EDUARDO MARCELO CANDIDO

"TERAPIA HORMONAL EXÓGENA EM RATOS SENIS: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE OS DIFERENTES LOBOS PROSTÁTICOS"

Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDUARDO MARCELO CANDIDO

"TERAPIA HORMONAL EXÓGENA EM RATOS SENIS: CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE OS DIFERENTES LOBOS PROSTÁTICOS"

Es	te exemplar corresponde è redação final
de	tese defendida pelota) candidato (a) Eduardo Marcelo Candido
0 2	provada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

	Candido, Eduardo Marcelo, 1979-
C161t	Terapia hormonal exógena em ratos senis: caracterização dos efeitos sobre os diferentes lobos prostáticos / Eduardo Marcelo Candido. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
	Orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Lobos prostáticos. Rato. Senescência. Terapia hormonal. Receptor de andrógeno. Receptores de estrógeno. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Hormonal exogen therapy in senile rats: characterization of effects upon different prostatic lobes Palavras-chave em Inglês: Prostatic lobes Rat Senescence Hormonal therapy Androgen receptor Estrogen receptors Área de concentração: Anatomia Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador] Maíra Aparecida Stefanini Camila Contin Diniz de Almeida Francia Taize Machado Augusto Humberto Santo Neto Data da defesa: 18-01-2013 Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 18 de janeiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valeria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)

Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Profa. Dra. Maira Aparecida Stefanini

Profa. Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia

Dra. Taize Machado Augusto

Profa. Dra. Elaine Minatel

Prof. Dr. Bruno Cesar Shimming

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira

Assinatura
The
Assinatura
Hourattertain
Assinatura
Amila
Assinatura

Fromouto Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedicatória

À minha amada Alessandra Esch, que surgiu em minha vida durante esse doutorado e me proporcionou a felicidade de um "título" do qual nem sonhava: o de marido!

Agradecimentos Especiais

À Deus, meu Senhor, amigo silencioso e único capaz de me ouvir, sentir e compreender integralmente!

 \hat{A} minha mãe, que sonhou comigo cada passo do meu aprendizado e jamais poupou esforços para me ver chegar até aqui.

 \hat{A} meu pai, cuja simplicidade e desconhecimento daquilo que eu fazia me bastavam para que eu fosse completo e feliz!

À minha amada esposa Alessandra, que me aceitou assim como sou e quis fazer parte da minha vida, me completando em todos os sentidos!

 \hat{A} Profa. Valéria, por sua solicitude, simplicidade no dia-a-dia, pelo conhecimento compartilhado e, sobretudo, pela paciência que teve comigo durante a realização desse doutorado.

Agradecimentos

Aos professores, titulares e suplentes, Dra. Maíra Aparecida Stefanini, Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia, Dra.Taize Machado Augusto, Dr. Humberto Santo Neto, Dra. Elaine Minatel, Dr. Bruno César Schimming e Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira, que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte desta banca de tese.

Aos professores Dra. Ana Paula Tiemi Taniguti, Dra. Evanisi Teresa Palomari e Dr. Renato Ferreti pelas arguições e valiosas sugestões para melhoria do projeto apresentado no exame de qualificação ao doutorado.

Ao Prof. Dr. Wagner José Fávaro pela importante ajuda na parte inicial do trabalho da tese.

À "Família da Reprodução": Amanda Cia Hetzl, Fabio Montico, Larissa Akemi Kido e Raísa Mistieri, com os quais convivi e compartilhei tantos momentos: o suor da ralação no biotério, as angústias do Blotting, as "pérolas" do Laboratório, as fofocas e comentários das novelas, BBB's e sites 'doidos' que a Shakira nos apresentava (risos), as idas deliciosas ao Yukusue, Tábua de Marés, etc., enfim, essas e tantas outras coisas que guardarei com alegria e carinho na memória e no coração. Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Anatomia, pelos momentos diversos e cujos contatos e conversas só não foram maiores, como no mestrado, devido à rotina corrida de trabalho e à compartimentalização dos laboratórios que, infelizmente, limitou nosso convívio.

Aos docentes do Departamento de Anatomia-IB-Unicamp pelo valioso aprendizado, desde as disciplinas que cursei durante o mestrado, até as conversas informais e conselhos do doutorado, que permitiram meu crescimento como pessoa, educador e pesquisador.

À querida Líliam Panagio, secretária da Pós-graduação, pela dedicação e eficiência com que desenvolve há anos seu trabalho. E por me "traduzir" os diversos trâmites burocráticos (dos quais não sou fã) até que a tese pudesse ser concluída e defendida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do IB-Unicamp.

À CAPES/PROEX e CAPES/PROAP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1 - Introdução Geral	
2 - Justificativa e Objetivos	
3 - Materiais e Métodos	
3.1 – Animais e Procedimento Experimental	
3.2 – Microscopia de Luz	
3.3 – Detecção da Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico	
3.4 – Análises Morfométricas	
3.5 – Dosagens Hormonais Séricas	
3.6 – Imunomarcação dos Receptores Androgênicos, Estrogênicos α e β , e K	i-67
3.7 – Western Blotting	
3.8 – Contagem de células Ki-67 positivas	
3.9 – Análise Estatística	
4 – Resultados	
4.1 – Artigo 1	
4.2 – Artigo 2	
5 – Considerações Finais e Conclusão Geral	
6 - Referências Bibliográficas	
7 – Apêndice (Tabela Análise Macroscópica)	
8 – Anexo (Certificado do CEUA/UNICAMP)	

O objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar a estrutura e a biologia molecular dos receptores esteróides dos lobos prostáticos e da glândula de coagulação em ratos senis, submetidos a diferentes terapias hormonais exógenas, além de identificar os processos de proliferação e apoptose nesses órgãos. Trinta ratos da linhagem Sprague-Dawley com 10 meses de idade foram divididos em seis grupos experimentais e submetidos aos respectivos tratamentos: Grupo Senil/Controle (SC); Grupo Senil/Testosterona (ST); Grupo Senil/Estrógeno (SE); Grupo Castrado (CA); Grupo Castrado-Testosterona (CT); e Grupo Castrado-Estrógeno (CE). Após trinta dias de tratamento, os animais foram sacrificados e as amostras do lobo ventral (LV), lobo dorsal (LD) e glândula de coagulação (GC) foram coletadas e processadas para microscopia de luz, imunohistoquímica e Western Blotting. As concentrações séricas de hormônios esteróides em amostras sanguíneas também foram determinadas. Os resultados mostraram manutenção tecidual epitelial no LD e na GC após administração de testosterona (grupos ST). Já o LV apresentou espaçamento entre epitélio e estroma. Na administração de testosterona pós-castração (grupos CT), as respostas divergiram entre as glândulas analisadas. No LV tanto o epitélio quanto o estroma mantiveram-se alterados. O LD apresentou recuperação morfológica na comparação com o grupo CA. Já na GC, enquanto o epitélio mostrou sinais de recuperação, o estroma manteve características de hiperplasia e hipertrofia. A administração de estrógeno (grupos SE e CE) manteve ou pouco alterou a morfologia da GC, porém, provocou ampla desestruturação tecidual nos lobos ventral e dorsal, com geração de micro-ácinos, presença de NIPs e focos inflamatórios. A imunohistoquímica revelou diferenças quanto a imunorreatividade dos receptores androgênicos e estrogênicos em relação aos compartimentos epitelial e estromal em todos os órgãos avaliados. O AR foi intensamente imunorreativo no epitélio dos lobos dorsal e ventral, situação oposta à observada nas glândulas de coagulação, onde o AR foi prevalentemente estromal. O ER α foi essencialmente estromal em todos os órgãos, enquanto que o ER β foi essencialmente encontrado no epitélio do lobo ventral e no estroma das glândulas de coagulação. No lobo dorsal, o ER β foi essencialmente estromal nos grupos SC e ST, com sua imunorreatividade alterando-se para epitelial nos grupos SE e CA, mostrando que esse receptor respondeu efetivamente à ação hormonal alterando sua localização. Assim, pode-se concluir que a terapia hormonal exógena, especialmente de testosterona, pode ser útil na manutenção tecidual prostática e que a imunorreatividade diferencial dos receptores hormonais pode sugerir uma forma lobo-específica de atuação dos hormônios sexuais na manutenção tecidual e promoção de patogênese prostática.

The aim of the present study was to characterize and compare the structure and the molecular biology of the steroid hormone receptors from prostatic lobes and coagulating gland in elderly rats submitted to different hormonal exogen therapies, besides identifying the apoptosis and proliferation processes in these organs. Thirty ten-month-old male rats were divided into six groups: Senile/Control group (SC); Senile/Testosterone group (ST); Senile/Estrogen group (SE); Castrated group (CA); Castrated-Testosterone group (CT); and Castrated-Estrogen group (CE). After 30-day treatment, the animals were sacrificed and the prostatic ventral lobe (VL), dorsal lobe (DL) and coagulating gland (CG) samples were collected and processed for light microscopy, immunohistochemistry and Western Blotting analyses. Serum steroid hormone concentrations in blood samples were also determined. The results showed epithelial tissue maintenance in DL and CG after testosterone administration (ST groups). However, the VL presented spacing between the epithelium and the stroma. After castration and testosterone administration, it was verified that both epithelium and stroma were changed in the VL. The DL showed morphological recovery in relation to the CA group. The CG showed signs of epithelial recovery in contrast to the glandular stroma, which maintained features of hyperplasia and hypertrophy. Estrogen administration (SE and CE groups) caused few changes in the CG morphology. However, the estrogen led to intense tissue disorganization in both VL and DL, showing microacini, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and inflammatory foci. The immunohistochemical analysis showed intense AR immunoreactivity in the epithelium of the DL and VL, whereas AR immunoreaction was predominant in the stromal cells in the CG. ER α occurred preferentially in the stromal compartment in all the studied organs, while ER β was found preferentially in the VL epithelium and in the CG stroma. ER β immunoreactivity was predominantly stromal in the DL from SC and ST groups. In contrast, there was a change of the ER β reactivity to the epithelial cells in the DL from SE and CA groups. This fact showed that this hormone receptor actually was responsive to the hormonal action changing its localization. So, it could be concluded that hormonal exogen therapy, especially with testosterone, could be useful in prostatic tissue maintenance. In addition, the differential immunoreactivities of the hormonal receptors could suggest a lobe-specific way of action of the sex steroidal hormones in tissue maintenance and in the triggering of prostatic pathogenesis.

1.1 - Generalidades e estrutura da próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina presente em todas as ordens de mamíferos (Setchell & Brooks, 1988; Untergasser et al., 2005). Sua secreção é formada por diferentes constituintes como ácido cítrico, ácido siálico, espermina e prostaglandinas, enzimas como amilase, fibrinogenase, aminopeptidase, transglutaminase, fosfatases ácida e alcalina, uma cascata de fibrinolisinas e zinco, as quais propiciam condições favoráveis para a maturação e sobrevivência dos espermatozóides (Lin & Bissell, 1993; Bull et al., 2001).

No homem, a próstata encontra-se localizada ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária onde são descritas três regiões glandulares: zona periférica, zona central e região préprostática, envoltas por uma fina camada fibromuscular (Setchell & Brooks, 1988). Já em roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal de acordo com a localização ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumüller & Seitz, 1990). Esses lobos estão conectados à uretra por uma série de ductos e são funcionalmente similares à próstata humana. (Jesik et al., 1982). Os diferentes lobos prostáticos diferem quanto à morfologia, aos tipos de produtos secretados e à resposta hormonal (Colombel & Buttyan, 1995; Costello & Franklin, 1994). De maneira geral, os lobos prostáticos são compostos por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, onde o epitélio secretor simples encontra-se envolvido pelo estroma (Aumüller & Adler, 1979). A membrana basal está localizada entre o epitélio e o estroma, tendo como seus principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (Knox et al., 1994).

O epitélio da próstata é simples, formado por células colunares com citoplasma apresentando complexo de Golgi, retículo endoplasmático granular, grânulos de secreção e mitocôndrias. Também, entremeadas às células epiteliais evidenciam-se células basais, as quais estão intimamente relacionadas à reposição da população de células epiteliais, bem como o transporte e a distribuição de substâncias entre os compartimentos epitelial e estromal (McNeal, 1988; Abate-Shen & Shen, 2000; Garraway et al., 2003).

O estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002). Também, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes constituem partes integrais do estroma (Tuxhorn et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. A principal função dos fibroblastos é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (Lin & Bissell, 1993; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001), sendo um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Tuxhorn et al., 2001). Além disso, componentes estruturais como colágeno e fibras elásticas proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido. Os proteoglicanos regulam a estrutura e a permeabilidade da matriz extracelular, ligando-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases, modulando a atividade destes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Kreis & Vale, 1999 e Tuxhorn et al., 2001). Assim, em associação, células estromais e matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (Tuxhorn et al., 2001; Cornell et al., 2003).

A interação epitélio-estroma tem papel primordial na manutenção da estrutura e funcionamento da próstata (Ekman, 2000). Baseando-se em aspectos morfológicos, funcionais e embriológicos, esta interação pode ser considerada como única unidade funcional (Aumüller & Seitz, 1990; Hayward & Cunha, 2000). A membrana basal é o ponto de união dessa interação oferecendo suporte mecânico e fisiológico ao epitélio secretor (Knox et al., 1994; Hayward & Cunha, 2000). O desequilíbrio da interação epitélio-estroma na próstata favorece a formação do carcinoma prostático (Cunha et al., 2002). As células estromais associadas às células tumorais respondem aos andrógenos e fatores de crescimento levando a interrupção da homeostase epitélio-estroma, o que desencadeia processos de crescimento, migração, angiogênese, apoptose e metástases tumorais (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2003; Cornell et al; 2003).

Muitos dos componentes da matriz extracelular como as metaloproteínases de matriz (MMPs) e as distroglicanas têm sido investigados como possíveis colaboradores no processo de metástase tumoral, através de complexas interações parácrinas com os elementos do estroma, bem como com o próprio epitélio prostático (Cunha & Matrisian, 2002; Pinto et al., 2010). Além disso, suas diferentes expressões durante as fases das lesões pré-maligna e maligna constituem-se em importantes sinais indicativos de como tais lesões evoluem nos tecidos da próstata.

15

1.2 - Próstata e Hormônios

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). O desenvolvimento andrógeno-dependente do sistema urogenital masculino ocorre via interações epitélio-estroma no qual o andrógeno orienta o desenvolvimento epitelial através de mecanismos parácrinos, mediados por receptores androgênicos no estroma glandular (Cunha et al., 1992). Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos sendo que, o complexo receptor-hormônio associado à cromatina nuclear, regula a expressão do gene específico (Prins et al., 1991).

A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática (Hsing, 2001; Toorians et al., 2003). A DHT é resultante da conversão da testosterona através da enzima 5 α -redutase (Prins et al., 1991; Toorians et al., 2003). Dois tipos de 5 α -redutases são identificados nos tecidos. A 5 α -redutase tipo I é encontrada na maioria dos tecidos, já a tipo II é predominante nos órgãos genitais incluindo a próstata (Hsing, 2001).

A castração é um dos métodos mais utilizados para o estudo dos mecanismos envolvendo a testosterona na manutenção e funcionamento da próstata. A partir desses estudos, sabe-se que a deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão (Banerjee et al., 2000; Vilamaior et al., 2000). Embora, a testosterona e a DHT utilizem o mesmo receptor de andrógeno (AR) para atuarem no tecido prostático, essas ações parecem estar associadas a diferentes funções teciduais (Prins et al., 1991; Toorians et al., 2003). Tanto a testosterona quanto a DHT são capazes de manter a atividade prostática, porém a DHT é 10 vezes mais potente que a testosterona, devido a sua dissociação do receptor de andrógeno ser mais lenta (Droller, 1997). Apesar do declínio dos níveis de testosterona no plasma sanguíneo após a castração, vários estudos indicaram que a DHT continua a ocorrer, através da conversão de andrógenos adrenais. Dessa forma, a DHT está presente após a supressão androgênica, sendo necessários procedimentos terapêuticos adicionais para que o bloqueio hormonal seja efetivo (Nishiyama et al., 2004). A flutamida é um dos mais conhecidos antiandrógenos não-esteroidais, agindo como inibidor competitivo da testosterona e DHT na ligação com o tamanho da glândula foi notada nos seis primeiros meses de tratamento com este fármaco, enquanto que as combinações de castração cirúrgica mais flutamida promoveram diminuição de 56% da próstata (Noldus et al., 1996; Montalvo et al., 2002).

Apesar da próstata ser primariamente regulada por andrógenos, seu desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores, é sensível a outros hormônios, destacando-se o estrógeno, que atua sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais do órgão quanto às alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). O estrógeno possui efeito anti-androgênico e regula negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonada, com consequente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002).

A biossíntese de estrógeno ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (citocromo P450 aromatase), expressada

17

pelo gene Cyp19 (Fishman & Goto, 1981; O' Donnell et al., 2001; Risbridger et al., 2003). Esta enzima é regulador crítico entre o balanço de andrógeno e estrógeno, a qual contribui para o nível circulante e no tecido desses hormônios (Risbridger et al., 2003). A evidência da síntese local de estrógenos na próstata foi demonstrada através da detecção local da enzima aromatase (Ellem *et al.*, 2004). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desse hormônio em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). A identificação desses dois subtipos de receptores estrogênicos no tecido prostático confirma a sinalização do caminho de estrógenos neste órgão (Cunha et al., 2002). Segundo Risbridger et al. (2001), utilizando tecido prostático recombinante de animais adultos *knockout* para os receptores estrogênicos α e/ou β , demonstraram que a resposta estrogênica completa no tecido prostático requer mecanismos parácrinos, tanto mediados por receptores α do estroma bem como receptores β do epitélio.

Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonada (Cunha et al., 2002). Os efeitos diretos de estrógenos são de difícil determinação uma vez que esses, na administração de estrógeno exógeno, são mediados pelo sistema nervoso central e rompem o equilíbrio hormonal normal. Tal ruptura, leva a inibição do *feedback* negativo da produção de gonadotrofinas endógenas e a depressão da biossíntese de testosterona testicular (Cunha et al., 2002).

Recentemente, as ações diretas de estrógenos na próstata foram avaliadas através de um modelo de camundongos hipogonadal (hpg), os quais têm deficiência pós-natal em gonadotrofinas e testosterona, mas são sensíveis a hormônios. Nesse estudo, verificou-se resposta proliferativa direta aos estrógenos nos lobos ventral e anterior da próstata e vesícula seminal desses animais. Tais alterações aberrantes foram demonstradas através de proliferação de fibroblastos no estroma e metaplasia das células epiteliais basais, além de processo inflamatório. Contudo, evidenciou-se redução das células musculares lisas e das células epiteliais secretoras. (Bianco et al., 2002). Os resultados também evidenciaram que as mudanças frente à administração de estrógenos foram lobo-específicas, sendo que o lobo anterior da próstata mostrou-se mais sensível a ação estrogênica, quando comparado ao lobo ventral. Contudo, os autores destacaram que a resposta estrogênica direta pode depender de outras variáveis adicionais como a dosagem administrada, tempo de exposição e a presença de andrógenos (Bianco et al., 2002).

Reciprocamente, um estudo utilizando camundongos estrógeno-modulados, os quais eram *Knockout* para enzima aromatase, demonstrou que doses elevadas de andrógenos têm efeitos morfológicos similares a doses elevadas de estrógenos. Os resultados exibiram doses periféricas e intraprostáticas elevadas de andrógenos, aumento dos receptores androgênicos, além da expansão dos volumes dos compartimentos estromal, epitelial e luminal indicando efeito proliferativo glandular (Jarred et al., 2002). Assim sendo, esses autores evidenciaram que tanto os estrógenos como os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos.

Além disso, na próstata existe um mecanismo denominado *imprinting* estrogênico ou estrogenização no desenvolvimento que se caracteriza pela exposição perinatal (do 1° ao 5° dia após o nascimento) ao estrógeno, a qual leva ao bloqueio da diferenciação normal das células

19

epiteliais, cujos efeitos manifestam-se na adolescência e vida adulta (Prins & Birch, 1997; Chang et al., 1999; Prins et al., 2001).

Em um estudo com ratos neonatais demonstrou-se que durante o desenvolvimento, a exposição desses animais a elevadas doses de estrógenos resulta em múltiplas mudanças no crescimento morfológico prostático, além de reduzir a sensibilidade à exposição de andrógenos na vida adulta, o qual inclui a aceleração da degradação dos receptores androgênicos prostáticos (Prins et al; 1991; Jarred et al., 2002). Também, outros efeitos da estrogenização na próstata incluem a ocorrência de atipia celular com o avançar da idade, processo inflamatório, hiperplasia epitelial e a emergência de lesões displásicas (Jarred et al., 2002; Bianco et al., 2002). Assim, essas lesões são de maior importância visto que as doenças inflamatórias podem ser positivamente associadas com mudanças benignas e malignas da próstata. Já as displasias, referem-se às neoplasias intraepiteliais prostáticas as quais precedem o desenvolvimento do carcinoma (Jarred et al., 2002).

Também, segundo Prins et al. (2001), em um experimento com camundongos estrógeno-modulados, deficientes para receptores α ou β , verificaram que as respostas crônicas ou agudas provenientes da estrogenização no desenvolvimento são mediadas principalmente por receptores α . Os autores ainda sugerem que, o receptor β não é requerido nessas ações, ou seu papel pode ser considerado de menor importância no processo.

