próstata masculina humana é uma glândula túbulo alveolar composta sendo a porção alveolar secretora. Os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (Reese *et al.*, 1996). Entremendo as porções glandulares existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com esparsas fibras conjuntivas (Carvalho *et al.*, 1996) e células musculares lisas que têm papel contrátil durante a ejaculação (Ross *et al.*, 1993). No tecido estromal estão presentes nervos e terminações nervosas. Uma fina cápsula fibromuscular envolve o órgão conferindo suas diferentes formas nos diversos mamíferos já estudados.

A próstata é a glândula mais volumosa e de maior expressividade funcional no aparelho reprodutor masculino, responsável pela secreção de um líquido fino de aspecto leitoso que compõe o volume seminal (Nettre, 1965). Tal secreção apresenta propriedades importantes para o processo de fertilização, colaborando com a neutralização do meio e contribuindo com o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (Guyton, 1984). Kratochvil (1994) descreve a constituição da secreção da próstata feminina, análoga



**Figura 1a:** Representação esquemática da localização periuretral da próstata masculina humana. Esquema segundo descrições de Zaviacic (1999).



**Figura 1b:** Representação esquemática da localização e distribuição dos ácinos da próstata feminina humana. Esquema baseado em descrições de Zaviacic (1999).

à secreção prostática masculina e sua importância durante o orgasmo feminino.

A próstata feminina humana é composta pelos mesmos componentes da masculina: glândula, ductos e musculatura lisa, havendo maior número de ductos (Zaviacic, 1999). A glândula prostática é túbulo alveolar revestida por células cúbicas ou cilíndricas, moderadamente altas. Glândulas e ductos estão embutidos num tecido muscular fibroso e vascularizado, proveniente da mucosa estromal da uretra (Zaviacic *et al.*, 2000).

Vários fatores afetam a próstata levando-na a alterações fisiopatológicas. Além dos fatores genéticos, raciais e alimentares, o declínio hormonal decorrente da idade contribui sobremaneira para a etiologia das doenças prostáticas. Muitos sintomas de doenças ditas do complexo prostático masculino podem se manifestar na próstata da fêmea porém, a ausência de informações e de estudos negligenciam este fato (Zaviacic, 1999). Técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas têm demonstrado ser a glândula parauretral uns dos tecidos de origem do adenocarcinoma na uretra feminina. Marcações uniformes positivas do PSA (antígeno específico prostático) no adenocarcinoma primário uretral comprovam essa origem (Dodson *et al.*, 1995).

## **2. A glândula prostática do gerbilo**

A próstata masculina do *Meriones unguiculatus* desperta o interesse biológico e biomédico pela sua morfologia semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e fusão dos seus lobos (Zanetoni, 2002). Enquanto o órgão feminino apresenta semelhança estrutural e fisiológica à próstata humana (Santos, 2002).

Anatomicamente, destaca em seu aparelho reprodutor masculino um par de testículos dos quais partem umas redes testiculares que se prendem cada uma, a um epidídimo amplamente convoluto, que estão envoltos por uma cápsula conjuntiva bastante resistente. A glândula prostática masculina está constituída de dois lóbulos amarelados ventrais à bexiga urinária, exatamente no ponto em que a uretra recebe dois ductos espermáticos. Estes lobos estão ligados na junção da bexiga com as vesículas seminais (Williams, 1974). Nas fêmeas, a próstata possui uma localização parauretral, estando em íntimo contato com

a parede da uretra, nas porções mediana e distal, sendo em peso, 10% da próstata masculina (Santos, 2002).

Histologicamente a próstata masculina do gerbilo apresenta um epitélio prismático simples composto por células secretoras. Entremendo as porções glandulares, o ácino, há um estroma conjuntivo vascularizado e com abundante musculatura lisa e uma relativa pobreza de fibras colágenas e elásticas entremendo à musculatura lisa (Zanetoni, 2002).

A próstata feminina possui os mesmos constituintes da próstata masculina: ácinos e ductos que se inserem numa matriz músculo-fibrosa. Onde os ductos revestidos pelo epitélio cúbico simples localizam-se mais próximos à uretra, formando aglomerados que se inserem na musculatura uretral. As unidades secretoras prostáticas, denominadas ácinos são constituídas por estruturas alveolares ou túbulos alveolares, revestidas por um epitélio cúbico simples ou alto cilíndrico localizados em porções mais distais da uretra podendo variar em forma e tamanho. Estes estão embebidos em um tecido músculo-fibroso altamente vascularizado. Havendo uma grande quantidade de fibras musculares lisas envolvendo o ácino, enquanto espessas fibras musculares esqueléticas são encontradas em regiões mais profundas do estroma ou na base do epitélio (Santos, 2002). Uma característica marcante da próstata feminina é a ausência de tecido capsular organizado.

### **3. Características da enzima fosfatase ácida**

Enzimas são proteínas de forma tridimensional com a função de acelerar as reações químicas no local em que ocorrem, principalmente dentro das células, ou seja, são catalisadores biológicos (Bull *et al*, 2002). O resultado da reação é uma mudança específica do substrato criando uma nova molécula química ou um produto. Izoenzimas são proteínas com atividade enzimática que catalisam reações similares, mas diferem em certas propriedades fisicoquímicas (Romas *et al.*, 1993).

As enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação química que realizam. As transferases, isomerases, ligases, oxidases, liases e as hidrolases. Esta última quebra moléculas químicas tendo sempre a água como parte do processo. As fosfatases ácidas são enzimas pertencentes à classe das hidrolases com habilidade de

catalisar em condições ácidas a hidrólise de monoésteres ortofosfato (Bull *et al.*, 2001). Podem ser diferenciadas de acordo com propriedades estruturais, catalíticas, imunológicas, distribuição no tecido e localização subcelular (Suter *et al.*, 2001).

As fosfatases ácidas estão presentes em maiores concentrações no tecido e secreção prostática, mas também são encontradas em eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fígado, baço, rins, ossos e outros tecidos humanos (Cerri *et al.*, 1999). Tenniswood e colaboradores (1976) acreditam que a próstata é o principal órgão que secreta fosfatase ácida, sendo sua síntese dependente de andrógeno.

Cinco importantes fosfatases ácidas humanas são identificadas: fosfatase ácida prostática (PAP); fosfatase ácida lisossomal (LAP); fosfatase ácida eritrocitária (EAP); fosfatase ácida do macrófago (MAP) e a fosfatase ácida osteoclástica (OcAP) (Bull *et al.*, 2001).

A fosfatase ácida lisossomal (LAP) é um monoéster ortofosfórico do compartimento endossomo/lisossomo. É expressa pelo cromossomo 11, com massa molecular de 100kDa e uma seqüência de 423 aminoácidos. In vitro, a LAP quebra fosfomonoésteres (adenosina monofosfato, timolftaleína fosfato e glicose-6-fosfato) no pH ácido (3,5-5,0). Esta fosfatase é fundamental para o catabolismo de um ou vários substratos no lisossomo (Satftig *et al.*, 1997). A deficiência da fosfatase ácida lisossomal é uma doença autossômica recessiva. As características clínicas da doença incluem vômito intermitente, letargia, hipotonia e hemorragia terminal na primeira infância. Outros casos estudados mostram que esta deficiência pode limitar os glóbulos brancos resultando em infecções recorrentes (Bull *et al.*, 2001). Muitas doenças lisossomais levam a manifestações morfológicas, bioquímicas e clínicas causadas pelo armazenamento do conteúdo lisossômico resultante da inativação de uma ou várias proteínas lisossomais (Satftig *et al.*, 1997).

A fosfatase ácida prostática humana é um antígeno de diferenciação específico da próstata. Expressa pelo cromossomo 3 essa glicoproteína dimérica possui massa molecular de 100kDa e uma seqüência de 345 amino ácidos (Bull *et al.*, 2001 e Lin *et al.*, 1993). Esta enzima catalisa a transferência de um grupo fosfato do monoéster para a água (hidrólise) ou para o álcool (transfosforilação) em solução ácida. A fosfatase ácida prostática (PAP) é

sintetizada pelo epitélio da glândula prostática e secretada no fluido seminal (Luchter e Ostrowski, 1974). A glândula prostática libera-a no soro em maiores quantidades quando há proliferação do tecido malignizado, sendo usada como um marcador sorológico do câncer de próstata (Bull *et al.*, 2001).

Embora muitos estudos de natureza bioquímica, citoquímica e até molecular destas enzimas na próstata tenham sido realizados, pouco se sabe sobre o comportamento destas ao longo do desenvolvimento pós-natal comparando suas atividades em ambos os sexos.

---

---

## OBJETIVO

---

---

O presente estudo teve por objetivo comparar a expressão da enzima fosfatase ácida nas próstatas masculinas e femininas do gerbilo *Meriones unguiculatus*, enfocando as fases do desenvolvimento pós-natal: jovem (antes da fase reprodutiva), adulto (na fase reprodutiva ativa) e senil (após a fase reprodutiva). Para a comparação foi empregada a técnica de citoquímica de enzimas para avaliação à microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

ATIVIDADE FOSFATÁSICA ÁCIDA NA PRÓSTATA DO GERBILO (*Meriones unguiculatus*): ESTUDO COMPARATIVO EM MACHOS E FÊMEAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL.

