

**RICARDO ALEXANDRE FOCHI**

**“INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA SOBRE A PRÓSTATA DO  
GERBILO (*Meriones unguiculatus*): INTERAÇÕES COM O  
ESTRÓGENO E COM A TESTOSTERONA”**

***“PROGESTERONE INFLUENCE ON GERGIL PROSTATE (*Meriones  
unguiculatus*): INTERACTIONS WITH ESTROGEN AND  
TESTOSTERONE”***

**CAMPINAS**

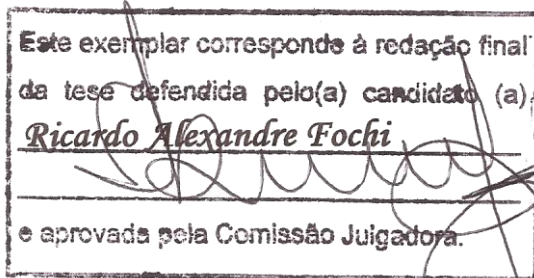
**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**RICARDO ALEXANDRE FOCHI**

**“INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA SOBRE A PRÓSTATA DO  
GERBILO (*Meriones unguiculatus*): INTERAÇÕES COM O  
ESTRÓGENO E COM A TESTOSTERONA”**

***“PROGESTERONE INFLUENCE ON GERGIL PROSTATE (*Meriones  
unguiculatus*): INTERACTIONS WITH ESTROGEN AND  
TESTOSTERONE”***



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

Doctorate thesis presented to the Biology Institute to obtain the Ph.D grade in Structural and Cell Biology in the area of Cell Biology

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

CAMPINAS

2013

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

F681i Fochi, Ricardo Alexandre, 1982-  
Influência da progesterona sobre a próstata do  
gerbilo (*Meriones unguiculatus*): interações com o  
estrógeno e com a testosterona / Ricardo Alexandre  
Fochi. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Gerbilo. 3. Progesterona. 4.  
Castração. 5. Receptores de esteróides. I. Taboga,  
Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Progesterone influence on gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate:  
interactions with estrogen and testosterone

**Palavras-chave em Inglês:**

Prostate

Gerbil

Progesterone

Castration

Steroid receptors

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Sebastião Roberto Taboga [Orientador]

Classius de Oliveira

Daniele Lisboa Ribeiro

Wagner José Fávaro

Luis Antonio Justulin Junior

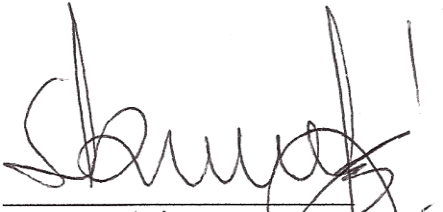
**Data da defesa:** 25-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 25 de fevereiro de 2013.

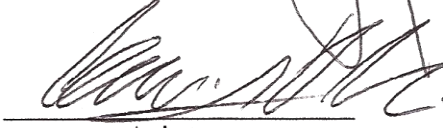
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



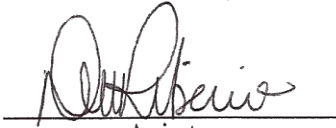
Assinatura

Prof. Dr. Classius de Oliveira



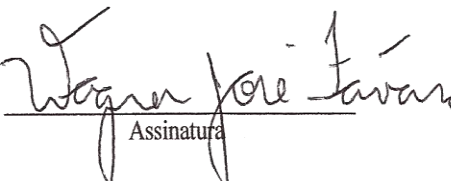
Assinatura

Profa. Dra. Daniela Lisboa Ribeiro



Assinatura

Prof. Dr. Wagner Jose Favaro

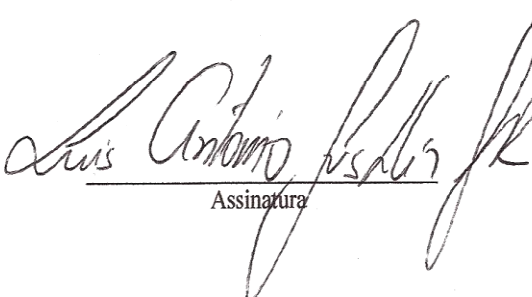


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

*Dedico*

À minha família que é o alicerce da  
pessoa em que me tornei.

## *Agradecimentos*

Aos meus queridos pais, Renato e Sônia pelas alegrias, conselhos e ensinamentos, cabendo-lhes o papel, muito bem feito, de ser o meu alicerce, possibilitando a realização de todos os meus sonhos.

Ao meu irmão Renato e cunhada Carol pelas orações, companheirismo e amor em família.

À minhas avós Francisca e Érica pelo amor e carinho sempre presente, que só uma avó pode dar.

À minha sogra Edna e aos cunhados José e Elenice que felizmente fazem parte agora da minha família.

Ao grande amor da minha vida, minha esposa Mãe, que sempre esteve e estará ao meu lado nos momentos fáceis e difíceis da vida, lembrando que o amor e o companheirismo são indispensáveis à vida.

A Deus, que nunca olhou as minhas fraquezas, mas focou-se sempre nas virtudes, guardando a minha vida e de todos que me rodeiam. “...porque sem mim nada podeis fazer”

Ao meu orientador e padrinho, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela oportunidade concedida, disponibilizando a sua indispensável orientação e o seu grande incentivo.

Ao indispensável técnico de laboratório, amigo e padrinho Luiz Falleiros Júnior, por todo o seu suporte e auxílio.

À minha amiga Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos.

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

À Líliam Panagio, que com sua imensa competência e dedicação, me deu suporte e auxílio ao longo do doutorado.

A todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram durante todo o meu doutorado apesar de todas as minhas piadinhas sem graça.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP pelo auxílio técnico e pela bolsa de estudos concedida desde a iniciação científica até o doutorado.

À todos os membros da banca examinadora pela participação e sugestões.

I – RESUMO.....	vii
II – ABSTRACT.....	ix
III – INTRODUÇÃO.....	11
1. <i>Conceitos gerais sobre a glândula prostática</i> .....	11
2. <i>Próstata feminina (glândula de Skene)</i> .....	15
3. <i>Gerbilo da Mongólia como modelo experimental</i> .....	18
4. <i>Características do desenvolvimento prostático</i> .....	20
5. <i>Interação epitélio-estroma na glândula prostática</i> .....	23
6. <i>Modulação da glândula prostática pelos hormônios esteroides</i> .....	25
I – OBJETIVO.....	37
IV – ARTIGO 1.....	38
<i>Progesterone as a morphological regulatory factor of the male and female gerbil prostate</i>	
V – ARTIGO 2.....	84
<i>Padrões de Secreção e Cinética do Epitélio Prostático de Fêmeas de Gerbilos (Meriones Unguiculatus) sob Influência da Progesterona</i>	
V – ARTIGO 3.....	120
<i>Regulação dose-dependente dos receptores de andrógeno na próstata ventral do gerbilo (Meriones Unguiculatus) pela progesterona</i>	
IX – CONCLUSÕES GERAIS.....	143
X – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
XI - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	163
XI - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)	164

A próstata, glândula do sistema genital que tem origem embrionária a partir do seio urogenital, não é exclusiva do sistema reprodutor masculino, sendo também encontrada em fêmeas de vários mamíferos, incluindo humanos e roedores. No macho ela pode apresentar-se altamente desenvolvida em razão da maior quantidade do hormônio testosterona, e, apesar de pouco desenvolvida em fêmeas, devido à baixa quantidade desse mesmo tipo hormonal, é uma glândula funcional. Em fêmeas adultas de gerbilos, a próstata possui uma localização parauretral, exibindo íntimo contato com a parede proximal e medial da uretra, a qual é homóloga a próstata ventral de roedores machos. Embora se conheça a influência da progesterona na fisiologia do sistema reprodutor feminino e masculino, poucos estudos exploram a sua influência, especificamente, sobre a glândula prostática. Desta forma, este trabalho avaliou os aspectos morfofuncionais da glândula prostática masculina e feminina, resultantes da influência da progesterona, e de suas interações com o estradiol e a testosterona. Para isso, gerbilos machos e fêmeas foram castrados cirurgicamente no início do período puberal, aos 45 dias de idade. Ao completarem 90 dias de idade, os gerbilos receberam doses subcutâneas de progesterona ou desse somado a estradiol e testosterona, durante 14 dias. Nos animais castrados de ambos os sexos a próstata mostrou uma morfologia regredida, com uma redução significativa na sua capacidade de secreção, da quantidade de células receptoras de androgênio (AR) e receptoras de estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ), porém sem alterar a marcação para receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Dessa forma, a castração cirúrgica foi bastante importante, uma vez que permitiu mimetizar de forma satisfatória um ambiente prostático com baixos níveis hormonais. Nos dois sexos, a administração de progesterona isoladamente conseguiu reverter alguns desses efeitos, com uma melhora considerável no padrão secretório da glândula, porém estruturalmente essas mudanças ocorreram de forma moderada. Nesses animais, foram observados um aumento expressivo dos ERs  $\alpha$  e  $\beta$ , além da presença de células receptoras de progesterona (PR). Em relação aos ARs foi evidenciado que a progesterona pode apresentar características indutoras ou inibitórias dependendo da sua concentração. O tratamento, simultâneo com a progesterona, de estradiol e testosterona desencadeou uma reestruturação glandular mais intensa nos machos e fêmeas, resultando em hipertrofia e hiperplasia do epitélio e do estroma glandular, recuperação do padrão de secreção e amplitude alveolar. Essas características, no entanto, foram acompanhadas pelo surgimento de lesões prostáticas como neoplasias intraepiteliais e o surgimento de debris celulares. A interação da progesterona com o estradiol também regulou positivamente os AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , porém não apresentou qualquer efeito sobre os PRs quando comparado aos animais tratados



somente com progesterona. Em adição, nesses animais houve um aumento acentuado da proliferação celular, o qual foi contrabalanceado pelo aumento também do índice de morte celular. Nos animais tratados com progesterona e testosterona, a próstata também se desenvolveu e mostrou um aumento das células AR-positivas e do índice apoptótico, havendo, entretanto uma redução dos ER $\alpha$ , ER $\beta$  e PR. Dessa forma, é razoável concluir que a próstata feminina e masculina comporta-se de forma bastante semelhante frente à ação dos hormônios progesterona, estradiol e testosterona. Ademais, embora a progesterona apresente efeitos estruturais razoáveis na glândula prostática, a sua interação com o estrógeno e a testosterona é capaz de promover uma intensificação desses efeitos, sem recriar, porém um ambiente homeostático semelhante aos dos animais intactos. A progesterona também mostrou ser um fator regulador em potencial da atividade proliferativa e apoptótica prostática, opondo-se aos efeitos da testosterona e do estradiol. Outro fator importante é a descoberta de que a progesterona pode induzir ou inibir a presença de células AR-positivas na glândula, e que esse dualismo funcional é resultado do efeito dose-dependente desse hormônio sobre a próstata.

## ABSTRACT

---

The prostate is a gland of reproductive system that arises from the urogenital sinus, being located around the urethra below the bladder. The existence of this gland is not exclusive of the male reproductive system, being found in females of various species, including rodents and humans. In the male, it can be highly developed due to the increased amount of the testosterone, and although poorly developed in females, due to the low quantity of this hormone, it is a functional gland. The prostate of female gerbils has a paraurethral location, showing a closer contact with the proximal and medial urethra wall, being homologous to the ventral prostate of male rats. This study evaluate the morphofunctional aspects of the prostate gland in males and females, regarding the influence of progesterone, and their interactions with estradiol and testosterone. For this, male and female gerbils were surgically castrated in early pubertal period, at 45 days of age. At 90 days of age, the gerbils received subcutaneous doses of progesterone alone or associated to testosterone or estradiol during 14 days. In castrated animals of both sexes, prostate showed a regressed morphology, with a significant reduction in its secretion capacity, the amount of androgen receptor cells (AR) and estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ), but without changing the labeling for estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Thereby, surgical castration was very important, since it allowed mimetize a prostatic environment with low hormone levels. In both sexes, the administration of progesterone alone could reverse some of these effects with a considerable secretion improvement, but structurally these changes occurred in a moderate way. In these animals, we observed a significant increase of ER  $\alpha$  and  $\beta$ , besides the presence of progesterone receptor (PR) cells. Regarding ARs, it was shown that progesterone can have inductor or inhibitory characteristics depending on its concentration. The treatment with progesterone plus estradiol and progesterone plus testosterone triggered a more intense prostate restructuration in male and female, resulting however in a hypertrophy and hyperplasia of the glandular epithelium and stroma, besides recovery of the alveoli amplitude and pattern of cellular secretion. These characteristics, however, were followed by the development of prostatic lesions like intraepithelial neoplasia and cellular desquamation. The progesterone and estradiol interaction also upregulated the AR, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , however had no effect on the PRs when compared to the animals treated with progesterone alone. In addition, in these animals there was a marked increase in cellular proliferation, which was counterbalanced by increased cell death. In animals of either sex treated with progesterone and testosterone, the prostate also became developed and showed an increase of AR-positive cells and apoptotic index, although there was a reduction of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR. Thus, it is reasonable to conclude that the female and male prostate

behaves similarly after the progesterone, estradiol and testosterone administration. Moreover, although the progesterone has reasonable structural effects on the prostate gland, its interaction with estrogen and testosterone can intensificate these effects, but do not recover a homeostatic environment similar to that of intact animals. The progesterone also proved to be a potential regulatory factor of the proliferative and apoptotic activity, opposing the effects of testosterone and estradiol. Another important finding is that progesterone can induce or inhibit the presence of AR-positive cells in the gland, and this functional dualism is the result of dose-dependent effect of this hormone on the prostate.

### *1. Conceitos gerais sobre a glândula prostática*

Todos os mamíferos machos adultos possuem pelo menos um par de glândulas acessórias no seu trato genital. Estas glândulas são nomeadas de acordo com a sua estrutura, posicionamento anatômico e função, sendo a próstata e a vesícula seminal as mais estudadas em trabalhos que tratam sobre filogenia comparada em mamíferos (Price, 1963). Dentre as glândulas acessórias, a próstata é uma glândula volumosa e de alta expressividade funcional (Netter, 1965).

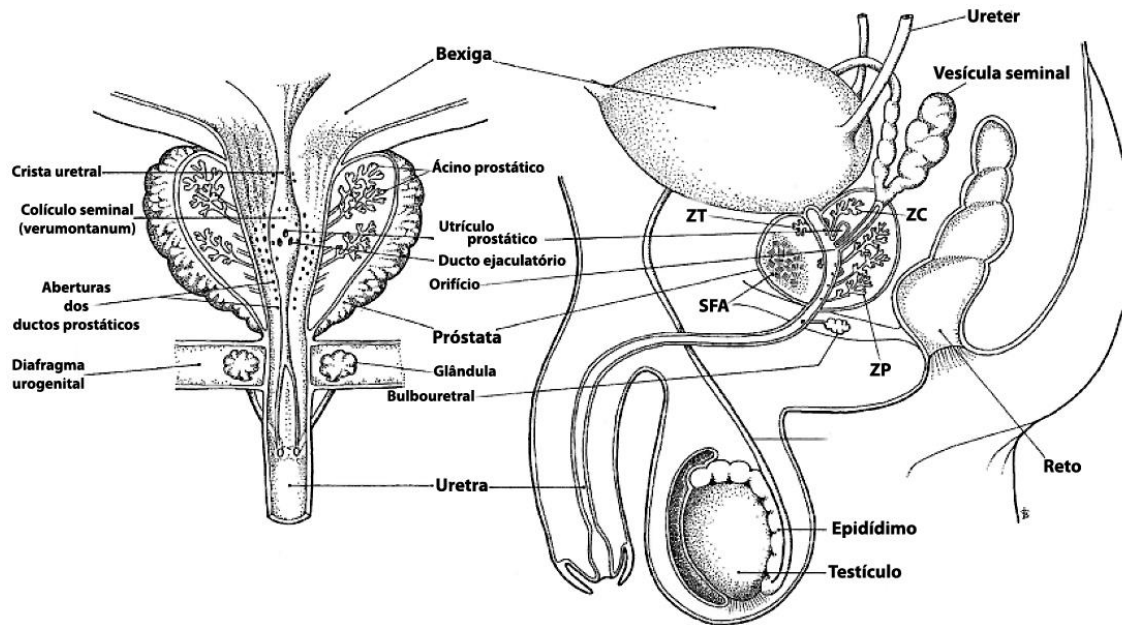
A próstata secreta um líquido alcalino fino de aspecto leitoso que aumenta o volume do sêmen, contendo cálcio, íon citrato, íon fosfato e enzimas coagulantes. A secreção prostática apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito, colaborando com a neutralização do meio e contribuindo grandemente para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (Price, 1963; Guyton, 2006). Os componentes do fluido seminal e o seu papel biológico individual varia entre as diferentes espécies. Nos roedores, por exemplo, as proteínas presentes no fluido seminal formam o “plug copulatório”, o qual atua como uma proteção contra a superfecundação (Williams-Ashman, 1984). No homem, o produto de secreção prostático predominante é o antígeno prostático específico (PSA), o qual é uma serina protease pertencente à família das calicreínas importante para a dissolução do coágulo seminal (Wang et al, 1979). A secreção produzida pela glândula prostática auxilia em parte o sucesso da fecundação, na medida em que a fertilidade é comprometida na ausência dessa glândula. Em relação às vesículas seminais o mesmo não é verdadeiro, uma vez que está ausente em algumas espécies como os gatos e os cães (Hayward e Cunha, 2000).

Em humanos a glândula prostática apresenta macroscopicamente um formato redondo, elíptico ou triangular, pesando algumas gramas no nascimento e aproximadamente 20 gramas quando adulto (figura 1). Estruturalmente ela é encapsulada por uma fina camada de tecido fibroelástico que lhe confere uma aparência não lobulada (Kumar e Majumder, 1995). A cápsula de tecido fibroelástico, entretanto, origina septos que

penetram no interior da glândula subdividindo-a em cinco lobos: anterior, posterior, médio e dois laterais. Cada lobo comporta de 30 a 50 glândulas tubuloalveolares, 16 a 32 ductos excretores, um estroma denso, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Kumar e Majumder, 1995). Histologicamente, a próstata está dividida em 3 zonas principais: a central, a periférica e a de transição. Em humanos, a próstata normal é uma glândula túbulo-alveolar, composta de ductos e alvéolos, com atividade secretora principalmente ligada à região alveolar, podendo haver também secreção das células ductais que contribui para a composição final da secreção prostática (Reese et al., 1986). O compartimento epitelial consiste principalmente de três tipos celulares: célula basal, secretora e neuroendócrina, sendo as duas primeiras dependentes de hormônios esteróides, reagindo diferentemente a cada um deles, e a última regulada por neuropeptídeos (De Marzo et al., 1998, Rumpold et al., 2002). As células luminais secretoras estão em maior quantidade no epitélio glandular, sendo responsável pela produção e secreção do conteúdo glandular para o lúmen prostático. As células basais formam uma camada contínua entre o epitélio e a membrana basal, sendo consideradas células-tronco epiteliais. As células neuroendócrinas podem ser notadas na camada epitelial, tanto da próstata em desenvolvimento quanto na adulta (Marker et al., 2003). O exato papel das células neuroendócrinas na próstata ainda não é conhecido, entretanto acredita-se que esse tipo celular participa da regulação tanto do desenvolvimento e crescimento glandular quanto da secreção prostática. Essas funções são suportadas pela produção de neuropeptídios por essas células com características semelhantes a fatores de crescimento, além de serem indutores da divisão celular (Abrahamsson e Di Sant'Agnese, 1993). Ainda no epitélio é observada a presença de algumas células intermediárias, que expressam características intermediárias entre as células basais e luminais. A importância sobre esse tipo celular ainda é discutida, o que se sabe é que as células intermediárias não são dependentes de andrógenos para a sua sobrevivência. Atualmente as células intermediárias vêm sendo associadas ao desenvolvimento de lesões malignas no epitélio prostático, postulando-se que tais células são na verdade progenitoras de transformações malignas que ocorrem no epitélio glandular (Leenders e Schalken, 2003).

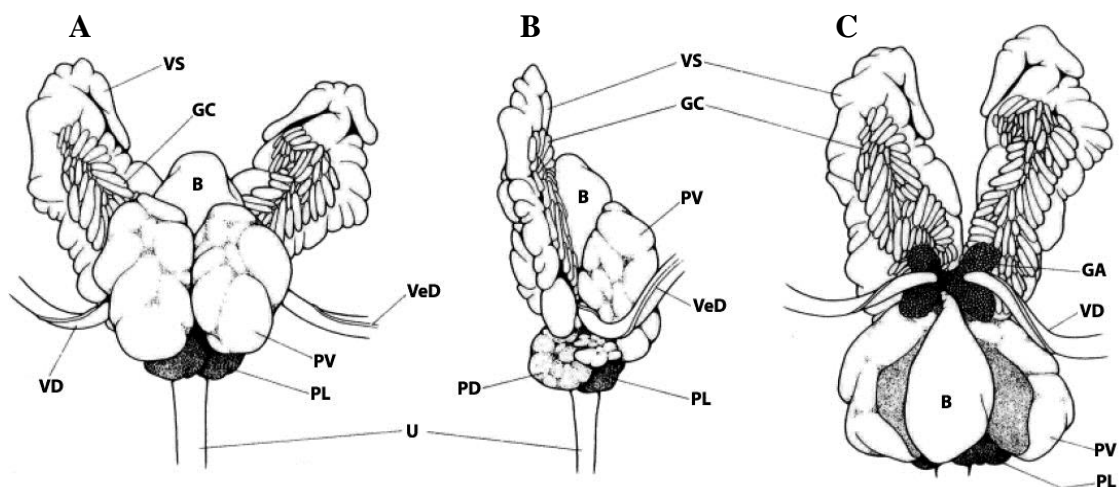
O estroma prostático é um arranjo complexo de células musculares lisas e fibroblastos imersos em uma matriz extracelular (MEC) ao redor dos ácinos e ductos

(Tuxhorn et al., 2001). Neste compartimento encontram-se ainda macrófagos e células endoteliais vasculares, apresentando um papel importante nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999). Além disso, tais células apresentam plasticidade funcional, sendo capazes de modular seu fenótipo frente a situações fisiológicas e patológicas, caracterizando-se pela mudança na expressão de genes de proteínas específicas (Worth et al., 2001). Grande importância tem sido atribuída às células musculares lisas, tanto no controle homeostático, quando no desenvolvimento e estabelecimento de neoplasias da próstata (Cunha et al., 1996; Farnsworth, 1999). Os fibroblastos, juntamente com as células musculares lisas, sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da matriz extracelular, que é composta de fibras de colágeno, elásticas e proteoglicanos, entre outras moléculas que se associam a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas remodeladoras (Tuxhorn et al., 2001). Na próstata humana adulta, camadas de células do músculo liso circundam os ductos epiteliais e, por seu papel contrátil, promove a eliminação das secreções prostáticas no interior da uretra, durante a ejaculação (Hayward et al., 1996).



**Figura 1.** Representação esquemática em cortes frontal e sagital do complexo urogenital masculino, ilustrando a posição anatômica da próstata adulta e estruturas associadas. ZC: zona central; ZP: zona periférica; SFA: estroma fibromuscular anterior; ZT: zona de transição (modificado de Timms, 2008).

Em roedores, embora a morfogênese prostática ocorra de maneira análoga a de humanos as suas morfologias são notavelmente diferentes. Enquanto nos humanos há uma evidente compactação dos lobos prostáticos, nos roedores é possível distinguir geralmente quatro lobos: anterior, dorsal, lateral e ventral (Figura 2). Em alguns roedores, como ratos e camundongos, os lobos lateral e dorsal são considerados uma única estrutura por se originarem de brotos da mesma região do seio urogenital, formando o lobo dorsolateral (Sugimura et al., 1986; Rochel et al., 2007). Devido às diferenças lobo-específicas quanto aos padrões de brotamento, a forma final de cada lóbulo é diferente. Além disso, cada lobo apresenta características histológicas distintas com pregas epiteliais extensas no lobo anterior, dobras menores porém significativas no lobo dorsolateral e pregas mínimas no lobo ventral (Cunha et al., 2004). A glândula prostática de ratos é composta por um par de lobos ventrais posicionados no istmo da bexiga e um grupo de ácinos dorsolaterais e seus ductos. No rato, as glândulas coaguladoras (lobo anterior) e vesículas seminais circundam dorsolateralmente a uretra na base da bexiga, formando um anexo anatômico separado (Price, 1963). Ao se estudar a histologia da próstata em ratos é possível estabelecer homologias tênues com as zonas prostáticas de humanos, sendo comparável o lobo anterior e dorsal com as zonas central e periférica, respectivamente (Slayter et al., 1994). Ainda em roedores, cada lobo prostático é envolto e separado do outro por um estroma relativamente delgado, composto por apenas algumas células fusiformes distribuídas entre as fibras de colágeno. Nos lobos prostáticos, o estroma de cada ducto e alvéolo é imediatamente rodeado por um tecido conjuntivo frouxo, conferindo uma arquitetura lobular à próstata, sem a intervenção de um estroma colagenoso denso como o que circunda as glândulas dos lóbulos adjacentes na próstata humana. Além disso, feixes de nervos encontrados no estroma prostático (dentro da cápsula) na região póstero-lateral da glândula humana não são observadas em roedores. Em vez disso, feixes grossos de nervo e gânglios associados são normalmente encontrados no tecido conjuntivo frouxo peri-estromal, principalmente em secções do lobo dorsolateral (Harmelin et al., 2005).



**Figura 2.** Órgãos sexuais acessórios masculinos de rato adulto. A, vista anterior; B, vista lateral; C, vista anterior com a bexiga rebatida para a região caudal. Glândula ampular do vaso deferente (GA); bexiga (B); glândula coaguladora (GC); próstata dorsal (PD); próstata lateral (PL); vesícula seminal (VS); próstata ventral (PV); vaso deferente (VD); veia do deferente (VeD). *Modificado de Timms, 2008.*

## 2. *Próstata feminina (glândula de Skene)*

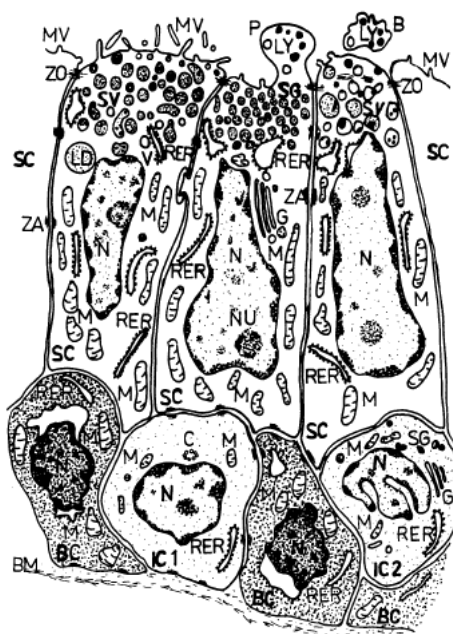
O desenvolvimento de uma próstata em mamíferos do sexo feminino tem sido reportado desde o século XVII, quando Reinier de Graaf (1641-1673) usou este termo para descrever um conjunto de glândulas localizadas em torno da uretra, as quais considerou homologas a próstata masculina (de Graaf, 1672). Outro nome importante no que se diz respeito aos conhecimentos primordiais sobre a próstata feminina foi o do ginecologista americano Alexander J. C. Skene (1838-1900). Ele redescreveu, dois séculos depois de Graaf, a próstata feminina como sendo formada por dois ductos parauretrais principais que se abrem em orifícios em ambos os lados da uretra, e que são desprovidos de função secretória (Skene, 1880). Desde então este conjunto passou a ser chamado de “glândulas parauretrais de Skene” e, por um longo tempo, esta glândula foi considerada como um órgão vestigial, sem nenhuma importância biológica para o organismo feminino (Zaviacic e Ablin, 2000).



No entanto, a partir de 1950 novas pesquisas retomaram a discussão a respeito da próstata feminina, principalmente com relação ao papel biológico que este órgão poderia desempenhar no organismo da mulher (Huffman, 1948; 1951; McCrea, 1952; Tepper et al., 1984; Wernet et al., 1992; Zaviacic, 1993; Zaviacic et al., 1993). Destes trabalhos, destacam-se os de Zaviacic e colaboradores que juntos editaram um livro que descreve amplamente a próstata feminina humana, abordando principalmente seus aspectos estruturais e funcionais, bem como suas implicações sexológicas (Zaviacic, 1999).

Zaviačič apresenta a próstata feminina humana como um conjunto parauretral de numerosas glândulas e ductos que estão inseridas em um estroma fibromuscular (Zaviačič et al., 2000a). As glândulas são revestidas por um epitélio secretor maduro e diferenciado, que apresenta dois tipos principais de células (figura 3): as basais, que são células fonte responsáveis pela manutenção da população de células prostáticas, e as secretoras ou luminais que produzem continuamente o líquido prostático (Zaviačič et al., 2000b). As células luminais são as mais numerosas e expressam o antígeno específico da próstata (PSA) e a fosfatase ácida prostática (PAP), dois importantes marcadores prostáticos (Zaviačič et al., 1993).

O exato papel biológico que a próstata desempenha no organismo feminino ainda não foi totalmente esclarecido. Estudos bioquímicos demonstraram que o líquido prostático liberado durante a ejaculação feminina apresenta a mesma constituição química do líquido prostático masculino. Dentre os componentes do ejaculado feminino humano, os mais abundantes são o PSA, PSAP, zinco e frutose (Zaviacic et al., 1993; Zaviacic, 1999). Evidências indicam que a frutose produzida por esta glândula escoar em pequenas quantidades da uretra para a vagina, desempenhando importante papel para a reprodução. Assim, como a frutose é a principal fonte de energia para os espermatozoides, a fêmea também garante o sucesso da fertilização dos ovócitos. Além disso, estudos recentes confirmaram a detecção de níveis de PSA no soro e na urina de mulheres (Zaviacic e Ablin, 2000; Schmidt et al., 2001). Estes trabalhos indicaram que a próstata é a principal produtora de PSA nas fêmeas, embora existam outras fontes extra prostáticas para sua expressão (Diamandis e Yu, 1997; Yu e Berkel, 1999; Galadari et al., 2004; Kocak, 2004).



**Figura 3.** Aspectos ultra-estruturais da glândula prostática feminina humana segundo Zaviacic et al. (2000a). SC: célula secretora; BC: célula basal; IC1 e IC2: células intermediárias; B: “blebs” apicais; BM: membrana basal; C: capilar; D: desmosomos; G: complexo de Golgi; LY: lisossomos; LD: gotícula lipídica; M: mitocôndrias; MV: microvilosidades; N: núcleo; NU: nucléolo; P: protuberância do citoplasma apical; RER: retículo endoplasmático rugoso; SV: vesículas de secreção; ZA: zônula de aderência; ZO: zônula de oclusão.

Em relação à sua importância sobre o comportamento sexual feminino alguns trabalhos têm associado a próstata feminina ao ponto de Gräfenberg (ponto-G), ressaltando a importância do estímulo deste ponto para que o fenômeno de ejaculação feminina aconteça (Schubach, 2002). Pela definição de Gräfenberg, o ponto-G se refere a uma “área” ou “zona” ricamente inervada presente na parede ântero-superior da vagina, através da qual a próstata feminina pode ser acessada (Gräfenberg, 1950). No entanto, artigos polêmicos defendem que o ponto G e a próstata feminina são exatamente a mesma estrutura, e não apenas uma região próxima à glândula (Addiego et al., 1981; Hines, 2001).

Experimentos com material humano são muito limitados, pois a próstata feminina só pode ser obtida a partir de necropsias de mulheres que sofreram morte cerebral (Zaviacic, 2000a). Assim, torna-se necessária a adoção de modelos experimentais que

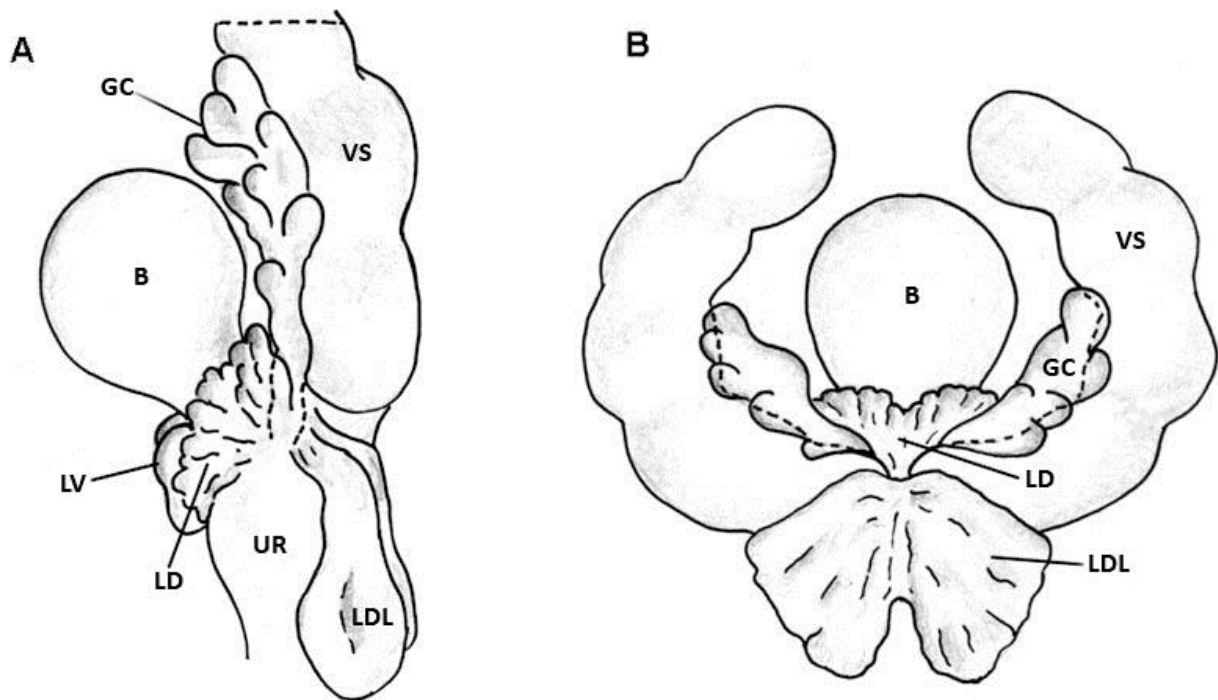
apresentem uma glândula prostática semelhante à da mulher, a fim de se extrapolar os dados para a espécie humana.