Estudos envolvendo os ER β estrogênicos têm adicionado mais um nível de complexidade nos mecanismos de ações dos estrógenos na próstata (Weihua et al., 2002). Experimentos caracterizaram importante envolvimento dos ER β nos mecanismos prostáticos, conjuntamente as ações exercidas pelos ER α , sendo os efeitos estrogênicos produto de um

20

balanço dinâmico entre ERα e ERβ (Adams et al., 2002; Weihua et al., 2002). Os ERβ são expressos especialmente nas células epiteliais basais da próstata normal, sendo que essa subpopulação de células mostra importante propriedade biológica, com potencial efeito proliferativo sobre as células epiteliais além de envolvimento na carcinogênese (McNeal et al., 1995; Weihua et al., 2002; Imamov et al., 2005). Estudos têm postulado um efeito antiproliferativo dos ERβ na próstata (Imamov et al., 2004, Attia & Ederveen, 2012). Em contraste, a estimulação do ERα têm sido responsabilizado por eventos como: proliferação aberrante, inflamação e desenvolvimento de lesões pré-malignas (Ellem & Risbridger, 2010, Attia & Ederveen, 2012). Segundo Weihua et al. (2002), camundongos *Knockout* para os ERβ demonstraram focos de hiperplasia epitelial celular no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade, sendo que com 1 ano de idade esses animais desenvolveram neoplasias. Portanto, esse experimento confirmou a capacidade antiproliferativa relacionada aos ERβ. Contudo, Taylor et al. (2006) consideraram a ação antiproliferativa dos estrógenos como mediada por outras vias, as quais não envolvem os receptores estrogênicos.

Além disso, outros estudos destacaram que ER β podem estar envolvidos não só à um processo antiproliferativo epitelial mas também à diminuição do processo apoptótico epitelial glandular (Imamov et al., 2004). Esta afirmação baseou-se no fato de camundongos *Knockout* para os ER β apresentar aumento da proliferação epitelial e decréscimo da apoptose (Imamov et al., 2004). Segundo Adams et al. (2002), os receptores estrogênicos β em conjunto com os hormônios androgênicos podem mediar diversos efeitos sobre a proliferação epitelial prostática, primeiramente promovendo a proliferação celular em períodos iniciais gestacionais e após isso agir de forma a limitar o crescimento celular em períodos tardios gestacionais em fetos humanos. Ainda, diversos estudos demonstraram que o ER β é supra-regulado por andrógenos. Tal fato foi demonstrado pela administração de testosterona em ratos, com consequente aumento do nível de expressão desse receptor no RNA mensageiro (Adams et al., 2002; Asano et al., 2003).

1.3 – Senescência e Lesões Prostáticas

Outro ponto importante a ser considerado no desenvolvimento e manutenção da próstata é a idade. A senescência é o período da vida na qual ocorrem importantes mudanças no ambiente hormonal, resultando em alterações morfofisiológicas na próstata de várias espécies, as quais predispõem o órgão ao desenvolvimento de desordens urológicas tais como a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (Banerjee et al., 2000; Krtolica & Campisi, 2002; Lau et al., 2003; Roy-Burman et al., 2004). Nas diferentes espécies animais (humana, roedores, etc) o desbalanço hormonal decorrente do envelhecimento é fator determinante para as alterações morfofuncionais na próstata (Banerjee et al., 2000; Roy-Burman et al., 2004). Ellem & Risbridger (2010) revelaram como a alteração nas taxas de testosterona/estrógeno podem induzir a tais lesões glandulares. Segundo esses autores, a elevação dos níveis de testosterona na ausência de estrógenos leva ao desenvolvimento de hipertrofia e hiperplasia, mas não à malignescência glandular. Em contraste, altos níveis de estrógeno associados a baixos níveis de testosterona tem sido ligados ao desenvolvimento de inflamação no idoso e à emergência de lesões pré-malignas (Ellem & Risbridger, 2010).

Devido às condições patológicas que acometem a próstata, essencialmente durante a senescência, sua morfologia, fisiologia e, recentemente, os complexos e intrincados mecanismos moleculares que a envolvem têm sido examinados com particular atenção. Desordens benignas e malignas da próstata estão entre as doenças mais comuns a afetar os homens, particularmente em países industrializados (Ellem & Risbridger, 2010). Estatísticas demonstraram que o câncer de próstata (CaP) é, atualmente, o segundo maior causador de mortes relacionadas à cânceres, sendo agora o tipo de câncer não-cutâneo mais comumente diagnosticado entre os homens em países desenvolvidos, com os mais altos índices pertencendo aos norte americanos, seguidos pelos australianos e neo-zelandeses (Parkin et al., 2005, Montejo et al., 2010). Tanto a HBP quanto o CaP afetam a qualidade de vida dos envolvidos e os custos em saúde excedem, anualmente e a nível mundial, 4 bilhões de dólares (Guess, 2001). A HBP caracteriza-se por uma predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). O câncer de próstata, em contraste, é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Além da HBP e do CaP, outros processos patológicos da próstata tem sido frequentemente reportados em diferentes tipos de estudos. Entre eles, a neoplasia intraepitelial prostática (NIP), considerada uma lesão que precede o carcinoma prostático, e a atrofia inflamatória proliferativa (AIP). A AIP, descrita inicialmente por De Marzo et al. (1999), é tipicamente associada com inflamação prostática, e considerada uma possível precursora da NIP de alto grau e do CaP (Nelson et al., 2003). As lesões da AIP tendem a ocorrer na periferia da próstata e emergem como consequência da proliferação regenerativa das células epiteliais como uma resposta a uma injúria causada por infecção, trauma celular resultante de dano oxidativo, hipóxia e autoimunidade (Nelson et al., 2003). Além disso, as lesões da AIP são frequentemente observadas adjacentes à NIP de algo grau e estágios iniciais do CaP (De Nunzio et al., 2011).

A fundamental importância da próstata no processo reprodutivo masculino, associada a grande incidência de doenças sobre a mesma tem motivado diferentes estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinológica desse órgão.

Sabe-se que, a próstata é um órgão andrógeno dependente sendo que a manutenção dos níveis hormonais androgênicos é essencial para a homeostase glandular. No entanto, tem sido crescente o número de pesquisas apontando o estrógeno como elemento fundamental no desenvolvimento e funcionamento desse órgão, mesmo esse hormônio sendo encontrado em baixas quantidades se comparado à testosterona. O envolvimento dos hormônios androgênicos e estrogênicos durante a carcinogênese prostática e a progressão tumoral tem sido evidenciado em vários estudos clínicos e experimentais. Assim, o mecanismo indireto pelo qual atuam tais hormônios tem sido o principal fator ligado à origem dessas doenças e, dessa forma, constituem-se em ferramentas de extrema importância no entendimento de como o desbalanço entre andrógenos e estrógenos podem contribuir para incidência de processos patológicos sobre o órgão.

A senescência é o principal fator etiológico responsável pela depleção androgênica natural nos homens. É nesse período que se revelam o maior número de lesões prostáticas, como hiperplasia benigna prostática, neoplasia intraepitelial prostática e o câncer de próstata. Muitos trabalhos, especialmente clínicos, mostraram a ocorrência dessas doenças no idoso, anteriormente apontando a testosterona e sua depleção como principal agente desencadeador e, mais recentemente, o estrógeno e sua correlação com tais lesões. No entanto, são escassos os estudos sobre indivíduos e/ou animais senis comparando as diferentes regiões prostáticas e suas relações com ambos os hormônios.

Os mecanismos de ação dos estrógenos sobre a próstata através dos receptores α e β vem sendo estudados e apontados como indicadores importantes da ação hormonal sobre o desenvolvimento e progressão de alterações patogênicas nesse órgão. A descoberta do segundo receptor estrogênico, ER β , tem sinalizado uma nova perspectiva para os efeitos dos estrógenos, os quais foram anteriormente atribuídos como sendo mediados pelos ER α . Diferentes estudos destacaram o papel fundamental do ER β para a manutenção da próstata. A compreensão de como e onde os hormônios atuam sobre esses receptores e quais deles agem durante a interação epitélio-estroma na senescência e frente a diferentes condições hormonais, pode auxiliar na compreensão do surgimento e propagação das lesões prostáticas, além de abrir novas perpectivas quanto à descoberta de tratamentos terapêuticos e prevenção das lesões que acometem este órgão glandular.

Assim, considerando o importante papel dos receptores androgênicos e estrogênicos, além de suas interações com os hormônios sexuais na manutenção morfofisiológica da próstata durante a senescência, os principais objetivos do presente estudo foram:

- a) Imunolocalizar e comparar a ocorrência do receptor de andrógeno (AR) e receptores de estrógeno α e β (ERα e ERβ) na próstata de ratos senis nos diferentes lobos prostáticos e na glândula de coagulação, bem como, sob diferentes situações de administração hormonal;
- b) Caracterizar a morfologia e os processos de proliferação e apoptose nos diferentes lobos prostáticos no idoso frente à administração de estrógeno e testosterona;

 c) Analisar os níveis hormonais na senescência e mediante as variações hormonais impostas aos animais nesse período da vida.

3.1 – Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley com 10 meses de idade obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Os animais obtidos do CEMIB foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia até atingirem 10 meses de idade, sendo, posteriormente, divididos em 6 grupos experimentais com 5 animais cada:

<u>Grupo Senil/Controle (SC)</u>: os animais receberam injeções subcutâneas de 5 mL/ Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;

Grupo Senil/Testosterona (ST): os animais receberam 5 mg/ Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona (Deposteron-Novaquímica/Brazil) diluídos em 5 mL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias, modificado de (Franck-Lissbrant et al., 1998);

<u>Grupo Senil/Estrógeno (SE)</u>: os animais receberam 25 μg/ Kg de peso corpóreo de 17βestradiol (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluídos em 25 μL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias, modificado de (Prins et al., 2001);

- <u>Grupo Castrado (CA)</u>: os animais foram anestesiados com Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brasil) na dosagem de 0,25 ml da mistura para cada 100 gramas de peso corpóreo e, posteriormente, castrados por incisão cirúrgica com retirada dos testículos, sendo sacrificados após 30 dias de castração;
- <u>Grupo Castrado-Testosterona (CT)</u>: 30 dias após castração os animais receberam 5mg/ Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona diluídos em 5 mL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;
- <u>Grupo Castrado-Estrógeno (CE)</u>: 30 dias após castração os animais receberam 25 μg/ Kg de peso corpóreo de 17β- estradiol diluídos em diluídos em 25 μL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;

Os animais dos seis grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após 30 dias de tratamento todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados e, após a coleta dos órgãos e

sangue, sacrificados. As amostras dos lobos ventral e dorsal da próstata e as glândulas de coagulação foram coletadas para análises macroscópica, microscopia de luz, imunohistoquímica e Western Blotting. O sangue foi obtido através de punção cardíaca para a realização das dosagens hormonais séricas.

3.2 - Microscopia de Luz

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brasil) na dosagem de 0,25 ml da mistura para cada 100 gramas de peso corpóreo. Através de incisão abdomino-pélvica, amostras dos lobos ventral e dorsal da próstata, além da glândula de coagulação foram coletadas de cinco animais de cada grupo experimental, e fixadas em paraformaldeído 4% (por 24 horas) e solução de Bouin (por oito horas). Todas as amostras coletadas foram da porção média-distal do órgão. Após fixação, os tecidos fixados em paraformaldeído foram lavados em água corrente *overnight*, enquanto que os fixados em solução de Bouin foram lavados em álcool etílico à 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de alcoóis. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo (Biocut – Modelo 1130) com espessura de 5 µm, com posterior coloração em Hematoxilinaeosina (HE), Picrosírius-Hematoxilina (PH) (Junqueira et al., 1979), Prata Amoniacal (PA) (Vilamaior et al., 2000), fotografados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidos às análises morfométricas.

3.3 - Detecção da Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico

Amostras dos lobos ventral, dorsal e glândula de coagulação de cinco animais, os mesmos destinados à microscopia de luz (com fixação em paraformaldeído 4%), foram seccionadas e submetidas às reações de detecção da fragmentação do DNA e Feulgen. A fragmentação do DNA foi detectada utilizando o sistema de detecção fluorescente para apoptose (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os núcleos apoptóticos foram identificados e fotografados através do microscópico Nikon TS-100, equipado com fluorescência (DXM 1200F, Nikon).

Para a reação de Feulgen, os cortes foram submetidos à hidrólise com 4 N HCl por 75 minutos e tratados com o reagente de Schiff por 40 minutos. Depois de extensa lavagem, os cortes foram desidratados e montados em lâminas. A seguir, seis campos de cada animal foram analisados com objetiva de 40X e o índice apoptótico foi determinado dividindo-se o número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos microscópicos. Os núcleos apoptóticos foram identificados por características como picnose e/ ou fragmentação nucleolar, de acordo com Kerr & Searle (1973). Somente as células epiteliais foram consideradas para contagem.

3.4 - Análises Morfométricas

Para o estudo morfométrico foram utilizados cinco animais de cada grupo, os mesmos utilizados para a microscopia de luz. As secções das próstatas ventral, dorsal e glândula de coagulação foram provenientes das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. Posteriormente, as imagens celulares obtidas foram digitalizadas no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidas às mensurações das áreas celular, nuclear, citoplasmática, acinar, luminal, epitelial e estromal por meio do programa *Nis elements: advanced research* (IPLS-W, Software Windows para captura de imagem).

A quantificação das áreas acinar, luminal, epitelial e estromal foram realizadas em cinco campos aleatoriamente definidos por animal (25 campos por grupo), fixando-se as observações com a objetiva de 20X. Já para quantificação das áreas celular, nuclear, e citoplasmática foram utilizadas células epiteliais contidas em cinco campos aleatoriamente definidos por animal (25 campos por grupo), fixando-se as observações com a objetiva de 100X.

3.5 - Dosagens Hormonais Séricas

Amostras de sangue foram obtidas de cinco animais de cada grupo experimental, os mesmos destinados para a microscopia de luz, através de punção cardíaca, no ventrículo esquerdo. O sangue obtido foi colocado em tubo heparinizado. O soro foi separado por centrifugação, e armazenado a -20° C para subsequentes análises hormonais. As concentrações de testosterona e estradiol foram mensuradas por quimioluminescência em laboratório de análises clínicas de referência. Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos.

3.6 - Imunomarcação dos Receptores Androgênicos, Estrogênicos α e β, e Ki-67

A imunomarcação para receptor androgênico (AR), receptores estrogênicos a e ß (ERa e ERβ), e Ki-67 utilizou amostras do lobo ventral, dorsal e glândula de coagulação inclusos em solução de Bouin (5 animais por grupo). A seguir foram obtidos os cortes com 6 µm de espessura no micrótomo (Biocut – Modelo 1130), coletados em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em uma série decrescente de alcoóis e lavados em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos em micro-ondas (potência de 750 W) e/ou proteinase K (diluída em solução de Tris-HCl 100 mM e EDTA 50 mM). O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H_2O_2 (0,3% em metanol) por 15 minutos. Para diminuir as ligações inespecíficas proteína-proteína, os cortes foram incubados em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos AR, ERa, ERB, e Ki-67 foram localizados através dos anticorpos policionais rabbit N-20 (sc-816; Santa Cruz Biotechnology) para receptor de andrógeno, mouse M7047 (clone 1D5; Dako Cytomation Inc., Carpentia, CA, USA) para receptor estrogênico α , rabbit (06-629, Upstate) para receptor estrogênico β , e rabbit H-300 (sc-15402, Santa Cruz Biotechnology) para Ki-67, diluídos (1:100) em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. Após a lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-rabbit e anti-mouse HRP-conjugados (sc-3837 and sc-3697, Santa Cruz Biotechnology) e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB) diluída em tampão PBS. Para a contra-coloração destes foi utilizado verde de metila (*Methyl Green*) e hematoxilina. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400.

3.7 – Western Blotting

As amostras do lobo ventral, dorsal e glândula de coagulação de cinco animais de cada grupo experimental, os mesmos animais destinados às análises imunohistoquímicas, foram utilizadas para os procedimentos de Western Blotting. As amostras foram então coletadas e pré-congeladas em N-Hexano, acondicionadas em tubos criogênicos e, posteriormente, armazenadas em nitrogênio líquido à -80°C. À seguir, as amostras de tecido foram homogeneizadas com auxílio do Polytron em tampão de extração contendo, Triton-x-1%, NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, Hepes 1mM pH 7,6, PMSF 0,2 mM e 10°L/mL de coquetel inibidor de proteases (Sigma, St. Louis, MO). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 10 minutos a 11000 rpm a 4ºC. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad protein assay) e o correspondente a 75 µg de proteínas foi aplicado no gel de poliacrilamida. Após eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham). A qualidade da transferência assim como da quantificação de proteínas foi analisada pela coloração das membranas com Ponceau S. As membranas foram então bloqueadas com albumina soro bovino (3%) em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários policionais anti-rabbit AR-19 (sc-815) (Santa Cruz Biotechnology) para receptor androgênico (AR), anti-rabbit MC-20 (sc-542) (Santa Cruz Biotechnology) para receptor estrogênico alfa (ERα), anti-*rabbit* H-150 (sc-8974) (*Santa Cruz Biotechnology*) para receptor estrogênico beta (ERβ), anti-*rabbit* N-20 (sc-720) (*Santa Cruz Biotechnology*) para IGF-IRα ,na diluição 1:500. A seguir, os extratos foram lavados em tampão de lavagem (50 mM Na2PO4, 150 mM NaCL e 0,05% de Tween 20) por 60 minutos e em seguida incubados à temperatura ambiente por 2 horas em anticorpo secundário peroxidase-conjugado nas diluições de 1:800 à 1:2000. Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi revelada através de sistema ECL (Amersham), utilizando filme X-Omat da Kodak. A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria.

3.8 - Contagem de células Ki-67 positivas

Os índices proliferativos foram obtidos por contagem das células Ki-67 positivas e Ki-67 negativas (levemente contra-coradas com hematoxilina). Foram utilizadas amostras dos lobos ventral, dorsal e da glândula de coagulação de quatro animais de cada grupo experimental, os mesmos animais destinados a imunomarcação para Ki-67. A seguir, dez campos de cada animal foram analisados com objetiva de 40X e o número total de células Ki-67 positivas foi expresso em porcentagem do total de células epiteliais.

3.9 - Análise Estatística

Os parâmetros quantificados (áreas acinar, epitelial, estromal, luminal, nuclear, citoplasmática e celular, além das dosagens hormonais e dos percentuais apoptóticos e
proliferativos) foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (Montgomery, 1991; Zar, 1999). Os resultados obtidos desse trabalho de tese foram apresentados em formato de artigo, publicado ou a ser submetido à publicação em periódicos científicos.

Publicado no periódico Tissue and Cell - DOI: dx.doi.org/10.1016/j.tice.2012.03.007

"Senescence and steroid hormone receptor reactivities in accessory sex glands of elderly rats (Sprague-Dawley) following exogenous hormonal therapy"

Eduardo Marcelo Cândido, Wagner José Favaro, Fábio Montico, Amanda Cia Hetzl, Valéria Helena Alves Cagnon.

Department of Anatomy, Cellular Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

*Correspondence to: Dr. Valéria H. A. Cagnon, Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, PO Box 6109, São Paulo, Brazil. Telephone: (55) 19-3788- 6102. Fax: (55) 19-3289-3124. E-mail: <u>quitete@unicamp.br</u>.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the stromal and epithelial distribution of AR, ER α and ER β reactivities in the different accessory sex glands of elderly rats and during strong hormonal changes. Ten month old male rats were divided into six senile groups and submitted to treatment: Senile/Control group (SC); Senile/Testosterone group (ST): Senile/Estrogen group (SE); Castrated group (CA); Castrated/Testosterone group (CT); Castrated/Estrogen group (CE). After a 30 day treatment, the prostatic ventral lobe (VL), dorsal lobe (DL) and coagulating gland (CG) samples were processed for immunohistochemistry and Western Blotting. The results showed that AR immunoreactivity was characterized in the epithelium of VL and DL in senile/control rats and senile rats submitted to exogenous hormonal therapy. AR reactivity in the coagulating gland was verified predominantly in the stromal cells in the different experimental groups. ER α reactivity occurred predominantly in the stromal compartment in all accessory sex glands. In the DL and CG, ERa immunoreactivities were intense in the groups which received testosterone (ST) and estrogen (SE). ERB immunoreactivity in the CG was verified in the stromal compartment in the different experimental groups, showing a positive response to both increased testosterone and estrogen levels. ER^β reactivity, in the DL, was intensified in the stroma of senile rats with higher serum testosterone levels, and in senile rats with increased serum estrogen levels, especially in the glandular epithelium. Thus, the results revealed different distribution pattern of steroid hormone receptors in each one of the prostatic lobes in senescence, especially in the prostate dorsal lobe and coagulating gland, which is a fundamental factor due to the fact that major prostatic diseases occur in a later period of life.