O artigo foi submetido à revista *Cell Biology International*.

**ATIVIDADE FOSFATÁSICA ÁCIDA NA PRÓSTATA DO GERBILO (*Meriones unguiculatus*): ESTUDO COMPARATIVO EM MACHOS E FÊMEAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Ana Maria Galvan Custódio <sup>1</sup>

Rejane Maira Góes <sup>2</sup>

Sebastião Roberto Taboga <sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP, Campinas, SP – Caixa postal 6109 – CEP: 13084-971.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia – IBILCE – UNESP – São José do Rio Preto, SP – CEP: 15054-000.

**Título resumido:** Atividade fosfatásica ácida em próstatas femininas e masculinas.

**Palavras-chave:** próstata feminina, próstata masculina, gerbilo, citoquímica de enzimas, fosfatase ácida.

**\*Endereço para Correspondência:**

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

## RESUMO

Presente no organismo masculino e feminino a próstata é uma glândula composta por elementos epiteliais, estromais e neuroendócrinos cuja diferenciação e desenvolvimento estão sob a regulação hormonal. As fosfatases ácidas são enzimas difundidas entre os animais e vegetais. O presente trabalho comparou a expressão da enzima fosfatase ácida nas próstatas femininas e masculinas do *Meriones unguiculatus* nas fases jovem, adulta e senil. As próstatas foram removidas, congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas em criostato e incubadas com o substrato  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. O controle da reação foi incubado sem o substrato e com o inibidor NaF (fluoreto de sódio) adicionado a este. As lâminas foram contra coradas com Metil-Green. A verificação ultra-estrutural da atividade enzimática também foi realizada. O substrato  $\beta$ -glicerofosfato de sódio revelou, neste animal, atividade fosfatásica ácida total, destacando a prostática e a lisossomal. A intensidade da expressão enzimática foi de modo heterogêneo distinguindo as marcações: forte, intermediária, fraca e a ausente. Os dados obtidos sugerem o amadurecimento funcional da próstata feminina anterior ao órgão masculino. A atividade fosfatásica ácida em ambos os sexos ocorreu em todas as fases estudadas, verificando sua dependência aos níveis de testosterona oscilante ao longo do desenvolvimento pós-natal.

## INTRODUÇÃO

As fosfatases ácidas são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, pois catalisam a hidrólise de monoésteres ortofosfato sob condições ácidas (Bull *et al.*, 2001). Podem ser diferenciadas de acordo com propriedades estruturais, catalíticas, imunológicas, distribuição no tecido e localização subcelular (Suter *et al.*, 2001). Além da identidade funcional comum, as isoenzimas (ou tipos diferentes) das fosfatases ácidas diferem uma das outras devido ao tecido em que se expressa e cromossomo de origem, peso molecular, homologia do amino ácido, comprimento da seqüência e resistência ao “L(+)tartrate” e íons fluoreto (Bull *et al.*, 2001).

Essas enzimas estão presentes em concentrações maiores no tecido e na secreção prostática, além disto também são encontradas em eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fígado, baço, rins, ossos e outros tecidos humanos (Cerri *et al.*, 1999). Segundo Ellis e Brawer (1994) a fosfatase ácida é produzida nas células do epitélio acinar prostático e se concentram nos lisossomos e vacúolos secretores. Tenniswood e colaboradores (1976) acreditam que a próstata é o principal órgão que secreta fosfatase ácida, sendo sua síntese dependente de andrógeno.

Cinco importantes fosfatases ácidas humanas são identificadas: fosfatase ácida prostática (PAP); fosfatase ácida lisossomal (LAP); fosfatase ácida eritrocitária (EAP); fosfatase ácida do macrófago (MAP) e a fosfatase ácida osteoclástica (OcAP).

As fosfatases ácidas são normalmente encontradas em baixas concentrações. Entretanto, mudanças em suas sínteses podem levar a doenças. O processo fisiopatológico é manifestado pela alta ou baixa expressão enzimática, sendo úteis no diagnóstico, atuando como marcadores sorológicos, histológicos e na investigação fisiopatológica da doença (Bull *et al.*, 2001). Os níveis séricos de fosfatase ácida podem aumentar com a manipulação pelo toque retal e doenças prostáticas, renais, ósseas, hepáticas e em diferentes neoplasias (Cerri *et al.*, 1999).

A fosfatase ácida nos machos é um produto importante da secreção prostática, pois participa na hidrólise da fosforilcolina no plasma seminal, sendo também considerado um marcador do desenvolvimento das características sexuais secundárias (Spring-Mills e

Hafez, 1980). Segundo Zaviacic (1999), a importância dessa atividade enzimática nas fêmeas ainda não está clara, porém não se exclui a probabilidade de um desempenho similar ao macho com respeito às características sexuais secundárias femininas.

A próstata é uma glândula composta por elementos epiteliais, estromais e neuroendócrinos cuja diferenciação e desenvolvimento estão sob a regulação hormonal. Em humanos, a doença da próstata contribui para a morbidade e mortalidade na forma do adenocarcinoma e hiperplasia prostática benigna (Nelson *et al.*, 1998).

A próstata do gerbilo desperta o interesse biológico e biomédico pela sua morfologia semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e fusão dos seus lobos (Zanetoni, 2002). Este órgão não é exclusivamente masculino, está presente nas fêmeas de várias espécies de roedores e também na espécie humana. Inicialmente conhecida como glândula de Skene, apresenta homologia à próstata masculina. Nas fêmeas de gerbilo, a estrutura secretora prostática, os ácinos estão localizados na porção distal da uretra e variam em forma e tamanho. A estrutura básica dos ácinos da próstata feminina está em conformidade com o padrão estrutural apresentado pela glândula prostática feminina humana (Santos, 2002).

Estudos histoquímicos evidenciaram uma maquinaria enzimática típica na glândula feminina comparável à da próstata masculina, incluindo a presença de fosfatase ácida prostática e lisossomal. A evidência da fosfatase ácida na glândula de Skene foi uma forte razão para a incorporação do termo “próstata feminina” no início dos anos 80 (Zaviacic, 1999).

O objetivo do presente estudo foi comparar a expressão da enzima fosfatase ácida nas próstatas femininas e masculinas do gerbilo *Meriones unguiculatus*, durante as fases do desenvolvimento pós-natal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais:**

Neste trabalho foram utilizados 18 animais, sendo 3 machos e 3 fêmeas em cada fase do desenvolvimento pós-natal: jovens (até 3 meses de vida, antes da idade reprodutiva),

adultos (de 4 a 10 meses de vida, durante a idade reprodutiva) e senis (a partir de 11 meses de vida, após a idade reprodutiva), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu. Durante os experimentos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP com ração sólida Labina e água *ad libitum*.

### **Preparação do tecido para citoquímica de luz**

As próstatas de ambos os sexos foram obtidas após sacrifício do animal por inalação de éter etílico. O órgão foi removido, congelado em nitrogênio líquido e seccionado em criostato Leica CM1850. Criocortes seriados foram realizados nas próstatas femininas por apresentar um órgão diminuto não visível macroscopicamente.

Criocortes de 10  $\mu\text{m}$  foram fixados, por 5 minutos, em formalina-cálcio 10% e, posteriormente, incubados por 1 hora e 40 minutos no meio contendo o substrato  $\beta$ -glicerofosfato de sódio (Gömöri, 1950, modificado). O controle da reação foi obtido sem o substrato e, também, com o inibidor fluoreto de sódio (NaF) adicionado ao meio de incubação com o  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. Após a incubação, o material foi lavado com tampão acetato e gotejado com sulfeto de amônia (1%) por 3 minutos, lavado em água destilada e contra-corado com solução aquosa a 0,1% de Metil-Green, por 5 minutos.

Criocortes de 10  $\mu\text{m}$  foram corados pelo Azul de Toluidina 0,025% em tampão MvIlvaine pH 4,0 (Mello & Vidal, 1980), para uma visão geral da distribuição dos ácinos prostáticos.

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, usando-se filmes Kodacolor 135 mm ASA 100.

### **Preparação do tecido para citoquímica-ultra-estrutural**

Cortes de 50  $\mu\text{m}$  do tecido prostático foram feitos em criostato Leica CM1850, colocados em lâmina escavada, fixados em paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.3, lavados em tampão Tris-maleato 0,02M pH 7.3 em sacarose 10% e em tampão acetato 0,05M pH 5.0. Os cortes foram incubados com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio

por 1 hora e 40 minutos. O controle da reação foi incubado sem o substrato e com o inibidor NaF adicionado ao substrato pelo mesmo tempo. Os cortes foram lavados em tampão acetato 0,05M pH 5.0, tampão Tris-maleato 0,02M pH 7.3 em sacarose 10% e em tampão cacodilato 0,2M pH 7.3. Os cortes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.3 e lavados em água bidestilada. Após a pós-fixação os cortes foram desidratados em gradientes de acetona e incluídos em araldite (Serrano *et al.*, 1976 e Kimura e Ichihara, 1985, modificados).