### **3. *Gerbilo da Mongólia como modelo experimental***

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um roedor reconhecido pela sua adequação para o uso laboratorial desde os anos 60 (Williams, 1974). Esses animais são originários de ambiente desértico, consomem pouco líquidos e conseqüentemente tem micção escassa, se comparando com outros modelos de roedores utilizados em análises experimentais, fato que facilita a manutenção geral de um biotério.

A próstata do gerbilo tem se mostrado um interessante modelo biológico para estudos da biologia prostática, porque sua morfologia é muito semelhante à da próstata humana, no que diz respeito à distribuição dos componentes teciduais e celulares e organização dos lobos (Rochel et al., 2007). Esse tipo de conformação anátomo-histológica não está presente no rato e nem no camundongo, nos quais os lobos prostáticos são bem distintos (Price, 1963). Outra característica interessante relativa ao complexo prostático do gerbilo é o fato de a fêmea adulta apresentar a próstata com características secretórias muito semelhantes às descritas para a próstata do macho (Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004).

Assim como em outros roedores, a próstata do gerbilo macho é formada por quatro pares de lobos fortemente associado à uretra (figura 4) - lobo anterior ou glândula coaguladora (GC), lobo dorsal (LD), lobo dorsolateral (LDL) e lobo ventral (LV) – se diferenciando, entretanto pelo fato do LV ser o de menor volume. O LDL está localizado crânio-lateralmente, inserido entre a bexiga e os ductos da vesícula seminal e da GC (Rochel et al., 2007). Santos e colaboradores (2003) demonstraram que a próstata de fêmeas de gerbilos não é subdividida em diferentes lobos como a do macho, fato este compartilhado por outros roedores (Satoh et al., 2001; Flamini et al., 2002).



**Figura 4.** Vista lateral (A) e dorsal (B) do complexo prostático de gerbilo macho adulto. B: bexiga; GC: glândula coaguladora; LD: lobo dorsal; LDL: lobo dorsolateral; VS: vesícula seminal; LV: lobo ventral; UR: uretra pélvica e músculo uretral. *Modificado de Rochel et al., 2007.*

Histologicamente, a próstata é formada por glândulas túbulos-alveolares sendo que a sua atividade está ligada principalmente à porção alveolar. Entretanto os seus ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (Reese et al., 1986). Os lobos prostáticos são compostos por um estroma e por um tecido epitelial secretor formador das unidades tubulares. O compartimento estromal dos gerbilos, ricamente vascularizado, possui uma região subepitelial e uma camada de músculo liso, responsável pela contração durante a ejaculação, envolvendo os túbulos, em adição à região adjacente ao estroma intersticial situado entre os túbulos adjacentes. Além disso, é possível diferenciar os lobos prostáticos dos gerbilos em decorrência das suas peculiaridades quanto às características observadas em seu adenômero (Rochel et al., 2007). Os epitélios prostáticos masculinos e femininos, nas diferentes espécies estudadas, são constituídos por um compartimento basal, composto por células proliferativas e por um compartimento luminal secretor, composto por células diferenciadas e com capacidade secretora dos tipos

apócrinas e merócrinas (Zaviacic, 1999; Timms et al., 1999; Hudson et al, 2001). Em fêmeas de gerbilos a distribuição desses tipos celulares no epitélio é análoga às descritas para os outros mamíferos, incluindo a espécie humana (Santos et al., 2003).

A próstata feminina do gerbilo possui uma localização parauretral, estando em íntimo contato com a parede da uretra na região proximal medial de forma bi ou unilateral. Ela possui os mesmos constituintes da próstata masculina, que são os ácinos e ductos. A porção secretora da próstata de fêmeas adultas do gerbilo é revestida por um epitélio que varia de cúbico simples a colunar pseudo-estratificado. As células epiteliais são de dois tipos: as basais, que formam uma camada descontínua de células-fonte para a manutenção do crescimento prostático, e as secretoras que apresentam um citoplasma rico em organelas envolvidas nos processos de síntese e secreção de glicoproteínas. As células secretoras são distinguíveis em dois tipos de acordo com a sua forma de secreção, as merócrinas, subdivididas em claras e escuras, e as apócrinas. Na base do epitélio glandular encontram-se as células musculares lisas do estroma, dispostas de forma ordenada. O fibroblasto é outra célula comumente encontrada no estroma da próstata feminina. Além dos elementos celulares, o estroma também é rico em elementos fibrosos, como as fibras colágenas, reticulares e elásticas. Desta forma, a próstata feminina do gerbilo da Mongólia mostra-se como um excelente modelo experimental, pois apresenta uma grande semelhança estrutural e fisiológica com a próstata feminina humana e com ao LV da glândula masculina. Além disso, a ocorrência de próstata em fêmeas desses animais é muito elevada, sendo que cerca de 80% das fêmeas apresentam uma glândula prostática bem desenvolvida e ativa nos processos de secreção (Santos et al., 2003).

#### ***4. Características do desenvolvimento prostático***

A glândula prostática desenvolve-se a partir do seio urogenital (UGS) que, sendo uma subdivisão da cloaca, tem sua origem a partir de uma especialização do endoderma e do mesoderma que circunda a bexiga urinária (Marker et al., 2003). O UGS é composto por uma camada epitelial (UGE), a qual é circundada por um mesênquima (UGM)

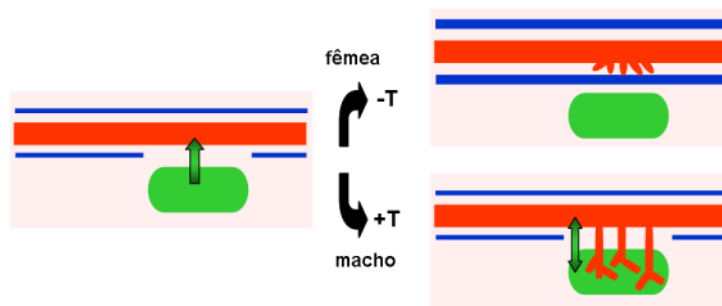
originário do mesoderma. Embora o processo de desenvolvimento seja contínuo, ele pode ser categorizado em cinco estágios que envolvem determinação, iniciação ou brotamento, morfogênese de ramificação, diferenciação, e maturação puberal (Prins e Putz, 2008). O processo de determinação prostática ocorre antes mesmo da evidência de uma estrutura morfológica em desenvolvimento, mediante a expressão de sinais moleculares atuantes em regiões específicas do UGS (Prins e Putz, 2008).

Em machos, o processo de desenvolvimento inicia-se quando células epiteliais do UGE formam brotos que penetram no interior do mesênquima circundante, o UGM, nas diversas direções pertinentes à divisão lobular prostática (ventral, dorsal e lateral). A ramificação prostática inicia-se quando os brotos epiteliais, do UGS, em processo de alongação entram em contato com o mesênquima circundante (UGM). A diferenciação epitelial e mesenquimal é simultaneamente coordenada com a morfogênese de brotamento, ocorrendo na direção proximal – distal. Paralelamente a esse processo, acontece também eventos que desencadeiam a canalização ductal (formação do lúmen). O crescimento final e o processo de maturação ocorrem na puberdade, quando os níveis de andrógenos circulantes aumentam. (Prins e Putz, 2008; Wang et al., 2001; Prins e Birch, 1995; Hayward et al., 1996).

Em embriões femininos, o processo de desenvolvimento prostático é semelhante. A ausência de testosterona (T) nesses embriões induz o UGS a originar a porção inferior da vagina e a uretra (Shapiro et al., 2004). O UGM passa a circundar o epitélio uretral, subdividindo-se em mesênquima periuretral e zona mesenquimal. Esta última região diferencia-se em músculo liso e em outra zona formada pelo mesênquima condensado ventral (VMP). Esta última estrutura apresenta localização análoga à próstata ventral masculina e representa o mesênquima do UGS sem a invasão do UGE (Thomson et al., 2002).

A frequência de desenvolvimento de uma glândula prostática funcional em fêmeas é muito elevada. Na espécie humana, cerca de 90% das mulheres desenvolvem um tecido prostático maduro e ativo nos processos de secreção (Zaviacic et al., 2000b). Em fêmeas de roedores, a morfogênese prostática parece ser influenciada pela posição intrauterina dos animais durante a gestação (Clark et al., 1991; Timms et al., 1999).

Durante a diferenciação do mesênquima, os andrógenos regulam a espessura e a continuidade da camada de músculo liso formada, de modo que a ausência de andrógenos em embriões femininos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua, ao contrário do que ocorre no embrião masculino, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002). Em fêmeas, o isolamento entre o VMP e o epitélio uretral, que é provocado pela camada de músculo liso, impede a formação de uma glândula prostática desenvolvida e lobulada. Desse modo, o reduzido tecido prostático observado em fêmeas de várias espécies é originário do UGS que não sofreu estímulo androgênico. No entanto, embora a próstata feminina adulta seja menor que a masculina, ela apresenta, em várias espécies estudadas, um epitélio secretor diferenciado e funcional (Zaviacic et al., 2000a; Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004; Fochi et al., 2008). O modelo ilustrativo da indução prostática em machos e fêmeas foi proposto por Thomson e colaboradores (2002) e pode ser observado na figura 5.



**Figura 5.** Modelo descritivo da indução da próstata ventral em embriões femininos e masculinos de ratos. Do lado esquerdo pode-se observar o VMP (verde) durante os estágios iniciais de indução prostática (17-18 dias de gestação). Observe que a camada de músculo liso (azul) é descontínua e permite a sinalização entre o VMP e o epitélio uretral (vermelho). Do lado direito pode-se observar a morfogênese prostática em machos e fêmeas (a partir de 21,5 dias de gestação). Em fêmeas, a ausência de testosterona permite que o músculo liso forme uma camada espessa e contínua, impedindo a sinalização parácrina entre os brotos prostáticos em crescimento (vermelho) e o VMP. Em machos, a testosterona induz a formação de uma camada muscular delgada e descontínua que permite a interação epitélio-mesenchimal. Os brotos que emergem do epitélio uretral (vermelho) invadem o VMP. Neonatalmente, esses brotos sofrem bifurcações laterais dentro do VMP, originando a próstata ventral (Santos e Taboga, 2006, modificado de Thomson et al., 2002).

## ***5. Interação epitélio-estroma na glândula prostática***

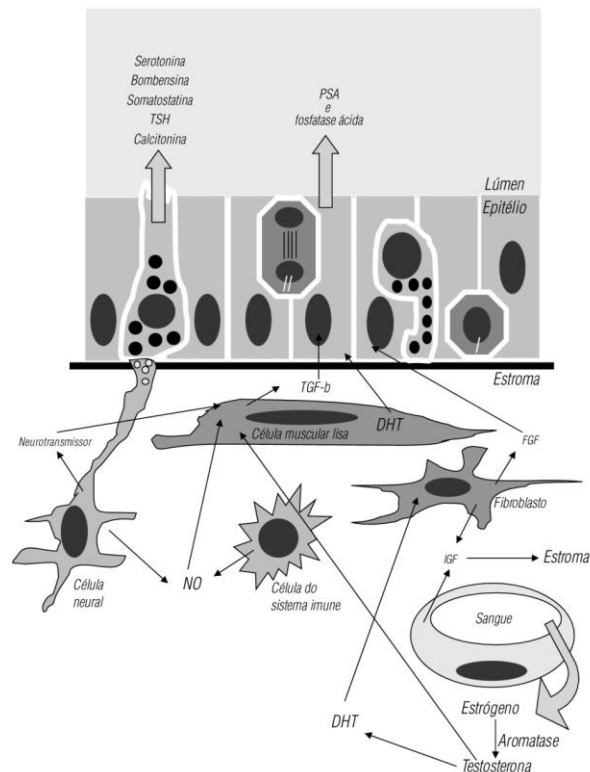
A manutenção de um epitélio prostático funcional é altamente dependente de andrógenos. Esse fato é comprovado através de estudos que se utilizam da privação androgênica por intermédio da castração, nos quais são observados uma intensa regressão do compartimento epitelial através do aumento da apoptose (Lee, 1981; Kyprianou et al., 2000). Sendo assim, tanto as células epiteliais quanto as estromais expressam AR (Prins et al., 1991). Estudos desenvolvidos por Cunha (1972a) utilizando isoladamente o epitélio e o mesênquima do seio urogenital – UGE e UGM, respectivamente – mostraram que o desenvolvimento da glândula prostática não foi possível mesmo na presença de níveis fisiológicos de andrógenos. No entanto, quando o UGE e o UGM são combinados há um desenvolvimento prostático normal. Esses resultados demonstram que de fato a interação entre o estroma e o epitélio prostático é fundamental para próstata. Procurando sanar dúvidas sobre quais são as contribuições de cada um desses compartimentos para o desenvolvimento prostático, alguns estudos se utilizaram de ratos insensíveis a andrógenos (Tfm) ou de mesênquimas epiteliais de regiões da pele considerados independentes de andrógenos (Sfm). Nesses estudos a interação entre o UGM + Tfm-E ou UGM + UGE de ratos normais levaram ao normal desenvolvimento da glândula prostática, entretanto quando se fez a interação entre UGE + Tfm-M ou do UGE + Sfm a próstata não se desenvolve (Kurita et al., 2001; Cunha, 1972b). Estes resultados mostram claramente que os vários efeitos dos andrógenos sobre o epitélio da glândula prostática não requer a presença de AR nas células secretoras, mas sim desse receptor nas células estromais, o que identifica uma importante dependência da ação parácrina entre o estroma e o epitélio prostático (Cunha, 2008). Assim, o estroma é responsável por elaborar fatores de crescimento que modulam atividades secretórias e proliferativas dentro da população celular estromal, através de estímulos autócrinos, que por sua vez são transmitidos por secreção parácrina ao epitélio (Farnsworth, 1999).

Membros dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), como por exemplo, o FGF7 e o FGF10 exercem importantes efeitos sobre o desenvolvimento prostático, garantindo um correto brotamento epitelial do UGS durante a morfogênese prostática



(Donjacour et al., 2003). Outro fator parácrino importante para a manutenção de uma glândula prostática funcional é o chamado sonic hedgehog (Shh). Estudos recentes evidenciaram que a sinalização mediada pelo Shh não é essencial para a indução prostática, mas é crucial para o crescimento glandular, brotamento epitelial, proliferação e também diferenciação prostática (Lamm et al., 2002; Freestone et al., 2003).

Esta interação parácrina entre o epitélio e o estroma ao seu redor tem importância fundamental durante a morfogênese prostática e na homeostase do órgão adulto, uma vez que tanto a proliferação como o fenótipo das células epiteliais dependem de alguma contribuição difusível do estroma (Cunha et al., 1985; Nemeth e Lee, 1996; Hayward et al., 1996; Taboga et al., 2009). As interações epitélio-estroma na próstata são, portanto, fundamentais para entender o controle da atividade normal da glândula e a ocorrência de desordens patológicas (figura 6).



**Figura 6.** Complexas interações entre epitélio e estroma na próstata. FGF-b (fator de crescimento beta), DHT (diidrotestosterona), NO (óxido nítrico), FGF (fator de crescimento fibroblástico), PSA (antígeno prostático específico), I (célula basal), II (célula em divisão). Fonte: Taboga et al., 2009.

## ***6. Modulação da glândula prostática pelos hormônios esteroides***

A morfologia da próstata feminina, tanto humana quanto de roedores, já foi descrita por vários pesquisadores (Shehata, 1980; Gross and Didio, 1987; Zaviačič, 1999; Flamini et al., 2002; Santos et al., 2003). No entanto, nenhum desses trabalhos investigou efetivamente os mecanismos que regem o funcionamento da glândula prostática feminina.

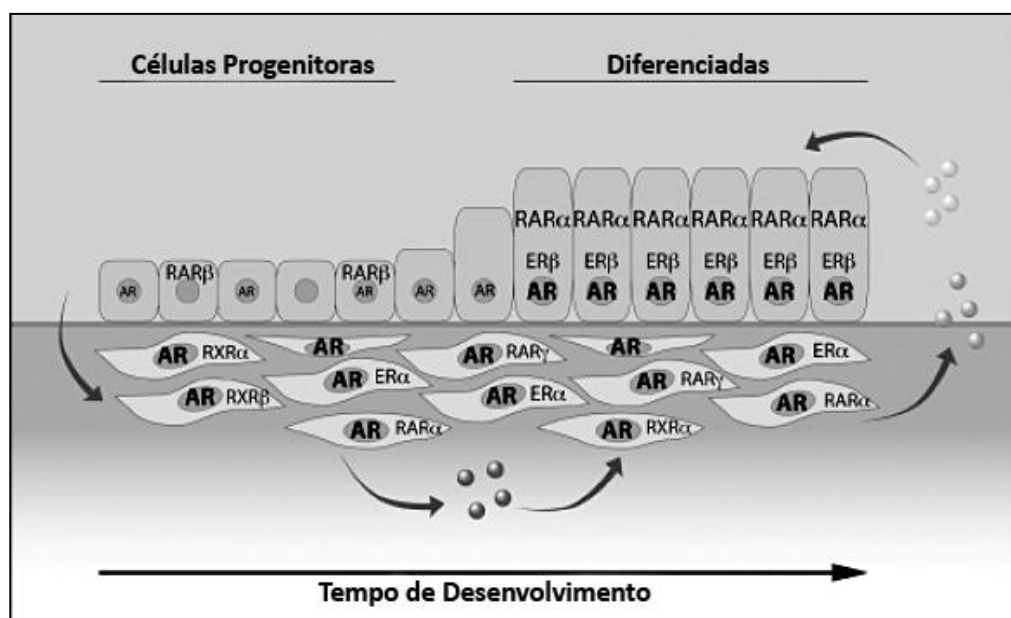
Diferentemente dos machos, as fêmeas adultas de mamíferos têm a manutenção das atividades sexuais e reprodutivas controladas de maneira cíclica através dos hormônios esteróides estrógeno (E2) e progesterona (P4). Assim, as fêmeas estão fortemente sujeitas as oscilações hormonais decorrentes dos seus processos fisiológicos normais. No entanto, poucos estudos procuraram investigar a influência destas oscilações hormonais sobre a glândula prostática feminina. Durante o ciclo estral de fêmeas de gerbilos da Mongólia, Fochi e colaboradores (2008) observaram que as oscilações hormonais são potencialmente capazes de influenciar a morfofisiologia da glândula prostática deste animal. O ciclo estral destes roedores é composto por quatro fases distintas: proestro, estro, diestro I e diestro II. Em todas as fases os níveis séricos de T permaneceram constantes, ao contrário dos níveis de E2 e de P4. O E2 apresentou um pico de atividade na fase de diestro II, coincidindo com um maior desenvolvimento da glândula prostática nas duas fases seguintes. O estágio de maior expressão hormonal da P4 foi constatado na fase de estro, momento a partir do qual foi observada uma regressão morfológica da glândula (Fochi et al., 2008). Estes dados são fortemente sugestivos de que o E2 e a P4, bem como suas interações com os andrógenos, influenciam de alguma maneira a morfofisiologia prostática nas fêmeas deste animal. No entanto, não existem até o momento, estudos que avaliem, diretamente, as influências da P4, ou de suas interações com o E2 e a T, sobre a próstata feminina e tão pouco sobre a masculina, por se tratar de um hormônio associado principalmente à fisiologia do sistema urogenital feminino.

A importância dos andrógenos para a regulação e o desenvolvimento do sistema urogenital feminino já é conhecida, fato esse comprovado pela presença de AR em vários órgãos do sistema reprodutor como os ovários, ovidutos e útero (Staub e Beer, 1997). Tratamentos experimentais em fêmeas adultas de gerbilos com testosterona, durante 21

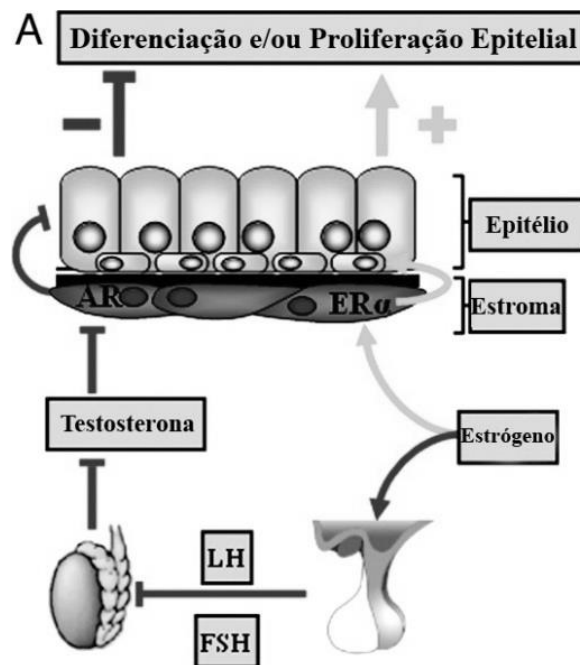
dias, mostraram que este hormônio também exerce um papel importante na regulação prostática da fêmea. Inicialmente, a administração de T desencadeia um maior crescimento glandular resultante da intensa proliferação celular, com um posterior aumento da área luminal devido ao aumento da atividade secretora, podendo desencadear o aparecimento de neoplasias intra-epiteliais com arranjo pseudocribiforme (Santos et al., 2006), indicando que a administração de T pode causar alterações importantes na próstata de gerbilos fêmeas. Estes efeitos demonstram em detalhe os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento prostático em camundongos e ratos *Wistar* machos (Vilamaior et al., 2006). É possível sugerir, com base nesses dados, que os andrógenos desempenham o mesmo papel na próstata feminina, relacionados primeiramente com a diferenciação do epitélio secretor e regulação da atividade secretora (Santos e Taboga, 2006), e que a menor quantidade de andrógenos, 0,35mg em média na fêmea e 7mg/dia em média no macho, contribui para o menor desenvolvimento da glândula prostática na fêmea (Staub e Beer, 1997; Santos et al. 2006).

Embora a próstata seja um tecido andrógeno-dependente, a sua fisiologia e patologia também é influenciada pelo E2. Ambos os receptores de estrógeno (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), são expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (figura 7). Além disso, a presença da enzima aromatase no tecido prostático de machos já foi observada, sugerindo que a próstata seja um sítio de aromatização e uma possível fonte de E2 (García-Flórez et al., 2005). Além de modular os efeitos dos andrógenos, o estrógeno parece aumentar a sensibilidade tecidual para outros hormônios, através do aumento do número de seus receptores (Timms et al., 1999). Duas rotas são utilizadas pelo estrógeno para influenciar a fisiologia prostática – diretamente via receptores de estrógenos intra-prostáticos e indiretamente pela regulação dos níveis de andrógenos via hipotálamo e pituitária (McPherson et al., 2008) (figura 8). Em ratos machos, o aumento da razão estrógeno/andrógeno, que ocorre no decorrer do envelhecimento, precede ou coincide com o aumento da incidência de câncer de próstata (Härkönen e Mäkela, 2004). Pelo fato dos níveis séricos de estrógeno serem elevados nas fêmeas, acredita-se que este hormônio possa agir diretamente na manutenção e fisiologia da próstata feminina (Santos e Taboga, 2006). Em mulheres no estágio pós-menopausa, quando os ovários diminuem a produção de estrógeno, existe uma grande probabilidade de

ocorrer o desenvolvimento de lesões prostáticas malignas ou pré-malignas (Sloboda et al., 1998). Estudos envolvendo a próstata de gerbilos senis indicam que a ocorrência espontânea de lesões prostáticas em fêmeas são mais frequentes e precoces do que em machos. Estes dados sugerem que o estrógeno desempenha um papel importante na manutenção da fisiologia prostática e que, da mesma forma que no macho, o balanço entre andrógeno/estrógeno é o fator chave na instalação de desordens prostáticas (Custódio et al, 2004, 2008).



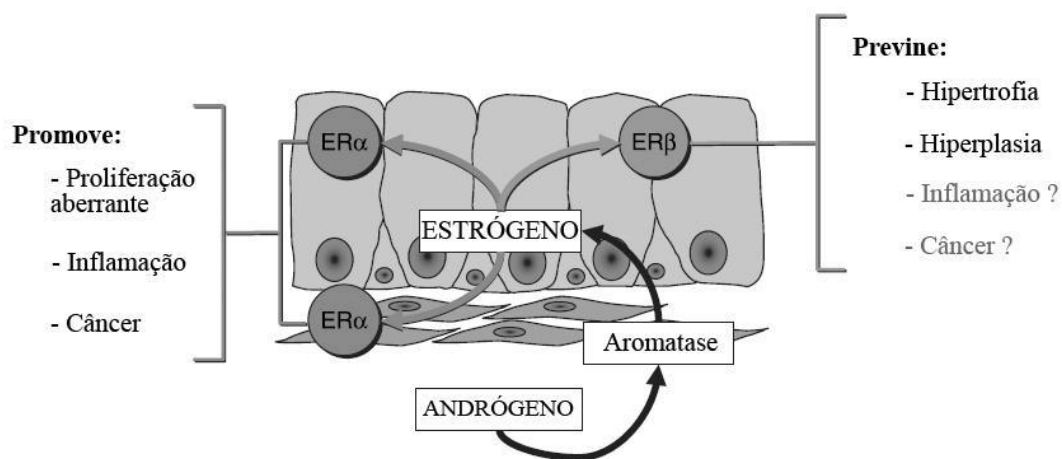
**Figura 7.** Expressão dos receptores nucleares AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  durante o desenvolvimento prostático. AR: receptor de andrógeno; ER: receptor de estrógeno; RAR: receptor de ácido retinóico; RXR: receptor X retinóico. Modificado de Prins e Putz, 2008.



**Figura 8.** Regulação estrogênica da diferenciação e proliferação prostática. A - O estrógeno pode afetar direta e indiretamente a diferenciação e proliferação prostática em camundongos machos. Indiretamente, suprimindo a liberação de LH pela pituitária e levando a uma redução da quantidade de testosterona produzida pelos testículos, inibindo assim a diferenciação e proliferação normal. Agindo localmente via ER $\alpha$  no estroma prostático, estimulando tanto a proliferação quanto a diferenciação. *Modificado de McPherson et al., 2008.*

Os estrógenos atuam sobre seus tecidos alvos através de seus receptores específicos, os quais são membros de uma vasta família de fatores de transcrição nuclear. Os dois receptores de estrógeno ER $\alpha$  e ER $\beta$  por não serem isoformas, são codificados por dois genes diferentes, o ESR1 e o ESR2, respectivamente (Walter et al., 1995 - Cloning of the human estrogen receptor cDNA; Prins e Korach, 2008). Esses receptores residem no núcleo celular e são ativados, principalmente, de forma direta pela ligação com o E2, mas também de forma indireta através de fatores de crescimento, como ocorre no útero (Klotz et al., 2002; Prins e Korach, 2007). Ambos os ER são expressos na glândula prostática, porém em diferentes compartimentos, e também apresentam diferentes funções. O ER $\alpha$  localiza-se primariamente no estroma prostático enquanto o ER $\beta$  é expresso no compartimento epitelial. A expressão desses receptores é temporalmente distinta, sendo possível observar a

presença do ER $\alpha$  no mesênquima prostático durante os estágios iniciais do desenvolvimento, desaparecendo por volta da quarta semana. Isso ocorre devido à produção crescente dos níveis de andrógenos que promove a supressão do ER $\alpha$  e estimula a expressão do ER $\beta$  (Prins et al., 2001; Omoto et al., 2005; Mcpherson et al., 2008). Estudos recentes mostram que na próstata o ER $\alpha$  parece exercer vários efeitos adversos, desencadeando proliferações aberrantes, inflamações e lesões cancerígenas, enquanto o ER $\beta$  exerce efeitos benéficos no epitélio, dentre os quais estão a prevenção de hiperplasias e hipertrofias mediado por seus efeitos anti-proliferativos e potencialmente anti-carcinógenos (Risbridger et al., 2007; Mcpherson et al., 2008; Ricke et al., 2008) (Figura 9).



**Figura 9.** Sumário dos mecanismos locais de sinalização estrogênica na glândula prostática. A testosterona é localmente convertida em estrógeno pela enzima aromatase, agindo via ER $\alpha$  e ER $\beta$  e regulando a homeostasia do epitélio prostático. *Modificado de Risbridger et al., 2007.*

Em tratamentos com as drogas antiestrogênicas é possível observar a ocorrência de importantes alterações na fisiologia prostática de fêmeas de gerbilo, como uma acentuada hiperplasia glandular, caracterizada pelo aumento das células epiteliais e estromais, assim como um aumento no número total de ductos e ácinos. A presença de neoplasia intra-epiteliais com arranjo pseudocribiforme também é frequente em casos de supressão da ação estrogênica (Santos et al., 2005, 2008). Todos estes dados mostram que o E2 é de fundamental importância para a fisiologia prostática, tanto de fêmeas como de machos, conservando a morfologia e funcionalidade normal desta glândula.

Outro hormônio importante no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, porém pouco estudado, é a P4. A P4 é um hormônio esteróide sintetizado pelos ovários e pelo córtex da adrenal, sendo a sua quantidade secretada dependente do nível de estímulo da gonadotrofina e do estado fisiológico do ovário. Uma vez secretada, ela pode agir ao nível do eixo hipotalâmico-hipofisário, regulando a secreção de gonadotrofina, no desenvolvimento do tecido mamário e do útero, podendo interferir também no comportamento sexual da fêmea de algumas espécies (Winneker et al., 2008; Peluso, 2006). Enquanto a P4 é geralmente considerada um hormônio sexual feminino, machos podem apresentar altos níveis deste hormônio como aqueles observados na fase folicular do ciclo menstrual normal, principalmente durante o período diurno (Kalra e Kalra, 1977; Oettel e Mukhopadhyay, 2004).

O hormônio P4 é produzido tanto pelas gônadas masculinas e femininas quanto pela adrenal. No testículo esse hormônio é sintetizado pelas células de leydig e no ovário pelo corpo lúteo. Assim como os demais hormônios esteróides a P4 tem como precursor a pregnenolona, metabólito esse produzido a partir do colesterol convertido nas mitocôndrias com a ajuda do citocromo P450<sub>scc</sub>, que é então convertida pela enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) (Pelletier et al., 2001). A enzima 3 $\beta$ -HSD pode ser encontrada tanto nas gônadas masculinas e femininas quanto no córtex da glândula adrenal. Dessa forma, no organismo masculino a P4 sintetizada pelas células de leydig se somam às concentrações de progesterona produzidas na adrenal (Naville et al., 1991; Oettel e Mukhopadhyay, 2004; Andersen e Tufik, 2006). Em fêmeas de ratos a quantidade de P4 sintetizada pelas adrenais é semelhante e em alguns casos superior à produzida pelos

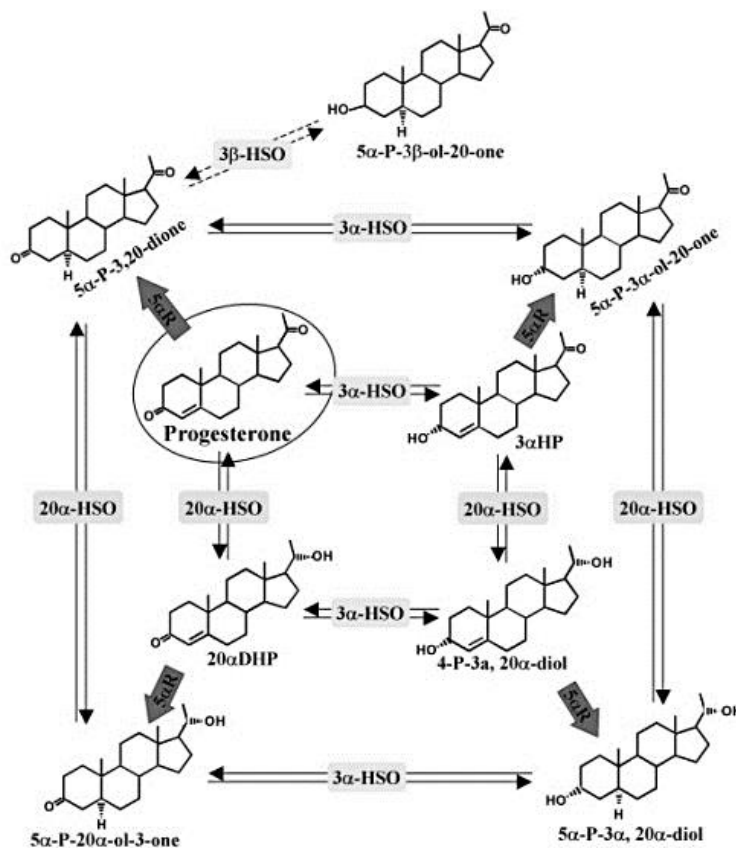
ovários, contribuindo expressivamente para a estabilização dos níveis séricos desse hormônio (Fajer et al., 1971).

Embora os papéis da P4 sobre a fisiologia prostática sejam pouco conhecidos, alguns trabalhos evidenciaram a sua atuação nesta glândula. Em próstatas de cachorros machos, Gallardo e colaboradores (2007) observaram a presença de receptores de progesterona (PR), os quais estavam presentes somente no núcleo das células epiteliais. A presença destes receptores no tecido prostático de cachorros sugere um papel fisiológico e patológico, na medida em que a sua expressão se mostrou aumentada em casos de desordens prostáticas. Em humanos do sexo masculino a progesterona atua também na fisiologia reprodutiva. Hiramatsu e colaboradores (1996) confirmaram esse fato mostrando a presença de PRs em próstatas hiperplásicas e neoplásicas de humanos. Em complementação, Kumar e colaboradores (1990) demonstraram que PRs citosólicos são encontrados em todos os casos de hiperplasia prostática benigna (BPH), assim como em todos os casos de carcinoma prostático, exercendo forte influência sobre estas formas de lesões prostáticas. Além disso, Oettel e Mukhopadhyay (2004) evidenciaram que algumas progestinas, com forte potencial antiandrogênico, são bastante eficazes no tratamento de BPH e de carcinomas prostáticos em humanos, por inibirem a captação de testosterona, reduzindo a quantidade dos ARs e a ligação dos andrógenos aos ARs remanescentes. A espermiogênese é outro fenômeno biológico bastante influenciado pela P4, a qual atua na capacitação espermática, reação acrossômica e na biossíntese de testosterona pelas células de Leydig (Oettel e Mukhopadhyay, 2004).