ABBREVIATIONS

AR: androgen receptor; ERα: estrogen receptor alpha; ERβ: estrogen receptor beta; SC: senile/control (group); ST: senile/testosterone (group); SE: senile/estrogen (group); CA: castrated (group); CT: castrated/testosterone (group); CE: castrated/estrogen (group)

KEY WORDS

Senescence, Accessory sex glands, Steroid hormones, Androgen receptor, Estrogen receptors

1. INTRODUCTION

Senescence is the time of life where there are significant changes in the hormonal environment, which are associated to morphological and functional changes in the prostate of various species (Lau et al., 2003; Montico et al., 2011). This is when the greatest number of prostatic diseases is encountered, such as benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostatic carcinoma. (Krtolica and Campisi, 2002; Lau et al., 2003; Schulman and Lunenfeld, 2002). Androgen depletion, due to senility, and the resulting imbalance in the ratio between androgens and estrogens have been pointed out as being etiological factors for the onset of prostate lesions.

Nowadays, hormone replacement therapy has been clinically used in order to mitigate the harmful effects of androgen ablation due to aging, thus improving life quality of the elderly (Algarté-Génin et al., 2004; Morales, 2002). However, previous studies have shown that the administration of testosterone in men with prostate cancer often exacerbates the disease, causing increased bone weakness, urinary obstruction and death (Marks et al., 2006).

The prostate is a male sex accessory gland which is essentially important in the reproductive process as it secrets various components that influence the capacitation and survival 2001; Lin of the spermatozoa (Bull et al., and Bissell, 1993). The prostate, in rodents, is divided into three pairs of lobes: ventral, lateral and dorsal according to the location around the prostatic urethra and a pair of coagulating glands (or anterior prostate) located on the concave face of the seminal vesicles (Aumüller and Seitz, 1990; Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986). These prostatic lobes differ in morphology,

41

types of compounds secreted and hormonal response (Colombel and Buttyan, 1995; Costello and Franklin, 1994).

As it is an organ which is primarily regulated by androgens, the ventral lobe is often used in experimental studies of prostatic carcinogenesis (Slayter et al., 1994). The lateral and dorsal lobes have also been evaluated in prostatic carcinogenesis studies, as being the main lobes develop this of lesion (Greenberg al.. 1995). to type et Androgens are the main sex hormone responsible for morphogenesis and maintenance of the structure and functioning of the prostatic cells (Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005; Leav et al., 2001). Testosterone and dihydrotestosterone (DHT) are the main androgens to induce prostatic differentiation (Hsing, 2001; Toorians et al., 2003).

Castration is one of the most commonly used methods for the study of mechanisms involving testosterone in the maintenance and functioning of the prostate. Based on these studies, it is known that androgen deficiency leads to involution of the prostate, intense activation of apoptosis and remodeling of the extracellular matrix of this organ (Flórez and Carvalho, 2005). Although the prostate is an organ that is primarily regulated by androgens, recent evidence has shown estrogens to be important steroid hormones, not only in the development and maintenance of the prostate tissue, but also in the development of glandular lesions, due to synergistic action with the androgens (Cunha et al., 2002, Weihua et al., 2001).

The imbalance in the ratio between androgens and estrogens due to senescence, has been pointed out as being a crucial factor for the appearance of lesions in the prostate (Ellem and Risbridger, 2010). However, the way in which this hormonal imbalance propitiates the appearance of these glandular disorders, and especially the role that estrogen plays in hormone imbalance is not completely understood (Ellem and Risbridger, 2010).

Androgens express their biological effects by interacting with specific intracellular receptors, where the hormone-receptor complex, associated with nuclear chromatin regulates the expression of the specific gene (Prins et al., 1991). On the other hand, estrogenic effects on the prostate are the result of the binding of this hormone in distinct α and β estrogen receptors $(ER\alpha, ER\beta)$, which are predominantly expressed in the stroma and epithelium, respectively (Cunha et al., 2002; Risbridger et al., 2001). The estrogenic action through these receptors appears to be antagonistic, and the activation of ER α has been reported as being responsible for the occurrence of aberrant proliferation, inflammation and development of premalignant lesions (Ellem and Risbridger, 2010). The activation of ER β , on the other hand, measures antiproliferative, anti-inflammatory and potentially anti-carcinogenic effects in the prostate (Ellem and Risbridger, 2010). Studies have evaluated the occurrence of estrogen receptors in both the human and rodent prostate. Increased or decreased expression of the androgen receptor (AR) in human beings has been an important indicator in an attempt to understand the development and progression of glandular lesions, particularly prostatic cancer (Fleischmann et al., 2011; Li et al., 2004). The reactivity of both AR and the estrogen receptor in rodents has been shown in different periods of animal life, from newborns to adults (Banerjee et al., 2001; Pelletier et al., 2000; Yamashita, 2004).

Despite senescence being the period of life when most prostatic lesions occur, there are still many questions about the dynamics of the prostatic microenvironment and actions of steroid hormones in terms of aging. Also, it is unclear how hormonal changes during senescence are involved in the pathogenesis and progression of prostatic diseases in the elderly, in terms of cellular aging. Thus, the aim of this study was to characterize the stromal and epithelial distribution of androgen (AR) and estrogen (ER α and ER β) receptor reactivities in the different accessory sex glands of elderly rats, as well as during strong hormonal changes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 – Animals and experimental procedures

Ten months old male rats (Sprague-Dawley), totalizing 30 animals, were used and divided into six senile groups (5 animals in each group) and submitted to the treatment: Senile/Control group (SC): 5 mL/Kg peanut oil (s.c.); Senile/Testosterone group (ST): 5 mg/Kg testosterone cypionate (Deposteron-Novaquímica, São Paulo, SP, Brazil) diluted in 5 mL peanut oil (s.c.) (Franck-Lissbrant et al., 1998; Sáttolo et al., 2004); Senile/Estrogen group (SE): 25 μ g/Kg 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluted in 25 μ L peanut oil (s.c.) (Prins et al., 2001); Castrated group (CA): rats were anesthetized with a 0.25 mL/100g body weight dose of Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brazil) and then castrated by surgical incision; Castrated/Testosterone group (CT): surgical castration and after 30 days the rats received the same treatment as the ST group; Castrated/Estrogen group (CE): surgical castration followed by the same treatment as the SE group after 30 days.

All rats received water and solid ration *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). After 30 days of treatment, the animals were weighed every other day on a semi-analytical scale (Marte AS 5500) and sacrificed. Samples from ventral and dorsal lobes of prostate and the coagulating gland were collected and processed for immunohistochemical and Western Blotting analysis. Steroid hormone concentrations in blood samples were also determined.

2.2 – Immunohistochemistry

Prostate ventral and dorsal lobes and coagulating gland samples from five animals in each group were collected and fixed by immersion in Bouin's solution during 24 h. After that, the samples were dehydratated, diaphanized and embedded in paraplast (Paraplast Plus, St. Louis, USA) and cut into 6 µm thick sections. The sections were deparaffinized in xylene, hydrated by a decreasing alcohol series and rinsed under distilled water. Antigens were retrieved by boiling the sections in a 10 mM citrate buffer (pH 6.0) three times for 5 min in a microwave oven. After that, the sections were incubated in 0.3% H₂O₂ for 15 min to block endogenous peroxidase. Nonspecific binding was blocked by incubating the sections in a blocking solution (3% BSA in TBS-T buffer) for 1 h at room temperature. Primary rabbit AR-19 (sc-815) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for AR; rabbit MC-20 (sc-542) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for ERa; rabbit H-150 (sc-8974) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for ER β antibodies were diluted in 1% BSA (1:50 AR; 1:35 ER α and ER β) and applied to the sections overnight at 4 °C. The sections were washed for 15 min TBS-T (100 mM Tris-base, 1,5 M NaCl, Tween 20, deionized water) and incubated for 2 h at room temperature with rabbit (sc-3836) or mouse secondary HRP-conjugated antibody (Promega Corporation, USA). After, washing in TBS-T buffer, peroxidase activity was detected using diaminobenzidine (DAB) chromogen from Envision Kit (Dako) for 10 min. Sections were lightly counterstained with methylgreen or hematoxylin, dehydrated in an increasing ethanol series, diaphanized in xylene, mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and photographed in the photomicroscope (Nikon Eclipse E-400).

2.3 – Western blotting analysis

Prostate ventral and dorsal lobes and coagulating gland samples from five animals in each experimental group were collected and frozen. The samples were weighed and homogenized in a Polytron homogenizer (Kinematica Inc., Lucerne, Switzerland) for 1 min in a 50 µL/mg lysis buffer (100 mM Tris-base [pH 7.5], 10 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 2 mM PMSF, 0,1 mg/ml aprotinin, deionized water). The tissue homogenates were centrifuged at 14.000 rpm for 20 min at 4 °C and the protein level was quantified by means of Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The supernatants were mixed (1:1) with 3x sample buffer and transferred to a dry bath at 100 °C for 5 min. Aliquots containing 75 µg of protein were separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, USA) at 70V for 3 h (Transfer buffer: 25 mM Tris-base, methanol, 0,02% SDS, 192 mM glycine, deionized water). The membranes were blocked with TBS-T containing 3% BSA for 60 min, rinsed in TBS-T and incubated at 4 °C overnight with the following primary antibodies: rabbit AR-19 (sc-815) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for AR; rabbit MC-20 (sc-542) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for ER α ; rabbit H-150 (sc-8974) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for ERβ and mouse ACTBD11B7 (sc-81178) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) for β-actin diluted in 1% BSA (1:100 for β-actin, 1:150 for ERα and 1:350 for AR and $ER\beta$). The membranes were then incubated for 2 h with rabbit or mouse secondary HRPconjugated antibody (Promega Corporation, USA) diluted 1:1000 in 1% BSA. After washing in TBS-T, peroxidases activity was detected by incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) for 10 min. β -actin quantification was used as an endogenous control for the comparison among groups. The intensity of antigen bands in each experimental group was determined by densitometry using the Nis-Elements: Advanced Research Software (USA) and was expressed as the mean ratio in relation to β -actin band density.

2.4 – Serum hormone levels

After 24 h following the last steroid administration, experimental animals were anesthetized with 0.25 mL/100g body weight dose of Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brazil). Blood samples were collected from five animals of each group by cardiac puncture in the left ventricle. Plasma was isolated by centrifugation (10.000 rpm, 4 °C, 10 min) and stored in -20 °C for subsequent analysis. The testosterone (ng/mL) and estradiol (pg/mL) serum concentrations were determined by radioimmunoassay using Coat-a-Count total testosterone/estradiol kits (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA).

2.5 – Statistical analysis

Average data for total testosterone and estradiol concentrations and protein levels determined by Western Blotting were compared among groups and analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) and Tukey multiple range test, with a significance level set at 5% (Montgomery, 1991; Zar, 1999). The results were expressed as the mean ± standard deviation.

3. RESULTS

3.1 – Immunological Analysis

A) ANDROGEN RECEPTOR (AR)

In a general view, AR immunoreactivity was verified predominantly in the epithelium of ventral and dorsal lobes of the prostate and preferentially in the stromal cells of the coagulating glands of all experimental groups.

In the ventral lobe (VL), AR immunoreactivity was intense in the epithelial cells and moderate in the stromal ones of the SC and ST groups, representing 78% and 81% of protein levels in relation to the β -actin level, respectively (Figures 1a-b, 4 and Table 1). The AR protein levels in these groups were statistically similar and significantly higher than the other groups (Figure 4). In the other experimental groups (SE, CA, CT and CE), AR immunoreactivities were moderate or weak in the epithelium and weak or negative in the stroma (Figures 1c-f, 4 and Table 1).

In the dorsal lobe (DL), AR immunoreactivity was intense in the epithelial cells and moderate in the stromal ones of the ST and SE groups. The protein levels (83% and 81%, respectively) were statistically similar in these groups and significantly higher than the other experimental groups (Figures 2b-c, 5 and Table 2). In the SC and CT groups, AR immunoreactivities were moderate in the epithelium and weak in the stroma (Figures 2a, 2e, 5 and Table 2). And in the CA and CE groups, AR immunoreactivities were weak in the epithelial cells and negative in the stromal ones (Figures 2d, 2f, 5 and Table 2).

In the coagulating gland (CG), AR immunoreactivity was weak in the epithelial cells and intense in the stromal ones of the ST group, representing 102% of protein level in relation to the β -actin level, which was significantly higher than those found in the other groups (Figures 3b, 6 and Table 3). In the SC and SE group, weak AR immunoreactivities were verified in the epithelium and moderate in the stroma (Figures 3a, 3c, 6 and Table 3). Finally, in the CA, CT and CE groups, the AR immunoreactivities were negative in the epithelium and weak in the stroma (Figures 3d-f, 6 and Table 3).

B) ESTROGEN RECEPTOR ALPHA (ERα)

In a general view, $ER\alpha$ immunoreactivity was verified predominantly in the stroma of all accessory sex glands studied.

In the VL, ER α immunoreactivities were weak in the epithelial cells and intense in the stromal ones of the SE, CA and CE groups, showing significantly higher protein levels (137%, 133% and 136%, respectively) than those found in the SC, ST and CT groups (Figures 1i-j, 1l, 4 and Table 1).

In the DL, ER α immunoreactivity was moderate in the epithelial cells and intense in the stromal ones of the SE group, showing a high protein level (133%), which was statistically similar to that found in the CA group and significantly higher in relation to the other groups (Figures 2i, 5 and Table 2). In the SC and ST groups, ER α immunoreactivities were negative in the epithelium and intense in the stroma (Figures 2g-h, 5 and Table 2). In the CT and CE groups, ER α immunoreactivities were weak and negative in the epithelium, respectively, and moderate in the stroma (Figures 2k-1, 5 and Table 2).

In the CG, ER α immunoreactivity was negative in the epithelial cells and intense in the stromal ones of the ST, SE and CA groups (Figures 3h-j, 6 and Table 3). ER α protein level of CA group (108%) was significantly higher than those in the other experimental groups (Figure 6). In the SC and CT groups, ER α immunoreactivities were negative in the epithelium and moderate in the stroma (Figures 3g, 3k, 5 and Table 3). Finally, in the CE group, ER α immunoreactivity was negative in the epithelium and weak in the stroma (Figure 31, 5 and Table 3).

C) ESTROGEN RECEPTOR BETA (ER β)

 $ER\beta$ immunoreactivity was verified predominantly in the epithelium of VL and preferentially in the stroma of the CG of all experimental groups. In the DL, the intensity of $ER\beta$ immunoreaction was extremely changed by the hormonal status of the animals.

In the VL, ER β immunoreactivity was intense in the epithelium and negative in the stromal cells of SC group. The protein level (85%) was significantly higher than those found in the other groups (Figures 1m, 4 and Table 1). In the ST group, ER β immunoreactivity was moderate in the epithelium and weak in the stroma (Figure 1n, 4 and Table 1). In the SE and CT groups, ER β immunoreactivities were moderate in the epithelium and negative in the stroma (Figura 1o, 1q, 4 and Table 1). And, in the CA and CE groups, ER β immunoreactivities were weak in the epithelium and negative in the stroma (Figura 1o, 1q, 4 and Table 1). And, in the ST and CE groups, IR β immunoreactivities were weak in the epithelium and negative in the stroma (Figures 1p, 1r, 4 and Table 1).

In the DL, $ER\beta$ immunoreactivities were weak in the epithelium and intense in the stroma of the SC and ST groups (Figures 2m-n and Table 2). In contrast, $ER\beta$

immunoreactivity was intense in the epithelial cells and weak in the stromal ones of the SE group (Figure 2o and Table 2). The protein levels did not differ statistically between these groups (SC-127%; ST-123%; SE-129%), which were significantly higher than the other ones (Figures 2p-r, 5 and Table 2).

In the CG, ER β immunoreactivity was moderate in the epithelium and intense in the stromal cells of the SE group (Figure 2o and Table 3). The protein level (86%) was statistically similar to that found in the ST group and significantly higher than those found in the other experimental groups (Figures 3m-n, 3p-r, 6 and Table 3).

3.2 – Hormonal Analysis

Serum testosterone average from the SC group was significantly higher than those found in the CA, SE CT and CE groups, and statistically lower than that in the ST group, which presented the highest level of this hormone. The CA, SE, CT and CE groups did not present significantly differences in the serum testosterone levels (Table 4). In relation to serum estradiol, the level was significantly lower in the SC group than in the other experimental groups, with the exception of the ST group, which presented a similar value. The highest serum estradiol levels were presented by CA and CE groups, which showed the same statistically values and were significantly higher than those in the other groups. Finally, the SE and CT groups also presented similar serum estradiol levels between them, and were statistically higher than those found in the SC and ST groups and significantly lower than those found in the CA and CE groups (Table 4).

4. DISCUSSION

The results herewith showed that AR immunoreactivity was more strongly characterized especially in the glandular epithelium of the prostatic ventral and dorsal lobes in senile/control rats and senile rats submitted to exogenous hormonal therapy. On the other hand, an important and distinct feature was observed in relation to the coagulating gland whose AR reactivity was verified predominantly in the stromal cells in the different experimental groups. In addition, an evident AR upregulation by androgens was characterized in the experimental groups which presented higher serum testosterone levels (SC and ST groups) in the different accessory sex glands. Nevertheless, a positive AR response in the dorsal lobe was observed when the serum estrogen levels increased in the SE group.

Senescence is a period of life which is associated with important changes in the hormonal environment in the prostatic gland from different species (Roy-Burman et al., 2004). Different authors verified that the prostatic microenvironment is less sensitive to androgen actions in senile rats due to decreased AR levels, in addition to testosterone aromatization into estradiol (Banerjee et al., 2001; Cordeiro et al., 2008; Ellem and Risbridger, 2010). Despite verifying the decrease of the serum androgen levels with aging, the levels of active androgen in the prostate tissue (dihydrotestosterone – DHT) did not decrease due to the increase activity of 5 α -reductase enzyme, which converts testosterone into DHT (Bonnet et al., 1993; Droller, 1997). Ellem and Risbridger (2010) postulated that the balance between androgens and estrogens is critical to prostate health. These same authors revealed that elevated testosterone in the absence of estrogen led to the development of prostatic hypertrophy and hyperplasia,

but not malignancy. In contrast, high estrogen and low testosterone levels led to prostate inflammation and development of pre-malignant lesions.

Prostate AR immunolocalization and its enhanced immunoreactivity and expression in the prostate carcinogenesis have been highlighted by different studies (Culig et al., 2003; Pelletier et al., 2000; Yamashita, 2004). These earlier studies showed AR immunoreactivity especially in the ventral and dorsal lobes of the prostate, pointing to this steroid hormone receptor as being predominant in the epithelium of the accessory sex organs of young and adult rodents (Banerjee et al., 2001; Pelletier et al., 2000; Yamashita, 2004). Pelletier et al. (2000) observed a weak AR immunoreaction in the epithelium and stroma of the prostate of adult rats. Nevertheless, these same authors did not establish which prostatic lobes were used in this study, considering the prostate as a single organ. Yamashita (2004) characterized AR immunolocalization predominantly in the epithelium of the ventral and dorsal lobes of the prostate in young rats (8 weeks old). However, these same authors verified the occurrence of weak AR immunoreactivity in both the epithelial and stromal compartments of the coagulating gland. Also, Banerjee et al. (2001) utilizing young (4 months old) and senile male Brown Norway rats (24 months old), demonstrated AR immunoreaction predominantly in the epithelium of the ventral, dorsal and lateral lobes. These same authors showed that AR immunoreaction decreased in the ventral lobe and increased in the dorsal and lateral lobes in elderly rats.

Thus, it could be concluded that the positive AR response in the DL with increased serum estrogen levels suggested that the intensified estrogen and testosterone ratio imbalance could sensitize the AR in this gland, which could be an important signaling pathway in the glandular microenvironment in senescence. Also, it could be concluded that the AR

53

distribution pattern is lobe-specific in senile rats among the accessory sex glands considering the androgen action and hormonal imbalance. The differential hormone responses in senescence were emphasized in the coagulating gland and prostatic dorsal lobe leading to changes in the epithelial-stromal interactions in the glandular microenvironment of both these specific glands. Moreover, this lobe-specific hormone response in senescence could be guided by the estrogen levels which increase in senile rats.

The present results showed a positive ER α reactivity predominantly in the stromal compartment in all accessory sex glands, not only in the SC group but also in those groups which presented accentuated hormonal imbalance. It was verified in the ventral lobe (VL), that the groups with and rogen ablation and increased serum estrogen levels had intense ER α immunoreactivities. The groups which received testosterone (ST) and estrogen (SE) also showed intense ER α immunoreactivities in the dorsal lobe (DL) and coagulating gland (CG). On the other hand, $ER\beta$ exhibited a distinct distribution pattern between epithelial and stromal compartments among the accessory sex glands. First, ER β in the VL was detected preferentially in the glandular epithelium in the animals from all studied groups, independent of the hormonal status in these animals. In contrast, $ER\beta$ in the CG, was found, especially in the glandular stromal compartment in the different experimental groups, showing a positive response to both increased testosterone or estrogen levels. ER β reactivity, in the prostatic dorsal lobe, was intensified specially in the glandular stroma of senile rats with higher serum testosterone levels (SC and ST groups), and in senile rats with increased serum estrogen levels (SE and CA groups), specially in the glandular epithelium.

Estrogen action upon the prostate is mediated by two subtypes of estrogen receptor, ER α and ER β (Ellem and Risbridger, 2009; Weihua et al., 2002; Yamashita, 2004). ER α was the first widely studied isoform and was localized mainly in the prostatic stroma of several species (Weihua et al., 2002). Later, ER β was characterized and placed in the prostatic epithelium in the majority of species (Weihua et al., 2002). However, specific ER β roles in the prostatic environment are not completely elucidated. Different studies have shown that estrogen action mediated by ER α is able to induce different prostatic diseases, such as aberrant proliferation, inflammation and prostate cancer (Ellem and Risbridger, 2009, 2010). On the other hand, ER β seems to mediate beneficial anti-proliferative, anti-inflammatory and anti-carcinogenic estrogen effects, suggesting that estrogens also have important positive control on the prostate function (Ellem and Risbridger, 2010).