Cortes ultrafinos, de aproximadamente 50 nm de espessura, foram obtidos em ultramicrótomo automático LKB, com navalha de diamante. Alguns cortes foram analisados sem contrastar e outros contrastados pelo acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (Watson, 1958) e citrato de chumbo a 2%, por 6 minutos (Venable e Coggeshall, 1965, modificado). As telas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM 910 do Centro de Microscopia "Prof. Celso Abbade Mourão" - IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

#### **Análise da intensidade de marcação dos ácinos**

A média dos perfis de ácinos prostáticos femininos e masculinos, do total de ácinos presentes no corte histológico, com diferentes intensidades de atividade enzimática foi submetida a histogramas de frequência elaborados no programa Excel. A análise estatística foi executada no software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). O teste de hipótese utilizado para a averiguação da significância foi o Anova, onde o nível de significância adotado foi 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### **RESULTADOS**

A próstata feminina apresentou na fase jovem ácinos desenvolvidos com lúmen maior que a dos machos (Figs. 1 e 7); esses ácinos na fêmea estão intimamente ligados à parede da uretra (Fig. 31), enquanto no macho circundam-na (Fig. 1). A próstata na fase adulta mostrou nas fêmeas, um epitélio colunar alto em relação ao macho (Figs. 13 e 19).

Na fase senil, em ambos os sexos, os ácinos apresentaram lúmen maior que as demais fases do desenvolvimento (Figs. 25 e 31).

O produto da reação destacou-se na região supranuclear, formando uma faixa de atividade enzimática sob a superfície luminal da célula epitelial, não sendo observada marcação positiva na região luminal.

A marcação dos ácinos nas próstatas, de ambos os sexos e em todas as idades, se deu de forma heterogênea (Figs. 2, 8, 14, 20, 26 e 32), o que permitiu classificá-la em 4 categorias: ácinos com marcação forte, intermediária, fraca e ausente. Os ácinos de marcação forte mostraram alta atividade enzimática em todo o seu epitélio (Figs. 3, 9, 10, 15, 16, 21, 27, 29 e 33). Faixas epiteliais com alta atividade enzimática foram intercaladas a faixas que não expressaram a enzima caracterizando a marcação intermediária (Figs. 5, 9, 10, 12, 16, 22, 27, 29 e 34). A baixa atividade fosfatásica ácida caracterizou o tipo de marcação fraca, onde apenas poucas células do ácino revelaram a atividade (Figs. 3, 4, 9, 12, 17, 24, 28 e 36). Ácinos com a ausência de marcação não apresentaram atividade enzimática positiva (Fig. 8).

Em algumas regiões epiteliais foram observados pontos citoplasmáticos intensamente marcados, que chamamos aqui de marcações puntiformes (Figs. 5, 12, 24, 34 e 36). Outros ácinos mostraram atividade fosfatásica ácida nuclear em diferentes intensidades de marcação nas idades estudadas (Figs. 4, 12, 16, 17, 24, 28 e 36).

A análise ultra-estrutural permitiu identificar marcações nucleares heterogêneas (Figs. 37, 40 a 42), marcações na região do Complexo de Golgi (Figs. 41 e 42), nos lisossomos (Fig. 37) e vesículas secretoras (Figs. 37 a 39). A atividade fosfatásica ácida foi também detectada nos "blebs" das secreções apócrinas (Fig. 44) e na superfície das células de secreção merócrinas (Fig. 43). Devido ao padrão de distribuição ultra-estrutural ter sido semelhante nas diferentes idades e sexo, nossos resultados documentam o material proveniente do macho adulto.

A análise quantitativa dos perfis de ácinos mostrou (Figs. 45 e 46), na fase jovem da próstata feminina, uma alta atividade fosfatásica ácida, onde elevados números de ácinos foram fortemente marcados (70,27%, erro padrão [EP]= 1,84), enquanto as marcações

intermediárias (12,95%; EP= 4,24) e fraca (12,88%; EP= 7,22) foram baixas e poucos ácidos não tiveram atividade enzimática (3,9%; EP= 2,08). Nos machos, poucos ácidos (3,28%; EP= 1,65) expressaram uma alta atividade enzimática ocorrendo uma maior marcação intermediária (18,07%; EP= 6,02). Porém, comparada a outras idades desse sexo, a baixa atividade enzimática ocorreu nessa fase, havendo elevado número de ácidos com marcação fraca (52,99%; EP= 8,15). A ausência de marcação foi consideravelmente grande (28,2%; EP= 14,27). Assim, nas fêmeas destacou-se uma alta atividade enzimática, ao contrário dos machos. Essa diferença pode ser comprovada pelo teste de hipótese utilizado para averiguação da significância, Anova ( $p \leq 0,05$ ), onde a intensidade de marcação forte na fase jovem foi altamente significativa, com  $p < 0,000011$ , juntamente com a marcação fraca, com  $p < 0,021173$ .

Na fase adulta da próstata feminina, comparada às outras idades deste mesmo sexo, elevado número de ácidos foram intensamente marcados (74,88%; EP= 19,80), evidenciando uma alta atividade fosfatásica ácida. Menor número de ácidos apresentou uma marcação intermediária (15,95%; EP= 12,76) e fraca (7,84%; EP= 7,84), porém a ausência da atividade fosfatásica ácida foi menor nessa fase (1,33%; EP= 1,33). Enquanto na próstata masculina os ácidos apresentaram elevada expressão da enzima, sendo a marcação forte (60,31%; EP= 15,71) quando comparada com outras idades desse sexo e com outras intensidades dessa mesma fase. A marcação intermediária foi grande (34,9%; EP= 14,61), enquanto a fraca foi baixa (4,78%; EP= 2,63). Nessa fase nenhum ácido apresentou ausência de atividade (0%; EP= 0). Assim, a alta atividade enzimática nas fêmeas foi mais elevada que nos machos, enquanto a ausência de marcação foi pequena na fêmea e no macho foi nula.

A fase senil da próstata feminina mostrou alta atividade enzimática com elevado número de ácidos marcados fortemente (62,76%; EP= 20,61), porém a marcação intermediária foi grande (31,35%; EP= 15,12) quando comparada às outras idades nesse sexo. Poucos ácidos marcaram-se fracamente (3,92%; EP= 3,92) ocorrendo um pequeno número de ácidos com marcação fraca e poucos ácidos não apresentaram atividade enzimática (1,96%; EP= 1,96). Nos machos, os ácidos apresentaram marcação forte

(26,34%; EP= 19,91) e fraca (24,68%; EP= 5,80), enquanto a marcação intermediária foi baixa (7,93%; EP= 19,53). Porém nessa idade, comparados às demais deste mesmo sexo, elevados números de ácinos não apresentaram atividade enzimática (41,06%; EP= 28,28). Dessa forma, as fêmeas exibiram uma maior atividade enzimática e poucos ácinos com ausência de marcação quando comparadas aos machos que mostraram muitos ácinos com ausência de atividade fosfatásica ácida.

## DISCUSSÃO

No gerbilo, a incubação do tecido prostático com o substrato sintético  $\beta$ -glicerofosfato de sódio provou ser excelente para a atividade fosfatásica ácida total, destacando a atividade prostática e lisossomal. Além deste substrato, a atividade pôde ser revelada em outras espécies pela cistidina 5' monofosfato e  $\alpha$ -naftol-fosfato que mostram a atividade lisossomal e “naphthol AS-BI phosphato” e fosforilcolina a atividade prostática (Serrano *et al.*, 1976 e Kimura e Ichiara, 1985). A reação negativa, obtida após a incubação dos criocortes no meio com ausência do  $\beta$ -glicerofosfato de sódio e com o seu uso adicionado ao inibidor NaF, ratificou a atividade enzimática do tecido prostático. Segundo Bull e colaboradores (2001) tanto a fosfatase ácida prostática, como a lisossomal são resistentes ao tartarato e íons fluoretos, ou seja, não manifestam sua atividade na presença desses inibidores.

A atividade fosfatásica ácida positiva não foi observada no lúmen dos ácinos femininos e masculinos, possivelmente devido às etapas da técnica histoquímica. Essa ausência de marcação tem sido explicada de várias maneiras. Segundo Kimura e Ichihara (1985) o produto da reação enzimática pode ter sido removido do lúmen durante o processamento histoquímico, ou então, as enzimas proteolíticas hidrolisaram a fosfatase ácida do lúmen, já que muitas estão presentes no líquido seminal.

Na fase jovem o padrão morfológico e a atividade fosfatásica ácida intensa observados na fêmea opõem-se à baixa atividade no macho, o que mostra um amadurecimento do órgão feminino anterior ao masculino. A atividade enzimática na fêmea, nessa idade, é comparável à fase adulta feminina e masculina, onde ocorre a mais

elevada expressão da fosfatase ácida. Na fase senil o macho mostrou uma atividade fosfatásica ácida baixa prevalecendo maior porcentagem de ácinos com ausência de atividade, enquanto a fêmea permaneceu com uma alta atividade.