Da mesma forma que a testosterona e o estrógeno são transformados em vários metabólitos exercendo diferentes efeitos, a P4 também pode ser convertida em outros esteroides progesterônicos (Huber e Ott, 2009). Entre os principais metabólitos da P4 estão as 5 $\alpha$ -pregnanes e a 4-pregnanes, sintetizadas pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase (5 $\alpha$ R) (figura 10). As 5 $\alpha$ -pregnanes são conhecidas por apresentar um papel estimulador de mitoses e também anti-apoptótico no tecido mamário, enquanto as 4-pregnanes fazem o oposto, levando a um aumento da apoptose e uma diminuição das mitoses. Durante a gravidez os níveis das 5 $\alpha$ -pregnanes encontram-se geralmente aumentados, permitindo um maior desenvolvimento



das glândulas mamárias, diminuindo consideravelmente durante o período pós-parto (Wiebe, 2006; Huber e Ott, 2009).



**Figura 10.** A progesterona é convertida em diferentes 5α-pregnanes pela enzima 5α-redutase (5αR), e também dois tipos de 4-pregnanes (3αHP e 20αDHP). Ambas as 4-pregnanes podem ser 5α-reduzidas pela 5αR para o respectivo 5α-pregnane. *Modificado de Wiebe e Lewis, 2003.*

Em alguns trabalhos a interação da P4 com a 5αR tem demonstrado ser um fator modulador da síntese de metabólitos androgênicos (principalmente a di-hidrotestosterona - DHT), como resultado da competição desse hormônio com a T pelo sítio ativa da enzima (Cabeza et al., 2001; Flores et al., 2003; Pérez-Ornelas et al., 2005). Por outro lado, a capacidade da P4 regular a esteroidogênese, tanto testicular quanto ovariana, leva a um paradigma. No testículo as células de Leydig são capazes de sintetizar tanto T quanto androstenediona através de suas enzimas citoplasmáticas (Feek et al, 1989). Esse fato tem

sido demonstrado em estudos com ratos, nos quais é evidenciado que no testículo de animais imaturos cerca de 50% da P4 é convertida em DHT, enquanto em ratos adultos há a produção quase exclusiva de T. Em humanos, entretanto, a conversão direta da P4 em DHT não é observada em nenhum período da vida, havendo apenas a produção T, a qual é dependente da idade (Ficher e Steinberger, 1971; Preslock, 1980; Feek et al., 1989).

Os efeitos fisiológicos da P4 são mediados pela sua interação com duas isoformas de receptores intracelulares específicos denominados PR-A e PR-B, as quais são co-expressas na maioria dos tecidos-alvo, sendo a sua regulação variável nos diferentes tecidos (Shao et al., 2006; Mulac-Jericevic e Conneely, 2004). Normalmente, o PR-B é um potente ativador de transcrição, enquanto o PR-A, a isoforma menor, é necessário para contrabalancear os efeitos do PR-B (Huber e Ott, 2009). Após a ligação da P4 com seu receptor, há uma modificação conformacional dos PRs e o complexo receptor-ligante é translocado para o núcleo onde interage com o DNA, alterando a transcrição de genes responsivos à P4 (Ismail et al., 2003) (figura 11). Ademais, ações rápidas mediadas pelos PRs que ocorrem independentemente da transcrição também foram observadas em vários tecidos como o cérebro, fígado, mama e espermatozoide (Losel e Wehling, 2003; Gadkar-Sable et al., 2005). Em humanos, Shah e coautores (2005) foram os primeiros a reportar a existência tanto de PR intracelulares quanto ligados à membrana, no testículo. Além disso, nesse estudo foram encontrados ambos os PR (A e B) e também um terceiro tipo de menor tamanho (55 kDa). Na maioria dos sistemas fisiológicos, incluindo o tecido mamário, a expressão dos PRs é induzida pelo E2, através do seu receptor nuclear (Lange, 2008; Soyak et al., 2002). Em geral, no útero a expressão do gene que codifica os PRs é regulado em parte através da ativação transcricional do gene PR pela proteína ER hormônio-ativada, ou seja, pelos ERs ligados ao estrógeno (Ing e Tornesi, 1997). No decorrer do ciclo menstrual as mudanças orquestradas nas concentrações do E2 e da P4 são essenciais para criar um endométrio receptivo que permita a implantação. O E2 folicular induz a proliferação das células epiteliais e dos fibroblastos estromais, enquanto a P4 induz a diferenciação glandular e glicogênese, assim como a diferenciação e proliferação dos fibroblastos estromais (Punyadeera et al., 2003). Estudos com camundongos *knockout* para os PRs (PRKO) demonstraram a importância deste hormônio na fisiologia da fêmea. Estes animais,

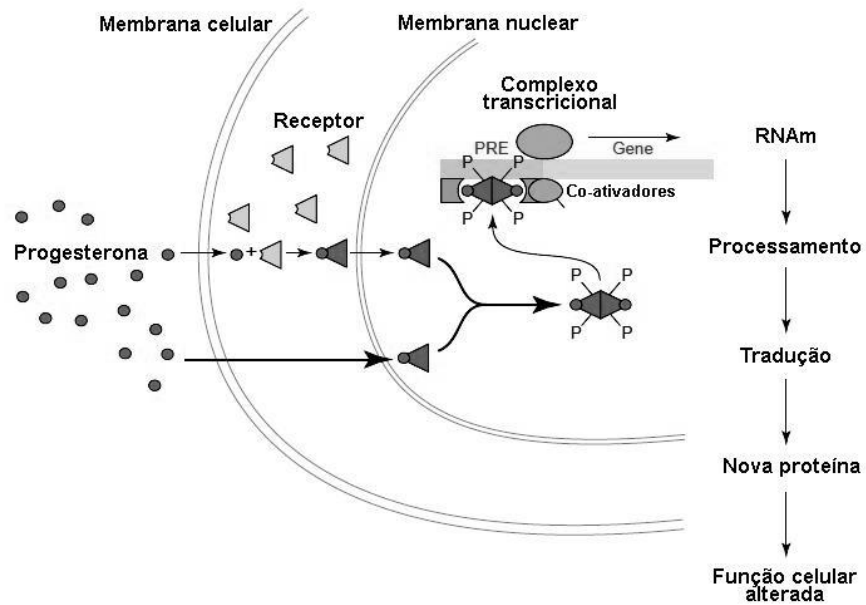
principalmente os que apresentavam ausência das duas isoformas de receptores, mostraram comportamento sexual alterado e várias implicações endócrinas, como defeitos na regulação neuroendócrina da gonadotrofina, disfunção uterina, falha na ovulação e defeitos na morfogênese da glândula mamária (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004; Soyak et al., 2002). Essa característica indutora do E2 sobre os PRs também foi demonstrada no sistema reprodutor masculino, mais especificamente nas glândulas bulbouretrais e na próstata. De Maria et al. (2010) demonstrou que a expressão de PRs nas glândulas bulbouretrais é um biomarcador em potencial da administração ilícita de 17 $\beta$ -estradiol em bezerros, na medida em que esse receptor se mostrou superexpresso mesmo após 7 dias de privação desse hormônio. Além disso, Divari e colaboradores (2011) evidenciaram que essa modulação também ocorre em gados adultos, havendo o aumento dos níveis de RNAm que codificam os PRs não somente na bulbouretral mas também na glândula prostática. Ademais, eles mostraram também que a superexpressão do PR ocorre tanto com a administração isolada de 17 $\beta$ -estradiol quanto em combinação com outros agentes e que isso acontece de forma independente de qualquer alteração morfológica glandular.

A P4 não age somente de forma direta através de seus receptores, mas também pode atuar através mecanismos parácrinos. Dessa forma, vários mediadores parácrinos influenciados pela P4 foram identificados (Rajaram e Brisken, 2012). O primeiro fator parácrino mediado pela P4 identificado foi o Wnt-4 no tecido mamário (Gavin e McMahon, 1992). De fato a síntese do RNAm codificador do Wnt-4 é induzido pelo tratamento com P4 exógena, além de sua expressão durante a gravidez requerer a ação do PR e a sua deficiência no epitélio da glândula mamária desencadear falhas no processo de brotamento e desenvolvimento da mama (Brisken et al., 2000). Estudos recentes identificaram o ativador do ligante NF-kB (RANKL), membro dos fatores de necrose tumoral (TNF), como outro mediador parácrino dos PRs (Kong et al., 1999). O RANKL é requerido para a diferenciação dos osteoclastos e organogênese dos linfonodos. Em camundongos a ausência do RANKL no tecido mamário desencadeia falhas na lactação enquanto a superexpressão do RANKL no epitélio é suficiente para desencadear o brotamento lateral na glândula mamaria de camundongos virgens (Fata et al., 2000; Fernandez-Valdivia et al., 2009). Satterfield e colaboradores (2008) mostraram também que no endométrio do útero de

ovinos a P4 regula vários fatores parácrinos, como o fator de crescimento fibroblástico (FGF-10), alguns receptores de fatores de crescimento insulínico (IGF), além de proteínas IGF-ligantes (IGFBP1 e IGFBP2). Todos esses reguladores parácrinos são essenciais para o correto funcionamento do endométrio, bem como o crescimento e desenvolvimento dos blastocistos peri-implantados.

Em suma, a P4 induz múltiplos efeitos biológicos em diferentes órgãos agindo sobre um grupo de células em distintos tecidos alvos. Muito embora esses efeitos sejam mediados de forma direta via PRs, muitas dessas funções também são realizadas indiretamente via fatores de secreção parácrinos. Dessa maneira, o estímulo hormonal é amplificado e a sinalização estimula múltiplos tipos celulares, fato esse importante para a coordenação funcional de diferentes células e tecidos (Rajaram e Brisken, 2012).

Atualmente vários trabalhos têm investigado a influência do estrogênio e da testosterona sobre o metabolismo da próstata de vários roedores (Timms et al., 1999; Härkönen & Mäkelä, 2004; Garcia-Flórez et al., 2005, Simanainen et al., 2007), incluindo o gerbilo (Scarano et al., 2006; Santos et al., 2008; Oliveira et al., 2007). No entanto, até o momento nenhuma pesquisa avaliou se a P4 participa direta ou indiretamente do controle fisiológico da próstata feminina e masculina. Desta maneira, mais estudos que investiguem o papel que a interação progesterona/andrógeno/estrogênio possui sobre a próstata feminina e masculina são necessários, especialmente levando-se em consideração que o desequilíbrio entre estes hormônios tem sido associado com a instalação de desordens prostáticas em mulheres (Sloboda et al., 1998; Kato et al., 2005; Sharifi-Aghdas e Ghaderian, 2004) senis e fêmeas de roedores (Custódio et al., 2008).



**Figura 11.** Mecanismo clássico de ativação do PR pela P4. A progesterona atravessa a membrana celular e se liga aos receptores de progesterona tanto no citoplasma quanto no núcleo. O complexo ligante-receptor se desloca para o núcleo, no qual interage com outro complexo ligante-receptor. Este complexo dimérico então se liga a elementos responsivos no DNA, e interage com proteínas nucleares co-reguladoras do receptor alterando a transcrição genética. PRE: elemento responsivo a progesterona. P: sítio fosforilado. *Modificado de Auger, 2001.*

## **OBJETIVOS**

---

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a importância do hormônio progesterona sobre a glândula prostática masculina e feminina (glândula parauretral de Skene) do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), caracterizando seus aspectos morfofuncionais e também a atividade dos receptores de andrógeno, estrógeno e progesterona.

Submetido a revista International Journal of Experimental Pathology



**PROGESTERONE AS A MORPHOLOGICAL REGULATORY  
FACTOR OF THE MALE AND FEMALE GERBIL PROSTATE**

Journal:	<i>International Journal of Experimental Pathology</i>
Manuscript ID:	IJEP-2013-01-1530
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	18-Jan-2013
Complete List of Authors:	Fochi, Ricardo; State University of Campinas, Department of Structural and Funcional Biology Santos, Fernanda; Federal University of Goiás, Morphology Góes, Rejane; Insitute of Biosciences, Letter ans Exact Sciences, Biology; Taboqa, Sebastião; São Paulo State University - UNESP, Department of Biology
Keywords:	progesterone, female prostate, puberty, castration

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1 PROGESTERONE AS A MORPHOLOGICAL REGULATORY FACTOR OF THE  
2 MALE AND FEMALE GERBIL PROSTATE

3

4

5 **Short running title:** Progesterone and prostate gland regulation

6

7

8 Ricardo A. Fochi\*, Fernanda C.A. Santos<sup>†</sup>, Rejane M Goes<sup>‡</sup>, Sebastião R. Taboga<sup>‡</sup>

9

10

11 \*Department of Structural and Funcional Biology, Institute of Biology, State University of  
12 Campinas (UNICAMP), São Paulo 13084-86, Brazil.

13 <sup>†</sup>Department of Morphology, Institute of Biology Sciences, Federal University of Goiás  
14 (UFG), Goiás 74001-970, Brazil.

15 <sup>‡</sup>Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences  
16 (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), São Paulo 15054-000, Brazil.

17

18

19 \*Corresponding Author Address:

20 Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences  
21 (IBILCE), Univ. Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo St., 2265, Jardim

22 Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil. Telephone: +55 17

23 32212386; Fax: +55 17 32212390. E-mail address: [taboga@ibilce.unesp.br](mailto:taboga@ibilce.unesp.br) (S.R. Taboga)



24 **ABSTRACT**

25           Testosterone (T) and estrogen are the main active steroid hormones in the male and  
26 female reproductive system, respectively. In female rodents, progesterone (P4), together  
27 with T and estrogen, has an essential role in the regulation of the estrous cycle, which  
28 influences the prostate physiology through their oscillations. In this work, we investigated  
29 how the male and female prostate gland of Mongolian gerbils, responds to surgical  
30 castration at the beginning of puberty, and what are the effects of T, estradiol (E2), and P4  
31 replacement, through quantitative and qualitative structural methods, as well as the study of  
32 the main steroid receptors location present in the prostate. In castrated animals of both  
33 sexes were noted an intense glandular regression, disorganization of the stromal  
34 compartment, and an abundant hyperplasia was observed. The replacement of P4 secured a  
35 mild recovery of the glandular morphology, inducing the growth of secretory cells and  
36 restoring the androgen receptor cells (AR). The administration of P4 and E2 extinguished  
37 the epithelial hyperplasia and intensified its hypertrophy, favoring the emergence of  
38 prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). In animals treated with T and P4, even though  
39 there are some inflammatory foci and lesions, the prostate gland revealed morphology  
40 closer to that of control animals. In summary, through the administration of P4, we could  
41 demonstrate that this hormone has anabolic characteristics, promoting hyperplasia and  
42 hypertrophy, mainly in the epithelial compartment. When combined with E2 and T, there  
43 an accentuation of glandular hypertrophy that interrupts the development of hyperplasia,  
44 and ensures the presence of a less dysplastic glandular morphology.

45

46 **Keywords:** Progesterone; Female prostate; Puberty; Castration.

47 **INTRODUCTION**

48 Progesterone (P4) is one of the sex hormones synthesized from pregnenolone,  
49 which is considered a key factor of this biochemical pathway, because it can give rise to  
50 hormones including testosterone (T) and estrogen (Lagrange et al. 2003; Aron et al. 2004).

51 In the female body, the ovary is the major P4 secretory site in female mammals,  
52 which is synthesized recurrently during the reproductive cycle. P4 is an important  
53 modulator of normal female reproductive functions, which include ovulation and the  
54 glandular development of the uterus and breasts, as well as neuro-behavioral expression  
55 associated with the sexual responses (Lydon et al. 1995).

56 All physiological effects of this hormone are regulated by its two isoforms of  
57 nuclear receptors, PR and PR-B, which are co-expressed in most target tissues (Graham and  
58 Clarke 1997; Mulac-Jericevic and Conneely 2004). The expression of this two receptor  
59 isoforms can be modulated by both P4 and estrogen. In various target tissues, with the  
60 exception of breast, estrogen has the ability to increase PR expression, while P4 has the  
61 opposite effect (Graham and Clarke, 1997).

62 Although P4 be a steroid widely studied in females, the presence of this hormone in  
63 the male organism is still little recognized. Serum concentrations of P4, while  
64 comparatively lower than those observed in females, can be considered significant. In rats  
65 of both sexes, the serum P4 undergoes a significant increase in its levels during the peri-  
66 pubertal period (37-45 days) (Dohler and Wuttke, 1974). In the male organism, the  
67 synthesis of P4 is supplied by the adrenal gland, which in females may be similar to or  
68 greater than the amount produced by the ovaries, and also by the Leydig cells in the  
69 testicles, through the action of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) (Fajer et al.

70 1971; Pelletier et al. 2001; Andersen and Tufik 2006). Besides the presence of the  
71 hormone, both isoforms of PR are also expressed in the male reproductive tract, including  
72 the prostate gland, whose expression has been studied in prostatic diseases such as benign  
73 prostatic hyperplasia (BHP) and carcinomas (Brown et al. 1987; Luetjens al. 2006; Wang et  
74 al. 2007). The use of progesterone-derivatives as therapy in men with BHP and prostate  
75 carcinoma has been studied for some time (Schacter et al. 1989; Gann et al. 1996). This  
76 interest is due to the fact that progesterone is potentially able to inhibit the action of the  
77 enzyme  $5\alpha$ -reductase, which is responsible for the conversion of testosterone to  
78 dihydrotestosterone (DHT), a metabolite with greater affinity for the androgen receptor  
79 (AR) (Cooke et al. 1997).

80 In the female gonadal system the presence of a prostatic gland, albeit less studied,  
81 has already been documented in both humans and rodents (Zaviacic et al. 2000; Flamini et  
82 al. 2002; Santos et al. 2003). Though its function is not fully understood, it is known that  
83 the female prostate gland physiology is endocrinologically regulated similarly to the male  
84 prostate gland (Santos et al. 2008; Biancardi et al. 2010). An important factor to be taken  
85 into consideration about the female prostate is the hormonal fluctuation due to the  
86 reproductive cycle. In Mongolian gerbils, structural studies have shown that hormonal  
87 changes of T, E2 and P4 during the estrous cycle promotes morphofunctional changes in  
88 the female prostate, such as glandular growth during the stages of proestrus and estrus, and  
89 prostatic regression in diestrus I and II (Fochi et al. 2008).

90 Another important hormone for prostate homeostasis, and which seems to have  
91 influence on P4, is estrogen. In addition to prostate physiology regulation through the  
92 receptors  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  and modulating the action of androgens, studies in male mice have

93 demonstrated that estrogen is also able to increase the expression of PR in the prostate  
94 (Risbridger et al. 2001).

95         The importance of T and estrogen for the prostate gland, whether male or female, is  
96 widely recognized; however, the interaction between P4 and the prostate is still poorly  
97 understood. The presence of both hormone and progesterone receptors in the prostate  
98 suggest a physiological role of P4 on the gland. The goal of this work was to analyze the  
99 consequences of P4 exogenous administration, as well as its synergism with T and  
100 estrogen, on the structure and physiology of the male and female prostate gland.

101

## 102 **MATERIAL AND METHODS**

103

### 104 1. Surgical procedure and experimental groups

105         In the presente study we used both female and male gerbils (*Meriones*  
106 *unguiculatus*), with ages of 45 to 104 days. All animals were kept in the biotherium of the  
107 Biology Department of the Institute of Biosciences, Letters and Sciences campus of São  
108 José do Rio Preto – SP, under adequate light and temperature conditions according to the  
109 internal rules of the Committee on Ethics and Animal Welfare (25 °C, 12-h light/12-h dark,  
110 with food and water *ad libitum*).

111         Initially the gerbils were arbitrarily divided into two groups: non-castrated and  
112 castrated. At 45 days of age, the animals to be castrated were anesthetized (ketamine 800  
113 µl/Kg and xylazine 200 µl/Kg) and submitted to ovariectomy (females) and bilateral  
114 orchietomy (male), and then returned to the biotherium (Sisk and Meek 2001). When all

115 animals completed 90 days of age, they were divided into five experimental groups for both  
116 sexes, with 8 animals each (Figure 1).

117 All hormones were diluted in mineral oil (Nujol®) and then administered by  
118 subcutaneous injections (0.1 ml per animal). After 14 days of treatment, the gerbils were  
119 weighed and killed by decapitation following inhalation of CO<sub>2</sub>. The prostates were  
120 weighed and processed in accordance with the appropriate methodology for each of the  
121 analysis. All animal-handling procedures were carried out during the morning (between 8  
122 and 10:00 a.m.).

123

## 124 2. Serum hormonal dosages

125 Blood samples were collected through cervical vessel rupture by decapitation, in 4  
126 ml test tubes with separating gel. The serum dosages of progesterone, estradiol, and  
127 testosterone were performed according to a published method (Fochi et al. 2008; Santos et  
128 al. 2011), in which chemiluminescence was performed in automated Vitros-ECi (Johnson  
129 & Johnson, Orthoclinical Diagnostics Division, Rochester, NY), which can detect levels of  
130 0.1–3814 pg/ml for estradiol, 0.1–150 ng/ml for testosterone, and 0.1–100 ng/ml for  
131 progesterone. The hormonal ratios were calculated by dividing the dosages values of each  
132 animal, in each group individually, and not only by dividing the means obtained for each  
133 group.

134

## 135 3. Structural analysis

136 After death, the prostatic complex of males and females were extracted and  
137 weighed. The female prostate complex comprises the urethra together with adhered tissues.

138 Although the entire male prostate complex was removed, only the ventral lobe was used by  
139 its structural proximity to the female gland, which was weighed separated from the others.  
140 The prostatic fragments were fixed by immersion in Karnovsky solution (5%  
141 paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for  
142 morphometric and estereological tests and in 4% paraformaldehyde for immunolabeling  
143 analyses. After fixation, the tissues were washed under running tap water, dehydrated in an  
144 ethanol series, cleared in xylene, embedded in paraffin (Histosec; Merck, Darmstadt,  
145 Germany) or glycol methacrylate resin (Historesin embedding kit; Leica, Nussloch,  
146 Germany), and cut into 3- $\mu$ m sections with an automatic rotatory microtome (RM2155;  
147 Leica). By relative weights it is understood the ratio between prostate and body weights  
148 (ventral prostate weights / male body weights; female prostate weights / female body  
149 weights).

150

#### 151 4. Morphometric and stereological analysis

152 The morphometric and stereological analyses were performed using male and  
153 female histological prostate sections, separately, embedded in historesin and stained with  
154 hematoxylin-eosin. Prostatic sections were digitized and studied through a System Images  
155 Analyzer with Image-Pro Plus 6.0 software (© 1993-2006 Média Cybernetics, Inc.). For the  
156 morphometric study, measurements of the epithelium cells height and stromal smooth  
157 muscle layer thickness were made in 200 random prostatic fields. Through stereology, the  
158 relative volumes of prostate tissue compartments (lumen, epithelium, muscular stroma, and  
159 non-muscular stroma) were obtained using a Weibel multipurpose graticule with 130 points

160 and 60 test lines (Weibel, 1963), in a total of 30 prostatic random fields for each group  
161 (n=8).

162

### 163 5. Immunohistochemistry

164 To verify the location of steroid receptors in the prostate, immunostaining was  
165 performed as follows. Deparaffinized and rehydrated histological sections were subjected  
166 to antigen retrieval in TRIS-EDTA buffer, pH 9.0 at 100°C. The endogenous peroxidase  
167 blocking was performed with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 15-30 min. The slides were then  
168 incubated with primary antibodies to androgen receptor (AR, rabbit polyclonal IgG, N-20,  
169 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), estrogen (ER- $\alpha$ , rabbit polyclonal IgG,  
170 MC-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and progesterone (PR, rabbit  
171 polyclonal IgG, C-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a dilution of  
172 1:100, overnight at 4°C. After being washed in PBS and incubated in EnVision<sup>TM</sup> + Dual  
173 Link System-HRP (Dako; Denmark, Carpinteria, CA, USA) polymer for 45 min, the  
174 reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB) and the sections were counterstained  
175 with Harris hematoxylin. Negative controls were obtained by omitting the step with the  
176 primary antibody incubation. The quantification of PR was graded based at Bass et al.  
177 (2009), in which intensity ranges among 0 to +3. The +1 score represents fewer than 10%  
178 of cells positive for marker, +2 between 10% to 50% positive and +3 more than 50%  
179 positive. For ER $\alpha$  and AR the total number of cells were counted in 30 microscopic fields  
180 randomly selected from each experimental group, being separated in positively and  
181 negatively stained. A minimum of 1000 cells were counted and then the percentage of  
182 immunolabeling was calculated as the number of positive cells divided to total number of

183 cells. For the final computation of immunostainings, the positive cells of both prostatic  
184 compartments (epithelium and stroma) were summed.

185

## 186 6. Statistical study

187 All quantitative results are expressed as mean  $\pm$  S.D. The datas were initially  
188 studied by analysis of variance (one-way ANOVA) and, subsequently, by Tukey or  
189 Kruskal–Wallis test for multiple comparisons, with a 5% significance level ( $P \leq 0.05$ ). The  
190 statistical tests were performed with Statistica 7.0 software (StarSoft Inc., Tulsa, OK). The  
191 quantitative comparisons were carried out only between the groups of the same sex.

192

## 193 **RESULTS**

194

### 195 1. Biometric Analysis

196 In relation to the body weight of animals, no significant variations were found  
197 between all experimental groups (Table I). There was, however, in both sexes a significant  
198 weight reduction of the prostate gland and relative weight after surgical castration. None of  
199 the treatments was able to recover the weight of the female prostate complex. The ventral  
200 lobe of the male gland, however, showed a significant increase in the absolute and relative  
201 weight.

202

### 203 2. Serological Analysis of Steroid Hormones

204 Serum concentrations of total T, E2 and P4 are shown in Table II.



205 **Testosterone.** A significant reduction due to castration was observed in both sex of CaC  
206 group, remaining unaltered at the CaP and CaPE animals. The two sexes showed the same  
207 pattern for this hormone at CaPT group, expressing significantly higher levels of  
208 testosterone compared to all others.

209 **Estradiol.** In males, the castration did not alter the concentrations of E2, unlike females, in  
210 which was observed a significant reduction. The females of CaP and CaPT groups showed  
211 the same E2 levels that in NC animals. Male animals treated with P4 and P4 plus T not had  
212 their E2 levels altered regarding NC and CaC animals. The serum levels of this hormone  
213 changed expressively in both sexes of the CaPE group, in which was found the highest  
214 concentration in relation to all other groups.

215 **Progesterone.** The administration of exogenous P4 triggered a significant increase of this  
216 hormone in blood serum. By castration, the P4 levels became lower in the male and female  
217 animals. At CaP group, the P4 concentration increased, reaching values near those found in  
218 male and female animals of NC group. The highest levels of this hormone were observed in  
219 CaPE group of both groups, being greater than the concentration found in the NC. Gerbils  
220 treated with T and P4 revealed no changes in the levels of this hormone, remaining similar  
221 to concentrations observed in the NC and CaC groups.

222 **Hormonal Ratios.** In males the T/E2 and T/P4 ratios reduce after castration, while at  
223 females only the T/E2 ratio decrease. Through treatments, the T/E2 ratio changed merely at  
224 the CaPT animals of both sexes, being bigger than at NC group. Both in females as males  
225 the administration of P4 reduces the T/P4 and E2/P4 ratios, occurring the same in CaPE  
226 group. The administration of P4 plus T increased the T/P4 ratio in males and females, but in  
227 the formers the E2/P4 ratios also increased while in females these values are not altered.

228 3. Quantitative Analyses

229 The morphometrical and stereological results are shown in table I.

230

231 4. Stereology

232 In relation to this parameter, there were differences between the sexes. In the males  
233 of the CaC, CaP, and CaPT groups there was a significant increase in the volume of the  
234 muscle compartment in relation to observed in the NC. In the CaPE group, the volume of  
235 the muscle compartment reduced, becoming similar to that found in the NC. As for the  
236 epithelium, castration triggered a significant reduction in the volume of this compartment,  
237 which increased in the CaP and CaPT groups, however with greater intensity in the CaPE,  
238 being comparable to the values of the NC animals. The lumen also suffered a volume  
239 decrease after castration, increasing at CaPE and CaPT groups until normal values. In  
240 females, the volume of the muscular compartment remained the same after castration and  
241 treatment with P4, decreasing however in the CaPE group and increasing at CaPT animals.  
242 At the CaPE group, the volume of epithelium increased, remaining the same, however,  
243 when compared to CaPT, in which the epithelium reached its highest volume. With  
244 castration, there was a reduction in the volume of the luminal compartment; however, it  
245 significantly increased in the CaP, CaPE and CaPT group.

246

247 5. Morphometry

248 **CaC Group.** Significant height reductions were observed in the prostatic epithelial  
249 cells of males (39.85%) and females (14.44%) compared to intact controls. In  
250 ovariectomized females, the muscle layer thickness did not change in relation to the

251 control, unlike males, in which there was a significant reduction in muscle thickness of the  
252 castrated animals (30.61%).

253 **CaP Group.** In the animals of this group, the secretory epithelial cells became  
254 larger (24% male; 15.45% female) compared to the CaC. In addition, a significant increase  
255 was observed in the smooth muscle layer thickness of both sexes, and in males, the smooth  
256 muscle cells were larger than in NC.

257 **CaPE Group.** In males, the development of the epithelial layer was higher in this  
258 group when compared to all the others, while at females was only smaller than in CaPT  
259 group. The muscular layer of this group increased significantly compared to the other  
260 groups, both in males and in the females.

261 **CaPT Group.** In these animals, differences were observed as to the height of  
262 prostatic epithelial cells in relation to gender. In females, the epithelial height was greater  
263 than in all other groups. In males, however, this measure was 18.42% lower when  
264 compared with the CaPE group. The thickness of the prostatic stromal muscle layer  
265 underwent an increase in both sexes. In females, this measure was greater than in the CN  
266 and CaC, but fewer than in the CaPE and equal to the CaP. In contrast, the stromal  
267 thickness in males of this group was higher than in CaC and CaP, but was lower than the  
268 CaP and equivalent to NC.

269

## 270 6. Prostate gland structure

271 **CaC Group.** In both sexes, it was possible to observe common consequences  
272 regarding the castration. There was the occurrence of several atrophic alveoli with reduced  
273 lumen (Fig. 2a, b and 2k, l) containing cell masses inside (Fig. 2b, l). These alveoli also had

274 reduced secretory cells, with cuboid or low columnar aspect (2f, g and 2p, q). The  
275 epithelium became folded and the basement membrane irregular. The stromal compartment  
276 became developed and disorganized, being formed by an irregular smooth muscle layer,  
277 concentrically outlining the prostate alveoli (Fig 2g, q and 3a,c). In some alveoli, the  
278 muscle cells had an irregular phenotype, different from the typically spindle aspect found  
279 (Fig. 2g, q and 3a, arrow). In both sexes, although the muscle layer became irregular, the  
280 thickness reduction is not so evident (Fig. 2g, q).

281         **CaP Group.** In castrated animals treated with progesterone, the alveoli showed  
282 different behaviors for each sex. In the male, the luminal compartment underwent few  
283 changes, remaining smaller than the NC group (fig. 2c). In females, however luminal  
284 amplitude was recovered, being similar to prostate alveoli found in intact animals. (Fig.  
285 2m). For both sexes, the progesterone replacement made the secretory cells become taller,  
286 returning practically to the initial state (fig. 2h, r). Both in males and in females, a lesser  
287 amount of cell masses in the alveoli was observed, although there were instances of cellular  
288 debris (Fig. 3b e 3d, arrow head) and intraepithelial neoplasia (Fig. 3e,g), characterized by  
289 agglomeration of morphologically heterogeneous epithelial cells. The stromal compartment  
290 also suffered significant changes, having a recovery of smooth muscle surrounding the  
291 prostatic alveoli in both males (Fig. 2h) and females (Fig. 2r). At first, there was an increase  
292 of muscle thickness in relation to the CaC group, but this was not enough to return to the  
293 thickness in NC. In females, the muscle layer became thicker, being greater than the non-  
294 castrated group. In the glandular epithelium, it was also possible to find the presence of  
295 ciliated secretory cells (2m and 3f).

296           **CaPE and CaPT Group.** The CaPE and CaPT were the groups that had major  
297 structural changes of the prostate gland. The alveoli showed broader lumens (Fig. 2d, n, e,  
298 o) and a simple columnar epithelium with large nuclei (Fig. 2i, s, j, t). Some foci of  
299 abnormal growths in the stromal and epithelial compartment were observed, as scaling of  
300 epithelial cells developed into the lumen (Fig. 3i, n, o) and intraepithelial neoplasia (Fig. 3j,  
301 k, l, m). In both sexes, the secretory cells were significantly larger and the nucleus more  
302 spheric than those found in the NC group, as well as in other analyzed groups. Relative to  
303 the CaPE group, in these cells a greater amount of secretory vesicles in the cytoplasm of  
304 both sexes can be seen (Fig. 2i,s). The smooth muscle layer surrounding the prostatic  
305 alveoli also became thicker in both sexes, although in the males of the CaPE group, the  
306 volume of this compartment was reduced by additional treatment with estrogen.  
307 Additionally, in CaPT, it is also possible to observe a rearrangement of the stromal and  
308 epithelial compartment, with a cellularity similar to that observed in the control animals.  
309 This change is more intense in male gerbils compared to female ones (Fig. 2j). The acini in  
310 females of this group, although morphologically similar to control animals, show folded  
311 acini arising from the intense cell growth, as well as increased cellularity (Fig. 3o). Still in  
312 the females of CaPT group, it is possible to observe the occurrence of inflammatory cells  
313 inside the luminal compartment (Fig. 3p, asterisk) and also in the prostatic stroma (fig. 3,  
314 star).

315

## 316 7. Immunohistochemistry

317           **Androgen Receptor (AR).** The expression of AR-positive cells in the male and  
318 female prostate glands showed a similar behavior (Table III). After castration, there was a

319 significant reduction in the amount of AR-positive cells, which were noted as few cells,  
320 mainly in glandular epithelium of the CaC group (Fig. 4a, b, f, g). The administration of  
321 progesterone (CaP) and progesterone with estrogen (CaPE) induced a recovery of the  
322 number of AR-positive cells, leveling up with NC. In the CaP group, the presence of  
323 labeled cells was more intense in the stroma than in the epithelial layer (Fig. 4c, h). With  
324 the addition of E2 in the CaPE group, there was a more homogeneous distribution of  
325 labeled cells between these two compartments (Fig. 4d, i). The amount of AR cells was  
326 significantly higher in CaPT when compared to all other studied groups, focusing mainly in  
327 the epithelial cells (Fig. 4e, j).