Yamashita (2004), studying the androgen and estrogen receptor distributions in male reproductive tissues of young Wistar rats (8 week old), observed ER β immunoreaction only in the epithelium of the VL, DL and CG. ER β immunoreaction was moderate in the VL, weak both in the DL and CG. These same authors verified that ER α reactivity was negative in both epithelial and stromal compartments of VL, DL and CG in young Wistar rats. Moreover, Pelletier et al. (2000) studied the prostate in adult rats (Sprague-Dawley) and observed positive ER β reactivity only in the glandular epithelium, in addition to the absence of prostatic positive ER α signal by means of both techniques: immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Mäkelä et al. (2000) characterized ER α and ER β expressions in the accessory sex glands and lower urinary tract in adult (4-month-old) Noble Rats. These authors showed strong ER β expression in the epithelium of the VL and LL and moderated ER β expression in the epithelium of CG. These same authors detected ER α only in the stromal cells surround the prostatic collecting ducts. In addition, Sar and Welsch (2000) investigated the ER α and ER β immunoreactivities in the rat prostate and epididymis of neonatal, postnatal, immature and adult male Sprague-Dawley rats. These authors detected ER α immunolocalization only in the connective tissue cells of the ventral prostate of early postnatal rats while ER β was seen in the epithelium of ventral and dorsolateral lobes. These same authors did not verify ER β immunoreaction in the prostate of neonatal rats. However, ER β presented a positive immunoreaction in the prostates of 5-day-old rats. Sar and Welsch (2000) also verified that ER β immunoreactivity increased in the older animals in relation to the younger animals. Also, Ellem and Risbridger (2009) postulated that, although ER α was commonly found in the prostate stroma of healthy tissues, under treatment with exogenous estrogen ER α can also be readily detected in the prostate epithelium.

Thus, it could be concluded that both ER α and ER β reactivities in the different prostatic lobes and coagulating gland showed a particular distribution in elderly rats, pointing to senescence as a determining factor for the structure and dynamic of the accessory sex glands microenvironment. Also, the androgen/estrogen ratio imbalance led to differential estrogen receptors immunoreactivities between epithelial and stromal compartments of the senile rats from all studied groups. ER α showed sensitivity not only in the increased estrogen levels, but also in the increased testosterone levels, pointing to a sensitization to hormonal imbalance in contrast to an upregulation of each one of these steroid hormones. Moreover, in the DL, the positive ER β immunoreactivity indicated an upregulation by androgens in the stromal cells. However, positive ER β immunoreactivity in the epithelial cells suggested an upregulation by estrogenic hormones, signaling different pathways of hormonal action through this steroid receptor.

Considering the different hormone responses in the accessory sex glands of the senile rats, it could be concluded that the lobe-specific hormone reactivity is a biologically important factor considering the cross-talk between glandular epithelial-stromal compartments and its implication in the development and tissue maintenance of these organs, as well as the occurrence of lesions, including glandular malignancies.

Thus, the results herewith revealed different distribution pattern of steroid hormone receptors in each one of the prostatic lobes in senescence, especially in the prostate dorsal lobe and coagulating gland, which is a fundamental factor due to the fact that major prostatic diseases occur in a later period of life.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (2009/50396-2)

REFERENCES

- Algarté-Génin, M., Cussenot, O., Costa, P., 2004. Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. Eur. Urol. 46, 285-295.
- Aumüller, G., Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. Int. Rev. Cytol. 121, 127-231.

- Banerjee, P.P., Banerjee, S., Brown, T.R., 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. Endocrinol. 142, 4066-4075.
- Bonnet, P., Reiter, E., Bruyninx, M., Sente, B., Dombrowicz, D., de Leval, J., Closset, J., Hennen, G., 1993. Benign prostatic hyperplasia and normal prostate aging: differences in types I and II 5 alpha-reductase and steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) levels, but not in insulin-like growth factor mRNA levels. J. Clin. Endocrinol. Metab. 77, 1203-1208.
- Bull, J.H., Ellison, G., Patel, A., Muir, G., Walker, M., Underwood, M., Khan, F., Paskins, L.,
 2001. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. Br. J. Cancer 84 (11), 1512-1519.
- Colombel, M.C., Buttyan, R., 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. Methods Cell Biol. 46, 369-385.
- Cordeiro, R.S., Scarano, W.R., Campos, S.G., Santos, F.C., Vilamaior, P.S., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. Micron 39 (8), 1312-1324.
- Costello, C.L., Franklin, B.R., 1994. Effects of prolactin on the prostate. Prostate 24, 162-166.
- Culig, Z., Klocker, H., Bartsch, G., Steiner, H., Hobisch, A., 2003. Androgen receptors in prostate cancer. J. Urol. 170, 1363-1369.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. Differentiation 70, 473-485.

- Droller, M.J., 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. Br. J. Urol. 79 (2), 42-52.
- Ellem, S.J., Risbridger, G.P., 2009. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1155, 174-186.
- Ellem, S.J., Risbridger, G.P., 2010. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 118, 246-251.
- Fleischmann, A., Rocha, C., Schobinger, S., Seiler, R., Wiese, B., Thalmann, G.N., 2011. Androgen receptors are differentially expressed in Gleason patterns of prostate cancer and down-regulated in matched lymph node metastases. Prostate 71, 453-460.
- Flórez, M.G., Carvalho, H.F., 2005. Célula epitelial prostática. In: Carvalho, H.F., Collares-Buzato, C.B. (Eds.), Células: uma abordagem multidisciplinary. Manole, Barueri, pp. 335-345.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., Rosen, J.M., 1995. Prostate câncer in a transgenic mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (8), 3439-3443.
- Hsing, A.W., 2001. Hormones and prostate cancer: what's next? Epidemiol. Rev. 23 (1), 42-58.
- Imamov, O., Schim, G.J., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2005. Estrogen receptor beta in health and disease. Biol. Reprod. 73 (5), 866-871.
- Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C., 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate 3 (1), 81-97.
- Krtolica, A., Campisi, J., 2002. Cancer and Aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34, 1401-1414.

- Lau, K.M., Tam, N.N., Thompson, C., Cheng, R.Y., Leung, Y.K., Ho, S.M., 2003. Ageassociated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. Lab. Invest. 83, 743-757.
- Leav, I., Lau, K.M., Adams, J.Y., McNeal, J.E., Taplin, M.E., Wang, J., Singh, H., Ho, S.M., 2001. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. Am. J. Pathol. 159, 79-92.
- Li, R., Wheeler, T., Dai, H., Frolov, A., Thompson T., Ayala, G., 2004. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate. Am. J. Surg. Pathol. 28, 928-934.
- Lin, C.Q., Bissel, M.J., 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 7 (9), 737-743.
- Mäkelä, S., Strauss, L., Kuiper, G., Valve, E., Salmi, S., Santti, R., Gustafsson, J., 2000. Differential expression of estrogen receptors α and β in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. Mol. Cell Endocrinol. 164, 109-116.
- Marks, L.S., Mazer, N.A., Mostaghel, E., Hess, D.L., Dorey, F.J., Epstein, J.I., Veltri, R.W., Makarov, D.V., Partin, A.W., Bostwick, D.G., Macairan, M.L., Nelson, P.S., 2006. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. JAMA 296 (15), 2351-2361.
- Montgomery, D.C., 1991. Design and analysis of experiments, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

- Montico, F., Hetzl, A.C., Cândido, E.M., Fávaro, W.J., Cagnon, V.H.A., 2011. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. Micron 42, 642-655.
- Morales, A., 2002. Androgen replacement therapy and prostate safety. Eur. Urol. 41, 113-120.
- Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F., 2000. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. J. Endocrinol. 165 (2), 359-370.
- Prins, G.S., Birch, L., Greene, G.L., 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. Endocrinol. 129 (6), 3187-3199.
- Prins, G.S., Birch, L., Habermann, H., Chang, W.Y., Tebeau, C., Putz, O., Bieberich, C., 2001. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. Reprod Fertil Dev. 13, 241-252.
- Risbridger, G.P., Wang, H., Frydenberg, M., Cunha, G., 2001. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. Endocrinol. 142 (6), 2443-2450.
- Sar, M., Welsch, F., 2000. Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. Andrologia 32, 295-301.
- Sáttolo, S., Carvalho, C.A.F., Cagnon, V.H.A., 2004. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. Tissue Cell, 36, 417-430.
- Schulman, C., Lunenfeld, B., 2002. The aging male. World J. Urol. 20, 4-10.

- Slayter, M.V., Anzano, M.A., Kadomatsu, K., Smith, J.M., Sporn, M.B., 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobound-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. Cancer Res. 54, 1440-1445.
- Sugimura, Y., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. Biol. Reprod. 34, 961-971.
- Toorians, A.W., Kelleher, S., Gooren, L.J., Jimenez, M., Handelsman, D.J., 2003. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 5207-5211.
- Weihua, Z., Mäkelä, S., Anderson, L.C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J.I., Jensen, E.V., Nilsson, S., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2001. A role of estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 6330-6335.
- Weihua, Z., Warmer, M., Gustafsson, J.A., 2002. Estrogen receptor beta in the prostate. Mol. Cell Endocrinol. 193, 1-5.
- Yamashita, S., 2004. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. Anat. Rec. A 279 (2), 768-778.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall Upper, New Jersey.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. AR, ER α , and ER β immunoreactivities in the ventral prostate of rats from SC (a, g, m), ST (b, h, n), SE (c, i, o), CA (d, j, p), CT (e, k, q) and CE (f, l, r) groups. Epithelial and stromal reactivities were graded as negative (-), weak (+), moderate (++) and intense (+++), according to Table 1. Bars = 50 μ m.

Figure 2. AR, ER α , and ER β immunoreactivities in the dorsal prostate of rats from SC (a, g, m), ST (b, h, n), SE (c, i, o), CA (d, j, p), CT (e, k, q) and CE (f, l, r) groups. Epithelial and stromal reactivities were graded as negative (-), weak (+), moderate (++) and intense (+++), according to Table 2. Bars = 50 μ m.

Figure 3. AR, ER α , and ER β immunoreactivities in the coagulating gland of rats from SC (a, g, m), ST (b, h, n), SE (c, i, o), CA (d, j, p), CT (e, k, q) and CE (f, l, r) groups. Epithelial and stromal reactivities were graded as negative (-), weak (+), moderate (++) and intense (+++), according to Table 3. Bars = 50 μ m.

Figure 4. Representative Western Blotting and semiquantitative determination for AR, ER α and ER β protein levels in the ventral prostate of the experimental groups. Data were expressed as the mean percentage ± standard deviation in relation to the endogenous control β -Actin.

Figure 5. Representative Western Blotting and semiquantitative determination for AR, ER α and ER β protein levels in the dorsal prostate of the experimental groups. Data were expressed as the mean percentage ± standard deviation in relation to the endogenous control β -Actin.

Figure 6. Representative Western Blotting and semiquantitative determination for AR, ER α and ER β protein levels in the coagulating gland of the experimental groups. Data were expressed as the mean percentage ± standard deviation in relation to the endogenous control β -Actin.









5								
	SC	ST	SE	CA	СТ	CE		
130 KDa	_	-	das		IN	"我"	AI	R, 120 KDa
95 KDa		1.000	and the second	10.74	<u>California</u>	1000		
72 KDa	-	-	_	-	-		← EF	Rα, 66 KDa
55 KDa					N# KNAUES	2		
55 KDa		-	-	-			← EF	Rβ, 53 KDa
43 KDa								
34 KDa		-			4114		← β-ά	actin, 43 KDa
Rela	ation between	AR, ERa	and ER	β protein i	levels to β	-actin p	attern (%) i	n the DL
	SC	ST		SE	CA		СТ	CE
AR	73±0.1 a	83±3.1	b 8.	1 ± 2.2 b	$46 \pm 1.$	9 c 6	56±1.3 d	$26 \pm 0.4 \text{ e}$
ERα	115 ± 0.7 a	113 ± 1.3	8a 13	3 ± 1.3 b	137 ± 1	.6 b 1	04 ± 0.8 c	95±2.9 d
ERβ	127 ± 1.4 a	123 ± 2.6	6a 12	9 ± 3.8 a	88 ± 2 .	7 b 🛛 3	33 ± 3.2 c	$31 \pm 2.1 c$
Means followed by the same letter did not differ significantly (Tukey's test, $P < 0.05$).								

6	50	ст	SE	C A	ст	CE		
130 KDa.		51	3	CA			-	
	-	-	No.	E-WA			← AI	R, 120 KDa
95 KDa.					1000			
72 KDa	-	STORE THE	1.7289		(Protection of			
	1000	-	-	-	Extract	1	← EF	Rα, 66 KDa
55 KDa.	-	NEL STORE						
55 KDa-	Kenne	-	-		-		← EF	Rβ, 53 KDa
43 KDa.								
34 KDa	-	-		-	-		← β-	actin, 43 KDa
Rela	tion betweer	n AR, ERo	and ER	β prot <mark>ein l</mark>	evels to f	8-actin pa	attern (%) i	n the CG
	SC	ST		SE	CA		CT	CE
AR	93±3.9 a	$102 \pm 2.$	7 b 7	$8 \pm 4.1 c$	47 ± 1 .	6 d 3	6 ± 3.4 e	29 ± 1.8 e
ERα	84 ± 1.8 a	95 ± 4.3	5 b 92	2±3.3b	108 ± 0	.9 c 8	0 ± 1.2 a	54 ± 2.4 d
ERβ	79±1.4 a	87 ± 2.1	1 b 80	5±1.3b	$69 \pm 2.$	7 c 7	6±1.6 a	33 ± 1.9 d
Mean	ıs followed b	y the same	e letter di	id not diff	er signific	antly (T	nkey's test,	P<0.05).

Receptors \rightarrow	AR		ΕRα		ΕRβ	
↓ Groups	Ep	St	Ep	St	Ep	St
Senile/Control	+++	++	+	+	+++	-
Senile/Testosterone	+++	++	-	+	++	+
Senile/Estrogen	+	+	+	+++	++	-
Castrated	+	-	+	+++	+	-
Castrated-testosterone	++	+	+	++	++	-
Castrated-estrogen	+	+	+	+++	+	-

Table 1. AR, ER α and ER β immunoreactivities in the ventral lobe of the prostate from

different experimental groups.

Intense (+++), Moderate (++), Weak (+) Negative (-)

Table 2. AR, ER α and ER β immunoreactivities in the dorsal lobe of the prostate fromdifferent experimental groups.

Receptors \rightarrow	AR		ΕRα		ΕRβ	
↓ Groups	Ep	St	Ep	St	Ep	St
Senile/Control	++	+	-	+++	+	+++
Senile/Testosterone	+++	++	-	+++	+	+++
Senile/Estrogen	+++	++	++	+++	+++	+
Castrated	+	-	+	+++	++	+
Castrated-testosterone	++	+	+	++	+	++
Castrated-estrogen	+	-	-	++	+	+

Intense (+++), Moderate (++), Weak (+) Negative (-)

Table 3. AR, ER α and ER β immunoreactivities in the coagulating glands from different

Receptors \rightarrow	AR		ΕRα		ΕRβ	
↓ Groups	Ep	St	Ep	St	Ep	St
Senile/Control	+	++	-	++	+	++
Senile/Testosterone	+	+++	-	+++	+	+++
Senile/Estrogen	+	++	-	+++	++	+++
Castrated	-	+	-	+++	-	+
Castrated-testosterone	-	+	-	++	-	++
Castrated-estrogen	-	+	-	+	-	+

experimental groups.

Intense (+++), Moderate (++), Weak (+) Negative (-)
Hormones	Groups					
	SC	ST	SE	CA	СТ	CE
Testosterone	3.1 ± 1.0 a	5.6 ± 0.9 b	1.1 ± 0.2 c	0.04 ± 0.01 c	0.3 ± 0.1 c	0.1 ± 0.7 c
Estradiol	0.03 ± 0.006 a	0.06 ± 0.01 a	0.4 ± 0.2 ab	1.0 ± 0.1 c	$0.5 \pm 0.3 \mathbf{b}$	1.2 ± 0.1 c

Table 4. Serum testosterone (ng/mL) and estradiol (pg/mL) from rats of all experimental groups.

Means followed by the same letter did not differ significantly (Tukey's test P < 0.05).

Manuscrito que será traduzido e submetido à publicação no periódico *Microscopy Research and Technique*.

"Caracterização morfológica das glândulas sexuais acessórias frente à administração de testosterona e estrógeno em ratos (Sprague-Dawley) senis"

Eduardo Marcelo Cândido, Fábio Montico, Amanda Cia Hetzl, Larissa Akemi Kido, Valéria Helena Alves Cagnon.

Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Valéria H. A. Cagnon, Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Cx Postal 6109, São Paulo, Brasil. Telefone: (55) 19-3788- 6102. Fax: (55) 19-3289-3124. E-mail: <u>quitete@unicamp.br</u>.

1 - RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar e comparar a estrutura dos lobos prostáticos e da glândula de coagulação em ratos senis, submetidos a diferentes administrações hormonais exógenas, além de identificar os processos de proliferação e apoptose nesses órgãos. Trinta ratos da linhagem Sprague-Dawley com 10 meses de idade foram divididos em seis grupos experimentais: Grupo Senil/Controle (SC); Grupo Senil/Testosterona (ST); Grupo Senil/Estrógeno (SE); Grupo Castrado (CA); Grupo Castrado-Testosterona (CT); e Grupo Castrado-Estrógeno (CE). Após trinta dias de tratamento, os animais foram sacrificados e as amostras do lobo ventral (LV), lobo dorsal (LD) e glândula de coagulação (GC) foram coletadas e processadas para microscopia de luz e imunohistoquímica. Os resultados mostraram manutenção tecidual epitelial no LD e na GC após administração de testosterona (grupos ST). Já o LV apresentou espaçamento entre epitélio e estroma. Na administração de testosterona pós-castração (grupos CT), as respostas divergiram entre as glândulas analisadas. No LV tanto o epitélio quanto o estroma mantiveram-se alterados. O LD apresentou recuperação morfológica na comparação com o grupo CA. Já na GC, enquanto o epitélio mostrou sinais de recuperação, o estroma manteve características de hiperplasia e hipertrofia. A administração de estrógeno (grupos SE e CE) manteve ou pouco alterou a morfologia da GC, porém, provocou ampla desestruturação tecidual nos lobos ventral e dorsal, com geração de micro-ácinos, presença de neoplasia intraepitelial prostática (NIP) e focos inflamatórios. Ambos os hormônios sexuais, testosterona e estrógeno, foram capazes de induzir proliferação e apoptose, sendo a apoptose mais exacerbada. Entretanto, o estrógeno apresentou preponderante influência na indução da morte celular, o que pode ser tanto resultado direto de sua ação quanto consequência de sua ação indireta sobre os níveis androgênicos através da interferência no eixo hipotálamo-hipófise-gonada. Assim, pode-se concluir que a administração exógena de testosterona foi efetiva e atuou positivamente em relação ao estrógeno na manutenção da estrutura glandular geral dos lobos analisados, indicando esse hormônio esteroide como principal responsável pela manutenção estrutural das diferentes glândulas acessórias. Já a administração de estrógeno exógeno, especialmente frente à castração, provocou acentuadas alterações morfológicas tanto no epitélio quanto no estroma das diferentes glândulas sexuais acessórias, principalmente nos lobos ventral e dorsal, sugerindo a efetiva sinalização estrogênica na geração de um microambiente, especialmente estromal, potencialmente favorável à ocorrência de lesões glandulares que podem vir a preceder processos de malignescência glandular.

PALAVRAS-CHAVE: Lobos prostáticos, ratos, administração hormonal, morfologia, apoptose, proliferação.

2 - INTRODUÇÃO

A maturação e sobrevivência dos espermatozóides são eventos dependentes de condições favoráveis, as quais são propiciadas pela secreção prostática com seus diferentes constituintes (Lin & Bissell, 1993; Bull et al., 2001). A próstata é uma glândula sexual acessória masculina, presente na maioria dos mamíferos, e que na espécie humana, localiza-se ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária, onde são descritas três regiões glandulares: zona periférica, zona central e região pré-prostática (Setchell & Brooks, 1988). Já nos roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal de acordo com a localização ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumüller & Seitz, 1990). Esses diferentes lobos prostáticos diferem quanto à morfologia, aos tipos de produtos secretados e à resposta hormonal (Colombel & Buttyan, 1995; Costello & Franklin, 1994).

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática (Hsing, 2001; Toorians et al., 2003). Entretanto, apesar da próstata ser primariamente regulada por andrógenos, seu desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores, é sensível a outros hormônios, como o estrógeno, que atua sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais do órgão quanto às lesões (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). A biossíntese de estrógeno no organismo masculino ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização

desse hormônio pela enzima aromatase (citocromo P450 aromatase), expressada pelo gene Cyp19 (Fishman & Goto, 1981; Risbridger et al., 2003). Esta enzima é regulador crítico entre o balanço de andrógeno e estrógeno, a qual contribui para o nível circulante e no tecido desses hormônios (Risbridger et al., 2003).