Nossos resultados apontam para uma prematuridade da expressão da fosfatase ácida na próstata feminina quando comparada com a masculina. O baixo nível de testosterona existente no órgão feminino foi o suficiente para ativar a maquinaria de expressão da enzima, ainda na fase jovem, sendo essa concentração capaz de manter a expressão enzimática até as fases seguintes. No que se refere à expressão enzimática, há um desacordo com os estudos das dosagens hormonais intraprostáticas, efetuadas por Ghanadian e colaboradores (1997), onde o órgão feminino necessita das mesmas concentrações de testosterona requeridas pelo masculino para se desenvolver. Contudo, o organismo feminino produz apenas 5% do total de testosterona que é produzido diariamente pelo organismo masculino (Staub e Beer, 1997).

Ao contrário, a próstata masculina necessita uma concentração hormonal superior para expressar a alta atividade enzimática obtida apenas na fase adulta. Essa afirmativa vem ao encontro dos achados de Tenniswood e colaboradores (1976) que propõem a dependência da síntese de fosfatase ácida aos andrógenos.

A análise exploratória, obtida a partir do histograma de frequência, mostra que a fêmea mantém um padrão de marcação uniforme nas fases estudadas, enquanto no macho a variação foi visível. Isto foi resultante do nível de testosterona variável durante o desenvolvimento. A maior expressão enzimática ocorreu na fase adulta com a elevação dos níveis de testosterona. No climatério, a quantidade de ácinos com ausência de marcação elevou-se devido ao declínio hormonal decorrente da idade.

Na fase adulta a alta atividade observada em ambos os sexos sustenta a proposta de Zaviacic (1985) que demonstrou, por diferentes técnicas aplicadas à glândula prostática feminina, que a distribuição e atividade fosfatásica ácida são comparáveis aos ácinos prostáticos masculinos.

Segundo Zaviacic (1999) diferenças tem sido demonstradas entre a maquinaria enzimática da próstata feminina de uma criança com uma mulher na fase pós-menopausa, a

qual mostra redução de algumas enzimas, como: naftil esterase, desidrogenases e algumas glicose-6-fosfato, enquanto a fosfatase ácida lisossomal aumenta e a prostática é mantida ou se reduz.

O estudo citoquímico ultra-estrutural mostrou depósitos dos produtos da reação fosfatásica ácida nos núcleos, lisossomos, Complexo de Golgi e vesículas de secreção. A atividade enzimática heterogênea foi observada no núcleo da célula epitelial. Segundo Landim e colaboradores (2002) e Azeredo-Oliveira & Mello (1998) a atividade fosfatásica ácida nuclear heterogênea é expressa em várias células, mas seu controle permanece desconhecido. Os componentes nucleares freqüentemente apresentam atividade fosfatásica ácida positiva, sugerindo sua ativação durante a transcrição do RNA ribossômico no centro fibrilar do nucléolo (Oliveira, 1997). Taboga (2001) atribuiu a atividade fosfatásica ácida, bem como a atividade de outras enzimas nucleares, como sendo função da matriz nuclear, local especializado do núcleo interfásico onde estas enzimas podem estar localizadas. Portanto, há uma relação entre a intensidade de marcação e o nível de transcrição em que se encontra a célula (Landim *et al.*, 2002). A análise ultra-estrutural revelou dois tipos de secreção celular. A secreção do tipo merócrina, onde o produto foi liberado para o lúmen através da vesícula de secreção, e a do tipo apócrina, onde a secreção atingiu o lúmen pela formação do “bleb” apical. A fosfatase ácida é produzida nas células do epitélio dos ácinos prostáticos e se concentra nos lisossomos e vacúolos secretores (Ellis *et al.*, 1994).

As investigações histoquímicas e enzimáticas no órgão prostático contribuíram para fortalecer a homologia entre o órgão feminino e masculino, anteriormente dada apenas pela origem embriológica a partir do sino urogenital (Zaviacic, 1999).

A próstata feminina apresentou maturidade enzimática anterior à masculina e sua funcionalidade foi confirmada pela alta atividade fosfatásica ácida. Segundo Santos (2002) a próstata feminina pode ser considerada pouco desenvolvida, o que não deve ser associado à não-funcionalidade ou imaturidade deste órgão. A presença de um epitélio diferenciado e de células secretoras com alta atividade sintética é a mais forte evidência da sua maturidade funcional. Ao contrário de propostas antigas de que a próstata feminina era apenas um órgão resquicial embrionário sem nenhuma função biológica (Wernet *et al.*, 1992).

Nossos resultados na próstata masculina reforçam que a atividade da enzima no presente estudo é dependente das variações dos níveis séricos intraprostáticos de testosterona que oscilam ao longo da vida do animal. Enquanto a baixa concentração de testosterona existente na próstata feminina é o suficiente para manter a atividade enzimática ao longo de todo o desenvolvimento.

Assim, nosso estudo corrobora e solidifica a importância da glândula prostática feminina tanto quanto a masculina, sendo sua maturidade biológica e funcional evidente.

**Agradecimentos:**

Os autores externam agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos a AMGC e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Proc: 00/11648-1) pelo incentivo concedido a SRT através do Auxílio Regular à Pesquisa. Agradecimento especial ao Sr. Luiz Roberto Faleiros Jr., Sra. Rosana Silistino de Souza, MSc pela assistência técnica e à Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, MSc pelo suporte estatístico e conselhos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEREDO-OLIVEIRA MTV, MELLO MLS, (1998) Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios* 93: 33-42.
- BULL H, MURRAY PG, THOMAS D, FRASER AM, NELNOS PN, (2001) Demystified... Acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 55: 65-72.
- CERRI LMO, AJZEN S, ARAP S, CERRI GG (1999). *Ultra-sonografia da Próstata*, Sarvier, São Paulo.
- ELLIS WJ, BRAWER MK (1994) Papel de los marcadores tumorales en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata. In: Lepor H, Lawson RK(eds) *Enfermedades de la próstata*, vol 1 Panamericana, Argentina, pp 337-357.
- GÖMÖRI G, (1950) An Improved histochemical technique for acid phosphatase. *Stain Technol* 25: 81-85.
- GRANADIAN R, LEWIS JG, CHISHOLM GD, (1997) Androgen concentration in prostate and serum of the female an female *Praomys* (*Mastomys*) *Natalensys*. *Invest Urol* 15: 212-214.
- KIMURA M, ICHIHARA I, (1985) Cytochemical studies of acid phosphatases in rat lateral prostate with special reference to secretory apparatus and lysosome system. *Histochem* 82: 519-523.
- LANDIM CC, REGINATTO RD, MORAES RLMS e CAVALCANTE VM, (2002) Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. *Genetics and Molec Research* 1(2): 131-138.
- MELLO MLS, VIDAL BC (1980) *Práticas de Biología Celular*, Edgard Blücher – Funcamp, Campinas.
- NELSON PS, LAP W, SCHUMMER M, TRUE LD, LUI AY, BUMGARNER RE, FERGUSON C, DIMARK A, LEROY H, (1998) An expressed-sequence-tag database of human prostate: sequence analysis of 1168 cDNA clones. *Genomics* 47: 12-25.

- OLIVEIRA APML (1997). *Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomíneos do gênero Rhodnius*. Tese de mestrado, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.
- SANTOS FCA, 2002. *Caracterização morfo-funcional da próstata de fêmeas do gerbilo Meriones unguiculatus e avaliação dos efeitos da testosterona sobre os componentes teciduais do órgão*. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 91p
- SERRANO JA, SHANNON WA, STERNBERGER NJ, WASSERKRUG HL, SERRANO AA e SELIGMAN AM, (1976) The cytochemical demonstration of prostatic acid phosphatase using a new substrate, phosphorylcholine. *J Histochem and Cytoch* 24: 1046-1056.
- SPRING-MILLS E, HAFEZ ESE, (1980) Male accessory sex glands. *Br. J. Urol* 53: 263-265.
- STAUB NL, BEER MD, (1997) The role androgens in female vertebrates. *Gen. Compar. Endocrinology*, 108: 1-24.
- SUTER A, EVERTS V, BOYDE A, JONES SJ, LÜLLMANN-RAUCH R, HARTMANN D, HAYMAN AR, COX TM, EVANS MJ, MEISTER T, FIGURA KV, SAFTIG P, (2001) Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development* 128: 4899-4910.
- TABOGA SR (2001) Matriz nuclear. In: Carvalho HF, Pimentel SMR (eds) *A célula*, vol 1. Manole, São Paulo, pp 111-115.
- TENNISWOOD M, BIRD CE, CLARK AF, (1976) Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can. J. Biochem.* 54: 350-357.
- VENABLE JH & COGGESHALL R. (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol* 25: 407-408.
- WATSON ML, (1958) Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475-478.
- WERNERT N, ALBRECH M, SESTERHENN I, GOEBBELS R, BONKHOFF H, SEITZ G, INNIGER R, REMBERGER K, (1992) The "female prostate": location,

morphology, immunohistochemical characteristics and significance. *Euro Urol.* 22: 64-69.

ZANETONI C. 2002. *Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (Meriones unguiculatus): aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais.* Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 61.