328         **Estrogen Receptor (ER $\alpha$ )**. ER-positive cells were observed mainly in glandular  
329 stroma. In both sexes, castration did not trigger a significant change in the number of  
330 estrogen receptor cells (Table III and Fig. 5a, b, f, g). In females, the exogenous  
331 administration of P4 and E2 post-castration led to an increase of ER-positive cells, being  
332 higher than in animals of NC and CaC; however, there was no variation between CaP and  
333 CaPE groups (fig. 5h, i). At CaPT animals, the ER $\alpha$  labeled cells is similar to NC and CaC  
334 animals (fig. 5j). In the male prostate gland, a greater amount of labeled ER cells in CaP  
335 and CaPE (fig. 5c, d) is seen, but there was a significant reduction of these cells in animals  
336 of CaPT, matching the intact gland (fig. 5e).

337         **Progesterone Receptor (PR)**. There were no labeled cells in prostatic glands of NC  
338 and CaC animals (fig. 6a, b, f, g; Table IV). In gerbils treated with progesterone, PR-  
339 positive cells were observed mainly in the prostatic stroma. In gerbils treated with P4, PR-  
340 positive cells were exhibited both cytoplasmic and nuclear immunoreaction, and they were  
341 found mainly in the prostatic stroma (fig. 6 c, h). The PR-labeled cells of the CaPE group

342 were also mostly stromal, with also the presence of marked secretory cells for this receptor,  
343 especially the basal cells (fig. 6 d, i). In animals treated with P4 and T, it was still possible  
344 to see some PR-positive cells in the stroma; there is, however a more intense marking in the  
345 cytoplasm of the secretory epithelial cells (fig. 6 e, j).

346

## 347 **DISCUSSION**

348 This study revealed that the P4, together with E2 and T, causes changes in the prostate  
349 morphology, as well as in AR and ER $\alpha$  immunoexpression. The glandular regression of  
350 female prostate and male ventral prostate after castration was partially reversed by P4  
351 administration. In addition, the AR and ER $\alpha$  positive cells not changed, resembling the  
352 immunolabeling found in intact animals, and PR positive cells may be observed mainly at  
353 prostate stroma. The administration of P4 in conjunction with E2 and T after castration,  
354 leads to a more intense glandular development in both sexes, besides an increase of AR and  
355 ER $\alpha$  labeled cells in females prostate and a rise of AR and a decrease of ER $\alpha$  positive cells  
356 at ventral male prostate.

357 The prostate regression occurs mainly due to the reduction in testosterone serum  
358 levels, insofar as the androgens extensively influence their morphophysiology. Studies in  
359 which the testosterone replacement triggers accelerated processes of glandular development  
360 and recovery of prostate morphology confirm its relevance for the gland (Biancardi et al.  
361 2010). However, the lesions development of several kinds is a commonly found in the  
362 prostate of testosterone treated animals (Santos et al. 2006; Scarano et al. 2006; Oliveira et  
363 al. 2011). In males, the prostate gland becomes more developed than in females due the  
364 greater amount of serum testosterone in the male organism (Thomson 2001; Thomson et al.

365 2002). Thus, the reduction of its levels probably causes the most intense consequences in  
366 the male prostate. These changes found in the epithelial and stromal compartment is  
367 expected since in both sexes the correct balance of reproductive hormones is key to the  
368 prostate gland development, differentiation, and maintenance (Santos and Taboga 2006;  
369 Fochi et al. 2008; Scarano et al. 2008; Oliveira et al. 2011). In both sexes, after castration  
370 the T/E2 ratio decreased mostly due the lesser testosterone concentrations at the CaC group,  
371 reducing the differences among serum levels of these two hormones. The stromal  
372 compartment increase is probably due to the deficiency of testosterone which triggers the  
373 rearrangement of extracellular matrix fibers and also the synthesis of others stromal  
374 components like collagen. In this scenario, smooth muscle cells may be playing a synthetic  
375 role (Vermeulen et al. 2002; Scarano et al. 2008).

376         The replacement of P4, E2, and T in adulthood is not enough to reverse the  
377 glandular structure to the normal morphological state observed in the absence of castration.  
378 This fact is proven by the evidence of various tissue dysplasia found in several prostatic  
379 alveoli of treated animals, such as the presence of a differentiated cellularity. It is important  
380 to note that in the group treated with P4 and T, this dysplasia was observed with a lower  
381 frequency, especially in males. Probably this is due to the restructuring of the hormonal  
382 balance between T and E2, insofar as the imbalance between these two steroids has been  
383 singled out as one of the main factors responsible for the prostatic lesions onset. Indeed, the  
384 T/E2 ratio at CaPT animals increased and became larger than the CaC group and even that  
385 of the NC.

386         The development of the muscular stroma observed in the CaP group matches what  
387 occurs in the uterus, in which the P4 hormone is responsible for the gravid endometrium



388 maintenance, inducing the proliferation and differentiation of fibroblasts in the uterine  
389 stroma (Punyadeera et al. 2003). Our data demonstrate that P4 administered at a  
390 concentration of 1 mg/kg promotes a partial prostate restructuring, besides not having  
391 antiandrogenic effects in female and male prostate, instead triggers an increase in AR-  
392 positive cells. This find corroborates with earlier studies, in which the P4 administration at  
393 concentrations of 0.3 to 10 mg leads to a prostate weight increase in a dose-dependent  
394 manner, both in the dorsolateral as ventral lobes (Nishino et al. 2009). The rise of PR-  
395 positive cells in the stroma, both in the CaP and CaPE, compared to castrated animals  
396 coincided with the increase of ER $\alpha$  cells. This is consistent with previous studies that found  
397 that E2 has a stimulatory effect on the PR via ER $\alpha$  (Kurita et al. 2000; Yatkin et al. 2009).  
398 The PR is induced by the interaction between ER-linked with regions responsive to  
399 estrogen present in its gene, more specifically in the 5' region (Murakami et al. 1990; Ohta  
400 et al. 1993; Parczyk et al. 1997; Kurita et al. 2000). This stimulatory modulation of E2 on  
401 PR expression by ER probably was responsible for hypertrophy and hyperplasia observed  
402 in the glands of CaP and CaPE animals. The presence of PR only in the glandular stroma  
403 shows evidence that the growth of secretory cells triggered by the P4, is a result of the  
404 paracrine interaction between the prostatic stroma and epithelium. Therefore, the  
405 expression of the PRs in the female prostate does not seem to be inhibited by increased P4  
406 serum concentration. This finding coincides with what occurs in the uterus during the  
407 secretory phase of menstrual cycle in womans (Lessey et al. 1988). Another mechanism  
408 that P4 can be modulating the prostate development is the induction of FGF10 and several  
409 IGFs synthesis, although this can not be confirmed in this study (Satterfield et al. 2008).  
410 The hormonal ratios encountered in CaP group indicates that in an environment with low T

411 concentrations, like a surgical castration, the increased of P4 serum levels with reduction of  
412 T/P4 and E2/P4 ratios, triggers a restructuring process of prostate gland morphology.

413 In animals treated with progesterone and estradiol (CaPE group), the hypertrophy  
414 observed in prostatic epithelial cells of both sexes demonstrates that progesterone has a key  
415 role in glandular homeostasis, ensuring together with the androgens and estrogens, a natural  
416 process of epithelial and stromal structuring of prostate. At CaPE group the hormonal ratios  
417 showed the same pattern observed in CaP animals. The difference however lies in the fact  
418 that the CaPE group, besides presenting a significant increase in the levels of E2, also has a  
419 higher concentration of T, both hormones with admittedly anabolic effects in the prostate.  
420 The rise of lesions and epithelial dysplasia in this group is probably caused by the presence  
421 of a high amount of ER $\alpha$ -positive cells, insofar as this type of receptor is responsible for  
422 mediating the adverse effects of E2 (McPherson et al. 2008; Ellem and Risbridger 2009).  
423 Some papers revealed that E2 has a stimulatory role on PRs expression via ER $\alpha$  (Brenner et  
424 al. 1990; Ing and Tornesi 1997). On the other hand, in this study the prostate shows a  
425 differently behavior, since although the PR labeled cells are superior in the CaPE group  
426 compared to NC and CaC animals, we found no differences relative to the CaP animals.  
427 Such finding suggests that the use of P4 and E2 simultaneously diminishes the intensity of  
428 PR induction by E2 on the prostate gland.

429 The glandular hypertrophy observed in the gerbils of the CaPT group occurred  
430 mainly in the epithelial compartment, and can be explained by high levels of circulating T  
431 found in these animals. Because testosterone is essential both for the development and  
432 structural maintenance of the prostate gland, the occurrence of high serum levels of this  
433 hormone along with the AR cells increase in this group, provides a suitable physiological

434 environment for the glandular hypertrophy (Scarano et al. 2006; Prins and Putz 2008). In  
435 these animals, the T/E2 increased beyond that observed in control animals. This data  
436 indicates that when T levels are higher, independently of E2/P4 ratio, the prostate grows  
437 and develops. The reduction of ER $\alpha$  and PR cells in the male and female prostate of the  
438 CaPT group supports the evidence that T has a suppressor effect on this type of receptor  
439 (Yatkin et al. 2009). This effect can be added to the least amount of lesions found in this  
440 group compared to the others, since the ER $\alpha$  mediates the negative effects of E2.

441         The reduction of AR-positive cells in the castrated animals corroborates with  
442 literature showing that the AR is quite sensitive to serum testosterone variation (Oliveira et  
443 al., 2007; Campos et al., 2010; Da Silva et al., 2013). The administration of P4 and E2 plus  
444 P4 was enough to reverse the AR level to the normal state found in the NC, probably  
445 because both T and E2 increased in these groups. Another feature of P4 is its ability to  
446 produce androgenic products that can bind to ARs. Probably this has also been responsible  
447 for the AR expression increase observed mainly in prostatic stroma of the CaP group  
448 (Nishino et al. 2009). Administration of progesterone alone and concomitant with estradiol  
449 employed in this investigation, showed the importance of epithelium-stroma interaction in  
450 the prostate gland, since the treatment with these hormones improved the AR expression in  
451 stromal cells, allowing the recovering of the prostate morphology which was similar to that  
452 observed in controls animals (Cunha et al. 2002; Cunha 2008). The association between P4  
453 and T proved quite efficient in inducing the expression of AR, proving more intense than in  
454 all other studied groups. In addition, in CaPT, the ARs are expressed mainly in the  
455 epithelium, the same pattern found in NC animals (Omoto 2008).

456 In summary, these results show that the physiological interaction between the  
457 hormones progesterone, estrogen, and testosterone, is essential for the maintenance of the  
458 prostate morphophysiology in males and females, and that the female prostate has a  
459 response pattern very similar to the male prostate gland in relation to the main steroid  
460 hormones acting in the reproductive system. The fact that the T/E2 ratio did not change, but  
461 the E2/P4 ratio decrease and even then the prostatic gland becomes developed, indicates  
462 that P4 is a regulator of prostatic homeostasis. Through the data, it is reasonable to  
463 conclude that P4 has a bland anabolic role on both female and male prostate glands. Its  
464 interaction with the prostate gland leads to a secretory epithelium hypertrophy and  
465 hyperplasia, besides also influencing the AR and ER $\alpha$  expression pattern. The synergism  
466 between P4 and E2 in this work did not influence the expression pattern of PR. On the other  
467 hand, in animals treated with T and P4, there was a reduction and also a change in the PR  
468 pattern, being expressed mainly in the cytoplasm of secretory cells. Although the prostate  
469 morphology of CaPE, and CaPT groups presented similar features to the animals treated  
470 separately with T and E2 (Santos et al. 2006; Scarano et al. 2008; Biancardi et al. 2010),  
471 there was a decreased occurrence of dysplasia in the former groups. This fact is important  
472 because it shows that the P4 contributes substantially to the morphophysiological balance  
473 of the male ventral prostate and female prostate, probably regulating the action of the  
474 testosterone and estradiol on the gland.

475

#### 476 **ACKNOWLEDGMENTS**

477 This paper is part of the PhD Thesis of RAF from the Institute of Biology,  
478 UNICAMP and was supported by Grants from the Brazilian Agencies FAPESP – São

479 Paulo Research Foundation (Procs. No. 2008/11386-9) and CNPq – Brazilian National  
480 Research and Development Council (Procs. No. 301596/2011-5 research fellowship to  
481 S.R.T.). The authors wish to thank to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior for technical  
482 assistance, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory.  
483

484 **REFERENCES**

485

486 Andersen M.L. & Tufik S. (2006) Does male sexual behavior require progesterone? Brain  
487 Res. Rev. 51, 136-43.

488

489 Aron D.C., Finding J.W. & Tyrrell J.B. (2004) Glucocorticoids and adrenal androgens. In:  
490 F.S. Greenspan. Ed D.G. Gardner. Basic and Clinical Endocrinology, Lange Medical Books  
491 pp 362–411.

492

493 Bass R., Perry B., Langenstroer P., Thrasher J.B., Dennis K.L., Tawfik O. & Holzbeierlein  
494 J. (2009) Effects of short-term finasteride on apoptotic factors and androgen receptors in  
495 prostate cancer cells. J. Urol. 181, 615-9.

496

497 Biancardi M.F., Santos F.C., Madi-Ravazzi L., Góes R.M., Vilamaior P.S., Felisbino S.L.  
498 & Taboga S.R. (2010) Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female  
499 prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype.  
500 Anat. Rec. (Hoboken) 293, 2163-75.

501

502 Bonkhoff H., Fixemer T., Hunsicker I. & Remberger K. (2001) Progesterone receptor  
503 expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. Prostate 48 285-  
504 91.

505

506 Brenner R.M., West N.B. & McClellan M.C. (1990) Estrogen and progestin receptors in the  
507 reproductive tract of male and female primates. *Biol. Reprod.* 42, 11-9.

508

509 Brown T., Clark A. & MacLusky N. (1987) Regional sex differences in progesterone  
510 receptor induction in the rat hypothalamus: effects of various doses of estradiol benzoate. *J.*  
511 *Neurosci.* 7, 2529–2536.

512

513 Campos SG, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior  
514 PS, Góes RM, Taboga SR. (2010) Tissue changes in senescent gerbil prostate after  
515 hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol.*  
516 91(5):394-407.

517

518 Cooke G.M., Pothier F. & Murphy B.D. (1997) The effects of progesterone, 4,16-  
519 androstadien-3-one and MK-434 on the kinetics of pig testis microsomal testosterone-4-  
520 ene-5alpha-reductase activity. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 60, 353-9.

521

522 Cunha G.R. (2008) Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future.  
523 *Differentiation.* 76, 578-86.

524

525 Cunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S., Mee S., Bigsby R.M., Higgins S.J., Sugimura  
526 Y., The endocrinology and developmental biology of the prostate, *Endocrino.* 8 (1987)  
527 338–362.

528

529 Cunha G.R., Hayward S.W. & Wang Y.Z. (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the  
530 prostate. *Differentiation*. 70, 473–485.

531

532 Da Silva DA, Zanatelli M, Shinohara FZ, Góes RM, Dos Santos FC, Vilamaior PS, Taboga  
533 SR. (2013) Effects of exposure to estradiol and estradiol plus testosterone on the mongolian  
534 gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Microsc Res Tech*. 76(5):486-95.

535

536 DeKlerk D.P., Coffey D.S., Ewing L.L., McDermott I.R., Reiner W.G., Robinson C.H.,  
537 Scott W.W., Strandberg J.D., Talalay P., Walsh P.C., Wheaton L.G., Zirkin B.R. (1979)  
538 Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia, *J*.  
539 *Clin. Invest*. 64:842–849.

540

541 Dohler K. & Wuttke W. (1974) Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to  
542 puberty in female and male rats. *Endocrinology*. 94, 1003–1008.

543

544 Ellem S.J. & Risbridger G.P. (2009) The dual, opposing roles of estrogen in the prostate.  
545 *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1155, 174-86.

546

547 Fajer A.B., Holzbauer M. & Newport H.M. (1971) The contribution of the adrenal gland to  
548 the total amount of progesterone produced in the female rat. *J. Physiol*. 214, 115-26.

549



550 Flamini M.A., Barbeito C.G., Gimeno E.J. & Portiansky E.L. (2002) Morphological  
551 characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus*  
552 *maximus maximus*. *Ann. Anat.* 184, 341-345.  
553

554 Fochi R.A., Perez A.P., Bianchi C.V., Rochel S.S., Góes R.M., Vilamaior P.S., Taboga  
555 S.R. & Santos F.C. (2008) Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the  
556 Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene  
557 Paraurethral Glands). *Biol. Reprod.* 79:1084-91.  
558

559 G. Schneider, M.A. Kirschner, R. Berkowitz, N.H. Ertel, Increased estrogen production in  
560 obese men, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 48 (1979) 633-638.  
561

562 G.R. Cunha, W. Ricke, A. Thomson, P.C. Marker, G. Risbridger, S.W. Hayward, Y.Z.  
563 Wang, A.A. Donjacour, T. Kurita, Hormonal, cellular and molecular regulation of normal  
564 and neoplastic prostatic development, *J. Ster. Bioch. Molec. Biol.* 92 (2004) 221-236.  
565

566 Gann P.H., Hennekens C.H., J. Ma, Longcope C. & Stampfer M.J. (1996) Prospective study  
567 of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1118-26.  
568

569 Graham J.D. & Clarke C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues.  
570 *Endocr. Rev.* 18, 502-19.  
571

572 Ing N.H. & Tornesi M.B. (1997) Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone  
573 receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-15.  
574

575 Kurita T., Lee K.J., Cooke P.S., Taylor J.A., Lubahn D.B. & Cunha G.R. (2000) Paracrine  
576 regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive  
577 tract. *Biol. Reprod.* 62, 821-30.  
578

579 Lagrange A.H. & Kelly M.J. Neuroactive steroid. In: Henry H.L., Norman A.N. (Eds.),  
580 *Encyclopedia of Hormones*, vol. 3. Academic Press, pp. 8–22.  
581

582 Lessey B.A., Killam A.P., Metzger D.A., Haney A.F., Greene G.L. & McCarty Jr K.S.  
583 (1988) Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone  
584 receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 67, 334-40.  
585

586 Luetjens C.M., Didolkar A., Kliesch S., Paulus W., Jeibmann A., Böcker W., Nieschlag E.  
587 & Simoni M. (2006) Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-  
588 human primates and men. *J. Endocrinol.* 189, 529-39.  
589

590 Lydon J.P., DeMayo F.J., Funk C.R., Mani D., Hughes A.R., Montgomery Jr C.A.,  
591 Shyamala G., Conneely O.M. & O'Malley B.W. (1995) Mice lacking progesterone receptor  
592 exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.  
593

594 M. Oettel, A.K. Mukhopadhyay, Progesterone: the forgotten hormone in men?, *Aging Male*  
595 7 (2004) 236–57.

596

597 M.J. Droller, Medical approaches in the management of prostate disease, *Br. J. Urol.* 79  
598 (1997) 42–52.

599

600 McPherson S.J., Ellem S.J. & Risbridger GP. (2008) Estrogen-regulated development and  
601 differentiation of the prostate. *Differentiation.* 76, 660-70.

602

603 Mulac-Jericevic B. & Conneely O.M. (2004) Reproductive tissue-selective actions of  
604 progesterone receptors. *Reproduction.* 128, 139-46.

605

606 Murakami R., Shughrue P.J., Stumpf W.E., Elger W. & Schulze P.E. (1990) Distribution of  
607 progestin-binding cells in estrogen-treated and untreated neonatal mouse uterus and  
608 oviduct: autoradiographic study with [125I] progestin. *Histochemistry.* 94, 155-9.

609

610 Nishino T., Ishibashi K., Hirtreiter C. & Nishino Y. (2009) The prostate growth stimulation  
611 by progesterone is due to androgenic products and progesterone receptor-mediated  
612 mechanisms. *Pharmazie.* 64, 587-9.

613

614 Ohta Y., Sato T. & Iguchi T. (1993) Immunocytochemical localization of progesterone  
615 receptor in the reproductive tract of adult female rats. *Biol. Reprod.* 48, 205-13.

616

617 Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. (2007) Cellular and  
618 extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following  
619 different types of castration and the consequences of testosterone replacement. *Cell Biol*  
620 *Int.* 31(3):235-45.

621

622 Oliveira S.M., Santos F.C.A., Corradi L.S., Góes R.M, Vilamaior P.S. & S.R. Taboga.  
623 (2011) Microscopic evaluation of proliferative disorders in the gerbil female prostate:  
624 evidence of aging and the influence of multiple pregnancies. *Micron.* 42, 712-7.

625

626 Omoto Y. (2008) Estrogen receptor-alpha signaling in growth of the ventral prostate:  
627 comparison of neonatal growth and postcastration regrowth. *Endocrinology.* 149, 4421-7.

628

629 Parczyk K., Madjno R., Michna H., Nishino Y. & Schneider M.R. (1997) Progesterone  
630 receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol.*  
631 *Biol.* 63, 309-16.

632

633 Pelletier G., Li S., Luu-The V., Tremblay Y., Bélanger A. & Labrie F. (2001)  
634 Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome  
635 P450<sub>sc</sub>, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450<sub>c17</sub>) in rat adrenal cortex  
636 and gonads. *Journal of Endocrinology.* 171, 373–383.

637

638 Prins G.S. & O. Putz. (2008) Molecular signaling pathways that regulate prostate gland  
639 development. *Differentiation.* 6, 641-59.

640 Punyadeera C., Verboost P. & Groothuis P. (2003) Oestrogen and progestin responses in  
641 human endometrium. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 393-410.

642

643 Risbridger G.P., Wang H., Frydenberg M., Cunha G.R. (2001) The metaplastic effects of  
644 estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype.

645 *Endocrinology.* 142, 2443–2450.

646

647 Santos F.C., Custodio A.M., Campos S.G., Vilamaior P.S., Góes R.M. & Taboga S.R.  
648 (2008) Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones*  
649 *unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries. *Biol. Reprod.* 79, 674-85.

650

651 Santos F.C., Leite R.P., Custodio A.M., Carvalho K.P., Monteiro-Leal L.H., Santos A.B.,  
652 Goes R.M., Carvalho H.F. & Taboga S.R. (2006) Testosterone stimulates growth and  
653 secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol.*

654 *Reprod.* 75, 370-9.

655

656 Santos F.C., Rochel-Maia S.S., Fochi R.A., Justulin Jr L.A., Santos S.A., Vilamaior P.S.,  
657 Felisbino S.L., Góes R.M. & S.R. Taboga. (2011) MMP-2 and MMP-9 localization and  
658 activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 419-27.

659

660 Santos F.C.A. & Taboga S.R. (2006) Female prostate: a review about the biological  
661 repercussions of this gland in humans and rodents. *Animal Reprod.* 3, 3-18.

662

663 Santos F.C.A., Carvalho H.F., Góes R.M. & Taboga S.R. (2003) Structure, histochemistry  
664 and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*)  
665 female prostate. Tissue Cell. 35, 447–457.

666

667 Satterfield M.C., Hayashi K., Song G., Black S.G., Bazer F.W. & Spencer T. E. (2008)  
668 Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the  
669 ovine uterus. Biol. Reprod. 79, 1226-36.

670

671 Scarano W.R., de Sousa D.E., Campos S.G., Corradi L.S., Vilamaior P.S. & Taboga S.R.  
672 (2008) Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and  
673 histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. Int. J. Exp. Pathol.  
674 89, 25-37.

675

676 Scarano W.R., Vilamaior P.S. & Taboga S.R. (2006) Tissue evidence of the testosterone  
677 role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones*  
678 *unguiculatus*) prostate. Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol. 288, 1190-200.

679

680 Schacter L., Rozenzweig M., Canetta R., Kelley S., Nicaise C. & Smaldone L. (1989)  
681 Megestrol acetate: clinical experience. Cancer Treat. Rev. 16, 49-63.

682

683 Sisk C.L. & Meek L.R. (2001) Sexual and reproductive behaviors. Curr. Protoc. Neurosci.  
684 Chapter 8 Unit 8.2.

685

686 Thomson AA. (2001) Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic  
687 development. *Reproduction*. 121, 187-95.

688

689 Thomson A.A., Timms B.G., Barton L., Cunha G.R. & Grace O.C. (2002) The role of  
690 smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*. 129, 1905-1912.

691

692 Vermeulen A., Kaufman J.M., Goemaere S. & Van Pottelberg I. (2002) Estradiol in elderly  
693 men. *Aging Male*. 5, 98–102.

694

695 Wang J., Eltoun I.E. & Lamartiniere C.A. (2007) Genistein chemoprevention of prostate  
696 cancer in TRAMP mice. *J. Carcinog*. 6, 3.

697

698 Weibel E.R. (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and  
699 others organs. *Lab. Invest*. 12, 131–155.

700

701 Yatkin E., Bernoulli J., Talvitie E.M. & Santti R. (2009) Inflammation and epithelial  
702 alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. *Int. J. Androl*. 32, 399-  
703 410.

704

705 Zaviacic M., Jakubovská V., Belešovic J. & Breza J. (2000) Ultrastructure of the normal  
706 adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat. Embryol*. 201, 51-61.

707

708

709 **CAPTIONS**

710

711 **Figure 1.** Schematic representation of the experimental groups employed in the study.

712 \*[NC]= intact animals treated with Mineral oil (Nujol®) - 1 mg/Kg/ every 48 hours;

713 \*[CaC] = castrated animals treated with Mineral oil (Nujol®) - 1 mg/Kg/ every 48 hours;

714 \*[CaP] = castrated animals treated with Progesterone (Sigma-aldrich) - 1 mg/Kg/ every 48

715 hours; \*[CaPE] = castrated animals treated with Progesterone + Estrogen ( $\beta$ -estradiol 3-

716 benzoato; Sigma-aldrich) – 1 mg/Kg/ every 48 hours; \*[CaPT] = castrated animals treated

717 with Progesterone + Testosterone (Testosterone Cypionate – Deposteron/Sigma-Pharma) 1

718 mg/kg/ every 48 hours.

719

720 **Figure 2.** Histological sections of the prostatic gland in the different experimental groups,

721 stained with hematoxylin & eosin. Note the greater luminal amplitude of the prostatic

722 alveoli in non-castrated animals (**a** and **k**) compared to castrated animals, which have cell

723 bodies within the lumen (**b** and **l**). (**g** and **q**) detail of prostatic epithelium and stroma,

724 showing the atrophy of epithelial cells and also muscle layer disorganization in females

725 with significant reduction in males. Notice the size recovery of the epithelial cells in the

726 prostatic alveoli of progesterone-treated animals (**h** and **r**) in relation to castrated animals

727 and the presence of ciliated secretory cells (**m**). In the CaPE animals, the luminal

728 compartment recovery is evident (**d**, **n**), as well as prostatic stroma and epithelium (**i** and **s**).

729 In the CaPT group, larger alveoli containing high secretory cells and structured muscle

730 stroma (**e**, **j**, **o**, **t**) can also be observed. *Al*: prostatic alveolus; *SMC*: smooth muscle cell;

731 *Ep*: epithelium; *L*: lumen; *S*: stroma; *Arrow*: muscular cell with irregular morphology and



732 subepithelial connective stroma; *Ur*: muscle of urethra. (**a-e**; **k-o**: aumento de 100x); (**f-j**;  
733 **p-t**: 1000x magnification).

734

735 **Figure 3.** Histological sections of gerbil prostate in CaC, CaP, CaPE, and CaPT groups. (**a**  
736 and **c**): castrated animals; (**b, d, e, f, g, h**): animals treated with progesterone. It is possible  
737 to observe in detail that the folding alveolar epithelium occurred in CaC animals, along  
738 with the presence of an irregular basal layer and smooth muscle cells with differentiated  
739 phenotype. The progesterone replacement triggers the formation of epithelial detachment  
740 and the occurrence of PIN (**b, d, e, g**). In addition, there is the development of ciliated  
741 secretory cells (**f**) and differentiated phenotype (**h**). In CaPE animals, cellular debris in the  
742 lumen and also frequent PINs (**i, j, k, l**) are observed. In the CaPT group, besides PINs,  
743 there are inflammatory cells both into the lumen and stroma (**m, n, o, p**). *SMC*: smooth  
744 muscle cell; *Ep*: epithelium; *L*: lumen; *S*: stroma; *PIN*: prostatic intraepithelial neoplasia;  
745 *Arrow*: muscular cell with irregular morphology and subepithelial connective stroma;  
746 *Curve Arrow*: ciliated secretory cell; *Large Arrow*: epithelial folding; *Arrowhead*:  
747 detachment of the epithelium. *Double Arrowhead*: Secretory cells with a differentiated  
748 phenotype; *Star*: stroma inflammation; \*: lumen inflammatory cells.

749

750 **Figure 4.** Prostate of adult gerbils submitted to anti-AR immunolabeling. Counterstain:  
751 Harris Hematoxylin. It is possible to observe a significant stain decrease in castrated  
752 animals, an increase in prostatic stroma of the CaP and CaPE animals group and its greater  
753 intensity in the prostatic epithelium of the CaPT group. *Ep*: alveolar epithelium; *L*: alveolar

754 lumen; *S*: Prostate stroma; *Arrow-head*: positive epithelial cells; *Arrow*: positive stromal  
755 cells.

756 **Figure 5.** Male and female prostate glands subjected to estrogen receptor (ER $\alpha$ )  
757 immunolabeling. Counterstain: Harris Hematoxylin. There were no ER $\alpha$ -positive cells in  
758 glandular epithelium. In the progesterone-treated and CaPE groups, there was an increase in  
759 these cells in the prostatic stroma. When progesterone and testosterone were administrated  
760 together, ER $\alpha$  was decreased in male prostate but in female it was not changed. *Ep*:  
761 alveolar epithelium; *L*: alveolar lumen; *S*: Prostate stroma; *Arrowhead*: stromal positive  
762 cells.

763

764 **Figure 6.** Histological sections immunolabelled for progesterone receptor (PR). There were  
765 no PR-positive cells in the NC and CaC animals group. The replacement of progesterone  
766 associated with estrogen triggered the rise of PR-positive cells, mainly in the stroma. In  
767 CaPT animals, only a few cells in the stroma and an intense cytoplasmic stain in secretory  
768 cells was observed. Insets correspond to male and female negative control for  
769 immunohistochemistry. *Ep*: alveolar epithelium; *L*: alveolar lumen; *S*: Prostate stroma;  
770 *Arrow*: positive basal cells; *Arrowhead*: positive stromal cells.

Table I. Quantitative parameters related to male and female prostate glands (Mean  $\pm$  SD).

PARAMETERS	GENDER	EXPERIMENTAL GROUPS				
		NC	CaC	CaP	CaPE	CaPT
Body weight (g)	Male	67.17 $\pm$ 2.64	63.50 $\pm$ 5.92	67.17 $\pm$ 1.47	67.17 $\pm$ 3.37	61.33 $\pm$ 7.23
	Female	58.80 $\pm$ 1.64	56.00 $\pm$ 4.24	58.00 $\pm$ 3.16	62.40 $\pm$ 2.30	56.00 $\pm$ 5.83
Prostatic weight (g)	Male	0.53 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.038 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>	0.031 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.056 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.135 $\pm$ 0.015 <sup>c</sup>
	Female	0.10 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.017 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.016 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.027 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.025 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
Relative weight (g/g)	Male	0.008 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.0005 $\pm$ 0.00003 <sup>b</sup>	0.0004 $\pm$ 0.00005 <sup>b</sup>	0.0008 $\pm$ 0.0001 <sup>b</sup>	0.0022 $\pm$ 0.0002 <sup>c</sup>
	Female	0.002 $\pm$ 0.0009 <sup>a</sup>	0.0003 $\pm$ 0.0001 <sup>b</sup>	0.0003 $\pm$ 0.00003 <sup>b</sup>	0.0005 $\pm$ 0.0001 <sup>b</sup>	0.0005 $\pm$ 0.00006 <sup>b</sup>
<b>STEREOLOGY (%)</b>						
Epithelium	Male	42.74 $\pm$ 2.37 <sup>a</sup>	26.62 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	34.46 $\pm$ 1.43 <sup>c</sup>	41.51 $\pm$ 2.03 <sup>ac</sup>	39.23 $\pm$ 1.96 <sup>ac</sup>
	Female	27.18 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	27.21 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	27.85 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	35.53 $\pm$ 1.83 <sup>b</sup>	39.49 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>
Lumen	Male	29.56 $\pm$ 3.19 <sup>a</sup>	13.62 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	12.46 $\pm$ 2.34 <sup>b</sup>	24.69 $\pm$ 2.90 <sup>ca</sup>	20.08 $\pm$ 2.27 <sup>ab,c</sup>
	Female	18.59 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	13.21 $\pm$ 1.92 <sup>b</sup>	21.69 $\pm$ 1.49 <sup>ac</sup>	20.56 $\pm$ 2.29 <sup>ac</sup>	20.23 $\pm$ 1.40 <sup>ac</sup>
Muscular stroma	Male	16.97 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	25.534 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	24.43 $\pm$ 1.14 <sup>b</sup>	19.41 $\pm$ 1.34 <sup>ca</sup>	24.13 $\pm$ 1.47 <sup>cb</sup>
	Female	23.87 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	23.69 $\pm$ 1.04 <sup>ac</sup>	23.69 $\pm$ 0.67 <sup>ac</sup>	21.1 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	25.82 $\pm$ 1.19 <sup>c</sup>
Non-muscular	Male	10.72 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	34.23 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>	28.64 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>	14.38 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>	16.56 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>
	Female	30.36 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	34.26 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>	26.77 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>	23.00 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>	23.43 $\pm$ 2.67 <sup>b</sup>
<b>MORPHOMETRY (<math>\mu</math>m)</b>						
Epithelium	Male	19.6 $\pm$ 3.26 <sup>a</sup>	11.79 $\pm$ 3.98 <sup>b</sup>	14.62 $\pm$ 2.74 <sup>c</sup>	24.86 $\pm$ 4.17 <sup>d</sup>	20.28 $\pm$ 4.53 <sup>a</sup>
	Female	13.92 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup>	11.91 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	13.75 $\pm$ 2.92 <sup>a</sup>	17.49 $\pm$ 5.13 <sup>c</sup>	27.14 $\pm$ 6.65 <sup>d</sup>
Muscular stroma	Male	14.11 $\pm$ 4.79 <sup>a</sup>	9.65 $\pm$ 3.17 <sup>b</sup>	10.83 $\pm$ 3.84 <sup>c</sup>	17.46 $\pm$ 5.49 <sup>d</sup>	15.04 $\pm$ 3.68 <sup>a</sup>
	Female	11.85 $\pm$ 2.90 <sup>a</sup>	11.07 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	13.64 $\pm$ 3.14 <sup>b</sup>	18.45 $\pm$ 3.68 <sup>c</sup>	14.53 $\pm$ 5.09 <sup>b</sup>

The superscript letters (a,b,c) correspond to the statistical differences between experimental groups.