A castração tem sido um dos métodos mais utilizados para o estudo dos mecanismos envolvendo a testosterona na manutenção e funcionamento da próstata. A partir desses estudos, sabe-se que a deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão (Banerjee et al., 2000; Vilamaior et al., 2000). Assim, a apoptose, combinada com a diminuição da proliferação celular, tem sido um dos principais mecanismos envolvidos na regressão da próstata em situações de privação androgênica (Arcolino et al., 2010). Sabendo-se disso, terapias antiandrogênicas, incluindo a castração cirúrgica e/ou química, são as primeiras escolhas no tratamento de tumores primários (Bruni-Cardoso et al., 2010).

Outro fator importante a ser considerado no desenvolvimento e manutenção da próstata é o avanço da idade. A senescência é o período da vida na qual ocorrem importantes mudanças no ambiente hormonal, resultando em alterações morfofisiológicas na próstata de várias espécies, as quais predispõem o órgão ao desenvolvimento de desordens urológicas tais como a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (Banerjee et al., 2000; Krtolica & Campisi, 2002; Lau et al., 2003; Roy-Burman et al., 2004). Nas diferentes espécies animais, como no homem e roedores, o desbalanço hormonal decorrente do envelhecimento é fator determinante para as alterações morfofuncionais na próstata (Banerjee et al., 2000; Roy-Burman et al., 2004). Ellem & Risbridger (2010) revelaram como a alteração nas taxas de testosterona/estrógeno podem induzir a tais lesões glandulares. Segundo esses

autores, a elevação dos níveis de testosterona na ausência de estrógenos leva ao desenvolvimento de hipertrofia e hiperplasia, mas não à malignescência glandular. Em contraste, alto nível de estrógeno associado a baixos níveis de testosterona tem sido ligados ao desenvolvimento de inflamação na senescência e à emergência de lesões pré-malignas (Ellem & Risbridger, 2010). Banerjee et al. (2000) demonstraram que os níveis de DHT epitelial foram decrescidos com o avanço da idade. Inversamente, os níveis de estradiol e estrona foram elevados tanto no epitélio quanto no estroma prostático (Banerjee et al., 2000). Dessa forma, as alterações nos níveis endógenos de hormônios esteróides relacionados ao envelhecimento contribuem efetivamente para o desequilíbrio glandular. Também, é conhecido que a redução dos níveis de testosterona no idoso causa a regressão do crescimento prostático tanto de origem benigna quanto maligna. No entanto, em homens com carcinoma prostático avançado a administração de testosterona frequentemente exacerba a doença, causando aumento da debilidade óssea, obstrução urinária e morte (Marks et al., 2006). Por outro lado, Algarté-Génin et al. (2004) relataram que a terapia hormonal exógena em homens idosos, cujos exames clínicos preliminares não revelaram lesões pré-malignas como a NIP, preveniria nesses pacientes o surgimento de doenças prostáticas, devido ao reestabelecimento dos níveis androgênicos normais que impediriam o desequilíbrio hormonal e a consequente interrupção da homeostase natural do órgão.

Devido às condições patológicas que acometem a próstata, essencialmente durante a senescência, sua morfologia, fisiologia e, recentemente, os complexos mecanismos moleculares que a envolvem têm sido examinados com particular atenção. Desordens benignas e malignas da próstata estão entre as doenças mais comuns a afetar os homens, particularmente em países industrializados (Ellem & Risbridger, 2010). Estatísticas vêm

78

demonstrando que o câncer de próstata (CaP) é, atualmente, o segundo maior causador de mortes relacionadas à cânceres, sendo agora o tipo de câncer não-cutâneo mais comumente diagnosticado entre os homens em países desenvolvidos, com os mais altos índices pertencendo aos norte-americanos, seguidos pelos australianos e neo-zelandeses (Parkin et al., 2005; Montejo et al., 2010). Tanto a HBP quanto o CaP afetam a qualidade de vida dos envolvidos e os custos em saúde excedem, anualmente e a nível mundial, 4 bilhões de dólares (Guess, 2001). A HBP caracteriza-se por predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). Já o câncer de próstata, é considerado uma doença do epitélio e, frequentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Além da HBP e do CaP, outros processos patológicos da próstata tem sido constantemente reportados em diferentes tipos de estudos. Entre eles, a neoplasia intraepitelial prostática (NIP), considerada uma lesão que precede o carcinoma prostático, e a atrofia inflamatória proliferativa (AIP). A AIP, descrita inicialmente por De Marzo et al. (1999), é tipicamente associada com inflamação prostática, e considerada uma possível precursora da NIP de alto grau e do CaP (Nelson et al., 2003). As lesões da AIP tendem a ocorrer na periferia da próstata e emergem como consequência da proliferação regenerativa das células epiteliais como uma resposta a uma injúria causada por infecção, trauma celular resultante de dano oxidativo, hipóxia e autoimunidade (Nelson et al., 2003). Além disso, as lesões da AIP são frequentemente observadas adjacentes à NIP de algo grau e estágios iniciais do CaP (De Nunzio et al., 2011).

Assim, considerando as lesões prostáticas ocorridas na senescência e a persistência de dúvidas com relação aos benefícios e/ou malefícios que reposição hormonal durante a senescência poderia acarretar, o objetivo geral do presente estudo foi o de caracterizar e

comparar estruturalmente os diferentes lobos prostáticos de ratos senis através da morfologia e de parâmetros morfométricos, frente à administração hormonal exógena de estrógeno e testosterona.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley com 10 meses de idade obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Os animais obtidos do CEMIB foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia até atingirem 10 meses de idade, sendo, posteriormente, divididos em 6 grupos experimentais com 5 animais cada:

<u>Grupo Senil/Controle (SC)</u>: os animais receberam injeções subcutâneas de 5 mL/ Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;

<u>Grupo Senil/Testosterona (ST)</u>: os animais receberam 5 mg/ Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona (Deposteron-Novaquímica/Brazil) diluídos em 5 mL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias, modificado de (Franck-Lissbrant et al., 1998);

<u>Grupo Senil/Estrógeno (SE)</u>: os animais receberam 25 μg/ Kg de peso corpóreo de 17βestradiol (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluídos em 25 μL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias, modificado de (Prins et al., 2001);

- <u>Grupo Castrado (CA)</u>: os animais foram anestesiados com Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brasil) na dosagem de 0,25 ml da mistura para cada 100 gramas de peso corpóreo e, posteriormente, castrados por incisão cirúrgica com retirada dos testículos, sendo sacrificados após 30 dias de castração;
- <u>Grupo Castrado-Testosterona (CT)</u>: 30 dias após castração os animais receberam 5mg/ Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona diluídos em 5 mL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;
- <u>Grupo Castrado-Estrógeno (CE)</u>: 30 dias após castração os animais receberam 25 μg/ Kg de peso corpóreo de 17β- estradiol diluídos em diluídos em 25 μL de óleo de amendoim, em dias alternados por 30 dias;

Os animais dos seis grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após 30 dias de tratamento todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados e, após a coleta dos órgãos e

sangue, sacrificados. As amostras dos lobos ventral e dorsal da próstata e as glândulas de coagulação foram coletadas para análises morfométricas, de microscopia de luz e imunohistoquímica. O sangue foi obtido através de punção cardíaca para a realização das dosagens hormonais séricas.

3.2 - Microscopia de Luz

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands[®], Paulínia, SP, Brasil) na dosagem de 0,25 ml da mistura para cada 100 gramas de peso corpóreo. Através de incisão abdomino-pélvica, amostras dos lobos ventral e dorsal da próstata, além da glândula de coagulação foram coletadas de cinco animais de cada grupo experimental, e fixadas em paraformaldeído 4% (por 24 horas) e solução de Bouin (por oito horas). Todas as amostras coletadas foram da porção média-distal do órgão. Após fixação, os tecidos fixados em paraformaldeído foram lavados em água corrente *overnight*, enquanto que os fixados em solução de Bouin foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de alcoóis. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo (Biocut – Modelo 1130) com espessura de 5 µm, com posterior coloração em Hematoxilinaeosina (HE), Picrosírius-Hematoxilina (PH) (Junqueira et al., 1979), Prata Amoniacal (PA) (Vilamaior et al., 2000), fotografados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidos às análises morfométricas.

3.3 - Detecção da Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico

Amostras dos lobos ventral, dorsal e glândula de coagulação de cinco animais, os mesmos destinados à microscopia de luz (com fixação em paraformaldeído 4%), foram seccionadas e submetidas às reações de detecção da fragmentação do DNA e Feulgen. A fragmentação do DNA foi detectada utilizando o sistema de detecção fluorescente para apoptose (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os núcleos apoptóticos foram identificados e fotografados através do microscópico Nikon TS-100, equipado com fluorescência (DXM 1200F, Nikon).

Para a reação de Feulgen, os cortes foram submetidos à hidrólise com 4 N HCl por 75 minutos e tratados com o reagente de Schiff por 40 minutos. Depois de extensa lavagem, os cortes foram desidratados e montados em lâminas. A seguir, seis campos de cada animal foram analisados com objetiva de 40X e o índice apoptótico foi determinado dividindo-se o número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos microscópicos. Os núcleos apoptóticos foram identificados por características como picnose e/ou fragmentação nucleolar, de acordo com Kerr & Searle (1973). Somente as células epiteliais (luminais e basais) foram consideradas para contagem.

3.4 - Morfometria em nível de Microscopia de Luz

Para o estudo morfométrico foram utilizados cinco animais de cada grupo, os mesmos utilizados para a microscopia de luz. As secções das próstatas ventral, dorsal e glândula de coagulação foram provenientes das lâminas histológicas coradas com HE. Posteriormente, as imagens celulares obtidas foram digitalizadas no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidas às mensurações das áreas celular, nuclear, citoplasmática, acinar, luminal, epitelial e estromal por meio do programa *Nis elements: advanced research* (IPLS-W, Software Windows para captura de imagem).

A quantificação das áreas acinar, luminal, epitelial e estromal foram realizadas em cinco campos aleatoriamente definidos por animal (25 campos por grupo), fixando-se as observações com a objetiva de 20X. Já para quantificação das áreas celular, nuclear, e citoplasmática foram utilizadas células epiteliais contidas em cinco campos aleatoriamente definidos por animal (25 campos por grupo), fixando-se as observações com a objetiva de 100X.

3.5 - Imunomarcação para Ki-67

A imunomarcação para Ki-67 utilizou amostras do lobo ventral, dorsal e glândula de coagulação inclusos em solução de Bouin (5 animais por grupo). A seguir foram obtidos os cortes com 6 μm de espessura no micrótomo (Biocut – Modelo 1130), coletados em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em uma série decrescente de alcoóis e lavados em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos em micro-ondas (potência de 750 W) e proteinase K (diluída em solução de Tris-HCl 100 mM e EDTA 50 mM). O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,6% em metanol) por 15 minutos. Para diminuir as ligações inespecíficas proteína-proteína, os cortes foram incubados em solução

bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, o antígeno Ki-67 foi localizado através do anticorpo policlonal *rabbit* H-300 (sc-15402, *Santa Cruz Biotechnology*) para Ki-67, diluídos (1:50) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. Após a lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-*rabbit* (1:300, sc-3837, *Santa Cruz Biotechnology*) e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB) diluída em tampão PBS. As lâminas com as amostras foram então levemente contra-coradas com hematoxilina, desidratadas, diafanizadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400.

3.6 - Contagem de células Ki-67 positivas

Os índices proliferativos foram obtidos por contagem das células Ki-67 positivas e Ki-67 negativas (levemente contra-coradas com hematoxilina). Foram utilizadas amostras dos lobos ventral, dorsal e da glândula de coagulação de quatro animais de cada grupo experimental, os mesmos animais destinados a imunomarcação para Ki-67. A seguir, dez campos de cada animal foram analisados com objetiva de 40X e o número total de células Ki-67 positivas foi expresso em porcentagem do total de células de um dado tipo celular (células epiteliais).

3.7 - Análise Estatística

Os parâmetros quantificados (áreas acinar, epitelial, estromal, luminal, nuclear, citoplasmática e celular, além dos percentuais apoptóticos e proliferativos) foram analisados

estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (Montgomery, 1991; Zar, 1999).

4 - RESULTADOS

Análises Estrutural/Morfométrica e Percentuais Apoptótico e Proliferativo

Lobo Ventral

a) Grupo Senil/Controle (SC)

O lobo ventral da próstata foi caracterizado por ácinos de diferentes tamanhos e mucosa pregueada (Figs. 1a, 1b e 1c), com área acinar estatisticamente maior em relação ao grupo CA (Gráfico 1). O epitélio secretor simples apresentou células colunares com núcleos basais (Figs. 1a e 1b). A área epitelial, embora numericamente maior que a apresentada pelos demais grupos, diferiu significativamente apenas dos CA e CE (Gráfico 1). O estroma prostático apresentou fibras colágenas (Fig. 1b) e reticulares (Fig 1c) adjacentes ao epitélio, entre as células musculares lisas e ao redor de vasos sanguíneos. Células inflamatórias foram observadas no estroma prostático, especialmente entre os elementos fibrilares (Fig. 1b). A área estromal glandular foi significativamente menor em relação àquela apresentada pelos animais do grupo CA. As áreas luminal, nuclear, citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente em relação aos demais grupos (Gráficos 1 e 2). Os percentuais apoptótico e proliferativo foram estatísticamente similares ao dos grupos ST e CT e significativamente menores em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráficos 7 e 8, e Figs. 4a e 5a, respectivamente).

b) Grupo Senil/Testosterona (ST)

Os ácinos do lobo ventral prostático apresentaram mucosa pregueada e epitélio secretor formado por células colunares (Figs. 1d e 1e). Espaçamento entre epitélio e estroma em vários ácinos foi evidenciado, mostrando desprendimento da membrana basal (Figs. 1d e 1f). As áreas acinar, epitelial e luminal não diferiram significativamente em relação ao grupo SC. Porém, aumento significativo na área epitelial foi caracterizado em relação aos grupos CA e CE (Gráfico 1). O estroma prostático apresentou fibras colágenas e reticulares aumentadas adjacentes ao epitélio glandular (Fig. 1e e 1f). Células inflamatórias dispersas pelo estroma também foram observadas, porém com frequência aparentemente menor em relação ao grupo SC (Fig. 1e). A área estromal, entretanto, não diferiu estatisticamente em relação ao grupo SC (Gráfico 1), o mesmo ocorrendo com as áreas nuclear, citoplasmática e celular (Gráfico 2). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC e CT e significativamente menor em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4b). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao do grupo SC, sendo significativamente maior em relação ao do grupo CT e significativamente menor em relação ao apresentado pelos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5b).

c) Grupo Senil/Estrógeno (SE)

O lobo ventral da próstata apresentou ácinos com mucosa de menor pregueamento se comparado aos grupos SC e ST (Fig. 1g e 1h). Ácinos diminuídos e micro-ácinos encontravam-se nas amostras desse grupo (Fig. 1g e 1h) e, embora a área acinar não difira estatísticamente dos grupos SC e ST, esta foi significativamente maior na comparação com o grupo CA (Gráfico 1). O estroma apresentou focos com grande concentração de células inflamatórias (Fig 1g), além de espessa camada de fibras colágenas e reticulares concentradas ao redor dos ácinos, adjacentes ao epitélio glandular (Figs. 1h e 1i, respectivamente). A área estromal não diferiu estatisticamente daquela apresentada no grupo SC, assim como as áreas luminal e nuclear (Gráficos 1 e 2). Já na comparação com o grupo CA, a área estromal desse grupo foi significativamente menor (Gráfico 1), enquanto que as áreas citoplasmática e celular foram estatisticamente maiores (Gráfico 2). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos CA, CT e CE e significativamente maior em relação ao dos grupos SC e ST (Gráfico 7 e Fig. 4c). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente menor em relação ao dos grupos SC, ST e CT (Gráfico 8 e Fig.5c).

d) Grupo Castrado (CA)

Os ácinos da próstata ventral apresentaram-se atróficos com ampla redução altura epitelial (Figs. 1j, 1k e 11). A presença frequente de microácinos é evidente (Figs. 1j e 1k). Tanto a área acinar quanto a epitelial foram significativamente reduzidas em relação àquelas apresentadas pelos grupos SC, ST, SE e CT (Gráfico 1). O estroma prostático caracterizou-se pela ocorrência de fibras colágenas e reticulares, hipertrofiadas e onduladas, circundando os micro-ácinos (Fig. 1k e 11), além de infiltrados de células inflamatórias tanto no interior do estroma quanto na interface epitélio/estroma (Fig. 1k). A área estromal foi significativamente maior em relação a maioria dos grupos, com exceção ao grupo CE com o qual não diferiu

estatisticamente (Gráfico 1). As áreas luminal, nuclear, citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente em relação ao grupo senil/controle (Gráficos 1 e 2). Somente em relação aos grupos SE e CT, as áreas citoplasmática e celular diferiram estatisticamente, sendo significativamente menores nesse grupo (Gráfico 2). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SE e CE e, significativamente maior em relação ao dos grupos SC, ST e CT (Gráfico 7 e Fig. 4d). Com relação ao percentual proliferativo, esse foi significativamente maior em relação ao apresentado por todos os demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5d).

e) Grupo Castrado/Testosterona (CT)

Ácinos de diferentes tamanhos e epitélio glandular atrófico na maior parte dos ácinos caracterizaram o lobo ventral prostático dos animais do grupo CT (Figs. 1m, 1n e 1o). As áreas acinar e epitelial, embora menores numericamente, não diferiram estatisticamente daquelas apresentadas pelos animais do grupo SC, porém, foram significativamente maiores na comparação com o grupo CA (Gráfico 1). O estroma prostático apresentou-se hipertrófico com grande quantidade de fibras colágenas e reticulares de aspecto ondulado (Figs. 1n e 1o), além de células musculares lisas volumosas entre esses elementos fibrilares (Fig. 1n). Presença moderada de células inflamatórias dispersas entre os elementos fibrilares do estroma (Fig. 1n). A área estromal não diferiu estatisticamente em relação ao grupo SC, sendo significativamente menor apenas em relação ao grupo CA (Gráfico 1). As áreas luminal, nuclear, citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente em relação ao grupo SC (Gráficos 1 e 2). Apenas na comparação com o grupo CA, as áreas celular e citoplasmática foram estatisticamente maiores

nesse grupo (Gráfico 2). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC, ST e SE e, significativamente menor em relação ao dos grupos CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4e). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao do grupo SC e significativamente menor em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5e).

f) Grupo Castrado/Estrógeno (CE)

Ácinos e microácinos de diferentes tamanhos e com variação da altura epitelial caracterizaram o lobo ventral da próstata dos animais do grupo CE (Figs. 1p, 1q e lr). Alguns ácinos apresentaram neoplasia intraepitelial prostática (Fig. 1p). O estroma prostático apresentou hipertrofia dos elementos fibrilares especialmente ao redor dos ácinos, com fibras reticulares de aspecto ondulado (Figs. 1q e 1r). Espessas camadas de células musculares lisas circundando os ácinos (Fig. 1p), além de focos inflamatórios foram observados em vários pontos do estroma prostático (Fig. 1q). Somente a área epitelial apresentou diminuição significativamente estatística em relação ao grupo SC (Gráfico 1). Variáveis como áreas acinar, luminal, estromal, nuclear, citoplasmática e celular) não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo SC e aos demais grupos (Gráficos 1 e 2). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SE e CA e, significativamente maior em relação ao dos grupos SC, ST e CT (Gráfico 7 e Fig. 4f). Enquanto que o percentual proliferativo foi estatísticamente menor em relação ao do grupo CA e significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5f).