ZAVIACIC M (1999) The human female prostate – From vestigial Skene’s paraurethral glands and ducts to woman’s functional prostate. 1st edn, vol 1. SAP-Slovak Academic Press, Bratislava, Slovakia.

ZAVIACIC M, (1985) The adult human female prostate homologue and the male prostate gland: a comparative enzyme-histochemical study. *Acta Histochem* 77: 19-31

## LEGENDAS DAS FIGURAS:

**FIGURAS 1 a 12:** Fotomicrografias de criocortes de próstatas masculinas (coluna da esquerda) e femininas (coluna da direita) de indivíduos jovens. **1:** Visão geral do órgão mostrando a disposição dos ácinos (a) ao redor da uretra (u) envolta por camada muscular (m), corados com Azul de Toluidina. 45X. **2 a 5; 8 a 10 e 12:** Reação positiva da atividade fosfatásica ácida com contracoloração de Metil-green. **2:** Ácinos com atividade enzimática heterogênea. 90X. **3:** Ácinos com marcações forte (f) e fraca (fr). 144X. **4:** Detalhe do ácino com marcação fraca (fr), destacando atividade nuclear (\*). 360X. **5:** Corte tangencial da calota de um ácino com marcação intermediária (i) e puntiforme (setas). 360X. **6:** Reação negativa: ausência do substrato. 90X. **7:** Visão geral dos ácinos (a) no tecido prostático corado com Azul de Toluidina. 45X. **8:** Atividade fosfatásica ácida heterogênea nos ácinos prostáticos (a) ligados intimamente à uretra (u), destacando ácinos com ausência de marcação (\*). 40X. **9:** Ácinos com marcações forte (f), intermediária (i) e fraca (fr). 300X. **10:** Ácinos com marcações forte (f) e intermediária (i). 360X. **11:** Reação negativa: presença do NaF. 150X. **12:** Ácinos com marcações intermediária (i), fraca (fr) destacando atividades puntiformes (setas) e nucleares (\*). 300X.

**FIGURAS 13 a 24:** Fotomicrografias de criocortes de próstatas masculinas (coluna da esquerda) e femininas (coluna da direita) de indivíduos adultos. **13:** Visão geral dos ácinos (a) corados com Azul de Toluidina. 36X. **14 a 17; 20 a 22 e 24:** Reação positiva da atividade fosfatásica ácida com contracoloração de Metil-green. **14:** Ácinos com atividade fosfatásica ácida heterogênea. 90X. **15:** Epitélio com atividade fosfatásica ácida alta, caracterizando a marcação forte (f). 200X. **16:** Ácino com marcação intermediária (i) destacando a atividade nuclear (\*). 360X. **17:** Epitélio de um ácino com marcação fraca (fr), destacando a atividade nuclear (\*). 300X. **18:** Reação negativa: ausência de substrato. 200X. **19:** Visão geral dos ácinos (a) no tecido prostático, destacando o epitélio mais espesso (\*) corado com Azul de Toluidina. 60X. **20:** Ácinos com atividade enzimática. 50X. **21:** Ácinos com marcações forte (f). 360X. **22:** Ácinos com marcações intermediária

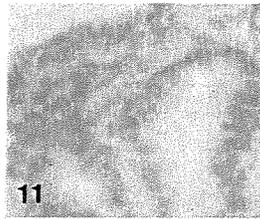
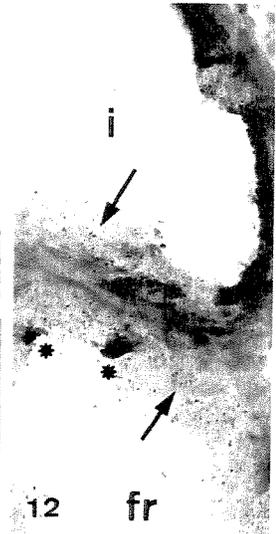
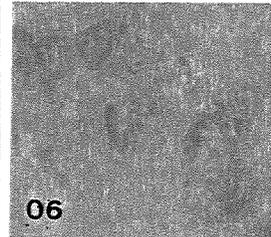
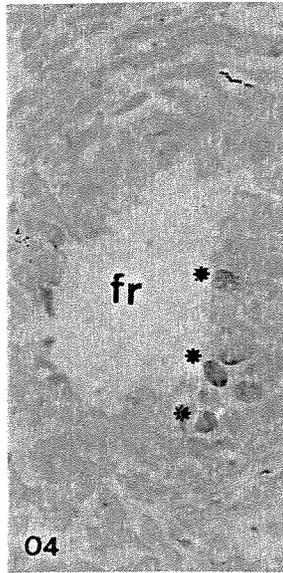
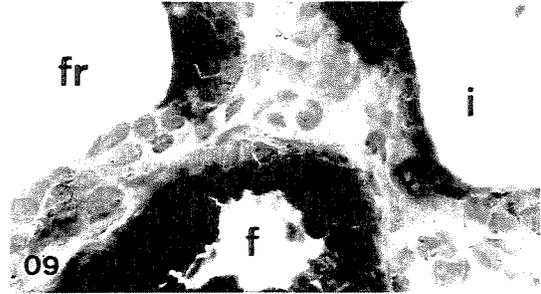
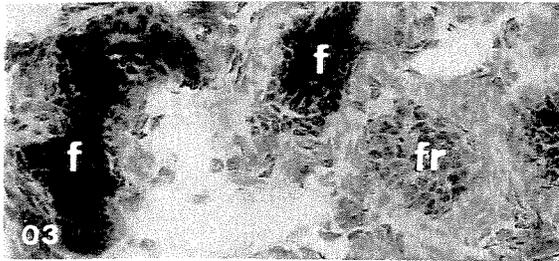
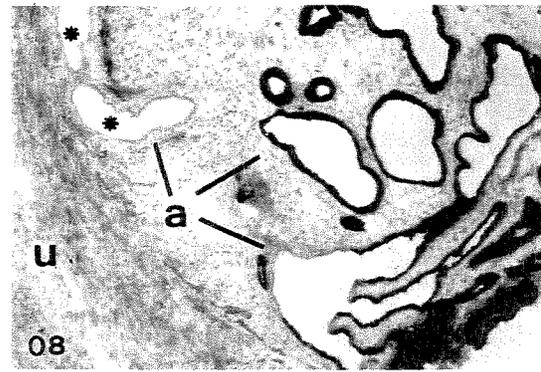
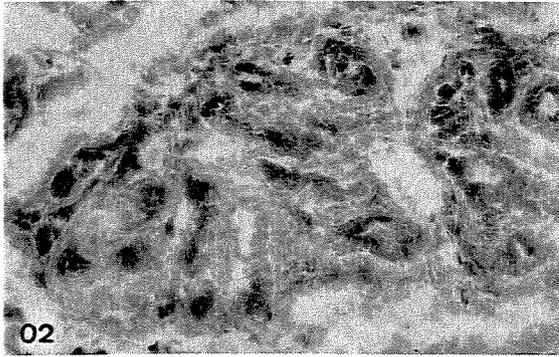
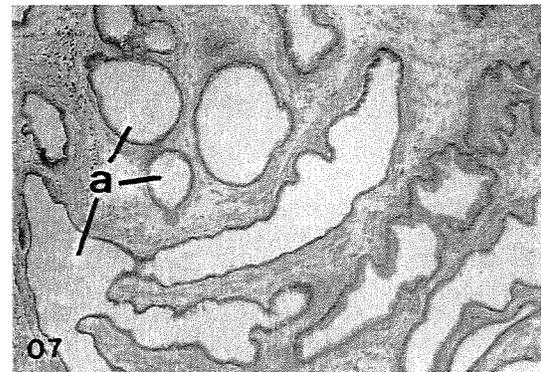
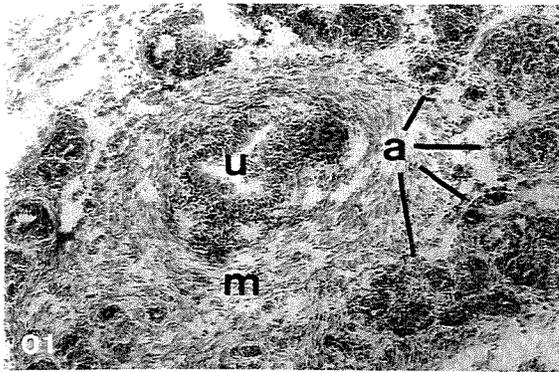
(i). 150X. **23:** Reação negativa: presença de NaF. 150X. **24:** Ácino com marcação fraca (fr) destacando as atividades nucleares (\*) e puntiformes (setas). 360X.