Table II. Serum hormone dosage of experimental groups (Mean  $\pm$  S.D.).

Sex	Hormones	Groups				
		NC	CaC	CaP	CaPE	CaPT
Male	Testosterone (ng/ml)	2.13 $\pm$ 0.287 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.04 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.018 <sup>c</sup>	8.59 $\pm$ 1.352 <sup>d</sup>
	Estradiol (pg/ml)	23.16 $\pm$ 4.224 <sup>a</sup>	16.68 $\pm$ 3.522 <sup>a</sup>	19.10 $\pm$ 4.104 <sup>a</sup>	119.06 $\pm$ 31.212 <sup>b</sup>	22.98 $\pm$ 2.722 <sup>a</sup>
	Progesterone (ng/ml)	0.48 $\pm$ 0.094 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.041 <sup>b</sup>	9.96 $\pm$ 0.512 <sup>c</sup>	11.56 $\pm$ 0.461 <sup>d</sup>	2.32 $\pm$ 0.530 <sup>e</sup>
Female	Testosterone (ng/ml)	0.42 $\pm$ 0.192 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.063 <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.091 <sup>c</sup>	7.33 $\pm$ 1.661 <sup>d</sup>
	Estradiol (pg/ml)	34.36 $\pm$ 7.080 <sup>a</sup>	16.28 $\pm$ 2.041 <sup>b</sup>	25.20 $\pm$ 4.113 <sup>a</sup>	124.58 $\pm$ 18.810 <sup>c</sup>	21.12 $\pm$ 3.421 <sup>a</sup>
	Progesterone (ng/ml)	6.68 $\pm$ 5.093 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.110 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 2.930 <sup>a</sup>	20.62 $\pm$ 4.830 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.462 <sup>c</sup>
Male	<b>Hormonal Ratios</b>					
	T/E2	103.89 $\pm$ 22.912 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.567 <sup>b</sup>	1.73 $\pm$ 0.328 <sup>b</sup>	1.79 $\pm$ 0.435 <sup>b</sup>	417.41 $\pm$ 107.480 <sup>c</sup>
	T/P4	5.281 $\pm$ 1.248 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.006 <sup>c</sup>	0.01 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	5.19 $\pm$ 1.880 <sup>a</sup>
Female	E2/P4	0.05 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
	T/E2	14.80 $\pm$ 4.394 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.570 <sup>b</sup>	4.34 $\pm$ 3.084 <sup>b</sup>	1.92 $\pm$ 0.329 <sup>b</sup>	569.43 $\pm$ 106.542 <sup>c</sup>
	T/P4	0.08 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	0.005 $\pm$ 0.0003 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.006 <sup>c</sup>	5.95 $\pm$ 1.161 <sup>d</sup>
	E2/P4	0.01 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	0.001 $\pm$ 0.0002 <sup>b</sup>	0.008 $\pm$ 0.0004 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.003 <sup>b,a</sup>

The superscript letters (a,b,c) correspond to the statistical differences between experimental

Table III. Relative frequency values of androgen and estrogen receptors in the prostate gland (Mean  $\pm$  S.D.).

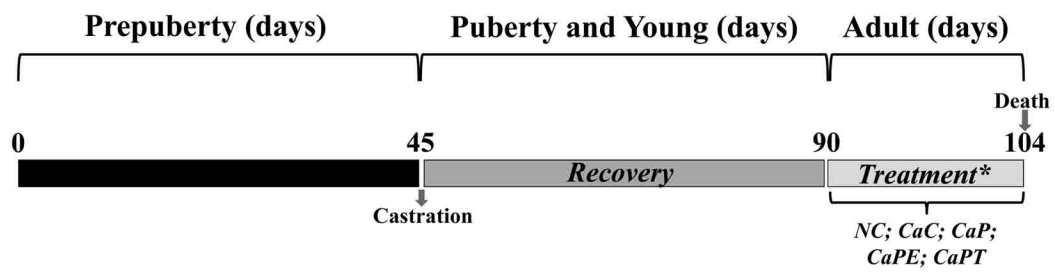
Groups	AR-positive cells frequency (%)		ER $\alpha$ -positive cells frequency (%)	
	Male	Female	Male	Female
NC	33.18 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	38.38 $\pm$ 5.68 <sup>a</sup>	4.28 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>
CaC	9.65 $\pm$ 4.07 <sup>b</sup>	10.00 $\pm$ 2.55 <sup>b</sup>	9.16 $\pm$ 0.58 <sup>b,a</sup>	7.01 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>
CaP	27.45 $\pm$ 5.66 <sup>a</sup>	31.77 $\pm$ 8.93 <sup>a</sup>	15.82 $\pm$ 1.54 <sup>c</sup>	31.49 $\pm$ 4.08 <sup>b</sup>
CaPE	28.03 $\pm$ 3.25 <sup>a</sup>	35.240 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	18.01 $\pm$ 1.70 <sup>c</sup>	23.11 $\pm$ 2.06 <sup>b</sup>
CaPT	43.69 $\pm$ 2.60 <sup>c</sup>	44.80 $\pm$ 2.93 <sup>c</sup>	2.48 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	10.32 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>

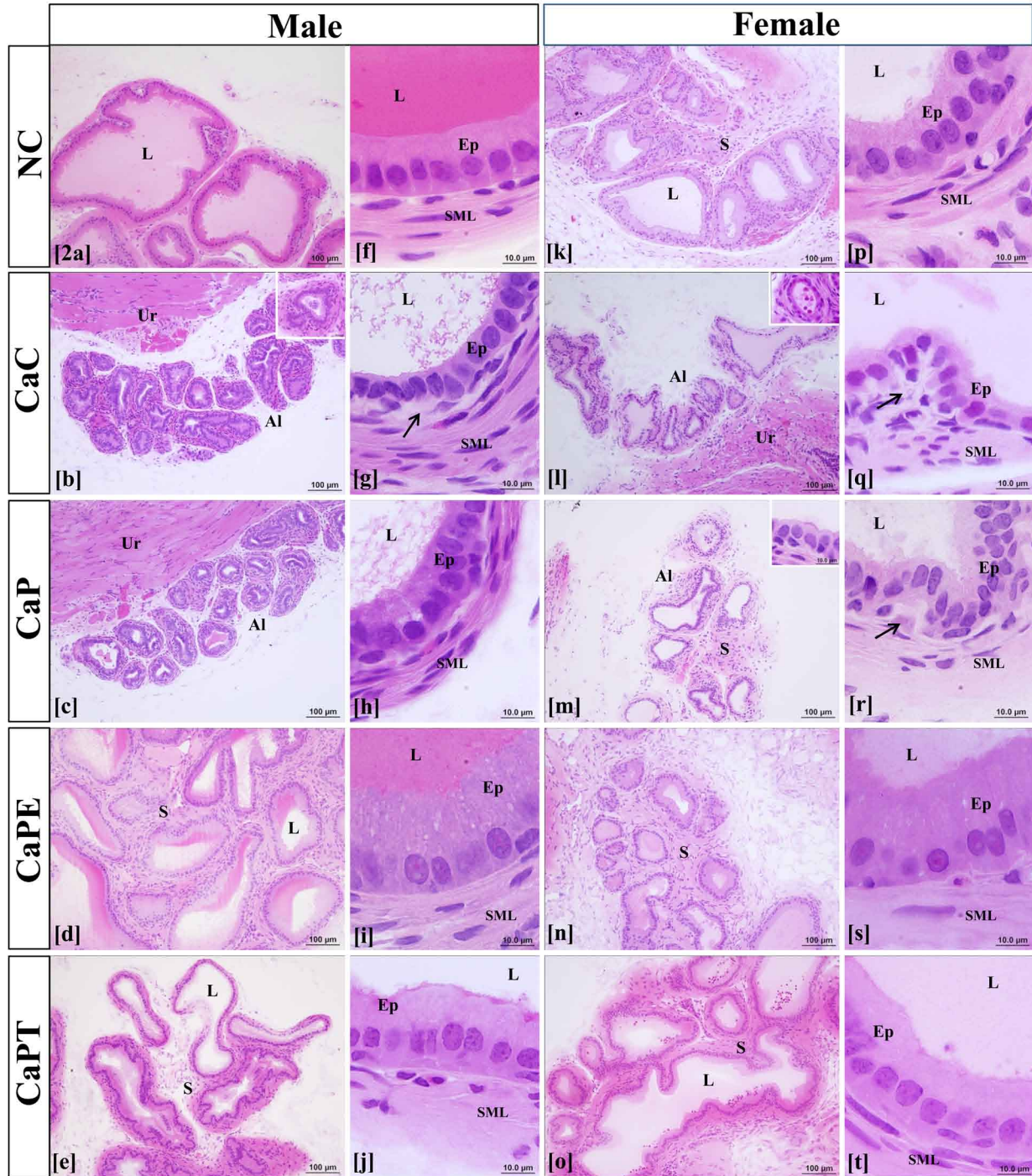
*The superscript letters (a,b,c) correspond to the statistical differences between experimental groups.*

Table IV. Semi-quantitative evaluation of progesterone receptor immunohistochemistry among different experimental groups.

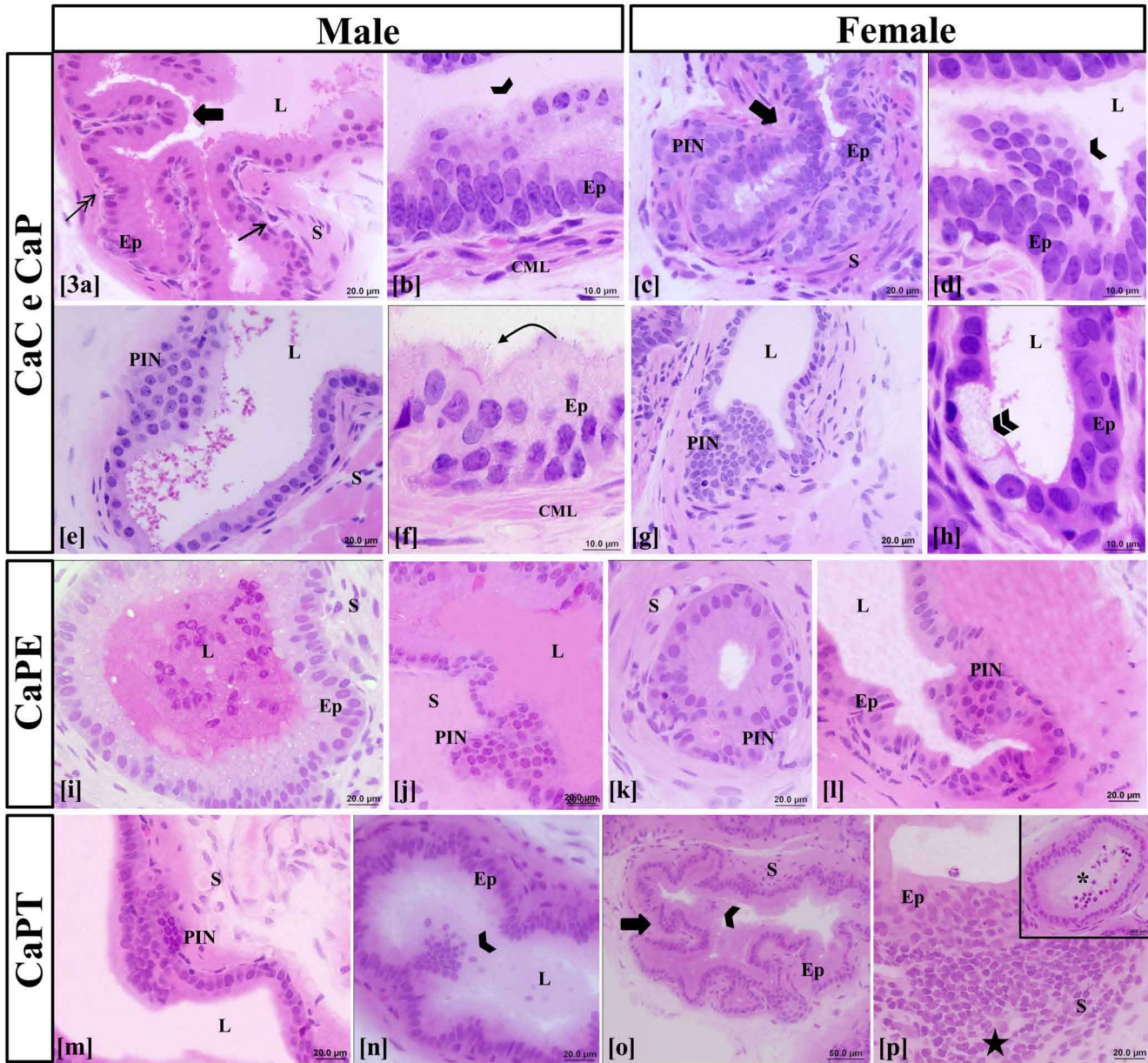
Groups	PR-positive cells intensity (%)	
	Male	Female
NC	0	0
CaC	0	0
CaP	+2	+2
CaPE	+2	+2
CaPT	+1	+1

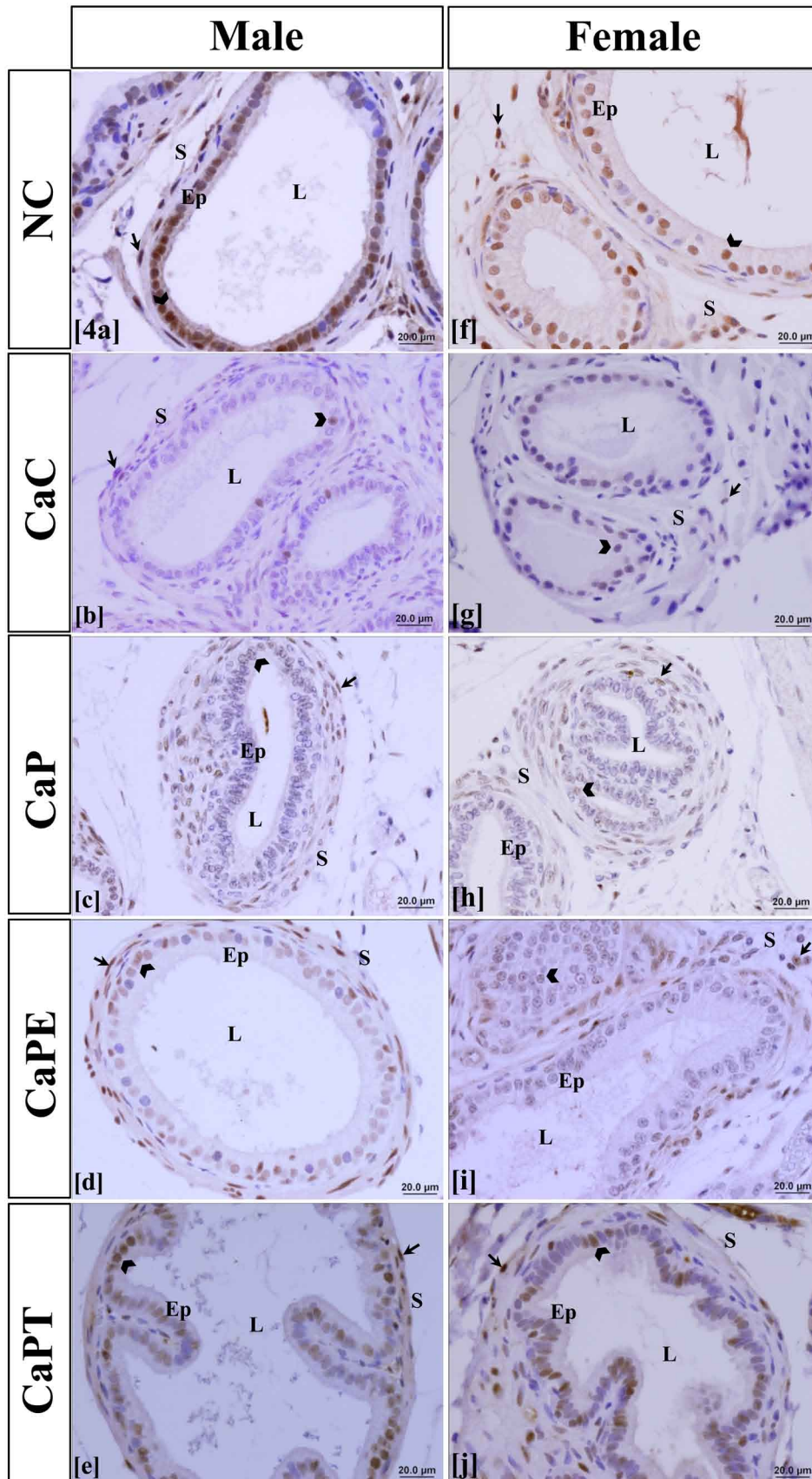
*PR nuclear intensity was graded on a score of 0 to 3+ according Bass et al.(2009), where (1+) to fewer than 10% of epithelial and stromal PR positive nuclei, (2+) from 10% to 50% of epithelial and stromal PR positive nuclei and (3+) to more than 50% epithelial and stromal PR positive nuclei.*

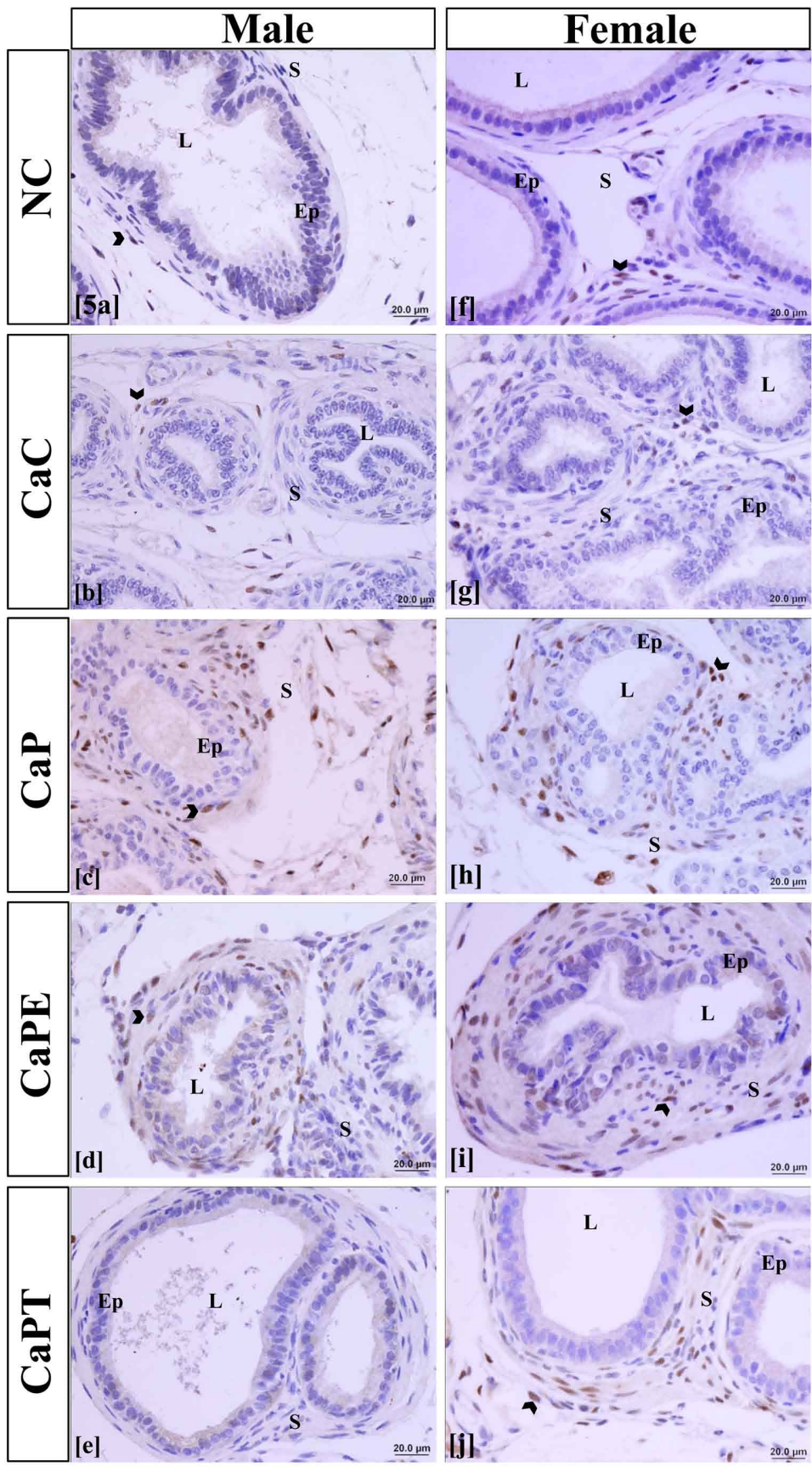


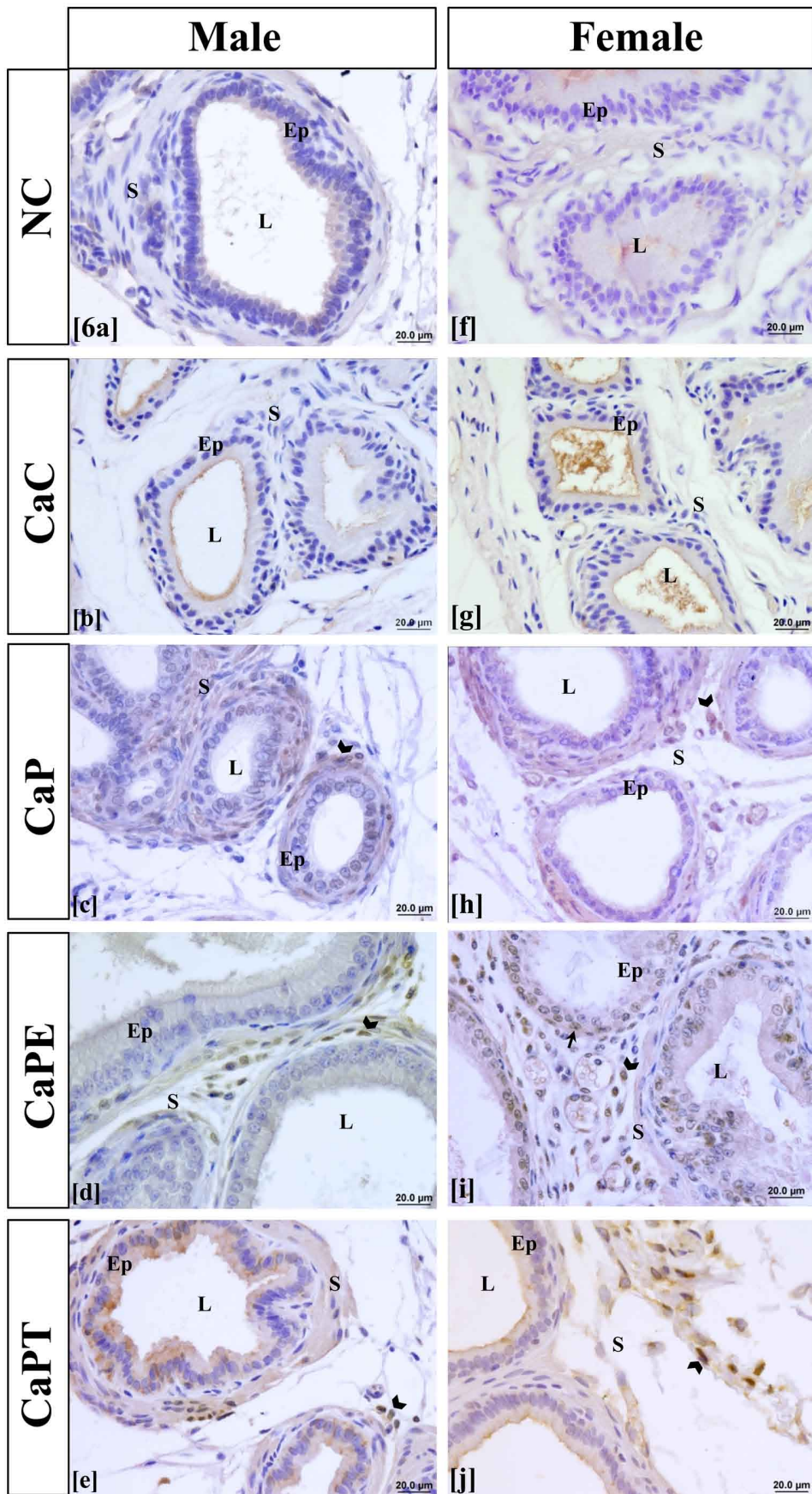












**PADRÕES DE SECREÇÃO E CINÉTICA DO EPITÉLIO PROSTÁTICO DE FÊMEAS DE GERBILOS (*Meriones Unguiculatus*) SOB INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA**

R. A. Fochi<sup>1</sup>, F. C. A. Santos<sup>2</sup>, S. R. Taboga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc N.º 08/11386-9).

\*Endereço para correspondência:

Sebastião R. Taboga, Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel +55-17-32212386; Fax: +55-17-32212390

## RESUMO

No organismo feminino, embora se tenha pouco conhecimento quanto à função da glândula prostática (glândula parauretral de Skene), sabe-se que ela é funcional e que pode apresentar o mesmo padrão de resposta aos hormônios esteróides atuantes no sistema reprodutor masculino. Os andrógenos, como a testosterona (T) e a dihidrotestosterona (DHT), são uns dos principais hormônios envolvidos na regulação e manutenção do epitélio secretor prostático. O estradiol (E2), através do seu receptor beta (ER $\beta$ ), é um importante modulador dos efeitos androgênicos sobre a próstata, controlando a proliferação celular e regulando a apoptose. No sistema reprodutor feminino a progesterona (P4) é responsável, dentre outras funções, pela manutenção do útero gravídico, garantindo ao endométrio uma maior atividade secretora, além de regular os processos de morte celular programada. Dessa forma, através deste estudo foram analisadas as consequências da reposição de P4, associada ou não à E2 e T, após castração cirúrgica sobre a glândula prostática feminina de gerbilos da Mongólia. Fêmeas de gerbilos foram castradas aos 45 dias de idade e ao completarem 90 dias receberam doses subcutâneas de P4, P4+E2 e P4+T por 14 dias. A castração cirúrgica desencadeou uma redução da atividade secretora e também do ER $\beta$ , a qual foi restituída após a administração de P4. Essa característica foi mantida nos animais tratados com E2 e P4, havendo um aumento na quantidade de células ER $\beta$ , apoptose e proliferação celular. A reposição de T+P4 não resultou em acréscimos expressivos na atividade secretora da glândula, acompanhado de uma redução de células ER $\beta$  e aumento da apoptose. Esses dados mostram que a próstata feminina é suscetível à ação da P4, e que a interação desse hormônio com a testosterona e estrógeno possui um caráter protetor, equilibrando a proliferação e morte celular, além de regular a ativação dos ER $\beta$  prostáticos.

## INTRODUÇÃO

A existência de uma estrutura análoga à glândula prostática no sistema reprodutor feminino em humanos e roedores, embora ainda pouco conhecida, é compartilhada por vários estudos na literatura (Zaviacic, 1999; Satoh et al., 2001; Flamini et al., 2002; Santos et al., 2003; Wimpissinger et al., 2007). Essa estrutura, ainda subestimada, é mais conhecida como glândula parauretral de Skene, cuja nomeação decorre da descrição por Alexander Skene, na qual concluiu se tratar de uma estrutura rudimentar e não funcional (Skene, 1880). Sabe-se atualmente, entretanto que essa conclusão é errônea, uma vez que estudos recentes confirmaram que essa glândula possui capacidade secretora semelhante à próstata masculina, deixando claro que o uso do termo “próstata” para essa estrutura é fundamentado (Zaviacic, 1993; Zaviacic e Ablin, 2000; Zaviacic et al., 2000b). Santos e colaboradores (2003) descreveram a morfologia dessa glândula em fêmeas de gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), mostrando ser bastante semelhante à de mulheres.

O fato das descobertas sobre a próstata feminina serem recentes, ainda pouco se sabe a respeito da sua fisiologia. O organismo feminino está sujeito à oscilações naturais decorrentes do ciclo reprodutivo, o que promove mudanças importantes em diversos órgãos do seu sistema reprodutor (Nishino e Totsukawa, 1996; Rehm et al., 2007). Os ciclos de crescimento e regressão pelas quais os diferentes órgãos do sistema reprodutor feminino atravessam são mediados pela interação que os hormônios testosterona (T), estradiol (E2) e progesterone (P4), têm sobre os processos de proliferação e apoptose (Hopwood e Levison, 1976; Sandow et al., 1979). No epitélio uterino, por exemplo, a P4 contrapõe-se aos efeitos do E2, inibindo a proliferação celular, podendo também reduzir os índices de apoptose ou mesmo não apresentar qualquer efeito regulatório sobre esse fenômeno (Martin et al., 1970; Terada et al., 1989; Slayden et al., 1993; Saegusa e Okayasu, 1998). A mama é outro órgão do trato reprodutor feminino bastante influenciado pelo ciclo reprodutivo. Nessa estrutura, os efeitos da P4 sobre a dinâmica epitelial ainda é controverso, uma vez que ela pode estimular, reduzir ou não apresentar qualquer efeito sobre a atividade mitótica e apoptose (Foidart et al., 1998).

Atualmente, sabe-se que essas mesmas variações hormonais são refletidas também na morfologia da próstata feminina, mostrando que essa glândula é responsiva aos

hormônios esteroides reguladores do ciclo reprodutivo (Fochi et al., 2008; Santos et al., 2011). A próstata feminina parece ser regulada principalmente pela interação entre o E2 e a P4, enquanto a T permanece praticamente constante ao longo do ciclo reprodutivo. Em relação aos efeitos da T sobre a próstata feminina sabe-se que, assim como na glândula masculina, esse hormônio é um forte indutor de proliferação e diferenciação, principalmente do compartimento epitelial (Santos et al., 2006). Ademais, a interação entre a T e o E2 parece ser também um fator importante para a homeostasia da próstata feminina, na medida em que o desequilíbrio entre esses dois hormônios durante a senescência leva a instalação de diversas lesões (Custódio et al., 2008).

Ainda que não se saiba em detalhes quais os efeitos da P4 sobre a próstata, a presença de receptores de progesterona (PR) nessa glândula tem sido fortemente associada à presença de lesões, como hiperplasia prostática benigna (BHP) e neoplasias (Hiramatsu et al., 1996; Gallardo et al., 2007). Essa relação, entretanto, parece ser explicada pela indução de promotores específicos no gene do PR por receptores de estrógeno alpha ( $ER\alpha$ ) ligados ao E2, uma vez que o  $ER\alpha$  está ligado aos efeitos danosos do E2 sobre a glândula prostática (Kastner et al., 1990). Além desse receptor, o estrógeno também possui outra forma, codificado por um gene diferente, chamado de receptor de estrógeno beta ( $ER\beta$ ), cuja distribuição é distinta em relação ao  $ER\alpha$  (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1997). Esse segundo receptor é expresso predominante na próstata adulta, sendo a relação  $ER\alpha/ER\beta$  muito importante para a homeostasia prostática. Diversos estudos têm confirmado que o  $ER\beta$  é responsável pela ação benéfica do estrógeno sobre a glândula prostática, auxiliando na diferenciação glandular e possuindo características antiproliferativas, controlando a estimulação androgênica sobre o crescimento glandular (Imamov et al., 2004; Risbridger et al., 2007).

O fato de a próstata feminina ser responsiva à administração de T exógena e drogas antiestrogênicas, além da confirmação da presença de ARs e ERs nessa glândula mostra que ela é funcional e que está sujeita potencialmente às mesmas patologias comuns a próstata masculina. A contribuição da P4 nesse sistema de controle hormonal sobre a glândula prostática ainda é pouco conhecida. A presença de PRs na próstata indica que esse hormônio possui realmente algum papel ainda não esclarecido sobre a glândula. Desta



forma, esse trabalho visa avaliar o comportamento da próstata feminina quanto à proliferação, morte celular, padrão de secreção e de expressão do ER $\beta$ , frente à administração exógena e P4, associada ou não à T e E2.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais*

Trinta e duas fêmeas de gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), com idades de 45 dias, foram submetidos à castração cirúrgica através de ovariectomia bilateral. Após a castração foram devolvidos ao biotério onde permaneceram por mais 45 dias. Esses animais ao completarem 90 dias de idade foram separados em 4 grupos. Cada grupo passou por um tratamento específico durante 14 dias, conforme mostrado na figura 1, recebendo doses subcutâneas de diferentes hormônios na concentração de 0,07 mg/aplicação (0,1 ml/aplicação/animal/48 horas). As fêmeas do grupo controle (n = 8), com 90 dias de idade, receberam doses subcutâneas de óleo mineral (Nujol®), durante 14 dias, a um volume de 0,1 ml/aplicação/animal/48 horas. Todos os procedimentos de manuseio dos animais foram realizados durante o período da manhã (entre 8 e 10 horas).

Todos os animais após os 14 dias de tratamento (104 dias de idade) foram mortos por decapitação, após anestesia em CO<sub>2</sub>, e o sangue coletado pelo rompimento dos vasos cervicais. Os complexos prostáticos das fêmeas foram removidos, pesados e imediatamente processados para microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

Os animais empregados neste estudo foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE / UNESP – campus de São José do Rio Preto. As condições exigidas pelas normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UNESP e do CEEA (Protocolo nº. 002/09) foram respeitadas, mantendo os animais sob luminosidade (ciclos de 12h claro e 12h escuro) e temperatura adequadas ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) assim como alimentação e água *ad libitum*.