Lobo Dorsal

a) Grupo Senil/Controle (SC)

O lobo dorsal da próstata foi caracterizado por ácinos com mucosa pregueada e epitélio secretor simples com células colunares e núcleos basais (Figs. 2a, 2b e 2c). A área acinar foi estatisticamente maior em relação à maioria dos grupos, com exceção ao grupo CT (Gráfico 3). A área epitelial apresentou mesma característica, sendo que não foi estatisticamente maior somente em relação ao grupo ST (Gráfico 3). A área luminal não diferiu estatisticamente do grupo SC, sendo significativamente maior que os grupos SE, CA e CE (Gráfico 3). O estroma prostático apresentou escassas fibras colágenas adjacentes ao epitélio (Fig. 2b). Fibras reticulares espessas encontravam-se concentradas ao redor dos ácinos (Fig. 2c). Diferentemente do lobo ventral, raras células inflamatórias foram observadas (Figs. 2a e 2b). A área estromal foi significativamente menor em relação à maioria dos grupos, com exceção ao grupo CT (Gráfico 3). A área nuclear diferiu estatisticamente apenas em relação ao grupo CE (Gráfico 4). Já as áreas citoplasmática e celular foram estatisticamente menores em relação aos grupos ST e CT e, significativamente maiores na comparação com o grupo CE (Gráfico 4). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos ST e CT e, significativamente menor em relação aos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4g). Já o percentual proliferativo foi significativamente maior em relação ao dos grupos ST, CT e CE e, estatísticamente menor em relação ao percentual apresentado pelo grupo SE, não diferindo significativamente apenas em relação ao do grupo CA (Gráfico 8 e Fig. 5g).

b) Grupo Senil/Testosterona (ST)

A estrutura glandular foi similar à observada nos animais do grupo SC (Fig. 2d e 2e). A área acinar foi estatisticamente inferior à do grupo SC e significativamente maior na comparação com os grupos SE, CA e CE (Gráfico 3). A área epitelial não diferiu estatisticamente do grupo SC, porém foi significativamente maior em relação aos demais grupos (Gráfico 3). O estroma glandular foi hipertrófico com fibras colágenas e reticulares aumentadas ao redor dos ácinos (Fig. 2e e 2f) A área estromal foi significativamente maior na comparação com o grupo SC e, estatisticamente menor em relação aos grupos SE, CA e CE (Gráfico 3). A área nuclear não diferiu estatisticamente em relação ao grupo SC, sendo significativamente maior apenas em relação aos grupos CA e CE (Gráfico 4). Já as áreas citoplasmática e celular foram estatisticamente maiores frente aos grupos SC, SE, CA, e CE (Gráfico 4). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC e CT e significativamente menor em relação aos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4h). Com relação ao percentual proliferativo, esse foi significativamente menor em relação ao dos grupos SC, SE e CA e estatísticamente maior em relação ao dos grupos CT e CE (Gráfico 8 e Fig. 5h).

c) Grupo Senil/Estrógeno (SE)

Os ácinos do lobo dorsal apresentaram epitélio secretor cúbico, o qual foi atrófico em relação aos grupos SC e ST (Figs. 2g e 2h). Eventuais ácinos mostraram epitélio desorganizado com núcleos basais picnóticos de distribuição irregular em relação às células

epiteliais luminais (Fig. 2g). Ás áreas acinar e epitelial foram significativamente menores comparadas aos grupos SC e ST (Gráfico 3). No estroma, as fibras colágenas e reticulares apresentaram aumento e pregueamento formando um número maior de camadas concêntricas ao redor dos ácinos (Figs. 2h e 2i). A área estromal foi significativamente maior em relação aos grupos SC, ST e CT. Porém, essa mesma variável foi significativamente menor se comparada ao grupo CE (Gráfico 3). As áreas nuclear, citoplasmática e celular não diferiram do grupo SC (Gráfico 4). O percentual apoptótico foi estatísticamente maior em relação ao dos grupos SC, ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos SC, ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos SC, ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos SC, ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4i). Já o percentual proliferativo foi significativamente maior em relação ao da maioria dos grupos, sendo estatísticamente similar apenas em relação ao percentual apresentado pelo grupo CA (Gráfico 8 e Fig. 5i).

d) Grupo Castrado (CA)

O lobo dorsal da próstata dos animais castrados apresentou ácinos de diferentes tamanhos com atrofia epitelial (Figs. 2j e 2k). Neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs) foram encontradas em alguns ácinos (Fig. 2j). As áreas acinar, epitelial e luminal foram significativamente reduzidas em relação ao grupo senil/controle (Gráfico 3). O estroma glandular apresentou-se hipertrófico, com grande quantidade de fibras colágenas (Fig. 2k) e reticulares (Fig. 2l / Gráfico 3) Focos de células inflamatórias foram evidenciados (Fig. 2k). As áreas nuclear, citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente das caracterizadas no grupo SC (Gráfico 4). Já em relação aos grupos que receberam testosterona exógena (ST e CT), as áreas citoplasmática e celular apresentaram-se significativamente reduzidas (Gráfico

4). O percentual apoptótico foi significativamente maior ao dos grupos SC, ST, SE e CT e, estatísticamente similar em relação ao do grupo CE (Gráfico 7 e Fig. 4j). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao dos grupo SC e SE, sendo significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5j).

e) Grupo Castrado/Testosterona (CT)

Os animais que receberam testosterona exógena após castração apresentaram ácinos de diferentes tamanhos com epitélio atrófico, embora com recuperação morfológica (Figs. 2m e 2n). As áreas acinar e luminal não diferiram estatisticamente do grupo SC. Já a área epitelial apresentou-se significativamente reduzida em relação ao grupo SC (Gráfico 3). Fibras colágenas e reticulares foram evidentes adjacentes ao epitélio glandular (Fig. 2n e 2o). A área estromal não diferiu significativamente da verificada no grupo SC, sendo estatisticamente menor em relação aos grupos SE, CA e CE (Gráfico 3). As áreas nuclear, citoplasmática e celular, mostraram-se aumentadas em relação ao grupo SC, sendo que somente a área nuclear não diferiu estatisticamente (Gráfico 4). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC e ST e, significativamente menor em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4k). Enquanto que o percentual proliferativo foi estatísticamente maior em relação ao do grupo CE e significativamente menor em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5k).

f) Grupo Castrado/Estrógeno (CE)

Ácinos de tamanhos variados e atróficos caracterizaram o lobo dorsal prostático dos animais desse grupo. A grande maioria dos ácinos apresentou estrutura similar à encontrada no grupo SE, com desorganização epitelial e células de núcleos picnóticos, especialmente na porção basal do epitélio (Fig 2p). O estroma foi caracterizado pela presença de células inflamatórias e grande quantidade de elementos fibrilares hipertróficos (Figs. 2q e 2r). As áreas acinar, luminal, epitelial, estromal, nuclear, citoplasmática e celular diferiram significativamente em relação aos grupos SC e ST (Gráficos 3 e 4). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao do grupo CA e, significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 7 e Fig. 41). Já o percentual proliferativo foi estatisticamente menor em relação ao apresentado por todos os demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 51).

Glândulas de Coagulação

a) Grupo Senil/Controle (SC)

As glândulas de coagulação dos animais senis/controle demonstraram ácinos de diferentes tamanhos, mucosa pregueada e lúmen evidente. As áreas acinar e luminal foram significativamente maiores em relação aos grupos SE e CA, não diferindo estatisticamente dos grupos ST e CT (Gráfico 5). O epitélio secretor simples foi formado por células cúbicas de núcleos centrais (Figs. 3a e 3b). A área epitelial foi estatisticamente menor em relação ao grupo ST (Gráfico 5). O estroma glandular apresentou fibras colágenas e reticulares espessas e

organizadas em feixes distribuídos adjacentes ao epitélio secretor e na totalidade do compartimento estromal (Fig. 3b e 3c). Eventuais células inflamatórias foram observadas no estroma glandular (Fig. 3a). A área estromal foi significativamente menor na comparação com os grupos SE, CA e CE (Gráfico 5). Já as áreas nuclear, citoplasmática e celular foram estatisticamente maiores em relação aos grupos CA e CE, não diferindo estatisticamente dos demais grupos experimentais (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4m). O percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao do grupo CT, sendo significativamente maior em relação ao percentual apresentado pelos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5m).

b) Grupo Senil/Testosterona (ST)

A aplicação de testosterona exógena nos animais senis (ST) promoveu ligeira hipertrofia do epitélio secretor com células tendendo de cúbicas à colunares e mucosa pregueada. Os núcleos foram basais na maioria das células epiteliais. O lúmen acinar reduzido, ocupado pelo pregueamento epitelial (Figs. 3d e 3e). As áreas acinar e luminal não diferiram estatisticamente se comparadas ao grupo SC. Já a área epitelial foi significativamente maior em relação ao grupo SC (Gráfico 5). O estroma apresentou espessas camadas de células musculares lisas ao redor dos ácinos (Fig. 3d e 3e). Fibras colágenas e reticulares aumentadas encontravam-se adjacentes ao epitélio e, também, no interior do estroma glandular. (Figs. 3e e 3f). A área estromal não apresentou diferença estatística em relação ao grupo SC, embora os elementos fibrilares apresentassem hiperplasia (Gráfico 5). Também, as áreas nuclear,

citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente da caracterizada no grupo SC (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC, ST e CT e, significativamente menor em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4n). Enquanto que o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao dos grupos SE e CE, e significativamente menor em relação ao percentual dos grupos SC, CA e CT (Gráfico 8 e Fig. 5n).

c) Grupo Senil/Estrógeno (SE)

As amostras glandulares do grupo SE apresentaram ácinos com mucosa acentuadamente pregueada, epitélio simples e células tendendo de cúbicos a colunares com núcleos predominantemente basais (Figs. 3g e 3h). As áreas acinar e luminal apresentaram-se significativamente menores em relação aos grupos SC, ST e CT (Gráfico 5). A área epitelial não diferiu estatisticamente dos diferentes grupos experimentais (Gráfico 5). Hiperplasia e hipertrofia dos elementos fibrilares foi verificada no estroma glandular, sendo as fibras reticulares marcadamente onduladas, projetando-se nas dobras epiteliais (Figs. 3h e 3i). Camadas concêntricas de células musculares lisas também se encontravam presentes ao redor de vários ácinos (Fig. 3g). A área estromal foi significativamente maior em relação aos grupos SC, ST e CT (Gráfico 5). As áreas nuclear, citoplasmática e celular foram significativamente maiores em relação aos grupos CA e CE (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos CA e CE e, significativamente maior em relação ao dos grupos SC, ST e CT (Gráfico 7 e Fig. 4o). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente

similar ao dos grupos ST, CA e CE, sendo significativamente menor em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 50).

d) Grupo Castrado (CA)

As glândulas de coagulação dos animais castrados apresentaram ácinos atróficos de diâmetro reduzido com epitélio cúbico simples e núcleos centrais na maioria das células (Figs. 3j e 3k). As áreas acinar e luminal foram significativamente reduzidas na comparação com o grupo SC (Gráfico 5). Já a área epitelial, embora menor numericamente, não diferiu estatisticamente da apresentada no grupo SC (Gráfico 5). O estroma foi caracterizado pela hipertrofia de células musculares lisas entremeadas por fibras colágenas e reticulares, também aumentadas, ao redor dos ácinos (Figs. 3k e 31), sendo sua área aumentada significativamente em relação à maioria dos grupos experimentais, com exceção do grupo SE do qual foi similar (Gráfico 5). Poucas células inflamatórias foram encontradas dispersas pelo estroma (Fig. 3j). As áreas nuclear, citoplasmática e celular foram significativamente menores em relação ao grupo SC e demais grupos, não diferindo estatisticamente apenas em relação ao grupo CE (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SE e CE e significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 7 e Fig. 4p). Já o percentual proliferativo não diferiu significativamente daqueles apresentados pelos grupos SE e CE, sendo estatísticamente maior em relação ao do grupo ST e significativamente menor em relação ao percentual proliferativo dos grupos SC e CT (Gráfico 8 e Fig. 5p).

e) Grupo Castrado/Testosterona (CT)

O tratamento com a testosterona após castração levou a recuperação parcial da maioria dos ácinos com nítida retomada do diâmetro dos ductos (Fig. 3m). As áreas acinar e luminal foram estatisticamente similares àquelas observadas nos grupos SC e ST (Gráfico 5). O epitélio glandular simples apresentou células cúbicas e núcleos centrais (Fig. 3n), sendo que a área epitelial não diferiu estatisticamente da apresentada pelo grupo SC, mostrando-se significativamente maior em relação aos grupos CA e CE (Gráfico 5). Fibras colágenas (Fig. 3m) e reticulares (Fig. 3o) hipertróficas encontraram-se dispersas por todo o estroma. Assim como na maioria dos grupos, raras células inflamatórias foram encontradas no estroma glandular (Fig. 3m). A área estromal foi estatisticamente similar àquela dos grupos SC e ST, e menor na comparação com os demais grupos estudados (Gráfico 5). As áreas nuclear, citoplasmática e celular não diferiram estatisticamente em relação ao grupo SC, sendo significativamente maiores na comparação com os grupos CA e CE (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SC e ST e, significativamente menor em relação ao dos grupos SE, CA e CE (Gráfico 7 e Fig. 4q). Enquanto que o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao do grupo SC e significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5q).

f) Grupo Castrado/Estrógeno (CE)

A aplicação exógena de estrógeno após castração apresentou ácinos glandulares reduzidos com área acinar significativamente menor em relação aos grupos SC, ST e CT e

estatisticamente maior se comparada ao grupo CA (Gráfico 5). Apesar do epitélio glandular estar atrofiado, mostrando células reduzidas com núcleos ocupando grande parte do volume celular, as áreas acinar e epitelial não diferiram estatisticamente das observadas no grupo SC, embora sejam numericamente menores (Figs. 3p e 3q / Gráfico 5). Células de fenótipo intermediário apresentando citoplasma claro ao redor dos núcleos ou na célula como um todo, foram identificados no epitélio glandular (Fig. 3q). No estroma glandular, caracterizou-se aumento de células musculares lisas circundando os ácinos (Fig. 3p), além de fibras colágenas e reticulares, hipertróficas e desorganizadas não só adjacentes ao epitélio, mas por todo o compartimento estromal (Figs. 3q e 3r). A área estromal foi maior estatisticamente das apresentadas pelos grupos SC, ST e CT (Gráfico 5). Já as áreas nuclear, citoplasmática e celular foram menores estatisticamente em relação à maioria dos grupos estudados, com exceção do grupo CA (Gráfico 6). O percentual apoptótico foi estatísticamente similar ao dos grupos SE e CA e, significativamente maior em relação ao dos demais grupos (Gráfico 7 e Fig. 4r). Já o percentual proliferativo foi estatísticamente similar ao dos grupos ST e SE, sendo significativamente menor na comparação com o percentual proliferativo apresentado pelos demais grupos (Gráfico 8 e Fig. 5r).

5 - DISCUSSÃO

No presente estudo, as análises morfométricas do lobo ventral da próstata mostraram que as áreas acinar, luminal, epitelial, estromal, nuclear, citoplasmática e celular no grupo SC, não diferiram de forma significativa em relação aos grupos ST e SE. Já os animais do grupo CA apresentaram áreas, acinar e epitelial, significativamente menores em relação aos demais grupos, sendo similar estatísticamente apenas das médias apresentadas pelo grupo CE. Desta forma, notou-se que a reposição exógena tanto de testosterona quanto de estrógeno em animais senis não levou a alterações significativas dos parâmetros morfométricos que caracterizaram o lobo ventral no grupo SC. Entretanto, a aplicação exógena somente de testosterona após castração levou a recuperação estrutural parcial, de quase todas as variáveis quantificadas analisadas, considerando comparação com o grupo castrado. Por outro lado, a aplicação de estrógeno no animal castrado não promoveu recuperação estrutural dos principais parâmetros quantitativos analisados.

Além disso, a análise estrutural do lobo ventral mostrou que os animais senis (SC) apresentaram epitélio com células colunares e núcleos basais, além de células inflamatórias dispersas entre os elementos fibrilares do estroma. Já o tecido glandular do lobo ventral do grupo ST destacou-se por apresentar espaçamento entre o epitélio e estroma com aparente deslocamento da lâmina basal e menor evidência de células inflamatórias estromais. No tecido prostático do grupo SE, a presença de vários micro-ácinos e focos de células inflamatórias no estroma foram característicos, diferindo do padrão observado nos grupos SC e ST. Também, a castração promoveu ampla regressão do órgão, com a ocorrência de numerosos micro-ácinos, NIP e grande aumento de elementos fibrilares e células inflamatórias no estroma. Nos grupos

CT e CE, sinais de recuperação epitelial foram verificados, o que não impediu a ocorrência micro-ácinos, lesões como a NIP e estroma glandular com marcantes alterações, especialmente no grupo CE.

O lobo dorsal prostático dos animais do grupo SC foi caracterizado por ácinos de diversos tamanhos, epitélio secretor colunar e eventuais células inflamatórias e elementos fibrilares. Características semelhantes foram observadas no grupo ST, contudo, destacou-se hipertrofia estromal sem aumento de células inflamatórias, o que pode ser verificado através da área estromal significativamente maior em relação ao grupo SC. Já no grupo SE, destacouse a ocorrência de epitélio alterado com células basais apresentando núcleos picnóticos, além de um número maior de células inflamatórias no estroma em relação aos grupos SC e ST. Tanto a área acinar quanto a estromal foram significativamente distintas entre esses três grupos (SC, ST e SE), sendo a área acinar maior no grupo SC e seguidamente menor nos grupos ST e SE. De maneira oposta, foi verificada área estromal menor no grupo SC e progressivamente maior nos grupos ST e SE. No grupo CA, a atrofia acinar e epitelial, incluindo a presença de NIP, além de marcada hipertrofia estromal foram evidenciadas no lobo dorsal prostático. Grande quantidade células inflamatórias também foram observadas nesse grupo. Já no grupo CT, recuperação parcial tanto morfológica quanto dos parâmetros morfométricos foi verificada no lobo dorsal, enquanto que o grupo CE apresentou características similares àquela dos grupos CA e SE.

Com relação à glândula de coagulação, ácinos de diversos tamanhos, revestidos por epitélio secretor cúbico simples foi caracterizado no grupo SC. Grande quantidade de elementos fibrilares circundavam os ácinos e escassas células inflamatórias estavam presentes no estroma glandular dos animais do grupo SC. No grupo ST, as áreas acinar, luminal,

104

epitelial e estromal foram similares às do grupo SC. Já no grupo SE, constatou-se hipertrofia estromal em relação a SC e ST. No grupo CA, ácinos de diâmetro reduzido com epitélio atrófico e grande quantidade de células musculares lisas e elementos fibrilares estromais foram característicos nessas glândulas. No grupo CT, observou-se recuperação da área acinar, em relação ao grupo CA, sem alterações estruturais marcantes no estroma, tendo esse, área e morfologia similares às do grupo SC. No grupo CE foi verificada diminuição da área estromal, além de aumento das áreas acinar e luminal em relação ao CA, sendo as áreas acinar, luminal e epitelial, menores que as encontradas no grupo SC.

Correlacionando a estrutura das três glândulas sexuais acessórias estudadas, foi evidenciada a prevalência da testosterona na manutenção de suas características morfológicas, sendo que o lobo dorsal apresentou-se mais positivamente responsivo à testosterona exógena, mesmo após a castração. Por outro lado, as glândulas dos animais que receberam estrógeno exógeno sofreram amplas alterações. Os lobos ventral e dorsal são os que mais apresentaram alterações, tanto epiteliais quanto estromais, muitas delas com características similares a AIP (Atrofia Inflamatória Proliferativa). A presença de NIP combinada com focos inflamatórios são fatores etiológicos que evidenciam a possibilidade de progressão para futuras lesões, incluindo as de malignescência celular. Ainda, na glândula de coagulação, que se mostrou menos susceptível às variações hormonais, a terapia hormonal estrogênica levou o órgão a alterações, especialmente no ambiente estromal.

Com relação aos percentuais de apoptose e proliferação entre as glândulas sexuais acessórias estudadas, verificou-se em todas elas e nos diferentes grupos experimentais, que o percentual apoptótico foi superior ao proliferativo. A castração levou ao aumento tanto do percentual proliferativo quanto do apoptótico nas diferentes glândulas analisadas. A

105

administração de testosterona no animal senil e no animal senil-castrado manteve próximos e sem distinção estatística os percentuais apoptóticos das glândulas avaliadas. Já o percentual proliferativo, apenas no lobo dorsal desses mesmos grupos (ST e CT), foi significativamente reduzido em relação ao grupo SC, indicando diferença na resposta proliferativa, dependendo da glândula alvo e do estado hormonal do animal. A administração de estrógeno elevou tanto os percentuais apoptóticos quanto os proliferativos nos diferentes lobos analisados, sendo a combinação entre castração e estrógeno exógeno aquela que mais promoveu apoptose. Apenas no lobo dorsal do grupo CE, o percentual proliferativo não foi superior ao do grupo controle e aos dos que receberam testosterona.

A apoptose, combinada com a diminuição da proliferação celular, é um dos principais mecanismos que levam à regressão da próstata em situações de privação androgênica (Arcolino et al., 2010). Taylor et al., (2006), em um estudo utilizando culturas de células da próstata de ratos e camundongos *knockout* para os receptores de estrógeno (α ERKO e β ERKO), demonstraram o efeito direto do 17 β -estradiol sobre a próstata, incluindo a indução da apoptose das células em cultura, que se apresentaram estrógeno-dependentes, mas não tiveram ação mediada via receptores de estrógeno α e β (ER α e ER β). Taylor et al., (2006) demonstraram também, que altas concentrações de estrógeno podem regular negativamente a expressão proteica do receptor de andrógeno (AR), o que proveria uma possível explicação para a apoptose induzida pelo estrógeno. Segundo Luo et al., (2008) utilizando ratos Sprague-Dawley adultos, o 17 β -estradiol foi capaz de induzir tanto a proliferação quanto a apoptose de células musculares lisas prostáticas. Esses autores relataram ainda, que a proliferação celular se deu devido ao aumento na expressão de ciclina D1, a qual acelera a transição da fase G1 para S do ciclo celular. Já a indução da apoptose nas células musculares lisas prostáticas ocorreu em função de uma suprarregulação da expressão de Bax (uma proteína próapoptótica), o que levou ao aumento na taxa de Bax/Bcl-2, o qual foi considerado fator crucial para o desencadeamento da apoptose (Luo et al., 2008). Assim, pode-se concluir ambos, testosterona e estrógeno, são capazes de induzir proliferação e apoptose, sendo a apoptose mais exacerbada. Entretanto, o estrógeno apresentou maior efeito na indução da morte celular, o que pode ser tanto um resultado direto de sua ação quanto uma consequência de sua ação indireta sobre os níveis androgênicos através da interferência no eixo hipotalâmicohipofisário-gonadal.