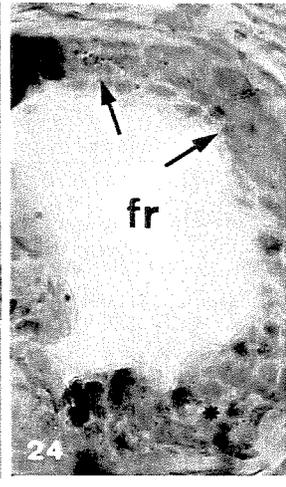
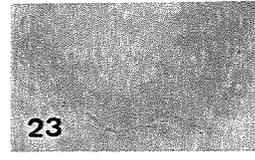
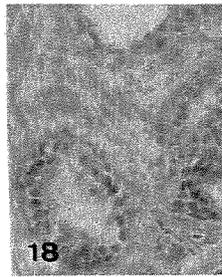
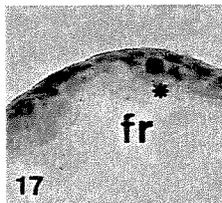
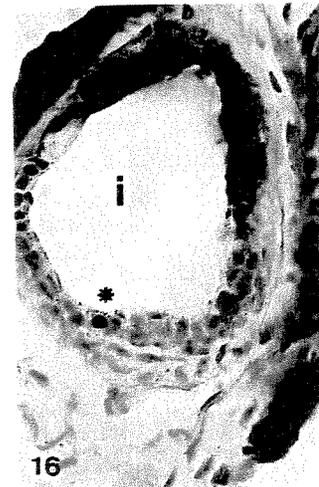
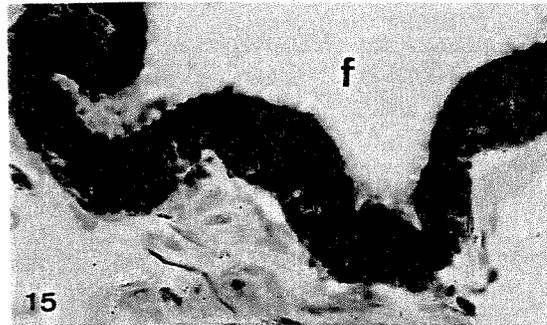
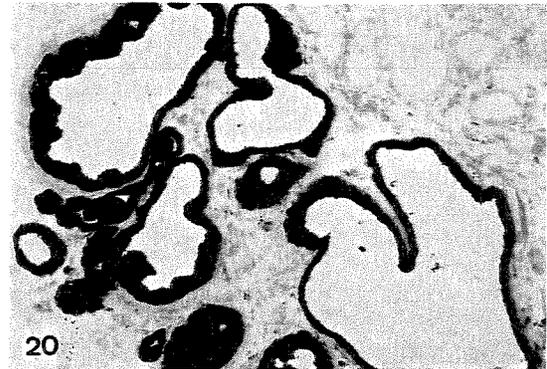
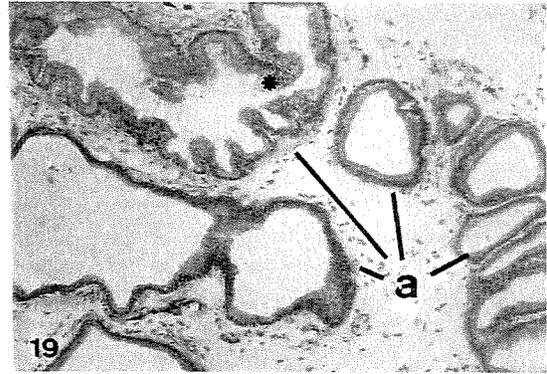
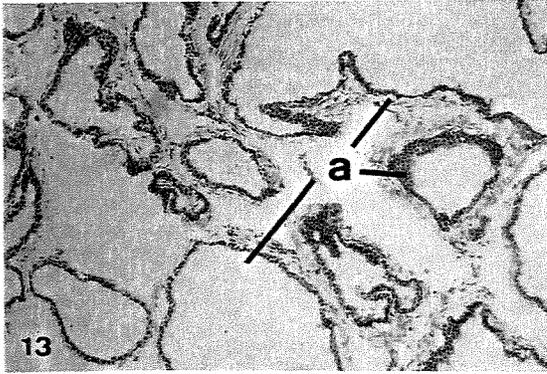
**FIGURAS: 25 a 36:** Fotomicrografias de criocortes de próstatas masculinas (coluna da esquerda) e femininas (coluna da direita) de indivíduos senis. **25:** Distribuição dos ácinos (a) com um aumento luminal (l) corados com Azul de Toluidina. 36X. **26 a 29; 32 a 34 e 36:** Reação positiva da atividade fosfatásica ácida com contracoloração de Metil-green. **26:** Atividade fosfatásica ácida heterogênea nos ácinos prostáticos. 45X. **27:** Ácinos com marcações forte (f) e intermediária (i). 45X. **28:** Ácino com marcação fraca (fr) destacando a atividade nuclear (\*). 150X. **29:** Ácinos com marcações forte (f) e intermediária (i). 90X. **30:** Reação negativa: ausência do substrato. 45X. **31:** Visão geral dos ácinos (a) intimamente ligados à uretra (u), destacando o aumento luminal (l), corados com Azul de Toluidina. 36X. **32:** Atividade enzimática nos ácinos. 45X. **33:** Detalhe do ácino com intensa atividade fosfatásica ácida (f). 360X. **34:** Epitélio acinar altamente marcado seguido por faixa de células com atividade puntiforme (seta), compondo a marcação intermediária (i). 360X. **35:** Reação negativa: presença do NaF. 150X. **36:** Ácino com marcação fraca (fr) destacando as atividades puntiformes (seta) e nucleares (\*). 360X.

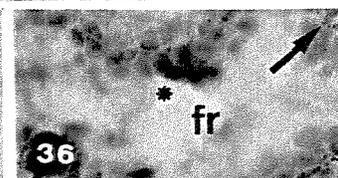
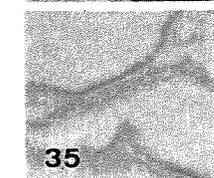
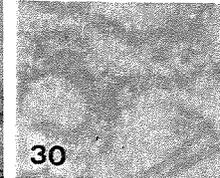
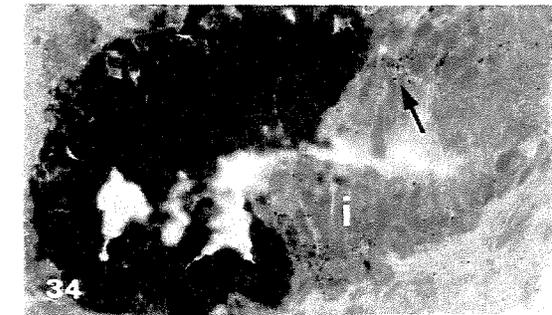
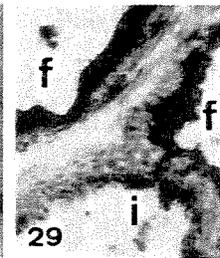
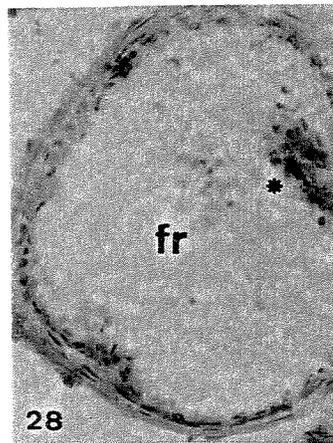
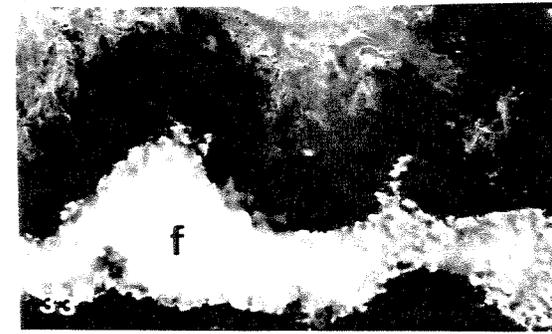
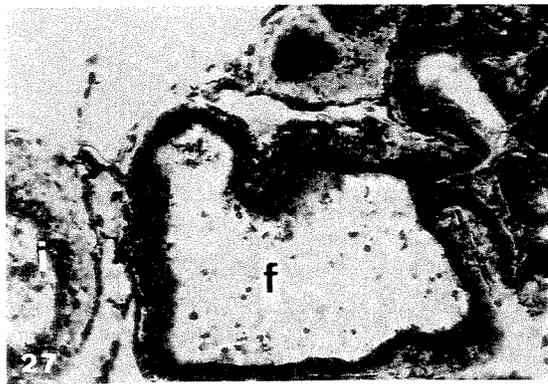
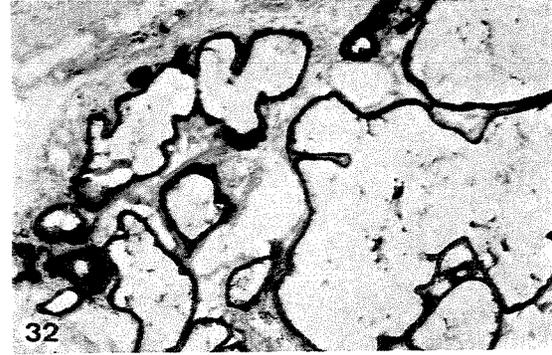
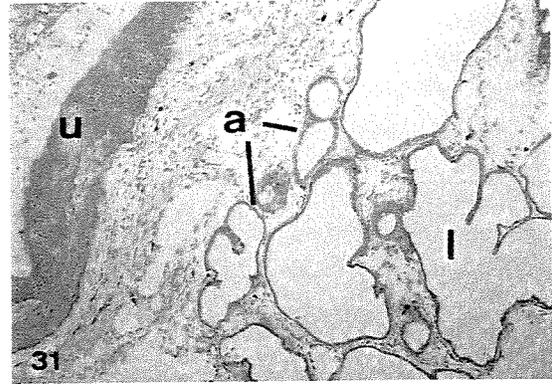
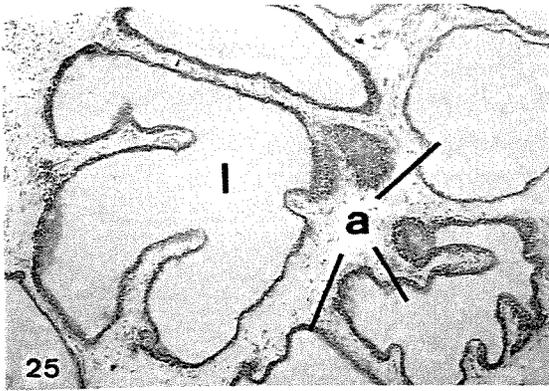
**FIGURAS 37 a 44:** Ultramicrografias do tecido prostático adulto masculino mostrando a reação positiva da atividade fosfatásica ácida após incubação com  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. **37:** Célula epitelial mostrando a atividade fosfatásica ácida, destacando-se a atividade no núcleo (n), lisossomos (l) e vesículas de secreção (vs). Sem contraste. 15500X. **38:** Periferia da vesícula de secreção com atividade positiva (vs) e detalhe da extrusão celular (seta) Sem contraste. 26.000X. **39:** Atividade fosfatásica ácida na periferia da vesícula de secreção (vs) e vesícula atingindo o ápice da célula (seta). Com contraste. 33.400X. **40:** Núcleo (n) com atividade fosfatásica ácida. 35.000X. **41:** Núcleo (n) e Complexo de Golgi (g) marcados positivamente. Sem contraste. 35.000X. **42:** Atividade positiva no Complexo de Golgi (g) posicionado acima do núcleo (n). Com contraste. 12.000X. **43:** Reação positiva mostrando a secreção do tipo merócrina (setas).