### *Dosagens hormonais séricas*

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3.000 rpm, sendo o soro separado e congelado (-20°C), para exames posteriores. As análises das concentrações séricas de testosterona, estradiol e progesterona foram realizadas em duplicata utilizando-se aparelho automatizado (VITROS ECI-Johnson & Johnson de Análise Quimioluminescente Ultra-sensível) em laboratório de análises clínicas de referência.

### *Análises Histoquímicas e Ultra-estruturais*

Parte dos tecidos prostáticos foram fixados durante 24h por imersão em solução Karnovsky (4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e embebidos em resina de glicol metacrilato (Historesin embedding kit; Leica, Nussloch, Alemanha), para análises histoquímicas. Outra parte foi fixada em paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4) e embebidos em parafina (Histosec; Merck Darmstadt, Alemanha), para análises imunohistoquímicas.

Alguns dos fragmentos prostáticos foram fixados em glutaraldeído 3% diluído em tampão Millonig pH 7,3 contendo ácido tânico 0,25%, durante 24 horas. Após lavagem em tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em resina Araldite (Cotta-Pereira et al., 1976). As telas de cobre contendo os cortes ultrafinos foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 2%, lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% e lavadas novamente. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO-Zeiss 906 (Leo-Zeiss, Cambridge, UK).

### *Análise Cariométrica*

Para a coleta dos dados cariométricos foram realizadas medidas de área e perímetro em um total de 200 núcleos de células epiteliais secretoras. Para isso foram utilizados 5 campos histológicos coletados em 5 lâminas diferentes por animais (5 campos/5 lâminas/cada animal/cada grupo). Todas as medidas foram obtidas em lâminas coradas pela

técnica da hematoxilina-eosina em Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus 6.0 (Copyright© 1993-2006 Média Cybernetics, Inc.).

#### *Deteção de células proliferativas e apoptóticas*

Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão TRIS-EDTA pH 9.0 a 100°C. O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol, durante 15 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, Mouse monoclonal IgG PC10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti caspase-3 ativada (Abcam, Rabbit polyclonal IgG, ab13847, Cambridge, UK), e receptor de estrógeno (ERβ, Rabbit polyclonal IgG H-150, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) à uma diluição de 1:100, overnight a 4°C. Após serem lavadas em PBS e incubadas com polímero EnVision™ + Dual Link System-HRP (Dako; Denmark, Carpinteria, CA, USA) por 45 minutos, as imunomarcações foram reveladas pela reação com a diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram contracolorados pela hematoxilina de Harris, desidratados e montados em bálsamo do Canadá. Controles negativos foram obtidos omitindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário. A quantificação foi realizada pela contagem de células marcadas e não marcadas (2000 células / grupo).

#### *Análise estatística*

Os dados obtidos pelas análises empregadas foram expressos pelas médias e seus erros padrões, sendo analisados inicialmente pela Análise de Variância (One-way ANOVA) e, posteriormente, pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis para comparações múltiplas com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), usando o programa Statistica 7.0 (Copyright©Statsoft, Inc. 1984-2004).

## RESULTADOS

### *Dosagens hormonais séricas*

A figura 2 demonstra os níveis hormonais séricos de T, E2 e P4 nos grupos estudados.

Como esperado as concentrações de testosterona no grupo CaC reduziram significativamente comparado com os animais intactos, permanecendo inalterado nos animais do grupo CaP e CaPE. No grupo CaPT entretanto, os níveis de testosterona tornaram-se expressivamente maiores quando comparados inclusive com o grupo CaC.

Os níveis séricos de E2 também reduziram após a castração. A administração de P4 e desse em conjunto com T levou a um aumento dos níveis de E2 até concentrações equiparáveis aos animais do CN. No grupo CaPE a elevação dos níveis de E2 foi extremamente considerável, sendo superior aos do CN.

O mesmo padrão observado para os outros hormônios avaliados foi encontrado para a P4 no grupo CaC. Com a administração de P4 no grupo CaP os níveis de progesterona aumentaram, se igualando aos do CN. No grupo CaPE os níveis de progesterona também se elevaram, porém não de maneira significativa. Através da administração de P4 e T a concentração de progesterona se tornou menor comparado com os grupos CN, CaP e CaPE.

### *Características Morfológicas*

Os dados referentes às quantificações cariométricas estão inseridas na Tabela I. Com a castração cirúrgica foi observado uma redução tanto da área quanto do perímetro nuclear, havendo também alterações na sua forma. Além disso, as células secretoras apresentaram uma redução da capacidade secretora glandular (Fig. 3a, b), uma pequena quantidade de secreção restrita à região apical do epitélio (Fig. 3c). A reposição de P4 no grupo CaP não promoveu alterações expressivas na área nuclear e no perímetro nuclear, mas proporcionou a retomada da sua atividade secretora, sendo evidenciada uma maior intensidade de secreção de caráter protéica no interior do lúmen (Fig. 3d). No grupo CaPE, a associação de E2 e P4 desencadeou um maior desenvolvimento do núcleo celular, aumentando a sua área e perímetro, desenvolvendo uma forma mais circular e nucléolos

mais evidentes, e a secreção tornou-se mais glicídica (Fig. 3e). Nos animais do grupo CaPT, a T e P4 mantiveram o crescimento nuclear observado no CaPE. Nesse mesmo grupo, embora exista uma intensidade de secreção maior que nos animais castrados, ela é inferior àquela observada nos animais do CaP e CaPE (Fig. 3f).

### ***Morfologia Ultraestrutural***

A próstata feminina dos animais pertencentes ao grupo CN possuem células secretoras características, apresentando uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma basal, e um proeminente complexo de Golgi e vesículas secretoras (Fig. 4a). O compartimento estromal é formado principalmente por células musculares lisas de aspecto uniforme e contrátil (Fig. 5a). As fibras elásticas são relativamente escassas enquanto as fibras de colágeno estão em maior quantidade e sempre dispostas na base do epitélio e entre as células musculares lisas (Fig. 5a).

Nas fêmeas ovariectomizadas a glândula é caracterizada pela presença de células luminiais baixas e núcleos irregulares (Fig. 4b). O citoplasma é eletrodenso e apresenta poucas organelas citoplasmáticas secretoras e algumas vesículas de secreção (Fig. 4b, Vs). As células basais se encontram em um estado de quiescência, evidenciando um núcleo com cromatina condensada e escassez de organelas secretoras (Fig. 4b, detalhe). O compartimento estromal sofreu remodelação, no qual foi encontrado células musculares mais delgadas com fenótipo contrátil, e uma grande quantidade de fibras de colágeno dispersas entre os feixes de células musculares lisas (Fig. 5b).

As glândulas prostáticas de fêmeas do grupo CaP são caracterizada por células epiteliais secretoras, compostas por um núcleo relativamente volumoso e citoplasma contendo algumas organelas secretoras (Fig. 4c). Pode ser observada no citoplasma basal a presença de retículo endoplasmático rugoso (Fig. 4c), enquanto no citoplasma apical é encontrado cisternas do Complexo de Golgi e inúmeras vesículas de secreção (Fig. 4c, detalhe). O compartimento estromal nesse grupo manteve as características do grupo castrado, no entanto as células musculares lisas se tornaram mais espessas (Fig. 5c).

No grupo CaPE, a próstata feminina apresentou células epiteliais hipertrofiadas com características tipicamente secretoras (Fig. 4d) , nas quais o retículo endoplasmático rugoso

está bem desenvolvido no citoplasma basal e cisternas do Golgi hipertrofiadas no citoplasma supranuclear (Fig. 4d). O estroma está formado por células musculares lisas regulares e uma menor quantidade de fibras de colágeno (Fig. 5d, e).

A castração seguida pela reposição de T e P4 desencadeou mudanças expressivas na próstata feminina do gerbilo. As células epiteliais secretoras tornaram-se mais desenvolvidas e com características marcadamente sintéticas (Fig. 4e). Uma grande quantidade de retículo endoplasmático foi observada no citoplasma basal (Fig. 4f), enquanto vastas cisternas de Golgi e seu sistema de vesículas foram observados no citoplasma apical (Fig. 4e). Ainda no citoplasma apical é possível observar uma grande quantidade de vesículas de secreção apresentando conteúdo tanto lipídico quanto glicoproteico (Fig. 4e). O compartimento estromal apresentou células musculares lisas ricas em organelas secretoras, associadas a uma pequena quantidade de fibras colágenas (Fig. f).

### ***Padrões dos ER $\beta$ , PCNA e Caspase-3***

A glândula prostática feminina mostrou uma imunoreatividade para o ER $\beta$  tanto citoplasmático quanto nuclear (Fig. 6a). Após a castração houve uma intensa redução de células ER $\beta$ -positivas no grupo CaC, podendo ser visto uma fraca marcação citoplasmática (Fig. 6b). Com a administração de P4, entretanto a marcação para esse receptor aumentou, assemelhando-se aos valores encontrados em animais do grupo CN (Tabela II; Fig. 6c). Outra característica importante desse grupo é a presença de uma discreta marcação para esse receptor também no estroma glandular (Fig. 6c, seta). No grupo CaPE a quantidade de células ER $\beta$ -positivas tornou-se maior que no grupo CaC, mas semelhante aos grupos CN e CaP (Tabela II; Fig. 6d). A administração de P4 e T reduziu a marcação para o ER $\beta$ , restringindo-se a uma expressão principalmente citoplasmática (Tabela II; Fig. 6e).

Quanto à proliferação celular, no grupo CaC não foram encontrados diferenças significativas (Tabela II; Fig. 7a, b). Em todos os grupos tratados com hormônios foi observado um maior índice de proliferação celular do que aquele encontrado no CN (Tabela II), não havendo, entretanto mudanças significativas pela administração de P4 pós-castração (Fig. 7c; Tabela II). Esse aumento foi expressivo principalmente no grupo tratado com P4 e E2, nos quais o índice de proliferação foi superior a todos os demais grupos (Fig.

7d). A administração de P4 e T no grupo CaPT desencadeou uma redução da proliferação em relação aos animais do grupo CaPE, permanecendo porém semelhante aos grupos CaC e CaP e superior ao CN (Fig. 7e; Tabela II).

A castração cirúrgica em nada alterou o índice apoptótico (Tabela II; Fig. 8a, b). A administração de P4 no grupo CaP também não desencadeou nenhuma alteração na apoptose (Tabela II; Fig. 8c). Em contrapartida, nos animais tratados com P4 e E2 foi observado um aumento expressivo da quantidade de células apoptóticas (Tabela II), principalmente no estroma muscular (Fig. 8d). Esse aumento também foi observado no grupo CaPT (Tabela II; Fig. 8e).

## **DISCUSSÃO**

Nossos resultados demonstraram que a castração cirúrgica prolongada não desencadeia alterações expressivas no que diz respeito à proliferação e apoptose celular na próstata feminina, havendo assim uma estabilização desses dois processos após um período de 45 dias, coincidindo com outros resultados da literatura (Banerjee et al., 1995; Lee et al., 1997; Kurita et al., 2001). Em relação ao ER $\beta$ , entretanto houve uma considerável redução da sua marcação após o período de castração. O fato da quantidade desse receptor aumentar nos animais tratados com P4 após a castração, sugere que esse hormônio, a concentrações de 0,07mg, possui um efeito indutor sobre o ER $\beta$ , promovendo a sua expressão inclusive no estroma glandular. As propriedades protetoras do ER $\beta$ , são bastante conhecidas, opondo-se as ações do ER $\alpha$  (Bardin et al., 2004; Risbridger et al., 2007). Esse efeito pode explicar o fato da aplicação de P4 não ter alterado os índices de proliferação celular dos animais CaP, enquanto a não alteração da quantidade de apoptose é consistente com as características inibitórias desse hormônio sobre a morte celular programada (Jo et al., 1993; Slayden et al., 1993; Rubin e Baserga, 1995).

A resposta do ER $\beta$  observada nos animais do grupo CaPE indica que a P4 possui um efeito sinérgico em relação ao E2 sobre esse receptor, na medida em que o tratamento isolado desse hormônio no grupo CaP também apresentou uma regulação positiva sobre o ER $\beta$ . O mais interessante é o fato de que nesse grupo tanto a proliferação quanto a apoptose aumentou expressivamente, mostrando que a P4, nas concentrações praticadas, não ofereça

resistência direta à proliferação celular mediada pelo E2. Contrapondo-se, entretanto, a esse efeito está a ocorrência de uma maior quantidade de apoptose, provavelmente induzida pela P4, proporcionando assim uma regulação indireta dos efeitos estrogênicos sobre a próstata. Essa duplicidade funcional da P4, aumentando ou diminuindo a morte celular programada, é comum também a outros tecidos do sistema reprodutor feminino (Rotello et al., 1989; Rotello et al., 1992; Saegusa e Okayasu, 1998; Bese et al., 2006).

As características regulatórias da T sobre a glândula prostática, inclusive a feminina, são facilmente encontradas na literatura, o que evidencia a importância desse andrógeno para a homeostasia prostática (Wright et al., 1999; Santos et al., 2006; Cordeiro et al., 2008; Campos et al., 2010). A próstata adulta embora apresente uma grande quantidade de AR e esteja sujeita a um ambiente rico em T, é uma glândula quiescente. Esse fenômeno acontece porque na próstata sadia os AR epiteliais são importantes para a diferenciação glandular, mas funcionam como supressores da proliferação epitelial (Wu et al., 2007; Simanainen et al., 2007). Neste trabalho, entretanto não foi observado esse efeito repressor da T sobre a proliferação celular na próstata feminina, uma vez que nos animais do grupo CaPT foram encontrados padrões de proliferação semelhantes ao dos castrados e maiores que as dos intactos. Esse fenômeno condiz com o crescimento glandular que ocorre após a castração e reposição hormonal de testosterona em ratos e gerbilos (Cordeiro et al., 2008; Nicholson e Rieke, 2011). Além disso, Rochel e colaboradores (2013) mostraram que na próstata feminina a reposição de testosterona por até 21 dias leva a uma redução da quantidade de ER $\beta$ , o que pode explicar o fato da próstata feminina sofrer um intenso crescimento mediante a reposição desse hormônio. Nossos dados, contudo não mostram qualquer variação desse receptor em comparação ao CaC, o que nos leva a acreditar que a P4, também administrada nos animais do grupo CaPT, suprimiu esse efeito indutor.

O tempo de castração utilizado nesse estudo, embora tenha permitido uma estabilização prostática através da regulação da proliferação e morte celular, desencadeou alterações notáveis da morfologia glandular. No grupo CaC tanto as células secretoras quanto o estroma prostático tornaram-se desorganizadas. A regressão do conteúdo citoplasmático coincide com a diminuição da quantidade de secreção observada nesse grupo, embora a área nuclear não tenha se alterado. Esse tipo de rearranjo do



compartimento estromal, é semelhante ao que ocorre na próstata ventral de gerbilos e ratos, no quais as células musculares mostram um padrão mais secretor (Vilamaior et al., 2005; Scarano et al., 2008). A reposição de P4 no grupo CaP parece não induzir alterações significativas no compartimento estromal, pois é mantido o mesmo padrão de distribuição das células musculares e de fibras extracelulares encontrado nos animais castrados. A P4, no entanto, desencadeou alterações mais marcantes nas células epiteliais, estabelecendo características mais secretoras a essas células, o que é consistente com o aumento de secreção evidenciado na próstata desses animais. A associação entre esse hormônio e a secreção do antígeno prostático específico (PSA) foi demonstrada em estudos no tecido mamário, aonde também é produzida essa caliceína (Sauter et al., 1996; Yu et al., 1994; 1995). Nesses estudos foi demonstrado que a progesterona possui um efeito estimulatório sobre a secreção de PSA, enquanto o estrógeno não apresenta essa característica (Sauter et al., 1998)

O uso de P4 + E2 e P4 + T modificou consideravelmente as características glandulares, no que se diz respeito a sua ultraestrutura. Nos grupos CaPE e CaPT a redução evidente da quantidade de fibras de colágeno e elásticas e a hipertrofia das células musculares lisas, proporcionaram à próstata feminina características semelhantes a próstata ventral de gerbilos machos (Rochel et al., 2007). A presença de um núcleo volumoso, bem como de retículo endoplasmático e cisternas de Golgi hipertróficos explicam a restituição da capacidade secretora da próstata encontrado nos grupos CaPE e CaPT. Essas particularidades sugerem que a P4 é capaz de regular a atividade das células epiteliais prostáticas em conjunto com o E2 e a T, não induzindo uma hipertrofia acentuada dessas células e ao mesmo tempo controlando a indução desse fenômeno pelos outros dois hormônios. Além disso, embora nos grupos CaPE e CaPT tenham sido encontrados uma maior quantidade de organelas secretoras nas células luminiais, a intensidade de secreção parece não se alterar em comparação com o grupo CaP, corroborando com a ideia de que a P4 é um modulador da atividade secretora prostática.

Esses dados mostram a importância da interação entre os hormônios reprodutivos sobre a fisiologia prostática. Os hormônios T, P4 e E2 são os principais esteroides envolvidos na regulação endócrina dos processos de proliferação e morte celular, nos

diversos tecidos reprodutivos femininos. A ocorrência de lesões na glândula prostática feminina em decorrência do desequilíbrio hormonal em mulheres pós-menopausa e mesmo em fêmeas de gerbilos foram bem estabelecidos em estudos anteriores (Kato et al., 2005; Custodio et al., 2008). Nossos dados mostram de maneira promissora que a P4 também é fator importante para o equilíbrio hormonal na próstata feminina, e que a sua contribuição para esse sistema é de caráter protetivo, regulando a proliferação celular, apoptose, crescimento e atividade secretora da próstata feminina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR. 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology*, 136:4368–4376.

Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. 2004. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11(3):537-51.

Bese T, Vural A, Ozturk M, Dagistanli F, Demirkiran F, Tuncdemir M, Arvas M, Sanioglu C, Kosebay D. 2006. The effect of long-term use of progesterone therapy on proliferation and apoptosis in simple endometrial hyperplasia without atypia. *Int J Gynecol Cancer*, 16(2):809-13.

Campos SG, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol*, 91(5):394-407.

Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*, 39(8):1312-24.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol*, 51:7-11.

Custódio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec (Hoboken)*, 291(4):463-74.

- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. 2002. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat*, 184(4):341-5.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod*, 79(6):1084-91.
- Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Béliard A, Fournier S, de Lignières B. 1998. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertil Steril*, 69(5):963-9.
- Gallardo F, Mogas T, Baró T, Rabanal R, Morote J, Abal M, Reventós J, Lloreta J. 2007. Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. *J Comp Pathol*, 136(1):1-8.
- Hiramatsu M, Maehara I, Orikasa S, Sasano H. 1996. Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in prostatic hyperplasia and carcinoma. *Histopathology*, 28(2):163-8.
- Hopwood D, Levison DA. 1976. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol*, 119(3):159-66.
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson JA. 2004. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(25):9375-80.
- Jo T, Terada N, Saji F, Tanizawa O. 1993. Inhibitory effects of estrogen, progesterone, androgen and glucocorticoid on death of neonatal mouse uterine epithelial cells induced to proliferate by estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46(1):25-32.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 9(5):1603-14.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. 2005. Female paraurethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(12):5925-30.

- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3):863-70.
- Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BV, Isaacs JT, Dahiya R, Cunha GR. 2001. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive systems. *Cell Death Differ*, 8:192–200.
- Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT. 1997. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31:131-138.
- Martin L, Finn CA, Carter J. 1970. Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J Reprod Fertil*, 21(3):461-9.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392(1):49-53.
- Nicholson TM, Ricke WA. 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*, 82(4-5):184-99.
- Nishino N, Totsukawa K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45(3):283-8.
- Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM. 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(3):233-45
- Risbridger GP, Ellem SJ, McPherson SJ. 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol*, 39(3):183-8.
- Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)*, 290(10):1233-47.
- Rochel-Maia SS, Santos FC, Alonso-Magdalena P, Góes RM, Vilamaior PS, Warner M, Gustafsson JÅ, Taboga SR. 2013. Estrogen receptors alpha and Beta in male and female gerbil prostates. *Biol Reprod*, 88(1):7.
- Rotello RJ, Hocker MB, Gerschenson LE. 1989. Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol*, 134(3):491-5.
- Rotello RJ, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE. 1992. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol*, 140(2):449-56.

- Rubin R, Baserga R. 1995. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab Invest*, 73(3):311-31.
- Saegusa M, Okayasu I. 1998. Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis. *Cancer*, 83(1):111-21.
- Sadow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM. 1979. Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am. J. Anat*, 156: 15-35.
- Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue & Cell*, 35:447-457.
- Santos FC, Leite RP, Custódio AM, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75(3):370-9.
- Santos FC, Rochel-Maia SS, Fochi RA, Justulin LA Jr, Santos SA, Vilamaior PS, Felisbino SL, Góes RM, Taboga SR. 2011. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol*, 173(3):419-27
- Satoh H, Mori K, Furuhashi K. 2001. Morphological and immunohistochemical characteristics of the heterogeneous prostate-like glands (paraurethral gland) seen in female Brown-Norway rats. *Toxicol Pathol*, 29(2):237-41.
- Sauter ER, Daly M, Linahan K, Ehya H, Engstrom PF, Bonney G, Ross EA, Yu H, Diamandis E. 1996. Prostate-specific antigen levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5(12):967-70.
- Sauter ER, Babb J, Daly M, Engstrom PF, Ehya H, Malick J, Diamandis E. 1998. Prostate-specific antigen production in the female breast: association with progesterone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(4):315-20.
- Scarano WR, de Sousa DE, Campos SG, Corradi LS, Vilamaior PS, Taboga SR. 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, 89(1):25-37.
- Simanainen U, Allan CM, Lim P, McPherson S, Jimenez M, Zajac JD, Davey RA, Handelsman DJ. 2007. Disruption of prostate epithelial androgen receptor impedes prostate lobe-specific growth and function. *Endocrinology*, 148(5):2264-72.
- Skene AJC. 1880. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am J Obstetr Diss Women Child*, 13:265-270.

- Slayden OD, Hirst JJ, Brenner RM. 1993. Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterin treatment. *Endocrinology*, 132(4):1845-56.
- Terada N, Yamamoto R, Takada T, Miyake T, Terakawa N, Wakimoto H, Taniguchi H, Li W, Kitamura Y, Matsumoto K. 1989. Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium. *J Steroid Biochem*, 33(6):1091-6.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int*, 29(9):809-16.
- Wimpissinger F, Stifter K, Grin W, Stackl W. 2007. The female prostate revisited: perineal ultrasound and biochemical studies of female ejaculate. *J Sex Med*, 4(5):1388-93.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. 1999. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, 140(10):4509-15.
- Wu CT, Altuwaijri S, Ricke WA, Huang SP, Yeh S, Zhang C, Niu Y, Tsai MY, Chang C. 2007. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(31):12679-84.
- Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. 1994. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem*, 27(2):75-9.
- Yu H, Gai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque MA, Roagna R, Ponzzone R, Sismondi P. 1995. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res*, 55(10):2104-10.
- Zaviacic M. 1993. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *J Sex Res*, 30:148-151.
- Zaviacic M. 1999. The female prostate: from vestigial Skene's paraurethral glands and ducts to woman's functional prostate. *Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press*. 171pp
- Zaviacic M, Ablin RJ. 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in human female. *Histol Histopathol*, 15:131-142.
- Zaviacic M, Zajicková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviacic T, Holomán K, Breza J. 2000. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *J Histotechnol*, 23:61-69.

**Tabela I.** Resultados das análises cariométricas da glândula prostática feminina nos diferentes grupos experimentais estudados. CaC: castrado controle que recebeu doses subcutâneas de óleo mineral; CaP: animais castrados com reposição de progesterona; CaPE: animais castrados com reposição de progesterona e estrógeno. CaPT: animais castrados com reposição de progesterona e testosterona. Os valores mencionados correspondem à média e desvio padrão.

<b>MORFOMETRIA NUCLEAR</b>					
<i>Grupos Experimentais</i>					
<i>Parâmetros</i>	<i>CN</i>	<i>CaC</i>	<i>CaP</i>	<i>CaPE</i>	<i>CaPT</i>
<i>Área Nuclear</i>	30,48 ± 1,86 <sup>a</sup>	25,80 ± 0,53 <sup>b</sup>	25,39 ± 1,68 <sup>b</sup>	36,94 ± 2,21 <sup>c,d</sup>	35,67 ± 1,96 <sup>d</sup>
<i>Perímetro Nuclear</i>	23,02 ± 0,82 <sup>a</sup>	20,77 ± 0,69 <sup>b</sup>	21,21 ± 0,79 <sup>b</sup>	24,60 ± 0,79 <sup>c</sup>	26,30 ± 1,14 <sup>d</sup>

As letras sobrescritas (a, b, c, d) correspondem às diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

**Tabela II.** Valores referentes à frequência relativa dos receptores de estrógeno, e aos índices de proliferação e morte celular programada ( $MD \pm DP$ ).

<b>Grupos Experimentais</b>					
<b>Parâmetros</b>	<b>CN</b>	<b>CaC</b>	<b>CaP</b>	<b>CaPE</b>	<b>CaPT</b>
<b><i>Frequência de Células ERβ-positivas (%)</i></b>	20,34 ± 2,25 <sup>a</sup>	10,29 ± 5,35 <sup>b</sup>	31,05 ± 2,46 <sup>c</sup>	46,01 ± 3,46 <sup>d</sup>	7,15 ± 1,19 <sup>e</sup>
<b><i>Índice de Proliferação (%)</i></b>	1,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,50 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,41 <sup>b</sup>	3,66 ± 0,68 <sup>c</sup>	1,89 ± 0,51 <sup>b</sup>
<b><i>Índice Apoptótico (%)</i></b>	1,51 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,70 ± 1,10 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,57 <sup>a</sup>	10,50 ± 1,69 <sup>b</sup>	9,03 ± 1,22 <sup>b</sup>

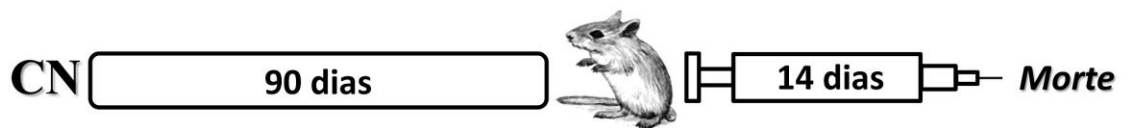
As letras sobrescritas (a, b, c, d) correspondem às diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.



## LEGENDA DAS FIGURAS

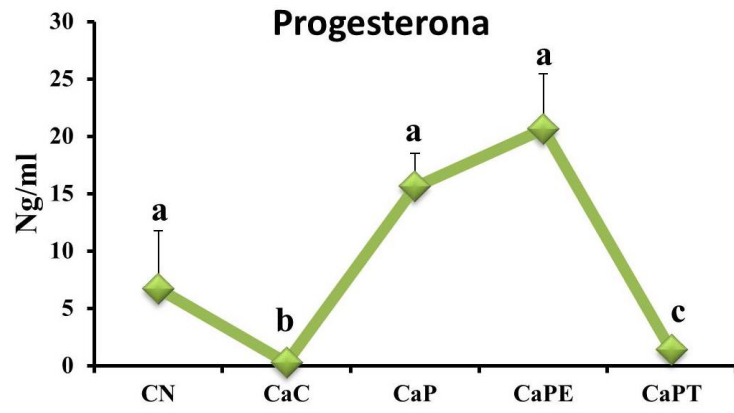
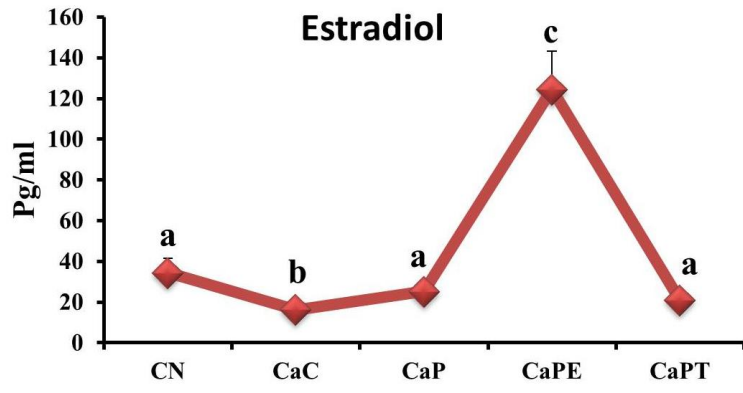
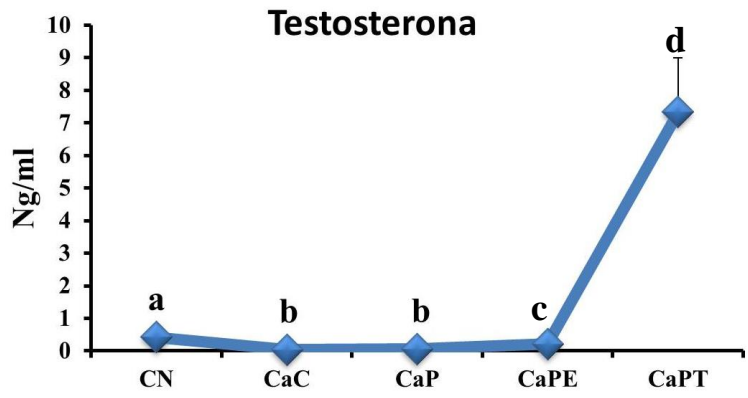
**Figura 1.** Esquema representativo dos grupos experimentais e seus respectivos tratamentos. CN: grupo controle normal, formado por animais adultos tratados com óleo mineral; CaC: grupo controle castrado, composto por animais castrados que receberam doses subcutâneas de óleo mineral; CaP: castrado progesterona, formado por animais castrados que receberam doses subcutâneas de P4 (Sigma-aldrich); CaPE: grupo castrado progesterona e estrógeno, composto por animais castrados que receberam doses subcutâneas de P4 + E2 ( $\beta$ -estradiol 3-benzoato; Sigma-aldrich); CaPT: grupo castrado progesterona e testosterona, formado por gerbilos castrados que receberam doses subcutâneas de P4 + T (Cipionato de Testosterona – Deposteron / Sigma-aldrich). Todos os hormônios foram administrados na concentração de 1 mg/kg/48h.  $\otimes$  representa a castração cirúrgica.

1



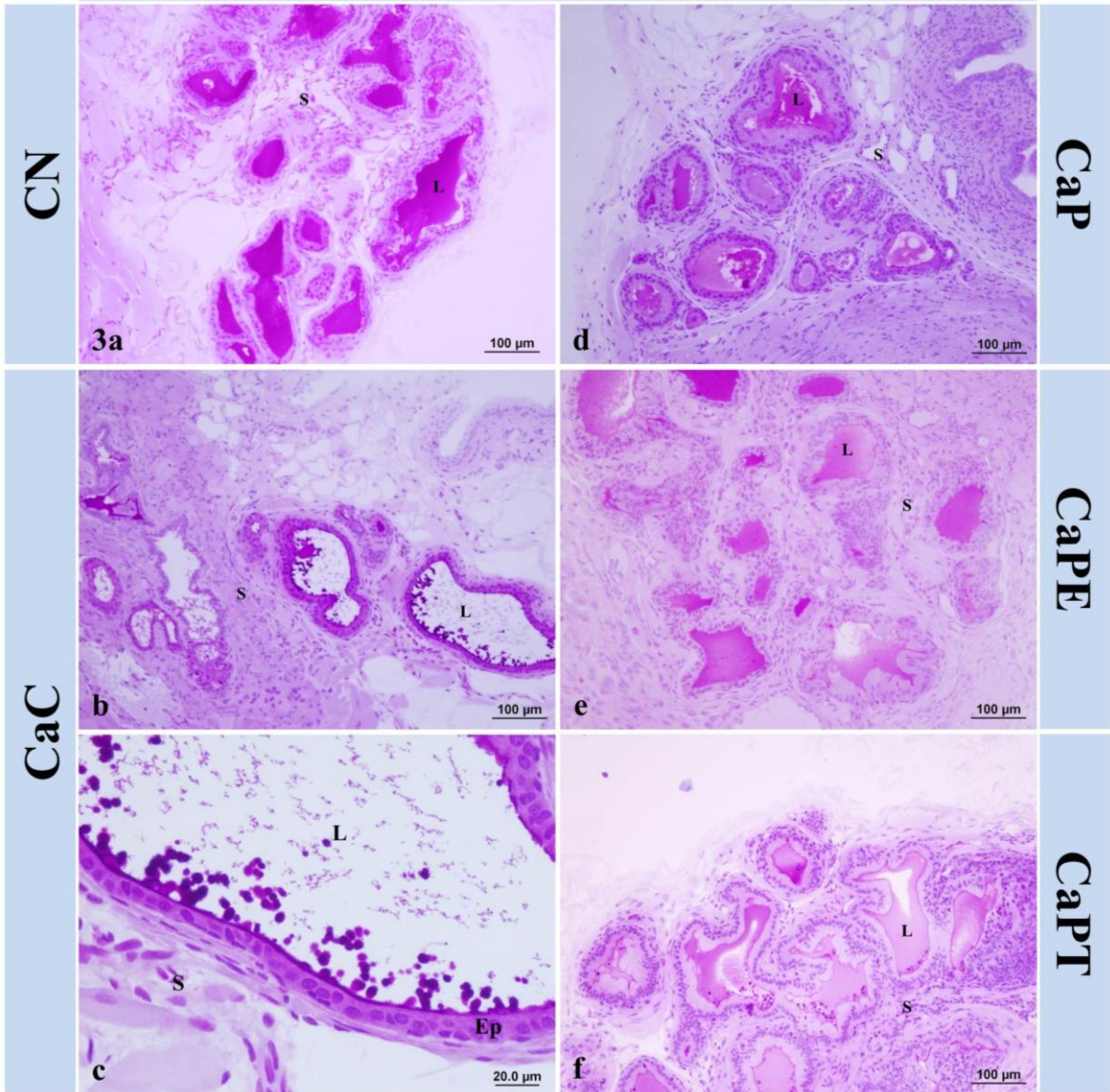
**Figura 2.** Representação gráfica dos níveis hormonais séricos de testosterona, estradiol e progesterona em fêmeas adultas de gerbilo nos diferentes grupos experimentais. CN: controle não-castrado que recebeu doses subcutâneas de óleo mineral; CaC: castrado controle que recebeu doses subcutâneas de óleo mineral; CaP: animais castrados com reposição de progesterona; CaPE: animais castrados com reposição de progesterona e estrógeno. CaPT: gerbilos castrados tratados com testosterona e progesterona. Os valores mencionados correspondem à média e ao erro padrão.