Kiplesund et al., (1988) em estudo comparativo do efeito da castração sobre os diferentes lobos prostáticos de ratos Wistar, observou redução tecidual, especialmente epitelial, em todos os órgãos analisados, sendo o lobo ventral o mais afetado pelos efeitos da castração em relação aos lobos dorsal, lateral e glândula de coagulação. Esses mesmos autores, acreditavam ainda, que os lobos ventral e lateral da próstata pudessem ser mais andrógenos-dependentes em relação ao lobo dorsal e à glândula de coagulação. Montico et al., (2011), analisando o efeito da terapia hormonal sobre a estrutura e reatividade das distroglicanas no lobo ventral de ratos (Sprague-Dawley) senis, observaram alterações morfológicas tanto no epitélio secretor quanto na estroma glandular de animais tratados com testosterona e estrógeno. Esses autores constataram que a terapia hormonal não foi capaz de reverter a hipertrofia estromal e ocorrência de células inflamatórias que, concomitantes às alterações epiteliais, indicaram que a reposição hormonal na senescência cria um microambiente reativo favorável à patogênese glandular.

O termo Atrofia Inflamatória Proliferativa (AIP) foi usado inicialmente por De Marzo et al., (1999) para descrever lesões prostáticas caracterizadas por atrofia focal, inflamação

107
crônica e células luminais em proliferação no epitélio atrófico. As inflamações crônicas, ocorridas por meio da AIP ou não, também tem sido foco recente de atenção. A inflamação per se é um fenômeno complexo consistindo de componentes humorais (citocinas) e celulares (leucócitos, monócitos e macrófagos) (Sciarra et al., 2008). Além disso, é usualmente um evento auto-limitante, com a liberação inicial de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos, seguidos de finalização da inflamação mediada por citocinas antiinflamatórias (Hamid et al., 2011). Entretanto, na inflamação crônica, composta por células T cronicamente ativadas e fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), há persistência desses promotores ou uma falha nos mecanismos que finalizam a inflamação. Assim, mais e mais citocinas pró-inflamatórias são liberadas como, também, vários fatores angiogênicos e de crescimento, os quais amplificam a resposta inflamatória (Hamid et al., 2011). Desta forma, as inflamações crônicas poderiam interferir ativamente na interação epitélio-estroma, ou mesmo, dar suporte às lesões instaladas, por meio das citocinas e fatores angiogênicos e de crescimento que constantemente são produzidas por elas. Quintar et al., (2012) utilizando ratos Wistar adultos submetidos à castração, demonstraram que a testosterona suprarregulou o sistema de imunidade inata nos tecidos prostáticos. Esses autores notaram que tanto o epitélio quanto o estroma, que são fontes importantes de proteínas de defesa prostática, aumentaram a produção das mesmas mediante depleção androgênica. Também, esses mesmos autores em trabalhos anteriores demonstraram que ambas, células epiteliais e estromais prostáticas, são capazes de suprarregular sinais pró-inflamatórios em situações de infecção bacteriana in vivo (Quintar et al., 2006, 2010). Recentemente, outros pesquisadores tem descrito a importância da senescência celular, um mecanismo naturalmente supressivo à ação tumoral, como sendo também um promotor de efeitos nocivos ao microambiente tecidual de vários órgãos, entre eles, a próstata (Coppé et al., 2010; Davalos et al., 2010). O mais significativo desses efeitos seria a aquisição do chamado "Fenótipo Secretor Associado à Senescência" (SASP – Senescent-associated Secretory Phenotype), onde fibroblastos senescentes adquirem um fenótipo secretor, liberando exacerbadamente citocinas pró-inflamatórias (Coppé et al., 2010; Davalos et al., 2010). Assim, considerando-se os presentes resultados, pode-se concluir que as características da AIP, com ênfase à ocorrência de inflamação, observadas nos grupos SE, CA e CE dos lobos ventral e dorsal, indicaram como o desbalanço hormonal, provocado pela castração e/ou acentuado pela adição de estrógeno exógeno, poderiam levar esses órgãos, a lesões cada vez mais severas, que comprometeriam a homeostase glandular dos mesmos.

A literatura especializada também demonstrou que o balanço entre os níveis circulantes de hormônios androgênicos e estrogênicos mudam significativamente com o avançar da idade (Vermeulen et al., 2002). Os níveis plasmáticos androgênicos declinam enquanto os estrogênicos se mantêm constantes (Droller 1997). A mudança de tal relação entre esses hormônios têm sido responsabilizada por desencadear eventuais lesões nas glândulas sexuais acessórias, especialmente na próstata (Ellem and Risbridger 2010). Estudos anteriores mostraram que animais tratados com andrógenos e estrógenos criaram uma reserva estrogênica na próstata levando, eventualmente, ao desenvolvimento de displasia epitelial e adenocarcinoma. Já animais *Knockout* para aromatase, expostos a doses elevadas de andrógenos, resultaram no desenvolvimento de hiperplasia prostática, embora alterações malignas não fossem detectadas (McPherson et al., 2007; Härkönen & Mäkelä, 2004). Risbridger et al., (2003) demonstraram que tanto andrógenos quanto estrógenos por si só, são capazes de alterar o crescimento normal da próstata, porém, individualmente, eles não induzem à malignidade prostática. Desta forma, a ação combinada de ambos os hormônios é

necessária para desencadear os eventos de malignescência glandular (Risbridger et al., 2003). Em concordância com os últimos autores, Bosland (2006) postulou que os andrógenos atuaram como fortes promotores de tumor quando concomitantes a uma fraca, mas contínua, presença do carcinógeno genotóxico, 17β-estradiol. Segundo, Algarté-Génin (2004), a terapia hormonal exógena em homens idosos, cujos exames clínicos preliminares não revelaram lesões pré-malignas como a NIP, poderia prevenir nesses pacientes o surgimento de doenças prostáticas, já que a reposição hormonal restabeleceria os níveis androgênicos normais impedindo as desrregulações celulares na próstata em função da queda e/ou desequilíbrio hormonal.

Assim, considerando-se os padrões estruturais analisados para os diferentes lobos prostáticos na senescência, pode-se concluir que a administração exógena de testosterona foi efetiva e atuou positivamente em relação ao estrógeno na manutenção da estrutura glandular geral dos lobos analisados, indicando esse hormônio esteroide como principal responsável pela manutenção estrutural das diferentes glândulas acessórias. Contudo, a suplementação de testosterona em animais senis levou a alterações estruturais evidentes no microambiente estromal, o que aponta o estroma como compartimento glandular sinalizador e/ou deflagrador de alterações estruturais provenientes do desequilíbrio hormonal entre andrógenos e estrógenos.

Ainda, pode-se concluir que, a depleção androgênica causada pela castração no período da senescência levou a alterações estruturais severas, cuja administração exógena de testosterona, indicou remodelação tecidual, especialmente no lobo dorsal. Entretanto, no lobo ventral a testosterona exógena não foi suficiente para garantir o retorno ao equilíbrio

110

morfológico glandular. Já a administração de estrógeno exógeno, especialmente frente à castração, provocou acentuadas alterações morfológicas tanto no epitélio quanto no estroma das diferentes glândulas sexuais acessórias, principalmente nos lobos ventral e dorsal, sugerindo a efetiva sinalização estrogênica na geração de um microambiente, especialmente estromal, potencialmente favorável à ocorrência de lesões glandulares que podem vir a preceder processos de malignescência glandular, através de acentuada alteração na interação epitélio-estroma que garante a integridade estrutural desses órgãos.

AGRADECIMENTO

À CAPES/PROEX e CAPES/PROAP pelo suporte financeiro que permitiu a execução deste trabalho.

6 – REFERÊNCIAS

- Algarté-Génin, M., Cussenot, O., Costa, P., 2004. Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. Eur. Urol. 46, 285-295.
- Arcolino, F.O., Ribeiro, D.L., Gobbo, M.G., Taboga, S.R., Góes, R.M., 2010. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. Int. J. Exp. Pathol. 91, 144-154.
- Aumüller, G., Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. Int. Rev. Cytol. 121, 127-231.
- Banerjee, P.P., Banerjee, S., Brown, T.R., 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. Endocrinol. 142, 4066-4075.
- Bruni-Cardoso, A., Augusto, T.M., Pravatta, H., Damas-Souza, D.M., Carvalho, H.F., 2010. Stromal remodelling is required for progressive involution of the rat ventral prostate after castration: identification of a matrix metalloproteinase-dependent apoptotic wave. Int. J. Androl. 33, 686-695.
- Bull, J.H., Ellison, G., Patel, A., Muir, G., Walker, M., Underwood, M., Khan, F., Paskins, L., 2001. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. Br. J. Cancer 84 (11), 1512-1519.
- Colombel, M.C., Buttyan, R., 1995. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. Methods Cell Biol. 46, 369-385.
- Costello, C.L., Franklin, B.R., 1994. Effects of prolactin on the prostate. Prostate 24, 162-166.

- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. Differentiation 70, 473-485.
- De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I., Nelson, W.G., 1999. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am. J. Pathol. 155, 1985-1992.
- De Nunzio, C., Kramer, G., Marberger, M., Montironi, R., Nelson, W., Schröder, F., Sciarra, A., Tubaro, A., 2011. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. Eur. Urol. 60 (1), 106-117.
- Droller, M.J., 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. Br. J. Urol. 79 (2), 42-52.
- Ellem, S.J., Risbridger, G.P., 2010. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 118, 246-251.
- Fishman, J., Goto, J., 1981. Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. J. Biol. Chem. 256, (9), 4466-4471.
- Franck-Lissbrant, I.; Häggström, S.; Damber, J.E., Bergh, A., 1998. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. Endocrinology 139, 451-456.
- Guess, H.A., 2001. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Epidemiol. Rev. 23 (1), 152-158.
- Hsing, A.W., 2001. Hormones and prostate cancer: what's next? Epidemiol. Rev. 23 (1), 42-58.
- Imamov, O., Schim, G.J., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2005. Estrogen receptor beta in health and disease. Biol. Reprod. 73 (5), 866-871.

- Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C., 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate 3 (1), 81-97.
- Junqueira, L.C., Bignolas, G., Brentani, R.R., 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method of collagen detection in tissue sections. Histochem. J. 11 (4), 447-455.
- Kerr, J.F., Searle, J., 1973. Detection of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. Virchows Arch. B. Cell Pathol. 13 (2), 87-102.
- Krtolica, A., Campisi, J., 2002. Cancer and Aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34, 1401-1414.
- Lau, K.M., Tam, N.N., Thompson, C., Cheng, R.Y., Leung, Y.K., Ho, S.M., 2003. Ageassociated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. Lab. Invest. 83, 743-757.
- Leav, I., Lau, K.M., Adams, J.Y., McNeal, J.E., Taplin, M.E., Wang, J., Singh, H., Ho, S.M., 2001. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. Am. J. Pathol. 159, 79-92.
- Lin, C.Q., Bissel, M.J., 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 7 (9), 737-743.
- Marks, L.S., Mazer, N.A., Mostaghel, E., Hess, D.L., Dorey, F.J., Epstein, J.I., Veltri, R.W., Makarov, D.V., Partin, A.W., Bostwick, D.G., Macairan, M.L., Nelson, P.S., 2006. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. JAMA 296 (15), 2351-2361.

- Montejo, C., Barcia, E., Negro, S., Fernández-Carballido, A., 2010. Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostatic cancer cells: Development of a new controlled release system. Int. J. Pharm. 387, 223-229.
- Montgomery, D.C., 1991. Design and analysis of experiments, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., 2003. Prostate cancer. N. Engl. J. Med. 349 (4), 366-381.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J. Clin. 55 (2), 74-108.
- Prins, G.S., Birch, L., Habermann, H., Chang, W.Y., Tebeau, C., Putz, O., Bieberich, C., 2001. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. Reprod Fertil Dev. 13, 241-252.
- Risbridger, G.P., Bianco, J.J., Ellem, S.J., McPherson, S.J., 2003. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer. Oestrogens and prostate cancer. Endocr. Relat. Cancer, 10 (2), 187-191.
- Roy-Burman, P., Wu, H., Powell, W.C., Hagenkord, J., Cohen, M.B., 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocr. Relat. Cancer 11 (2), 225-254.

Schulman, C., Lunenfeld, B., 2002. The aging male. World J. Urol. 20, 4-10.

Setchell, B.P., Brooks, P.E., 1988. Anatomy, vasculature, innervations and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J. (Eds.). The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, 753-836.

- Sugimura, Y., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. Biol. Reprod. 34, 961-971.
- Toorians, A.W., Kelleher, S., Gooren, L.J., Jimenez, M., Handelsman, D.J., 2003. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 5207-5211.
- Vilamaior, P.S.L., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: A possible role for smooth muscle cells. Prostate, 45, 253-258.
- Weihua, Z., Mäkelä, S., Anderson, L.C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J.I., Jensen, E.V., Nilsson, S., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2001. A role of estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 6330-6335.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall Upper, New Jersey.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figuras 1a – 1i. Fotomicrografias do lobo ventral da próstata dos animais dos grupos SC (a, b, c); ST (d, e, f) e SE (g, h, i), HE (a, d, g); PH (b, e, h) e PA (c, f, i). <u>Grupo SC</u>. (a): Ácinos com epitélio simples, células colunares altas (Ep) e núcleos basais. (b): Estroma (Es) contendo células inflamatórias e fibras colágenas (seta vazada). (c): Fibras reticulares (seta fina) nas adjacências do epitélio secretor. Lúmen (L). <u>Grupo ST</u>. (d): Epitélio secretor (Ep) com células colunares. Espaçamento na interface epitélio/estroma com sinais de destacamento da lâmina basal (asterisco). (e): Fibras colágenas (seta vazada) adjacentes ao epitélio (Ep). Estroma (Es) com eventuais células inflamatórias dispersas entre os elementos fibrilares. (f): Fibras reticulares (seta fina) concentradas preferencialmente ao redor dos ácinos. <u>Grupo SE</u>. (g): Ácinos de diâmetro reduzido e epitélio sem pregueamento (Ep). Foco com concentração de células inflamatórias (estrela) no estroma prostático (Es). Vaso sanguíneo (Vs). (h): Presença de microácinos (asteriscos). Estroma (Es) contendo fibras colágenas espessas (seta vazada) adjacentes ao epitélio (Vs). (h): Presença de microácinos (asteriscos). Estroma (Es) contendo fibras colágenas espessas (seta vazada) adjacentes ao epitélio (L). Mi Presença de microácinos (asteriscos). Estroma (Es) contendo fibras colágenas espessas (seta vazada) adjacentes ao epitélio glandular (Ep). (i): Fibras reticulares (seta fina) adjacentes ao epitélio (Es). Lúmen (L). Bar = 10µm.

Figuras 1j – 1r. Fotomicrografias do lobo ventral da próstata dos animais dos grupos CA (j, k, l); CT (m, n, o) e CE (p, q, r), HE (j, m, p); PH (k, n, q) e PA (l, o, r). <u>Grupo CA</u>. (j): Ácinos de diâmetro reduzido e epitélio (Ep) atrófico. Estroma hipertrófico (Es) com vários elementos celulares e fibrilares. (k): Fibras colágenas espessas (seta vazada) ao redor dos ácinos e no interior do estroma (Es). Presença de células inflamatórias tanto em focos no estroma (estrela)

quanto na interface epitélio/estroma (cabeça de seta). (I): Fibras reticulares (seta fina) concentradas ao redor dos microácinos. Epitélio (Ep). Lúmen (L). <u>Grupo CT</u>. (m): Epitélio secretor (Ep) atrófico. Lúmen evidente (L). Vaso sanguíneo (Vs). (n): Estroma (Es) com fibras colágenas espessas (seta vazada), células musculares lisas (cabeça de seta) e células inflamatórias dispersas entre os elementos fibrilares (seta fina). (o): Fibras reticulares adjacentes ao epitélio (Ep), no interior do estroma (seta fina) e ao redor de vasos sanguíneos (Vs). <u>Grupo CE</u>. (p): Ácinos com variação de altura epitelial (Ep). Presença de NIP do tipo plana (cabeça de seta) mostrada no detalhe (1000x). Camadas de células musculares lisas (seta fina) ao redor dos ácinos no estroma prostático (Es). (q): Epitélio (Ep) com variação da altura em diferentes ácinos. Microácinos (asterisco). Estroma (Es) contendo fibras colágenas (seta vazada) nas proximidades do epitélio glandular. Foco com concentração de células inflamatórias (estrela). Vaso sanguíneo (Vs). (r): Fibras reticulares (setas finas) (Ep). Lúmen (L). Bar = 10µm.

Figuras 2a – 2i. Fotomicrografias do lobo dorsal da próstata dos animais dos grupos SC (a, b, c); ST (d, e, f) e SE (g, h, i), HE (a, d, g); PH (b, e, h) e PA (c, f, i). <u>Grupo SC</u>. (a): Epitélio colunar simples (Ep) com núcleos basais. Espaço estromal reduzido (Es). Lúmen (L). (b): Estroma (Es) contendo fibras colágenas esparsas (seta vazada) nas proximidades do epitélio secretor (Ep). (c): Fibras reticulares espessas (seta fina) nas adjacências do epitélio secretor. Lúmen (L). <u>Grupo ST</u>. (d): Epitélio secretor (Ep) com células colunares. Escassas células inflamatórias presentes no estroma (Es). (e): Estroma (Es) com camadas volumosas de fibras colágenas (seta vazada). (f): Fibras reticulares delgadas (seta fina) adjacentes ao epitélio

secretor (Ep). <u>Grupo SE</u>. (g): Ácinos de diferentes tamanhos com epitélio secretor cúbico (Ep). Epitélio de aspecto pseudo-estratificado (Ep) com núcleos aparentemente normais na porção luminal do epitélio e núcleos picnóticos na parte basal, mostrado no detalhe (1000x). (h): Fibras colágenas delgadas (seta vazada) adjacentes ao epitélio secretor (Ep). (i): Estroma (Es) com a presença de delgadas fibras reticulares (seta fina) em camadas concêntricas ao redor dos ácinos. Lúmen (L). Bar = 10µm.

Figuras 2j – 2r. Fotomicrografias do lobo dorsal da próstata dos animais dos grupos CA (j, k, 1); CT (m, n, o) e CE (p, q, r), HE (j, m, p); PH (k, n, q) e PA (l, o, r). Grupo CA. (j): Ácinos de diferentes tamanhos com epitélio (Ep) alternando entre colunar e cúbico. Presença de NIP do tipo plana, mostrada no detalhe (1000x). (k): Grande quantidade de fibras colágenas (setas vazadas) presentes em todo o estroma (Es). Concentração de células inflamatórias (estrela). (1): Hiperplasia e hipertrofia de fibras reticulares (setas finas) ao redor dos ácinos e no interior do estroma glandular (Es). Lúmen (L). Grupo CT. (m): Epitélio secretor (Ep) uniforme com aparente recuperação do volume celular. Espaço estromal amplo (Es). Lúmen (L). (n): Estroma (Es) com fibras colágenas (seta vazada) concentradas ao redor dos ácinos. (o): Espaço estromal (Es) com fibras reticulares hiperplásicas, porém não hipertróficas (setas finas). Grupo CE. (p): Ácinos com diferentes diâmetros e epitélio (Ep) de caráter pseudoestratificado com células de núcleos normais intercaladas com células com núcleos picnóticos (seta fina). Células inflamatórias (estrela) no estroma glandular (Es). (q): Grande quantidade de fibras colágenas (setas vazadas) nas proximidades do epitélio glandular (Ep). Células inflamatórias dispersas entre os elementos fibrilares do estroma (Es). (r): Fibras reticulares hipertróficas (setas finas) ao redor dos ácinos e no interior do estroma prostático (Es). Lúmen (L). Bar = 10μm.

Figuras 3a – 3i. Fotomicrografias das glândulas de coagulação dos animais dos grupos SC (a, b, c); ST (d, e, f) e SE (g, h, i), HE (a, d, g); PH (b, e, h) e PA (c, f, i). Grupo SC. (a): Ácinos de diferentes tamanhos com epitélio cúbico simples (Ep) e núcleos centrais. Lúmen evidente (L). (b): Estroma (Es) com fibras colágenas espessas e onduladas (seta vazada) nas proximidades do epitélio secretor (Ep) e dispersas no espaço estromal (Es). (c): Fibras reticulares (seta fina) nas adjacências do epitélio secretor. Lúmen (L). Grupo ST. (d): Epitélio secretor (Ep) pregueado. Lúmen reduzido (L). Camadas espessas de músculo liso (asterisco) ao redor dos ácinos. (e): Estroma (Es) com fibras colágenas delgadas e onduladas (setas vazadas) adjacentes ao epitélio (Ep) e no interior do compartimento estromal (Es). (f): Fibras reticulares (setas finas) em várias partes do estroma. Grupo SE. (g): Ácinos de diferentes tamanhos circundados por espessas camadas de células musculares lisas (asteriscos) e com epitélio secretor bem desenvolvido (Ep). Espaço luminal reduzido (L). (h): Fibras colágenas delgadas (seta vazada) não apenas nas adjacências do epitélio secretor (Ep). (i): Estroma (Es) com a presenca de espessas fibras reticulares (seta fina) ao redor dos ácinos e entremeando as dobras epiteliais. Lúmen (L). Bar = $10\mu m$.