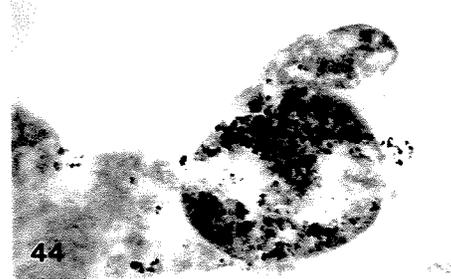
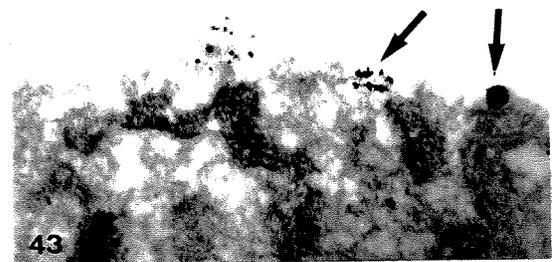
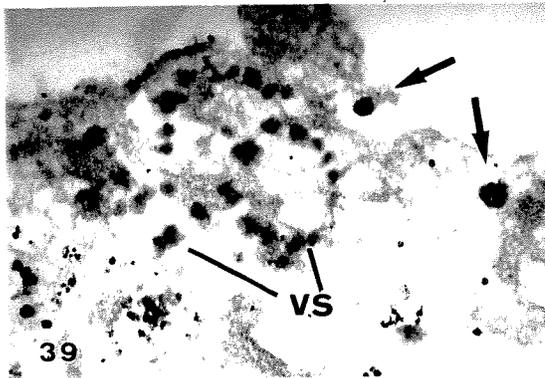
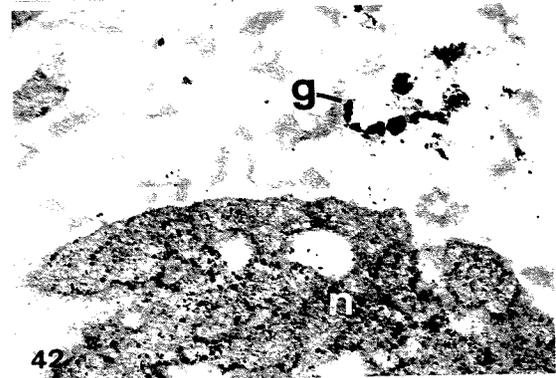
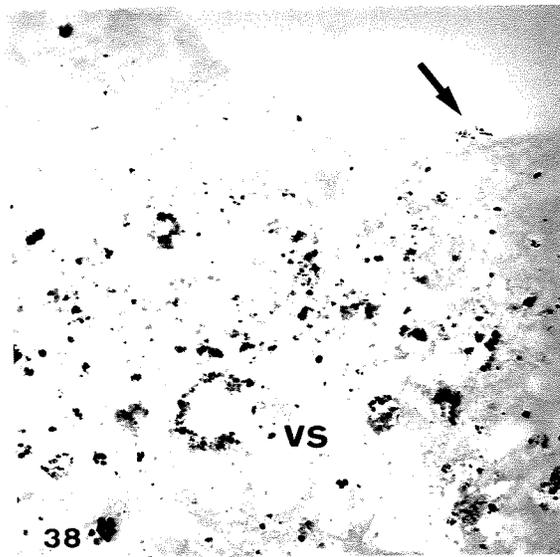
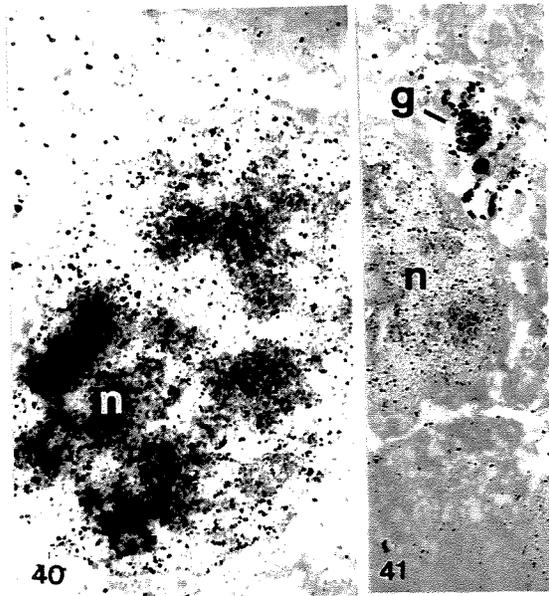
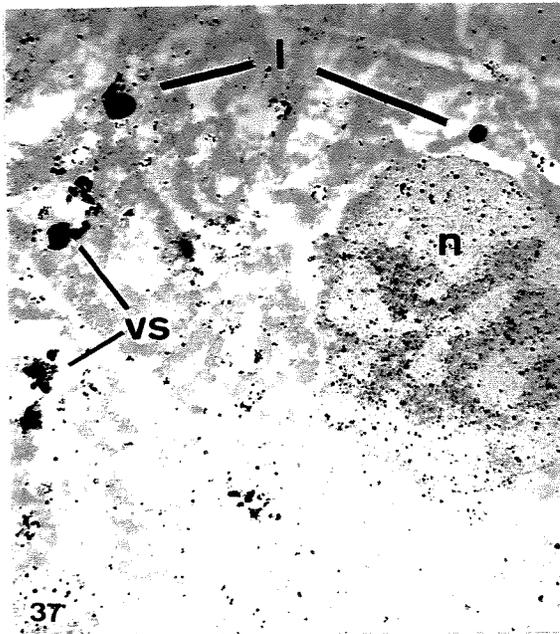
Com contraste. 43.200X. **44:** “Bleb” marcando a secreção do tipo apócrina. Com contraste. 36.200X.

**FIGURA 45 e 46:** Histogramas de frequências de médias e respectivos erros padrões dos perfis de ácinos prostáticos de gerbilos fêmeas (Fig. 45) e machos (Fig. 46) em diferentes intensidades de atividade da enzima fosfatase ácida.