2

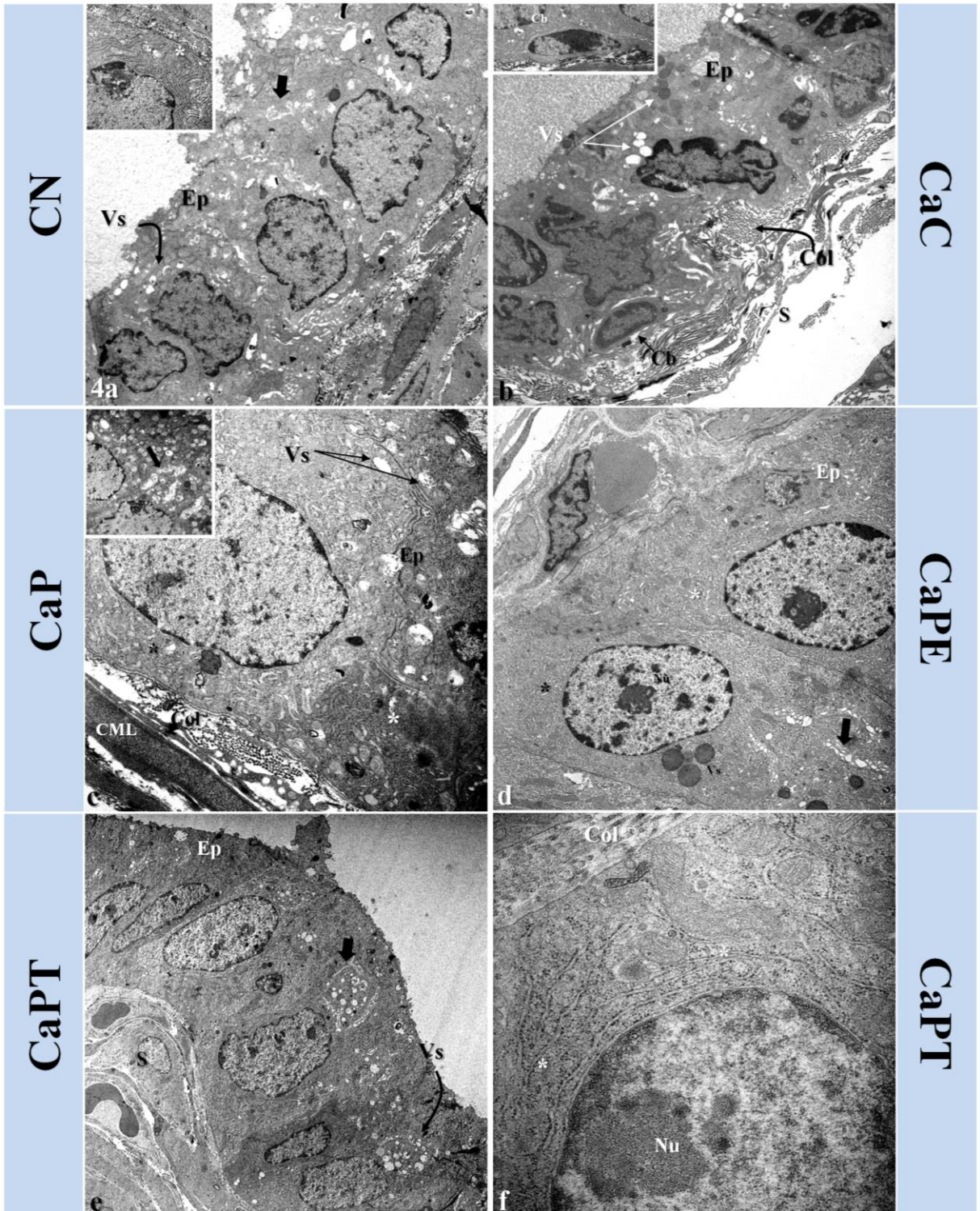


**Figura 3.** Cortes histológicos corados pela técnica de P.A.S. mostrando os aspectos gerais da secreção glandular da próstata de fêmeas diante os diferentes tratamentos empregados. Observar a redução da intensidade de secreção nos animais tratados e a posterior recuperação dessa intensidade mediante os diferentes tratamentos utilizados, bem como a variação do tipo de secreção, mais protéica no controle e CaP, e mais glicoprotéica no CaPE e CaPT. L: lúmen alveolar; S: estroma prostático; Seta: secreção apical. Coloração: P.A.S.

## Ácido Periódico de Schiff (PAS)

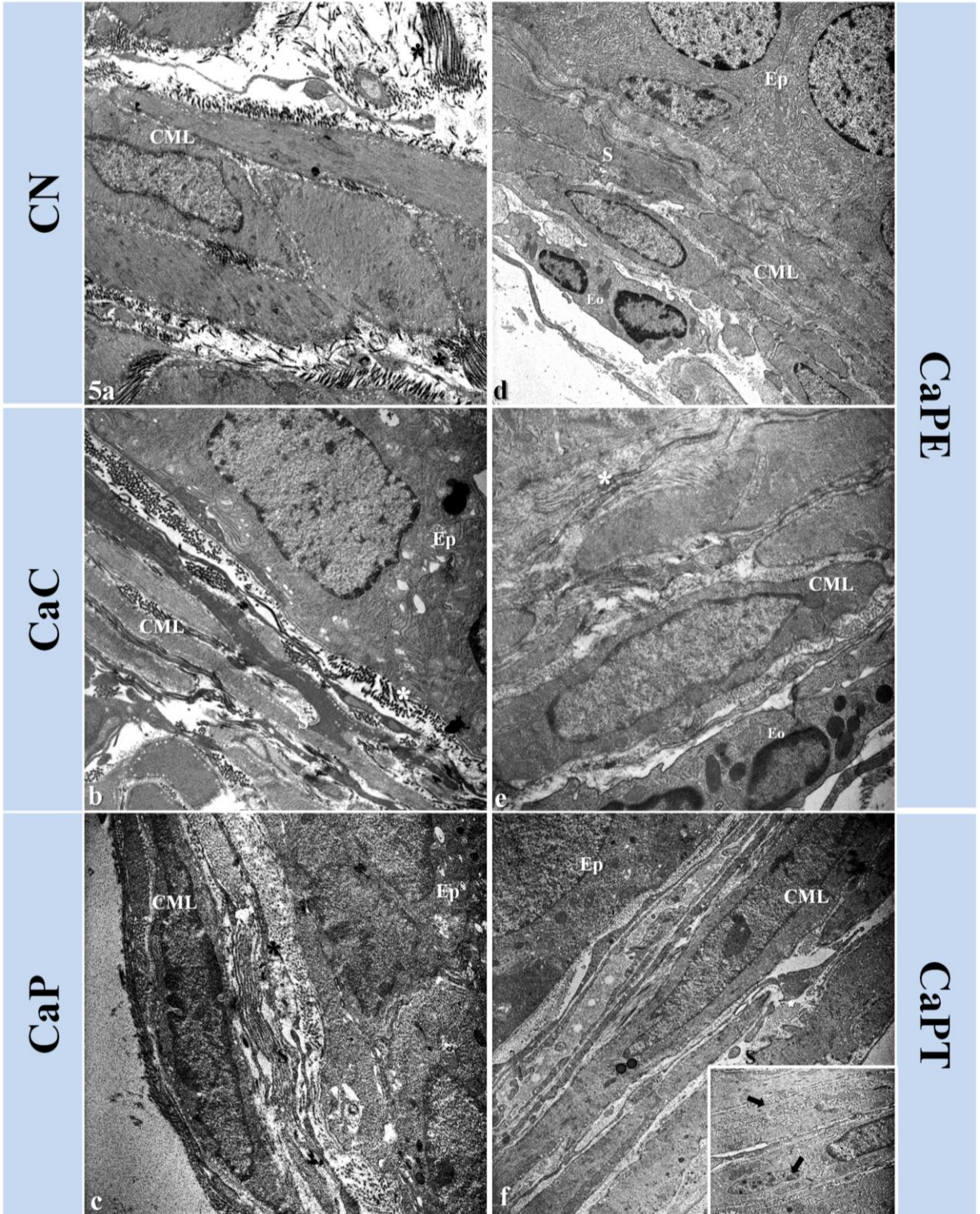


**Figura 4.** Ultraestrutura da próstata feminina do gerbilo. [a] células epiteliais (Ep) da próstata feminina dos animais intactos. É possível encontrar cisternas do complexo de Golgi desenvolvidas (seta), numerosas vesículas de secreção (Vs) e no detalhe a presença de retículo endoplasmático rugoso (asterisco) na região basal do epitélio. Aumento de 4646X. [b] compartimento epitelial prostático do grupo castrado, evidenciando células epiteliais (Ep) regredidas com núcleo irregular, grande quantidade de fibras de colágeno (Col) na transição epitélio estroma (S). Ainda é possível observar a presença de vesículas de secreção (Vs) e células basais pequenas (detalhe, Cb) e com cromatina condensada. 2784x. [c] características das células secretoras glandulares (Ep) nos animais tratados com progesterona. Notar a presença de grandes quantidade de vesículas secretoras (Vs), além de cisternas do Golgi (detalhe, seta), retículo endoplasmático (asterisco) e colágeno (Col) subepitelial. 2784x. 10000x. [d] animais tratados com progesterona e estradiol. Notar a presença de células epiteliais (Ep) desenvolvidas, contendo várias vesículas lipídicas (Vs), retículo endoplasmático (asterisco), aparelho de Golgi volumoso (seta) e nucléolos desenvolvidos (Nu). 6000x. [e, f] próstata feminina do grupo tratado com progesterona e testosterona. Observar a presença de células secretoras (Ep) volumosas e com núcleos grandes, várias vesículas secretoras (Vs), retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e grande quantidade na região basal do epitélio (asterisco). Na seta é possível ver cisternas do Golgi hipertróficos, além de nucléolo volumoso (Nu) e colágenos subepitelial (Col). 3597x e 27000x.



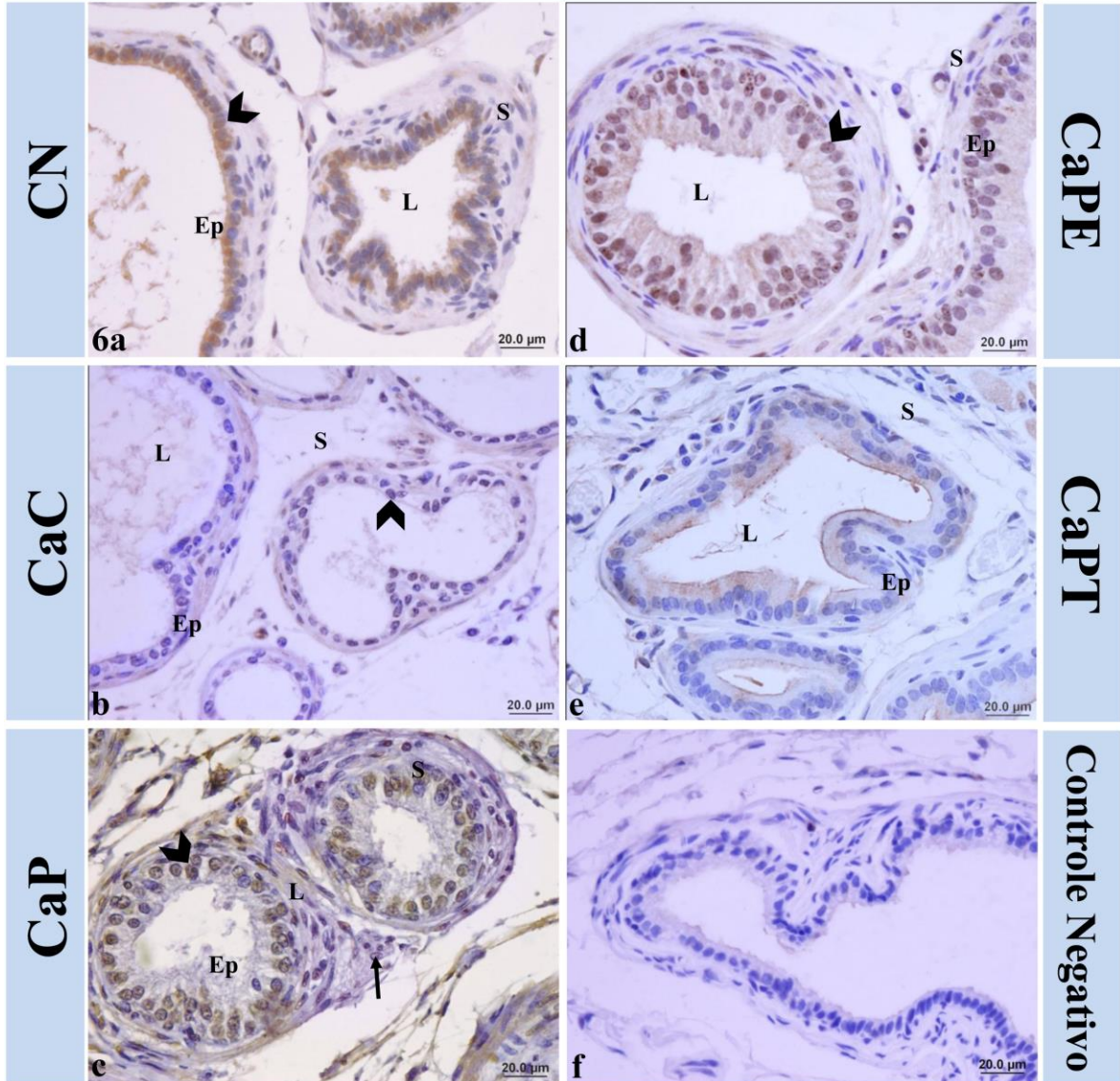


**Figura 5.** Ultraestrutura do estroma prostático feminino. [a] Células musculares lisas (CML) no estroma glandular de fêmeas intactas rodeadas por fibras de colágeno (asterisco). [b] detalhe da região de transição epitélio (Ep) - estroma (S) evidenciando a presença de várias fibras de colágeno (asterisco) nos animais castrados. 10000x. [c] estroma prostático dos animais tratados com progesterona, no qual é possível observar grandes quantidades de colágeno (asterisco) entre as células musculares lisas (CML) desenvolvidas e na transição epitélio (Ep) – estroma (S). 12930x. [d, e] compartimento estromal da glândula de animais tratados com progesterona e estrógeno. É possível notar que as células musculares lisas (CML) estão mais desenvolvidas, há uma menor quantidade de fibras de colágeno (asterisco) na região transição epitélio (Ep) – estroma (S). Eo = eosinófilo. 6000x e 12930x. [f] animais tratados com progesterona e testosterona. As células musculares lisas (CML) estão hipertrofiadas, contendo grandes quantidades de retículo endoplasmático (detalhe, seta), enquanto na transição epitélio (Ep) – estroma (S) é evidenciado uma redução da quantidade de colágeno. 7750x e 12930x.



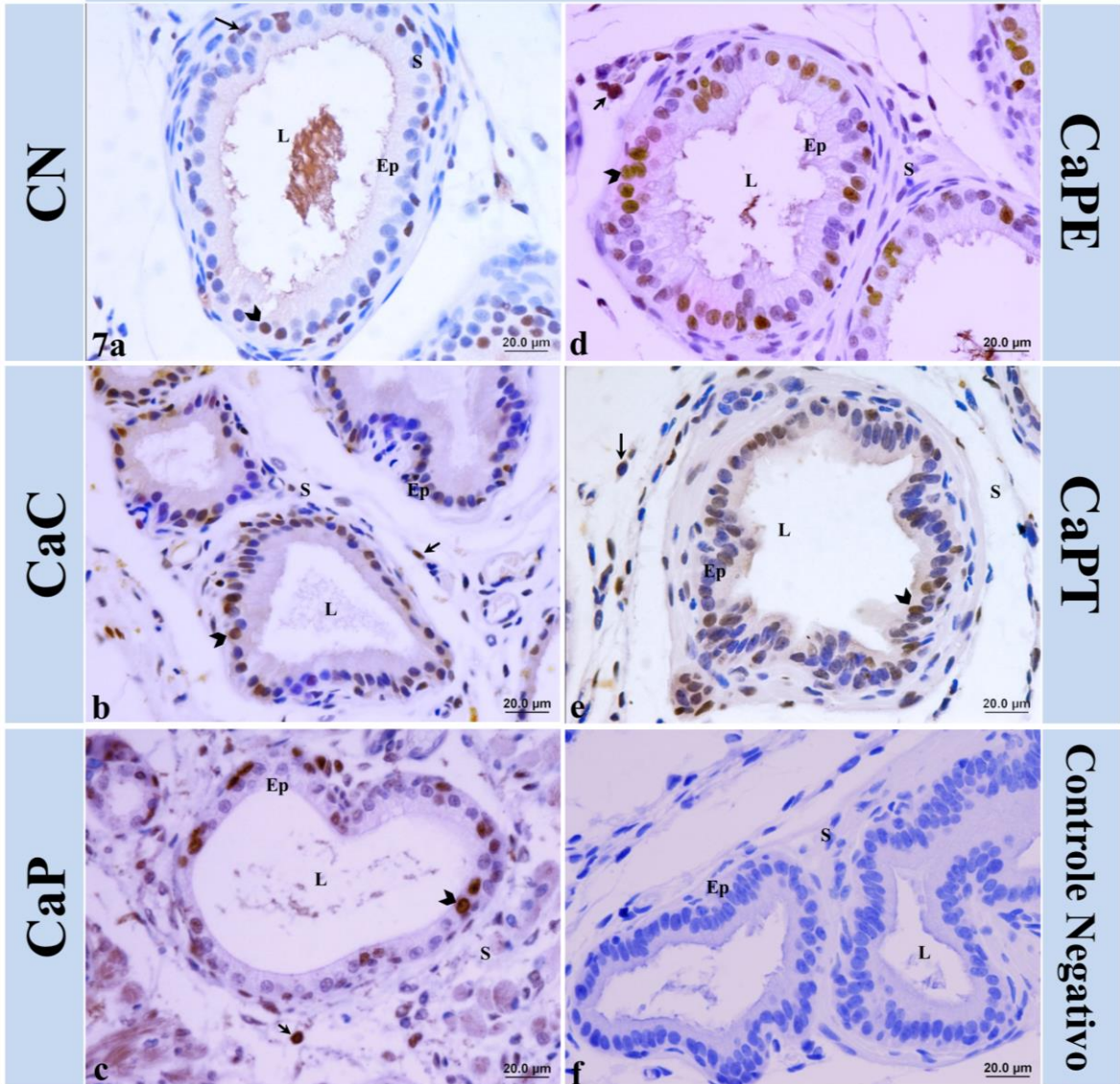
**Figura 6.** Aspectos gerais da marcação de células receptoras de estrógeno (ER $\beta$ ). A castração cirúrgica não desencadeou alterações expressivas no padrão de células ER $\beta$ -positivas. A administração de progesterona promoveu um pequeno aumento na quantidade dessas células. Nos animais do grupo CaPE houve um aumento expressivo de células ER $\beta$ -marcadas, enquanto no CaPT houve uma diminuição. *Ep*: epitélio alveolar; *L*: lúmen alveolar; *S*: estroma prostático; *Cabeça de Seta*: células epiteliais marcadas.

## Receptor de Estrógeno beta (ER $\beta$ )



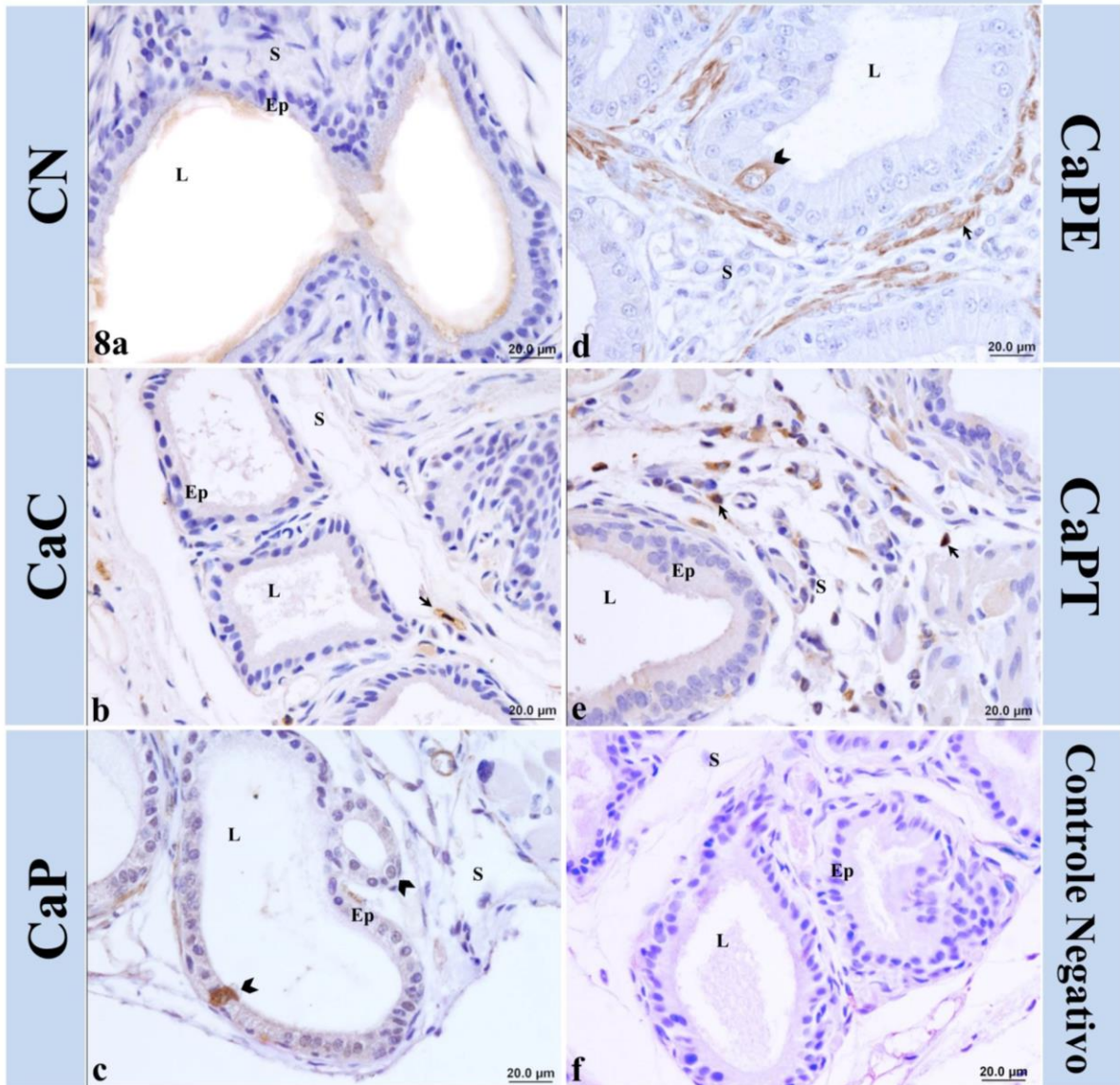
**Figura 7.** Próstatas de gerbilos fêmeas adultas submetidas à imunomarcção para células proliferativas (PCNA). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Notar a uma maior quantidade de células proliferativas nos grupos tratados. No CaP e CaPE há uma maior quantidade de células marcadas no estroma, enquanto que no CaPTocorre no estroma prostático. *Ep*: epitélio alveolar; *L*: lúmen alveolar; *S*: estroma prostático; *Cabeça-de-seta*: marcação em células epiteliais; *Seta*: marcação em células do estroma.

**PCNA**



**Figura 8.** Imunomarcção para detecção de células apoptóticas (Caspase-3 ativada). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Notar o aumento de células apoptóticas no grupo CaP e principalmente nos animais do CaPE e sua diminuição nos animais machos do grupo CaPT. *Ep*: epitélio alveolar; *L*: lúmen alveolar; *S*: estroma prostático; *Cabeça-de-seta*: marcação em células epiteliais; *Seta*: marcação em células do estroma.

## Caspase-3 Ativada





REGULAÇÃO DOSE-DEPENDENTE DOS RECEPTORES DE ANDRÓGENO NA  
PRÓSTATA VENTRAL DO GERBILO (*Meriones Unguiculatus*) PELA  
PROSGESTERONA

R. A. Fochi<sup>1#</sup>, J. A. Antoniassi<sup>2#</sup>, F. C. A. Santos<sup>3</sup>, S. R. Taboga<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, UNICAMP,  
Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio  
Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Goiás, Goiânia, GO.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc  
N.º 08/11386-9).

# R. A. Fochi e J. A. Antoniassi contribuíram igualmente para esse trabalho.

\*Endereço para correspondência:

Sebastião R. Taboga, Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP

E-mail: taboga@ibilce.unesp.br

Tel +55-17-32212386; Fax: +55-17-32212390

## **RESUMO**

O desenvolvimento e a manutenção da morfofisiologia prostática são regulados pela ação coordenada dos hormônios esteroides e seus receptores. Os andrógenos, representados pela testosterona e dihidrotestosterona, e os estrógenos são os principais reguladores das funções glandulares normais. Outro hormônio ainda pouco estudado na glândula prostática, principalmente por ser considerado um esteroide feminino, é a progesterona. Alguns estudos tem demonstrado a existência de receptores de progesterona na próstata, normalmente relacionado com a presença de lesões glandulares. Além disso, vários derivados sintéticos similares à molécula de progesterona, derivada ou não desse hormônio, têm sido empregados no tratamento de câncer prostático por possuírem características antiandrogênicas. Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar os efeitos da progesterona sobre a próstata ventral de gerbilos. Para isso gerbilos foram castrados cirurgicamente e então submetidos à administração de progesterona exógena em concentrações de 1, 3 e 10 mg/kg por 14 dias.. Nos animais que receberam 1 mg/kg foi observado um aumento significativo dos receptores androgênicos e um maior desenvolvimento do epitélio glandular, enquanto nos gerbilos tratados com 3 mg/kg não houve alterações significativas da morfologia prostática, a qual permaneceu semelhante aos dos animais castrados. A administração de 10 mg/kg, entretanto, levou a uma diminuição expressiva dos receptores de andrógeno, sem no entanto alterar a morfologia glandular. O tratamento com a progesterona evidenciou que esse hormônio possui um efeito dose-dependente sobre a glândula prostática, podendo induzir ou inibir a ativação de receptores de andrógeno. Essas observações enriquecem a discussão do uso da progesterona como uma possível droga antiandrogênica na glândula prostática, levando em consideração a ambiguidade funcional desse tipo de abordagem como consequência das características dose-dependentes deste hormônio.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da glândula prostática, bem como sua manutenção na vida adulta é amplamente dependente de andrógenos (Cunha et al., 1987; Timme et al., 1994, Marker et al. 2003). A regulação androgênica da próstata é mediada pelos receptores de andrógeno (AR) que é feita principalmente através da interação recíproca entre o estroma e o epitélio glandular (Thomson et al., 1997; Hayward et al., 1997; Wang et al., 2001). A testosterona (T) é o principal andrógeno sérico presente no organismo masculino, sendo sintetizado principalmente pelas células de Leydig e em parte pela glândula adrenal (Hsing et al., 2002). Na glândula prostática, entretanto o hormônio predominante é a dihidrotestosterona (DHT), sintetizada na glândula pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase tipo 2 ( $5\alpha$ R), que converte cerca de 90% da T que chega até a próstata (Hsing et al., 2002). A DHT regula a morfofisiologia prostática também pela interação com os ARs, pelo qual possui uma afinidade superior em relação à própria T (Rittmaster, 1994; Cunha et al., 1996; Banerjee et al., 2001). Enquanto a T regula principalmente a diferenciação sexual, mantendo as funções sexuais normais e a libido, a DHT possui um papel fundamental na virilização embrionária e puberal, além de regular as funcionalidades da próstata adulta (Soronen et al., 2004). A importância dos andrógenos para a glândula prostática tem sido demonstrada em diversos trabalhos que utilizam a castração como meio de ablação androgênica, nos quais a deficiência desse tipo de hormônio desencadeia mudanças significativas na morfologia glandular (Horsfall et al., 1994; Carvalho et al., 1997). O bloqueio da enzima  $5\alpha$ R, e assim da produção de DHT, por drogas como a finasterida, por exemplo, provoca um processo de involução glandular com a redução tanto da morfogênese quanto do crescimento glandular, além de importantes mudanças no estroma (Corradi et al., 2004, 2009).

A regulação exercida pelos andrógenos sobre a próstata não excluem a participação do estrógeno e da progesterona (P4) também nesse processo. O estrógeno tem se mostrado um importante regulador prostático, modulando os efeitos androgênicos através de seus dois receptores, ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Risbridger et al., 2007; McPherson et al., 2008). Essa modulação estrogênica é considerada muito importante para glândula, uma vez que o desequilíbrio entre a T e o estrógeno tem sido associado ao aparecimento de lesões

prostáticas (Schulze et al., 1990; Prins e Korach 2007). A existência de receptores de progesterona (PR) na próstata tem sido identificada em vários trabalhos da literatura, tanto em tecidos normais quanto neoplásicos (Karr et al., 1979; Hiramatsu et al., 1996). O papel exato dos PRs na próstata ainda é desconhecido, o que se sabe é que a sua expressão pode ser ativada mediante a interação com o ER $\alpha$ , sendo então modulado pelo estrógeno (Ing e Tornesi, 1997; Lange, 2008). A P4 assim como a T e o estradiol (E2) também é transformado em vários metabólitos com efeitos diversos, através de duas vias principais denominadas 5 $\alpha$ -pregnanes e 4-pregnanes (Huber e Ott, 2009). Entre as enzimas que se ligam à P4 estão a 5 $\alpha$ R que produz a 5 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (5 $\alpha$ -DHP) e a 3 $\alpha$ -HSO responsável pela síntese do 4-pregnano-3 $\alpha$ -ol-20-one (3 $\alpha$ HP). Recentemente, o uso de progestinas no tratamento de lesões prostáticas tem sido proposto, na medida em que essas substâncias possuem a capacidade de inibir a captação de T pela próstata e competir pela enzima 5 $\alpha$ R, reduzindo assim a quantidade de ARs e a síntese de DHT (Oettel e Mukhopadhyay, 2004; Wiebe, 2006). Algumas progestinas, porém, têm a capacidade de se ligar diretamente aos ARs e simular os efeitos da T sobre alguns tecidos (Mowszowicz et al., 1974; Kloosterboer et al., 1988; Labrie et al., 1990). Em relação a P4 natural, ainda pouco se sabe se ela possui também essa capacidade. Desta forma, esse trabalho visou avaliar os efeitos desse hormônio em diferentes doses sobre a próstata ventral de gerbilos, observando as suas características morfológicas e o comportamento dos ARs após castração cirúrgica e posterior administração de P4 exógena.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Delineamento Experimental*

Foram utilizados neste estudo quarenta gerbilos machos, com idades entre 45-104 dias de idade. Todos os animais foram mantidos em Biotério de manutenção do Departamento de Biologia, sob condições de luminosidade (12h claro e 12h escuro) e temperatura adequadas ( $\pm 25$  °C), bem como alimentação e água *ad libitum*, de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Unesp e do CEEA (Protocolo n°. 002/09).

Os animais utilizados como controle intacto (n=8), após completarem 90 dias de idade receberam doses subcutâneas de óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>) a um volume de 0,1 ml por aplicação durante 14 dias (injeções a cada 48 horas). Os demais gerbilos foram inicialmente castrados com 45 dias de idade, através de orquiectomia bilateral, e então devolvidos ao biotério por mais 45 dias. Esses animais castrados, então com 90 dias de idade, receberam doses subcutâneas de P4, diluído em óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>), durante 14 dias em concentrações variadas de acordo com o grupo (0,1ml/administração/animal) (Figura 1). Todos os animais foram mortos ao completarem 104 dias de idade após anestesia em CO<sub>2</sub> e decapitação. A pesagem dos gerbilos foi realizada imediatamente antes da anestesia pelo gás carbônico.

#### *Histologia e histoquímica*

A próstata ventral foi removida, pesada e imediatamente fixada por imersão em solução Karnovsky (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%) por 24 horas. Em seguida, o material foi processado para inclusão em historesina (Historesin embedding kit; Leica, Nussloch, Alemanha). Cortes de 1-5µm foram produzidos em micrótomo rotativo e coletados em lâminas de vidro. As avaliações referentes aos padrões de secreção glandular foram realizadas utilizando-se lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS). As demais lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina (H&E) e utilizadas para as análises gerais, estereológicas e morfométricas.

#### *Estereologia e Análises Morfométricas*

Trinta e dois campos microscópicos randomicamente selecionados em cada grupo experimental (4 por animal) foram fotografados e submetidos a avaliação estereológica pelo método de Weibel modificado para a glândula prostática (Huttunen et al., 1981). Através desse método a densidade de volume do epitélio, lúmen, músculo liso e estroma não muscular foram determinados. Por estroma não muscular entende-se todo o tecido que circunda os alvéolos prostáticos, exceto as células musculares lisas.

Para as avaliações morfométricas foram realizadas medições da altura epitelial em lâminas coradas com H&E. Cem medidas foram aferidas em 4 campos microscópicos por

animal, dentro de cada grupo. Ambas as análises foram feitas utilizando o software Image Pro Plus (Copyright © 1993-2006 Media Cybernetics, Inc.).

#### *Imunohistoquímica para Receptor de Andrógeno (AR)*

Parte dos fragmentos prostáticos foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4) e embebidos em parafina (Histosec; Merck Darmstadt, Alemanha), para a análise da expressão do receptor androgênico (AR) por imunohistoquímica. Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em TRIS-EDTA pH 9,0 a 100°C, por 45 minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, por 15 minutos. O anticorpo primário para AR (N-20, Santa Cruz) foi utilizado numa diluição de 1:100 overnight a 4°C. Após serem lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundários marcados com peroxidase (SC2005/Santa Cruz) por 1 hora, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC) por 45 minutos. Em seguida, foram revelados com a diaminobenzidina (DAB). A contracoloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. Controles negativos foram obtidos omitindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário. A quantificação da imunomarcação para o AR foi realizada contando o número de células marcadas e não marcadas em 20 campos microscópicos randomicamente escolhidos entre cada grupo experimental. Um mínimo de 1000 células foi contado e o número de células positivas foi dividida pelo número total de células contadas.