Figuras 3j – 3r. Fotomicrografias das glândulas de coagulação dos animais dos grupos CA (j, k, l); CT (m, n, o) e CE (p, q, r), HE (j, m, p); PH (k, n, q) e PA (l, o, r). <u>Grupo CA</u>. (j): Ácinos de diâmetro reduzido com epitélio cúbico simples (Ep) circundados por camadas de células

musculares lisas (asteriscos) no estroma glandular (Es). (k): Hiperplasia de fibras colágenas (setas vazadas) presentes entre o músculo liso que circunda os ácinos. Escassas células inflamatórias no estroma (Es). (l): Fibras reticulares especialmente ao redor das células musculares lisas (asteriscos). Lúmen (L). <u>Grupo CT</u>. (m): Epitélio secretor (Ep) com aparente recuperação do volume celular. Estroma glandular (Es) com aparente atrofia dos elementos celulares e fibrilares ao redor dos ácinos. Escassas células inflamatórias no estroma (Es). Lúmen (L). (n): Fibras colágenas (setas vazadas). (o): Espaço estromal (Es) com hiperplasia de fibras reticulares (setas finas) dispostas paralelamente ao epitélio secretor (Ep). <u>Grupo CE</u>. (p): Ácinos com lúmen amplo (L) e epitélio secretor atrófico (Ep). Espessa camada de células musculares lisas ao redor dos ácinos (asterisco). (q): Hiperplasia de fibras colágenas (seta vazada) no estroma glandular (Es). (r): Fibras reticulares hipertróficas (setas finas) por todo o estroma (Es) e, especialmente ao redor dos ácinos (Es). Lúmen (L). Bar = 10µm.

Figura 4. Fotomicrografias do lobo ventral (a-f), lobo dorsal (g-l) e glândula de coagulação (m-r) dos animais dos diferentes grupos experimentais com marcação para células apoptóticas (TUNEL). Bar = 50µm.

Figura 5. Fotomicrografias do lobo ventral (a-f), lobo dorsal (g-l) e glândula de coagulação (m-r) dos animais dos diferentes grupos experimentais com marcação para Ki-67. Bar = 50µm.



















Gráfico 1. Média das Áreas Acinar, Luminal, Epitelial e Estromal (µm²) do lobo ventral dos diferentes grupos experimentais.

Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a segunda letra for distinta (P < 0,05).

Gráfico 2. Média das Áreas Nuclear, Citoplasmática e Celular (µm²) do lobo ventral dos diferentes grupos experimentais.



Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a segunda letra for distinta (P < 0,05).



Gráfico 3. Média das Áreas Acinar, Luminal, Epitelial e Estromal (μ m²) do lobo dorsal dos diferentes grupos experimentais.

Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas ou três letras diferem, entre si, quando a segunda letra e/ou terceira letra forem distintas (P < 0,05).

Gráfico 4. Média das Áreas Nuclear, Citoplasmática e Celular (µm²) do lobo dorsal dos diferentes grupos experimentais.



Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0.05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a segunda letra for distinta (P < 0.05).



Gráfico 5. Média das Áreas Acinar, Luminal, Epitelial e Estromal (μm²) da glândula de coagulação dos diferentes grupos experimentais.

Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas ou três letras diferem, entre si, quando a segunda letra e/ou terceira letra forem distintas (P < 0,05).



Gráfico 6. Média das Áreas Nuclear, Citoplasmática e Celular (μm²) da glândula de coagulação dos diferentes grupos experimentais.

Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias com duas ou três letras diferem, entre si, quando a segunda letra e/ou terceira letra forem distintas (P < 0,05).



Gráfico 7. Porcentagem do Índice apoptótico das glândulas analisadas nos diferentes grupos experimentais.

Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a primeira e/ou segunda letra for distinta (P < 0,05).

Gráfico 8. Porcentagem do Índice proliferativo das glândulas analisadas nos diferentes grupos experimentais.



Médias seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a primeira e/ou segunda letra for distinta (P < 0,05).

O presente estudo permitiu constatar que:

- A identificação do receptor de andrógeno foi preferencialmente epitelial nos lobos dorsal e ventral, enquanto que na glândula de coagulação, essa prevaleceu no estroma glandular.
- A caracterização do receptor estrogênico α (ERα) foi essencialmente estromal em todos os órgãos avaliados, independente da variação hormonal para o qual o animal havia sido submetido.
- 3) O receptor estrogênico β (ERβ) foi a molécula que mais diferiu quanto a reatividade nas diferentes glândulas analisadas. No lobo ventral, o ERβ foi essencialmente localizado no epitélio glandular. Já na glândula de coagulação, esse receptor foi preferencialmente estromal. No lobo dorsal, o ERβ foi essencialmente estromal nos grupos com elevados níveis de testosterona sérica (SC e ST), com a imunolocalização alterando-se para a região epitelial nos grupos com depleção androgênica e elevação dos níveis de estrógeno (SE e CA), mostrando que esse receptor respondeu efetivamente à variação hormonal imposta aos animais nos grupos experimentais citados.

- 4) A distribuição do receptor de andrógeno foi lobo-específico entre as glândulas sexuais acessórias analisadas nos ratos senis, considerando tanto a ação androgênica *per se* quanto o desbalanço hormonal dos animais nos diferentes grupos experimentais.
- 5) A resposta positiva do receptor de andrógeno no lobo dorsal, nos animais com elevação dos níveis estrogênicos, sugeriu que na senescência essa resposta hormonal loboespecífica poderia ser guiada pelo estrógeno ou pelo desbalanço provocado pela elevação de seus níveis séricos.
- 6) Ambas as reatividades dos receptores de estrógeno α e β nos diferentes lobos prostáticos e na glândula de coagulação mostraram distribuição particular nos ratos senis. Além disso, o desbalanço nas taxas de andrógeno/estrógeno levaram a imunorreatividades diferenciais dos receptores de estrógeno entre os compartimentos epitelial e estromal nos ratos senis de todos os grupos estudados, apontando a senescência como fator determinante para a estrutura e dinâmica do microambiente dessas glândulas sexuais acessórias.
- 7) O padrão de distribuição dos receptores hormonais esteroidais é distinto em cada um dos lobos prostáticos na senescência, sendo a reatividade hormonal lobo-específica um fator biologicamente importante considerando-se a interação entre os compartimentos epitelial e estromal dessas glândulas e sua implicação no desenvolvimento e manutenção tecidual, tanto quanto na ocorrência de lesões, incluindo as de caráter maligno.

- 8) Ambos os hormônios sexuais, testosterona e estrógeno, são capazes de induzir proliferação e apoptose, sendo a apoptose mais exacerbada. Entretanto, o estrógeno apresentou preponderante influência na indução da morte celular, o que pode ser tanto resultado direto de sua ação quanto consequência de sua ação indireta sobre os níveis androgênicos através da interferência no eixo hipotálamo-hipófise-gonada.
- 9) As alterações teciduais com características semelhantes às descritas para a atrofia inflamatória proliferativa (AIP), enfatizadas pela ocorrência de inflamação, observadas nos grupos SE, CA e CE dos lobos ventral e dorsal, indicaram como o desbalanço hormonal, provocado pela castração e/ou acentuado pela adição de estrógeno exógeno, poderiam levar esses órgãos, a lesões cada vez mais severas, que comprometeriam a homeostase glandular dos mesmos.
- 10) A administração exógena de testosterona foi efetiva e atuou positivamente em relação ao estrógeno na manutenção da estrutura glandular geral dos lobos analisados, indicando a testosterona como principal responsável pela manutenção estrutural das diferentes glândulas acessórias. Contudo, a suplementação de testosterona em animais senis levou a alterações estruturais evidentes no microambiente estromal, o que aponta o estroma como compartimento glandular sinalizador e/ou deflagrador de alterações estruturais provenientes do desequilíbrio hormonal entre andrógenos e estrógenos.

- 11) A depleção androgênica causada pela castração no período da senescência levou a alterações estruturais severas, cuja administração exógena de testosterona, indicou remodelação tecidual especialmente no lobo dorsal. Entretanto, no lobo ventral a testosterona exógena não foi suficiente para garantir o retorno ao equilíbrio morfológico glandular. Já a administração de estrógeno exógeno frente à castração provocou acentuadas alterações morfológicas tanto no epitélio quanto no estroma das diferentes glândulas sexuais acessórias, principalmente nos lobos ventral e dorsal, sugerindo a efetiva sinalização estrogênica na geração de um microambiente, especialmente estromal, potencialmente favorável à ocorrência de lesões glandulares que podem vir a preceder processos de malignescência glandular, através de acentuada alteração na interação epitélio-estroma que garante a integridade estrutural desses órgãos.
- 12) Assim, de maneira geral, pode-se concluir que a terapia hormonal exógena, especialmente de testosterona, pode ser útil na manutenção tecidual prostática e que a imunorreatividade diferencial dos receptores hormonais frente ao desbalanço hormonal pode sugerir uma forma lobo-específica de atuação dos hormônios sexuais na manutenção tecidual e promoção de patogênese prostática.

ABATE-SHEN, C.; SHEN, MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* Oct 1, v.14, n.19, p.2410-2434, 2000.

ADAMS, J.Y., et al. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*, v.52, n.1, p.69-81, 2002.

ALGARTÉ-GÉNIN, M., CUSSENOT, O., COSTA, P. Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur. Urol.*, v.46, p.285-295, 2004. ARCOLINO, F.O., et al. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.91, p.144-154, 2010.

ASANO, K., et al. Regulation of Estrogen Receptor α and β Expression by Testosterone in the Rat Prostate Gland. *Endocr. J.*, v.50, n.3, p.281-287, 2003.

ATTIA, D.M.A.; EDERVEEN, A.G.H. Opposing Roles of ER α and ER β in the Genesis and Progression of Adenocarcinoma in the Rat Ventral Prostate. *Prostate* v.72, p.1013-1022, 2012. AUMÜLLER, G; ADLER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.*, Apr 30, v.198, n.1, p.145-58, 1979.

AUMÜLLER, G; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.*, v.121, p.127-231, 1990.

BANERJEE, S.; BANERJEE, P.P.; BROWN, T.R. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology*, v.141, n.2, p.821-832, 2000.

BIANCO, J.J., et al. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, v.143, p.4922-4933, 2002.

BONNET, P., et al. Benign prostatic hyperplasia and normal prostate aging: differences in types I and II 5 alpha-reductase and steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) levels, but not in insulin-like growth factor mRNA levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.77, p.1203-1208, 1993.

BRUNI-CARDOSO, A., et al. Stromal remodelling is required for progressive involution of the rat ventral prostate after castration: identification of a matrix metalloproteinase-dependent apoptotic wave. *Int. J. Androl.*, v.33, p.686-695, 2010.

BULL, J.H., et al. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br. J. Cancer.*, v. 84, n.11, p.1512-1519, 2001.

CHANG, W.Y., et al. Neonatal estrogen exposure alters the TGF- β signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21^{cip1/wafl} expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology*, v.140, p.2801-2813, 1999.

COLOMBEL, M.C.; BUTTYAN, R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. *Methods Cell Biol.*, v.46, p.369-385, 1995.

CORDEIRO, R.S., et al. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*, v.39, n.8, p.1312-1324, 2008.

CORNELL, R.J., et al. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the present of prostatic stroma. *Urology*, v.61, p.870-875, 2003.

COSTELLO, C.L.; FRANKLIN, B.R. Effects of prolactin on the prostate. *Prostate*, v. 24, p.162-166, 1994.

CULIG, Z., et al. Androgen receptors in prostate cancer. J. Urol., v.170, p.1363-1369, 2003.

CUNHA, G.R., et al. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J. Androl.*, v.13, n.6, p.465-475, 1992.

CUNHA, G.R., et al. Oestrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reproduction, Fertility and Development*, v.13, p.285-296, 2001.

CUNHA, G.R.; MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, v.70, p.469-472, 2002.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiantion*, v.70, p.473-485, 2002.

CUNHA, G.R., et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int. J. Cancer*, v.107, p.1-10, 2003.

De MARZO, A.M., et al. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, v.155, n.6, p.1985-1992, 1999.

De NUNZIO, C., et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur. Urol.*, v.60, n.1, p.106-117, 2011.

DROLLER, M.J. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br. J. Urol.*, v.79, n.2, p.42-52, 1997.

EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate*, v.10, p.14-18, 2000.

ELLEM, S.J., et al. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.89, p.2434-2441, 2004.

ELLEM, S.J.; RISBRIDGER, G.P. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1155, p.174-186, 2009.

ELLEM, S.J.; RISBRIDGER, G.P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ration in the prostate gland. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.118, n.4-5, p.246-251, 2010.

FISHMAN, J.; GOTO, J. Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J. Biol. Chem.*, v.256, n.9, p.4466-4471, 1981.

FLEISCHMANN, A., et al. Androgen receptors are differentially expressed in Gleason patterns of prostate cancer and down-regulated in matched lymph node metastases. *Prostate*, v.71, p.453-460, 2011.

FLÓREZ, M.G., CARVALHO, H.F. Célula epitelial prostática. In: Carvalho, H.F., Collares-Buzato, C.B. (Eds.), *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Manole, Barueri, pp. 335-345, 2005.

FRANCK-LISSBRANT, I., et al. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology*, v.139, n.2, p.451-456, 1998.

GARRAWAY, L.A., et al. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate*, v.55, n.3, p.206-218, 2003.

GREENBERG, N.M., et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, n.8, p.3439-3443, 1995.

GUESS, H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol. Rev.*, v.23, n.1. p.152-158, 2001.

141

HAYWARD, S.W.; CUNHA, G.R. The prostate: development and physiology. *Radiol. Clin. North Am.*, v.38, n.1, p.1-14, 2000.

HSING, A.W. Hormones and prostate cancer: What's next? *Epidemiol. Rev.*, v.23, n.1, p.42-58, 2001.

IMAMOV, O., et al. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.101, n.25, p.9375-9380, 2004.

IMAMOV, O., et al. Estrogen receptor beta in health and disease. *Biol. Reprod.*, v.73, n.5, p.866-871, 2005.

JARRED, R.A., et al. Induction of apoptosis in low-to moderate-grade human prostate carcinoma by red clover-derived dietary isoflavones. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.11, p.1689-1696, 2002.

JESIK, C.J.; HOLLAND, J.M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, v.3, n.1, p.81-97, 1982.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, a specific method of collagen detection in tissue sections. *Histochem*. *J.*, v.11, n.4, p.447-455, 1979.

KERR, J.F., SEARLE, J. Detection of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.*, v.13, n.2, p.87-102, 1973.

KNOX, J.D., et al. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha-6integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am. J. Pathol.*, v.145, n.1, p.167-174, 1994.

KREIS, T.; VALE, R. *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*. New York: Oxford University Press, 1999. KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. Cancer and aging: a model for the câncer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.34, n.11, p.1401-1414, 2002.

LAU, K.M., et al. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab. Invest.*, v.83, n.5, p.743-757, 2003.

LEAV, I., et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.*, v.159, n.1, p.79-92, 2001.

LI, R., et al. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.28, p.928-934, 2004.

LIN, C.Q.; BISSELL, M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.*, v.7, n.9, p.737-743, 1993.

MÄKELÄ, S., et al. Differential expression of estrogen receptors α and β in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.164, p.109-116, 2000.

MARKS, L.S., et al. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA*, v.296, n.15, p.2351-2361, 2006.

McNEAL, J.E. Normal histology of the prostate. Am. J. Surg. Pathol., v.12, n.8, p.619-633, 1988.

McNEAL, J.E.; HAILLOT, O.; YEMOTO, C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. *Prostate* v.27, p.258-268, 1995.
MONTALVO, L., et al. Regulation of the expression of protein kinase C isoenzymes in rat ventral prostate: effects of age, castration and flutamide treatment. *Life Sci.*, v.71, n.19, p.2257-2266, 2002.

MONTEJO, C., et al. Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: Development of a new controlled release system. *Int. J. Pharm.*, v.387, p.223-229, 2010.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, 1991.

MONTICO, F., et al. Hormonal therapy in the senescence: Prostatic microenvironment structure and adhesion molecules. *Micron*, v.42, p.642-655, 2011.

MORALES, A. Androgen replacement therapy and prostate safety. *Eur. Urol.*, v.41, p.113-120, 2002.

NELSON, W.G.; De MARZO, A.M.; ISAACS, W.B. Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, v.349, n.4, p.366-381, 2003.

NISHIYAMA, T.; HASHIMOTO, Y.; TAKAHASHI, K. The influence of androgen deprivation therapy on dihidrotestosterona levels in the prostatic tissue of patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.10, n.1, p.7121-7126, 2004.

NOLDUS, J., et al. Effect of flutamide and flutamide plus castration on prostate size in patients with previously untreated prostate cancer. *Urology*, v.47, p. 713-718, 1996.

O'DONNELL, L., et al. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

PARKIN, G.S., et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, v.55, n.2, p.74-108, 2005.

PELLETIER, G.; LABRIE, C.; LABRIE, F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.*, v.165, n.2, p.359-370, 2000.

PINTO, L.C.; FÁVARO, W.J.; CAGNON, V.H.A. Proliferative, structural and molecular features of the *Mdx* mouse prostate. *Int. J. Exp. Path.*, v.91, p.408-419, 2010.

PRINS, G.S.; BIRCH, L. Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, v.138, p.1801-1809, 1997.

PRINS, G.S.; BIRCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, v.129, n.6, p.3187-99, 1991.

PRINS, G.S., et al. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev.*, v.13, p.241-252, 2001.

RISBRIDGER, G.P., et al. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology*, v.142, n.6, 2443-2450, 2001.

RISBRIDGER, G.P., et al. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, v.10, n.2, p.187-191, 2003.

ROY-BURMAN, P., et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr. Relat. Cancer*, v.11, n.2, p.225-254, 2004.

SAR, M., WELSCH, F. Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia*, v.32, p.295-301, 2000.

SÁTTOLO, S.; CARVALHO, C.A.F.; CAGNON, V.H.A. 2004. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (Rattus norvegicus albinus) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell*, v.36, p.417-430, 2004.

SCHULMAN, C., LUNENFELD, B. The aging male. World J. Urol., v.20, p.4-10, 2002.

SETCHELL, B.P., BROOKS, P.E. Anatomy, vasculature, innervations and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, p. 753-836, 1988.

SLAYTER, M.V., et al. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobound-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res.*, v.54, p.1440-1445, 1994.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol. Reprod.*, v.34, n.5, p.973-983, 1986.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.*, v.11, n.1, p.51-59, 1997.

TAYLOR, R.A., et al. 17- β -estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER α and ER β . *Endocrinology* v. 147, n.1, p.191-200, 2006.

TOORIANS, A.W.F.T., et al. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.88, n.11, p.5207-5211, 2003.

TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.*, v.166, p.2472-2483, 2001.

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Experimental Gerontology*, v.40, p.121-128, 2005.

VILAMAIOR, P.S.L., et al. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: A possible role for smooth muscle cells. *Prostate*, v. 45, p.253-258, 2000.

WEIHUA, Z., et al. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.98, n.11, p.6330-6335, 2001.

WEIHUA, Z., WARMER, M., GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell Endocrinol.*, v.193, p.1-5, 2002.

WONG, Y.C.; XIE, W.; TSAO, S.W. Structural changes and alteration in expression of TGFβ1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate*, v.45, p.289-298, 2000.

YAMASHITA, S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *Anat. Rec. A*, v.279, n.2, p.768-778, 2004.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall Upper, New Jersey, 1999.

Dados da análise macroscópica que não foram incluídos nos artigos:

Média ± Desvio Padrão do Peso Corpóreo e das Glândulas analisadas nos diferentes grupos

Grupos	Peso Corpóreo	LV	LD	GC
SC	639 ± 22,6 ac	0,75 ± 0,05 a	0,33 ± 0,01 a	0,33 ± 0,05 a
ST	680 ± 42,7 a	0,82 ± 0,25 a	0,29 ± 0,03 a	0,28 ± 0,03 ac
SE	520 ± 69,5 b	0,29 ± 0,16 b	0,16 ± 0,05 b	$0,13 \pm 0,04$ b
CA	554 ± 68,4 bc	0,23 ± 0,26 b	0,1 ± 0,02 b	0,09 ± 0,01 b
СТ	505 ± 23,6 b	1,04 ± 0,31 a	0,32 ± 0,06 a	0,38 ± 0,03 ad
CE	428 ± 32,8 bd	0,17 ± 0,05 b	0,1 ± 0,01 b	$0,07 \pm 0,02$ b

experimentais (g/animal).

Médias (entre os grupos \downarrow) seguidas de letra inicial igual não diferem estatisticamente (P > 0,05). Médias compostas por duas letras diferem, entre si, quando a segunda letra for distinta (P < 0,05).

8 – ANEXO

DECLARAÇÃO Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Terapia hormonal exógena em ratos senis: caracterização dos efeitos sobre os diferentes lobos prostáticos": () não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança. Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto nº _ Instituição: (2591-1 (X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto nº_ Instituição: Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia.) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _ , Instituição: (* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado. tilo Incor Aluno: Eduardo Marcelo Cândido Orientadora: Profa. Dra. Valeria Helena Alves Cagnon Quitete Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da CEUA/UNICAMP Carimbo e assinatura Presidente da Comissão Interna de Biossegura Instituto de Biologia - UNICAMP Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido Carimbo e assinatura





Comissão de Ética no Uso de Animais **CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Terapia hormonal exógena em ratos senis: caracterização dos efeitos sobre os diferentes lobos prostáticos" (protocolo nº 2591-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete / Eduardo Marcelo Cândido, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de fevereiro de 2012.

Campinas, 24 de fevereiro de 2012.

. A. Augurld Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo

Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/