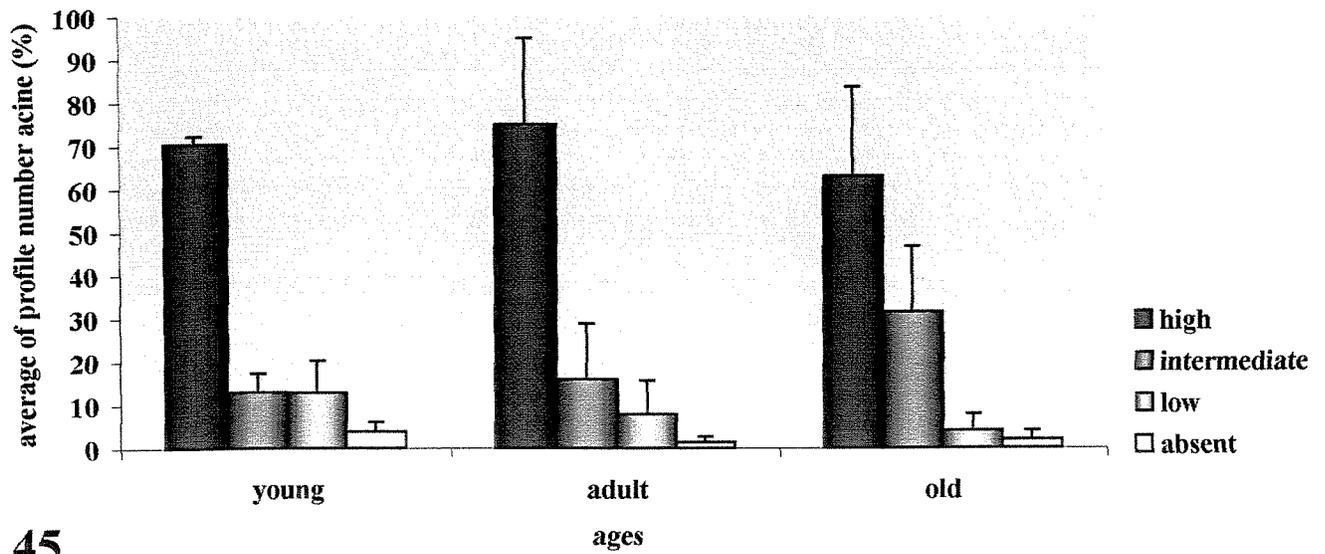






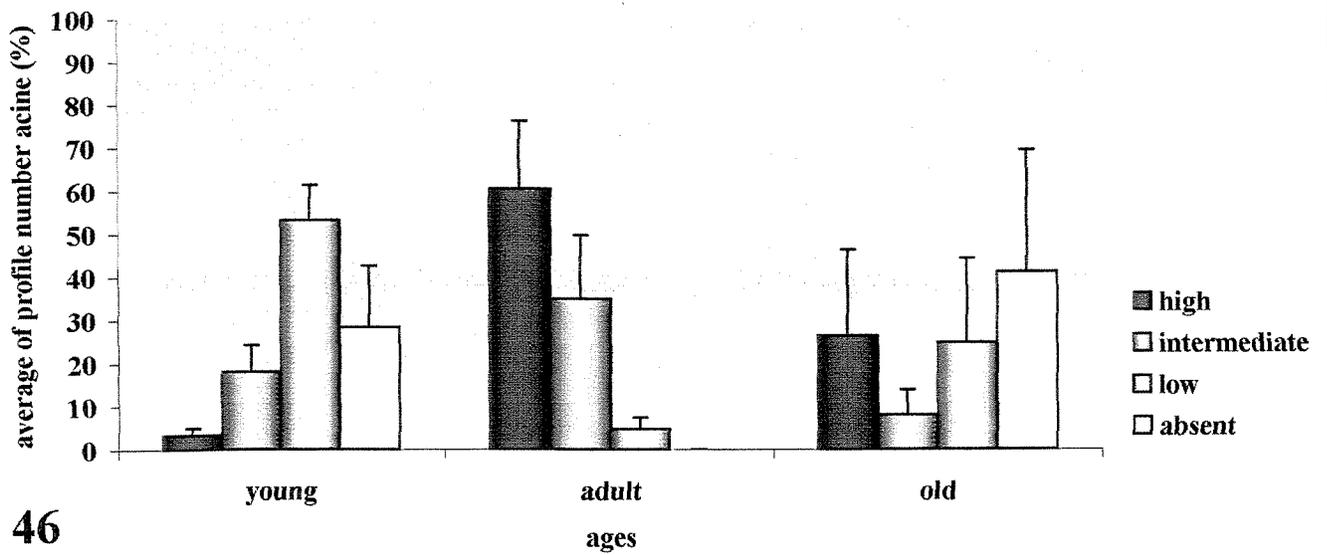


### Acid Phosphatase activity in Gerbil's female prostate



45

### Acid Phosphatase activity in Gerbil's male prostate



46

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

---

---

1- A atividade fosfatásica ácida revelou uma maquinaria enzimática na próstata feminina e masculina de *Meriones unguiculatus* ao longo das fases do desenvolvimento pós-natal. A atividade enzimática ocorreu de forma heterogênea nos ácinos, o que permitiu classificá-los em 4 categorias: ácinos com marcação forte, intermediária, fraca e ausente.

2- O  $\beta$ -glicerofosfato de sódio revelou ser um excelente substrato para o estudo da fosfatásica ácida total na próstata do gerbilo.

3- A distribuição da atividade fosfatásica ácida foi diferente nas fases do desenvolvimento em ambos os sexos.

4- O padrão de marcação dos perfis de ácinos, frente ao teste citoquímico para a atividade fosfatásica ácida, foi constante na próstata feminina e variável na masculina. Nas fêmeas a porcentagem de ácinos com alta atividade ocorreu em todas as fases ao longo do desenvolvimento pós-natal. O bloqueio da atividade não cessou com o envelhecimento dos animais.

5- As diferenças encontradas na expressão fosfatásica ácida, nos diferentes compartimentos glandulares da próstata de ambos os sexos, revelam que as variações dos níveis de testosterona influenciam na expressão dessa enzima.

6- A alta marcação da atividade na fêmea jovem indica uma prematuridade funcional da próstata feminina. A manutenção da atividade enzimática, em todas as fases da vida, permite afirmar que este órgão tem importância morfo-funcional para o desenvolvimento sexual feminino.

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- BULL H, MURRAY PG, THOMAS D, FRASER AM, NELNOS PN (2001) Demydtified... Acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 55: 65-72.
- CARVALHO HF. & LINE SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol. Int.* 20: 809-819.
- CERRI LMO, AJZEN S, ARAP S, CERRI GG (1999). *Ultra-sonografia da Próstata*, 1st edn, vol 1. Sarvier, São Paulo.
- DODSON MK, CLIBY WA, PETTAVEL PP, KEENEY GL, PODRATZ KC (1995) Female urethral adenocarcinoma: evidence for more than one tissue of origin? *Gynecol Oncol* 59(3): 352-357.
- GUYTON AC (1984) *Tratado de Fisiologia Médica*. 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro, 926pp.
- KRATOCHVIL S (1994) Orgasmic expulsions in women. *Cesk Psychiatr* 90(2): 71-77.
- LIN M-F, GARCIA-ARENAS R, CHAO Y-C, LAI MMC, PATEL PC, XIA XZ (1993) Regulation of prostatic acid phosphatase expression and secretion by androgen in LNCap human prostate carcinoma cells. *Arch Bioch. Bioph.* 300: 384-390.
- LUCHTER-WASYL E, OSTROWSKI W, (1974) Subunits structure of human prostatic acid phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 365: 349.
- NELSON PS, LAP W, SCHUMMER M, TRUE LD, LUI AY, BUMGARNER RE, FERGUSON C, DIMARK A, LEROY H (1998) An expressed-sequence-tag database of human prostate: sequence analysis of 1168 cDNA clones. *Genomics* 47: 12-25.
- NETTER FH (1965) *Reproductive system – The Ciba collection of medical illustration*. 5ed. CIBA, New York, 286p.
- REESE JH, McNEAL JE, REDWINE EA, SAMLOFF IM & STAMEY TA (1986) Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.* 136: 1148-1152.

- ROMAS NA, KWAN DJ (1993) Prostatic Acid Phosphatase. Biomolecular Features and Assays for Serum Determination. In *The Urology Clinics of North America*. Saunders Company. 581-588.
- ROSS MH, REITH EJ & ROMRELL LJ (1993) *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, Rio de Janeiro, 779p.
- SAFTING P, HARTMANN D, LÜLLMANN-RAUCH R, WOLFF J, EVERS M, KÖSTER A, HETMAN M, FIGURA KV, PETERS C (1997) Mice deficient in lysosomal acid phosphatase develop lysosomal storage in the kidney and central nervous system. *Journal of Biological Chemistry* 272: 18628-18635.
- SANTOS FCA, 2002. *Caracterização morfo-funcional da próstata de fêmeas do gerbilo *Meriones unguiculatus* e avaliação dos efeitos da testosterona sobre os componentes teciduais do órgão*. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 91p
- SUTER A, EVERTS V, BOYDE A, JONES SJ, LÜLLMANN-RAUCH R, HARTMANN D, HAYMAN AR, COX TM, EVANS MJ, MEISTER T, FIGURA KV, SAFTIG P, (2001) Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development* 128: 4899-4910.
- TENNISWOOD M, BIRD CE, CLARK AF, (1976) Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can. J. Biochem.* 54: 350-357.
- WILLIAMS WM (1974) *The anatomy of Mongolian Gerbil*. Tumblebrook Fram, INC. USA. 107p.
- ZANETONI C. 2002. *Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*): aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais*. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, SP. 61.
- ZAVIACIC M (1999) *The human female prostate – From vestigial Skene’s paraurethral glands and ducts to woman’s functional prostate*. 1st edn, vol 1. SAP-Slovak Academic Press, Bratislava, Slovakia.
- ZAVIACIC M, JAKUBOVSKÁ V, BREZA J, (2000) Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene’s gland). *Anat Embriol (Berl)* 201(1): 51-61.