#### *Estatística*

Os dados obtidos pelas análises empregadas foram expressos pelas médias e seus erros padrões, sendo analisados inicialmente pela Análise de Variância (One-way ANOVA) e, posteriormente, pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis para comparações múltiplas com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), usando o programa Statistica 7.0 (Copyright©Statsoft, Inc. 1984-2004).

## RESULTADOS

### *Peso Corporal e Prostático*

Todos os valores obtidos com a análise biométrica estão inseridos na Tabela I. Não foram encontradas diferenças significativas quanto aos pesos corporais dos gerbilos nos diferentes tratamentos. Quanto ao peso da próstata ventral foi observada uma redução significativa após a castração cirúrgica, a qual se manteve em todos os tratamentos. O mesmo padrão ocorreu com o peso relativo.

### *Análise Morfológica da Próstata Ventral*

As análises quantitativas referentes a estereologia e morfometria podem ser observadas na Tabela I. A castração dos gerbilos levou a uma redução da próstata ventral, evidenciando alvéolos atróficos (Fig. 2a, b) e revestidos por um epitélio cúbico com núcleo volumoso (Fig. 2f, g). Em contrapartida o estroma se tornou relativamente denso, devido principalmente à atrofia glandular e compactação do estroma (Fig. 2b, detalhe). O volume relativo do epitélio e do lúmen diminuíram no grupo CC em comparação ao CN, enquanto do estroma aumentou. O mesmo ocorreu com a altura das células epiteliais secretoras, diminuindo significativamente seu tamanho. Nesse grupo a membrana basal tornou-se espessa e pregueada, mostrando um arranjo pregueado em torno dos alvéolos prostáticos (Fig. 2g, seta). Além disso, a secreção glandular também diminuiu após a castração cirúrgica, restringindo-se a região apical do epitélio (Fig. 3a, b, c).

Nos animais do grupo CP1, o volume relativo dos compartimentos estromal e luminal diminuíram em comparação ao CC, enquanto o epitelial não se alterou (Fig. 2c). Nesse grupo as células epiteliais aumentaram de tamanho, se tornando maiores que aquelas observadas nos grupos CC, CP3 e CP10 (Fig. 2h). O estroma se tornou relativamente organizado, sendo muito semelhante ao encontrado nas próstatas ventrais dos animais CN, embora a membrana basal ainda seja espessa e irregular e a camada muscular mais delgada (Fig. 2h, seta). Neste grupo a recuperação da secreção glandular foi evidente, assemelhando-se ao padrão de secreção encontrado nos animais CN (Fig. 3d).

A histologia da próstata ventral dos animais CP3 permaneceu similar aos dos animais CC e CP1 (Fig. 2b, d, g, i). Os volumes dos compartimentos prostáticos não se alteram após a administração de P4 nesse grupo, entretanto a espessura da camada muscular adjacente aos alvéolos glandulares se tornou mais fina comparada a do grupo CC (Fig. 2i). Em relação ao estroma glandular não foram observadas diferenças marcantes nesse grupo comparado aos animais CP1, embora o volume desse compartimento se encontre significativamente maior (Fig. 2c, d). A secreção glandular é maior que a observada no grupo CC (Fig. 3b, e) e semelhante à encontrada nos animais CP1 (Fig. 3d, e).

Nos animais do grupo CP10 os volumes relativos do epitélio e lúmen diminuíram em relação ao CC (Fig. 2b, e). Comparado com o grupo CP1 houve uma redução do volume epitelial e um aumento do volume estromal (Fig. 2c, d, e). No grupo CP10 as células epiteliais permaneceram do mesmo tamanho comparado à próstata ventral dos animais castrados (Fig. 2g, j) e menores que a dos animais CP1 (Fig. 2h, j). A organização do compartimento estromal não sofreu alterações histológicas expressivas em relação aos animais castrados e demais grupos tratados com P4, embora seu volume tenha sido maior. O compartimento luminal também reduziu comparativamente aos animais do grupo CP3, sendo semelhante ao grupo CP1. A secreção glandular nesse grupo foi menor aos padrões encontrados nos demais grupos tratados com P4 (Fig. 3f).

#### *Padrão da Imunomarcacão para os ARs*

Nos animais intactos do CN, o AR foi observado em grande quantidade no epitélio glandular e em algumas células do estroma (Fig. 4a, g). Com a castracão cirúrgica houve uma significativa reduçãõ da marcaçãõ para esse receptor na próstata ventral, sendo observada uma marcaçãõ menos intensa e localizada principalmente no estroma glandular (Fig. 4b, g, h).

A administraçãõ de P4 exógena no grupo CP1 promoveu um aumento significativo da quantidade de células AR-positivas comparativamente aos animais CC, permanecendo inferior aos dos animais CN (Fig. 4c, g, h). Essa imunomarcacão também se concentra nas células do estroma prostático (Fig. 4c, cabeça de seta), sendo observadas poucas células epiteliais positivas (Fig. 4c, seta). No grupo CP3 há uma reduçãõ expressiva da quantidade



de células AR-positivas tanto no estroma quanto no epitélio comparado com o grupo CP1 (Fig. 4d, e, g, h), permanecendo, entretanto semelhante aos animais CC (Fig. 4b, e, g, h). O mesmo padrão foi observado na próstata ventral dos animais CP10 (Fig. 4f), havendo, porém uma redução mais acentuada da imunomarcção para AR, evidenciando uma menor quantidade de células positivas em relação aos animais de todos os demais grupos (Fig. 4g, h).

## **DISCUSSÃO**

Este trabalho revelou que a P4 pode exercer um efeito indutor ou inibidor sobre a expressão do AR, dependendo da sua concentração. Em concentrações de 0,07 mg, a P4 é potencialmente capaz de regular positivamente a expressão dos ARs, principalmente no estroma da próstata ventral de gerbilos, proporcionando um pequeno efeito anabólico sobre o compartimento epitelial. Em concentrações de 0,21 a 0,70 mg a P4 inverte o seus efeitos sobre os ARs, diminuindo a sua expressão tanto no estroma quanto no epitélio glandular.

A regressão glandular e a diminuição da quantidade de células AR-positivas nos animais castrados eram esperadas, uma vez que através da castração cirúrgica retirou-se a principal fonte de T. Esse mesmo padrão de comportamento glandular foi observado em próstata de ratos, mostraram que a imunomarcção para ARs diminui cerca de 2 a 7 dias após a castração, mas voltam a crescer após 1 a 3 dias de reposição por T (Prins e Birch, 1993). A hipertrofia das células epiteliais prostáticas nos animais do grupo CP1 corrobora o trabalho Nishino e colaboradores (2009), no qual foi demonstrado que a P4 possui um efeito indutor sobre a próstata dorsolateral provavelmente através de produtos androgênicos e em parte mediado pelos PRs. O desenvolvimento epitelial observado no grupo CP1 coincide com o aumento da expressão dos ARs na próstata ventral, principalmente no estroma glandular, o que indica uma regulação parácrina da P4 sobre o epitélio prostático. Além disso, conversão do hormônio P4 em T, embora pouco estudada, tem se mostrado possível no testículo e na glândula adrenal (Nayfeh e Baggett, 1966; Steinberger e Fischer, 1967; Galena e Turner, 1974; Tcholakian e Steinberger, 1978; Weissel e Krieg, 1997). O crescimento glandular e a regulação positiva do AR na próstata ventral dos gerbilos CP1 pode ser resultante em parte pela conversão da P4 exógena em metabólitos androgênicos,

nesse caso via glândula adrenal (Oettel e Mukhopadhyay, 2004; Andersen e Tufik, 2006), e principalmente pela ineficiência, nessa concentração, em inibir a interação desses com os ARs (Weissel e Krieg, 1997; Sanford et al., 1977).

Na próstata ventral a existência da enzima  $5\alpha$ -redutase é bastante conhecida, sendo responsável pela síntese do hormônio DHT, o qual é considerado um indutor mais potente dos ARs do que a T (Steers, 2001; Nakamura et al., 2005). O fato da P4 também servir como substrato para essa enzima indica um papel regulatório da P4 sobre a glândula (Wiebe, 2006; Huber e Ott, 2009). Além disso, há evidências de que o  $5\alpha$ -DHP, principal metabólito da P4 convertido pela  $5\alpha$ R, é potencialmente capaz de se ligar aos ARs, mediando os efeitos da T sobre o seu receptor (Wright et al., 1979a, 1979b). As características observadas na glândula dos animais do grupo CP3 e CP10 corroboram o fato da P4 inibir as propriedades indutivas da T sobre a próstata. No grupo CP3, a administração de P4 a 0,21 mg, manteve a expressão dos ARs e a morfologia glandular semelhante aos animais castrados, indicando que a síntese de metabólitos androgênicos decorrentes da P4 foi equilibrado através da competição tanto pela enzima  $5\alpha$ -redutase quanto pelos próprios ARs (Massa e Martini, 1972; Morfin et al., 1975). Nos animais CP10, entretanto, a concentração elevada de P4 administrada desencadeou uma maior inibição dos ARs, seja diretamente via ligação a esses receptores ou indiretamente via interação com a enzima  $5\alpha$ -redutase, embora não tenha levado a alterações significativas na histologia glandular.

Outro dado bastante interessante é a indução da secreção prostática observada em todos os grupos tratados com P4. Essa característica indutora da P4 sobre a secreção glandular foi demonstrada por Zarghami e colaboradores (1997) também no tecido mamário, no qual as oscilações hormonais do ciclo reprodutivo levam a um aumento expressivo da secreção do antígeno prostático específico (PSA) cerca de 10 a 12 dias após o pico de P4 na fase luteal. Além disso, algumas progestinas também apresentam esses efeitos estimulatórios sobre a secreção de PSA tanto no tecido prostático quanto no tecido mamário (Montgomery et al., 1992; Galadari et al., 2004).

Dessa forma, embora a P4 seja caracteristicamente um hormônio feminino, ela também pode ser considerada como um regulador endócrino em potencial da próstata

ventral de gerbilos. A P4 na próstata, em concentrações elevadas, tem a capacidade de inibir a expressão dos ARs, modulando os efeitos da T sobre a glândula, sendo a inibição dependente da concentração desse hormônio. Essas observações enriquecem a discussão do uso da progesterona como uma possível droga antiandrogênica na glândula prostática, levando em consideração a ambiguidade funcional desse tipo de abordagem como consequência das características dose-dependentes deste hormônio.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Andersen M.L. & Tufik S. (2006) Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res. Rev.* 51, 136-43.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of Brown Norway rat prostate. *Endocrinol*, 142(9); 4066-4075.

Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR. 1997. Elastic system of the ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*, 32: 27-34.

Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation*, 72(5):198-208.

Corradi LS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. 2009. Increased androgen receptor and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc Res Tech*, 72(12):939-50.

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev*, 8: 338-362.

Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat*, 155: 5-17.

Galadari I, Al-Mazroei M, Alkaabi J. 2004. Prostatic-specific antigen and idiopathic hirsutism in females. *Int J Dermatol*, 43(4):275-7.

Galena HJ, Terner C. 1974. Conversion of progesterone to androgens by non-flagellate germinal cells isolated from seminiferous tubules of rat testis. *J Endocrinol*, 60(2):269-76.

Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol*, 79 (Suppl 2):18-26.

Hiramatsu, M., Maehara, I., Orikasa, S. and Sasano, H. 1996. Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in prostatic hyperplasia and carcinoma. *Histopathology*, 28,163-168.

Horsfall DJ, Mayne K, Ricciardelli C, Rao M, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest*, 70 (Suppl.): 753-793.

Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate*, 52:213-235.

Huber JC, Ott J. 2009. The dialectic role of progesterone. *Maturitas*, 62(4):326-9.

Ing NH, Tornesi MB. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod*, 56(5):1205-15.

Karr JP, Wajzman Z, Madajewicz S, Kirdani RY, Murphy GP, Sandberg AA. 1979. Steroid hormone receptors in the prostate. *J Urol*, 122(2):170-5.

Kloosterboer HJ, Vonk-Noordegraaf CA, Turpijn EW. 1988. Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. *Contraception*, 38(3):325-32.

Labrie C, Simard J, Zhao HF, Pelletier G, Labrie F. 1990. Synthetic progestins stimulate prostatic binding protein messenger RNAs in the rat ventral prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 68(2-3):169-79.

Lange CA. 2008. Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids*, 73(9-10):914-21.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253: 165-174.

Massa R, Martini L. 1972. Interference with the 5 $\alpha$ -reductase system. A new approach for developing antiandrogens. *Gynecol Invest*, 2(1):253-70.

McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. 2008. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation*, 76(6):660-70.

Montgomery BT, Young CY, Bilhartz DL, Andrews PE, Prescott JL, Thompson NF, Tindall DJ. 1992. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*, 21(1):63-73.

- Morfin RF, Bercovici JP, Charles JF, Floch HH. 1975. Testosterone and progesterone metabolism and their interaction in the human hyperplastic prostate. *J Steroid Biochem*, 6(9):1347-52.
- Mowszowicz I, Bieber DE, Chung KW, Bullock LP, Bardin CW. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinology*, 95(6):1589-99.
- Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H (2005) In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12:101-107.
- Nayfeh SN, Baggett B. 1966. Metabolism of progesterone by rat testicular homogenates. I. Isolation and identification of metabolites. *Endocrinology*, 78(3):460-70.
- Nishino T, Ishibashi K, Hirtreiter C, Nishino Y. 2009. The prostate growth stimulation by progesterone is due to androgenic products and progesterone receptor-mediated mechanisms. *Pharmazie*, 64(9):587-9.
- Oettel M, Mukhopadhyay AK. 2004. Progesterone: the forgotten hormone in men?. *Aging Male*, 7(3):236-57.
- Prins GS, Birch L. 1993. Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology*, 132(1):169-78.
- Prins GS, Korach KS. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3):233-44.
- Risbridger GP, Ellem SJ, McPherson SJ. 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol*, 39(3):183-8.
- Rittmaster RS. 1994. Finasteride (review article). *The New England Journal of Medicine*, 330(2): 120-125.
- Sanford EJ, Paulson DF, Rohner TJ Jr, Santen RJ, Bardin CW. 1977. The effects of castration on adrenal testosterone secretion in men with prostatic carcinoma. *J Urol*, 118(6):1019-21.
- Schulze H, Claus S. 1990. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. *Prostate*, 16:331-43.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol*, 92: 281-286.

- Steers WD. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*, 58 (6 Suppl 1):17-24.
- Steinberger E, Ficher M. 1968. Conversion of progesterone to testosterone by testicular tissue at different stages of maturation. *Steroids*, 11(3):351-68.
- Tcholakian RK, Steinberger A. 1978. Progesterone metabolism by cultured Sertoli cells. *Endocrinology*, 103(4):1335-43.
- Thomson AA, Foster BA, Cunha GR. 1997. Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development*, 124(12):2431-9.
- Timme TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, 134(3):1039-45.
- Wang YC, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha Gr. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68, 270-279.
- Weisser H, Krieg M. 1997. Kinetic analysis of androstenedione 5 alpha-reductase in epithelium and stroma of human prostate. *Steroids*, 62(8-9):589-94.
- Wiebe JP. 2006. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 13(3):717-38.
- Wright F, Kirchoffer MO, Giacomini M. 1979a. Natural anti-androgen progesterone. *Ann Endocrinol (Paris)*, 40(3 Suppl):282-93.
- Wright F, Kirchoffer MO, Mauvais-Jarvis P. 1979b. Antagonist action of dihydroprogesterone on the formation of the specific dihydrotestosterone-cytoplasmic receptor complex in rat ventral prostate. *J Steroid Biochem*, 10(4):419-22.
- Zarghami N, Grass L, Diamandis EP. 1997. Steroid hormone regulation of prostate-specific antigen gene expression in breast cancer. *Br J Cancer*, 75(4):579-88.

**Tabela I.** Valores referentes às análises biométricas, esterológicas e morfométricas da próstata ventral do gerbilo nos diferentes tratamentos. (MD ± DP).

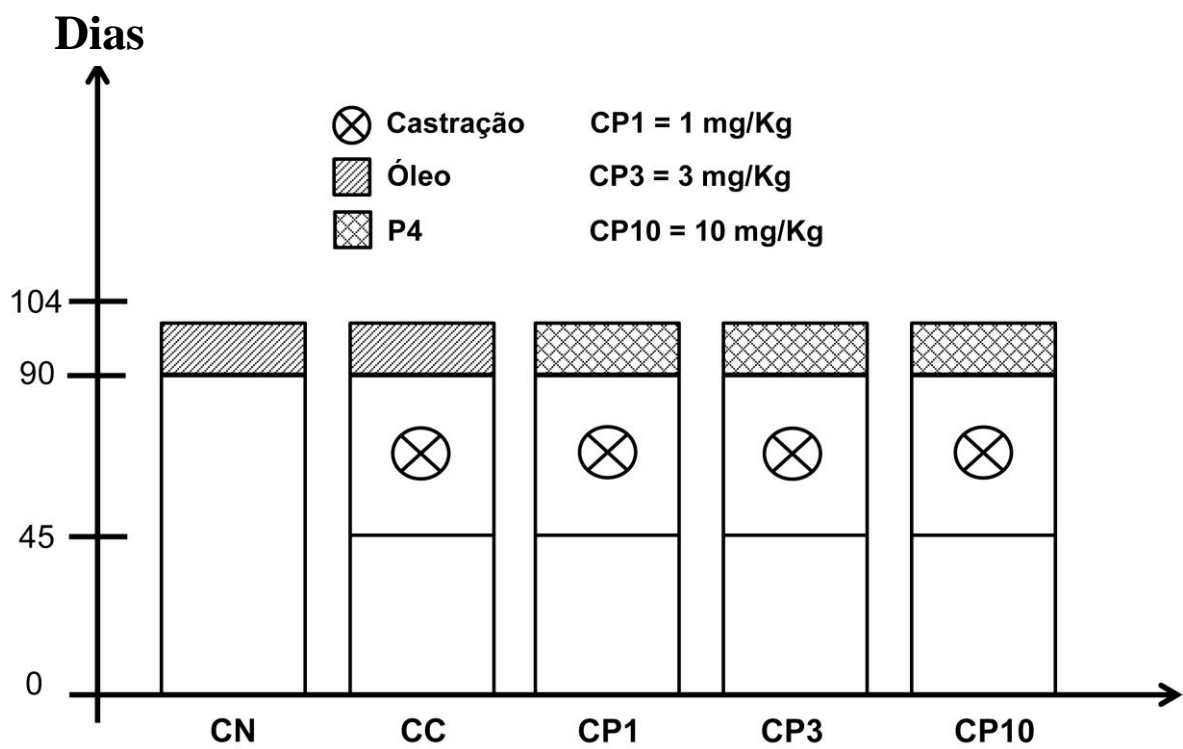
<b>Parâmetros</b>	<b>Grupos Experimentais</b>				
<b>BIOMETRIA</b>	<i>CN</i>	<i>CC</i>	<i>CPI</i>	<i>CP3</i>	<i>CP10</i>
<i>PESO (g)</i>					
Animal (A)	67,17 ± 2,64	65,20 ± 3,56	66,15 ± 1,93	68,00 ± 2,05	57,20 ± 2,10
Próstata Ventral (PV)	0,53 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,035 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,050 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,027 ± 0,001 <sup>b</sup>
Relativo (A/PV)	0,008 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,0004 ± 0,00002 <sup>b</sup>	0,0005 ± 0,00003 <sup>b</sup>	0,0007 ± 0,00004 <sup>b</sup>	0,0005 ± 0,00002 <sup>b</sup>
<b>ESTEREOLOGIA</b>	<i>CN</i>	<i>CC</i>	<i>CPI</i>	<i>CP3</i>	<i>CP10</i>
<i>VOLUME RELATIVO (%)</i>					
Epitélio	40,08 ± 1,60 <sup>a</sup>	31,61 ± 1,01 <sup>b</sup>	35,00 ± 1,17 <sup>c</sup>	29,84 ± 1,34 <sup>b</sup>	24,15 ± 1,29 <sup>d</sup>
Estroma Muscular	14,77 ± 2,91 <sup>a</sup>	35,31 ± 1,67 <sup>b</sup>	24,77 ± 1,19 <sup>c</sup>	34,46 ± 1,46 <sup>b</sup>	45,08 ± 1,43 <sup>d</sup>
Lúmen	30,69 ± 3,39 <sup>a</sup>	19,15 ± 1,76 <sup>b</sup>	8,46 ± 1,36 <sup>c</sup>	14,61 ± 1,33 <sup>b</sup>	9,85 ± 1,58 <sup>c</sup>
Estroma Não Muscular	14,46 ± 1,81 <sup>a</sup>	13,92 ± 1,32 <sup>a</sup>	31,77 ± 2,53 <sup>b</sup>	21,08 ± 1,91 <sup>b</sup>	20,92 ± 2,14 <sup>b</sup>
<b>MORFOMETRIA (µm)</b>	<i>CN</i>	<i>CC</i>	<i>CPI</i>	<i>CP3</i>	<i>CP10</i>
Epitélio	20,15 ± 2,03 <sup>a</sup>	13,43 ± 1,42 <sup>b</sup>	16,17 ± 1,64 <sup>c</sup>	13,12 ± 2,08 <sup>b</sup>	13,36 ± 1,75 <sup>b</sup>
Estroma	14,62 ± 2,52 <sup>a</sup>	13,86 ± 1,92 <sup>a</sup>	11,89 ± 2,30 <sup>b</sup>	10,55 ± 1,31 <sup>c</sup>	11,59 ± 1,59 <sup>b</sup>

As letras sobrescritas (a, b, c, d) correspondem às diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

## FIGURAS E LEGENDAS

**Figura 1.** Esquema representativo dos tratamentos e dos grupos experimentais utilizados. CN: grupo controle normal, formado por animais adultos tratados com óleo mineral (Nujol®); CC: grupo controle castrado, composto por animais castrados que receberam doses subcutâneas de óleo mineral (Nujol®); CP1: castrado progesterona 1, formado por animais castrados que receberam doses subcutâneas de P4 na concentração de 1 mg/kg ; CP3: grupo castrado progesterona 3, composto por animais castrados que receberam doses subcutâneas de P4 em concentrações de 3 mg/kg; CP10: grupo castrado progesterona 10, formado por gerbilos castrados que receberam doses subcutâneas de P4 em concentrações de 10 mg/kg. Todos os hormônios foram administrados no de 0,1 ml/kg/48h. P4: progesterone  $\geq 99\%$  (Sigma-aldrich / P0130).

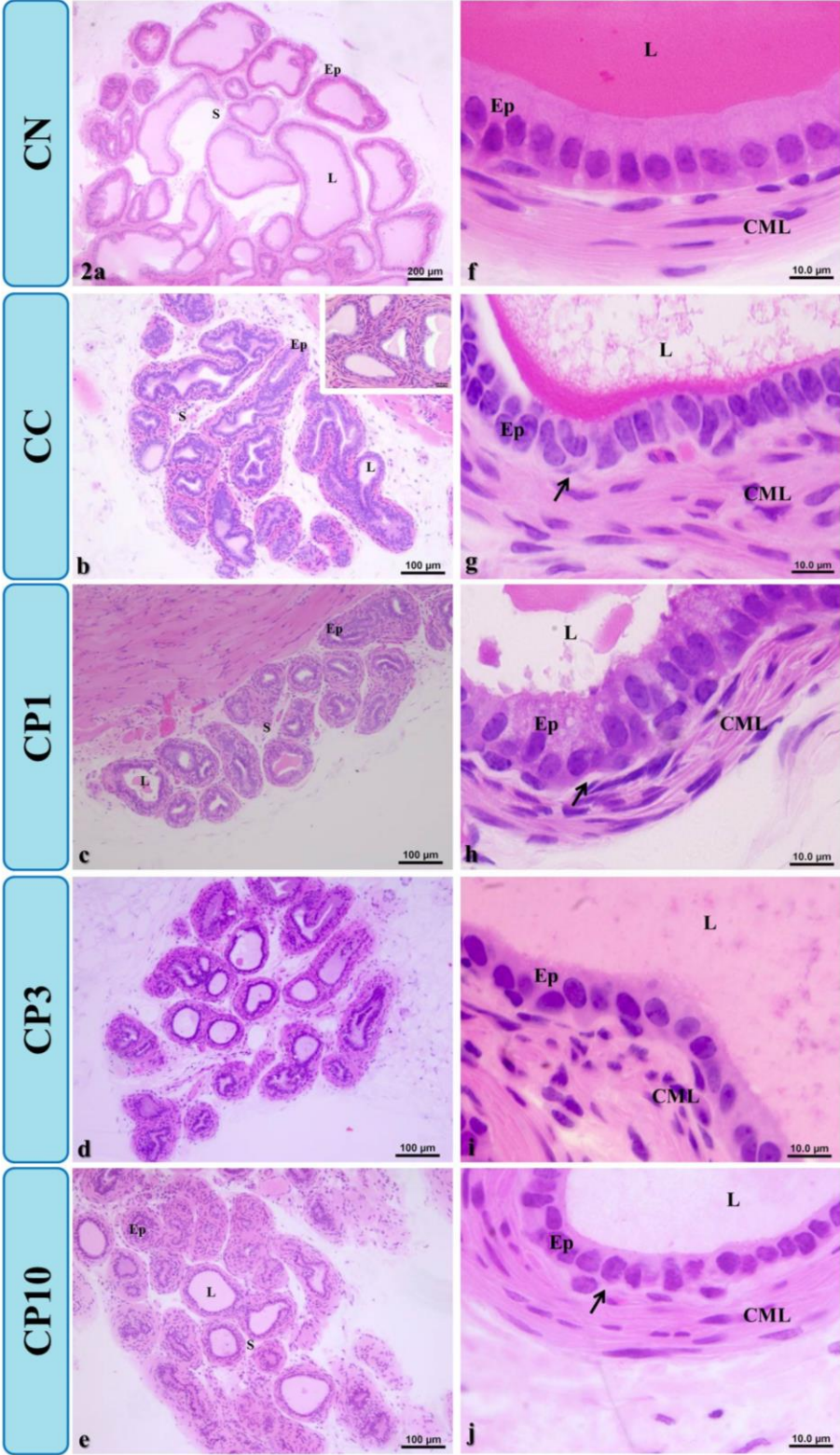




1

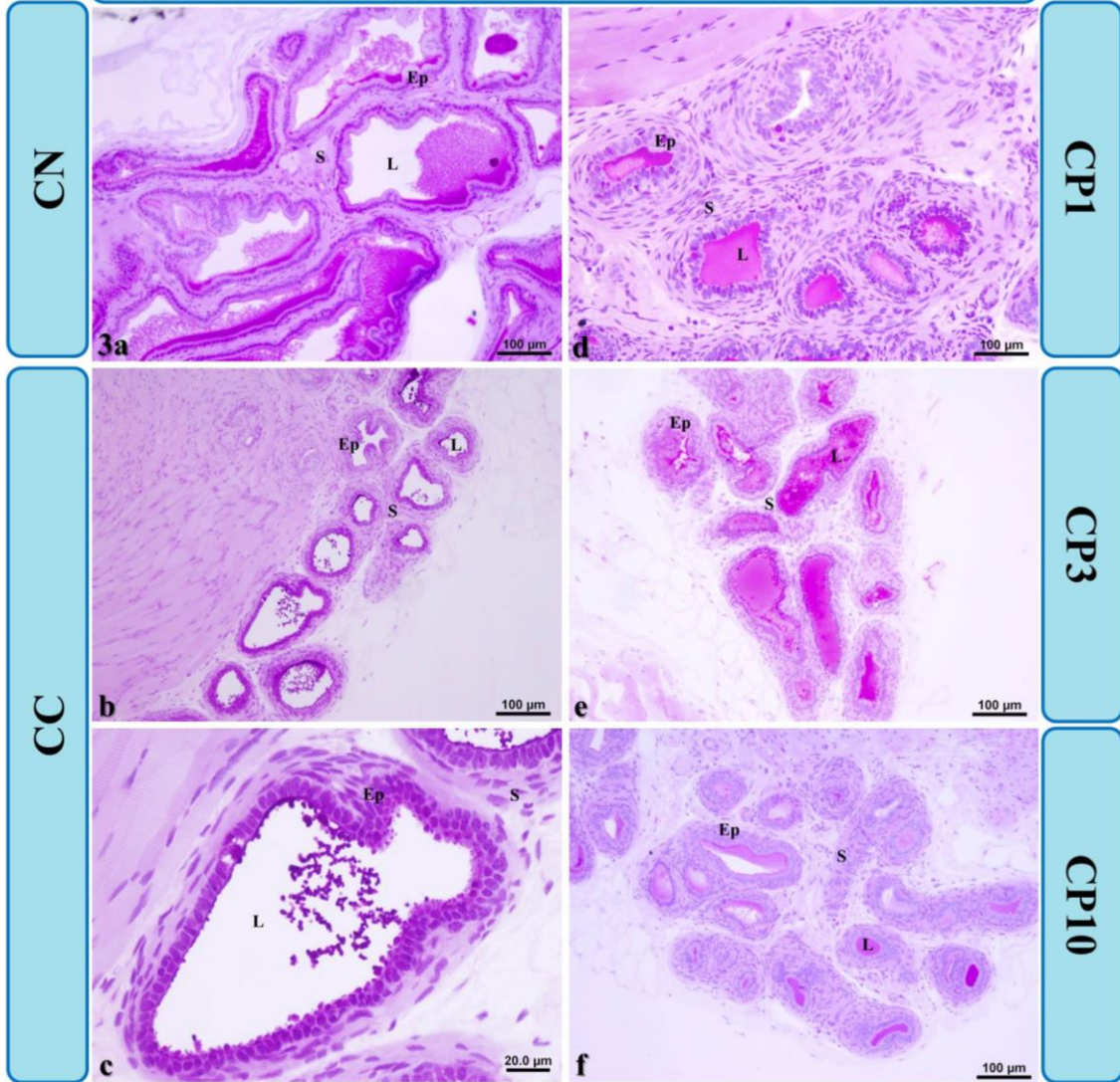
**Figura 2.** Cortes histológicos da glândula prostática ventral de gerbilos nos diferentes grupos experimentais, corados pela Hematoxilina & Eosina. CN: controle intacto; CC: controle castrado; CP1: castrado + progesterona (1 mg/kg); CP3: castrado + progesterona (3 mg/kg); CP10: castrado + progesterona (10 mg/kg). CML: células muscular lisa; Ep: epitélio; L: lúmen; S: estroma; Seta: membrana basal.

## Morfologia Geral (H&E)



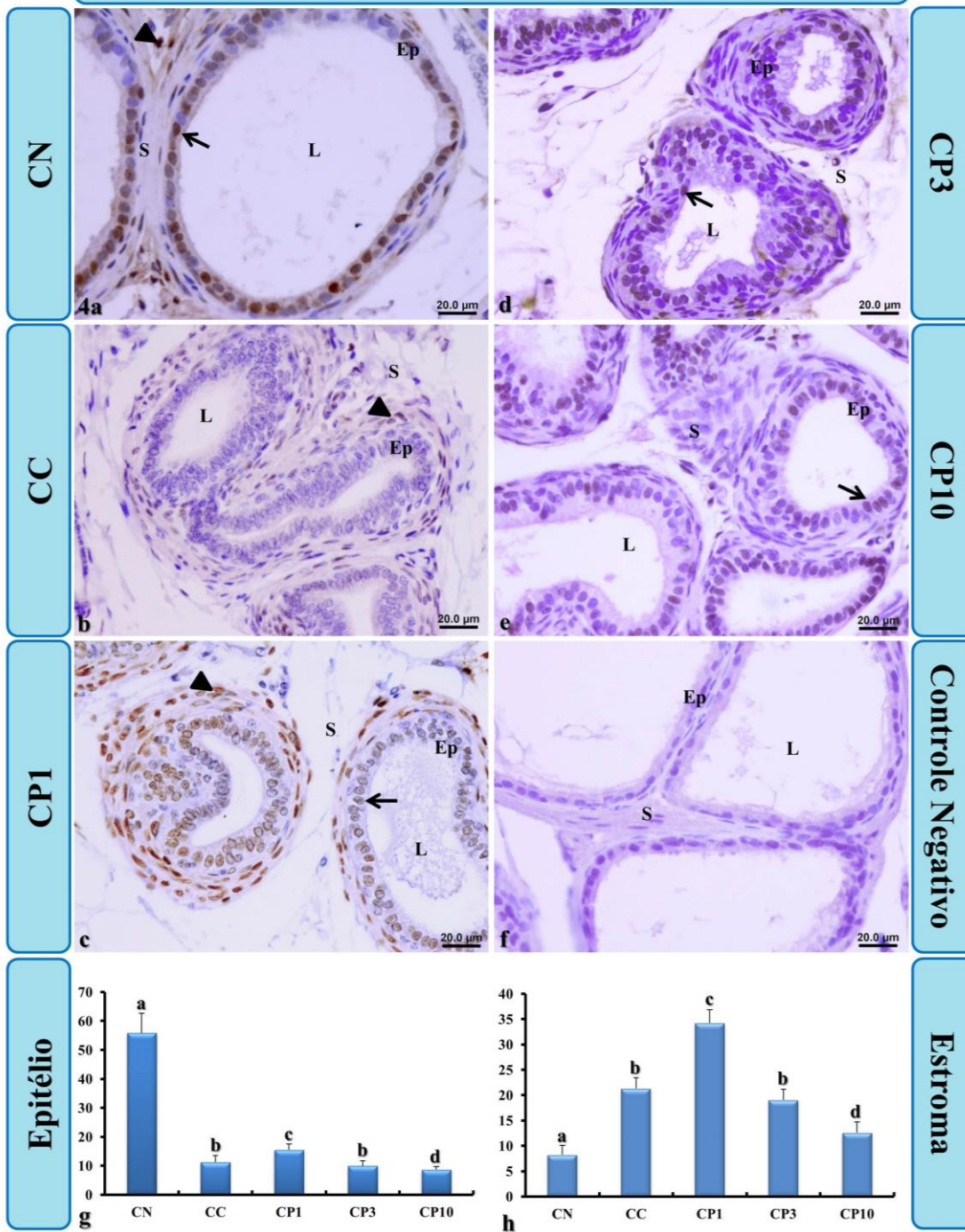
**Figura 3.** Aspectos gerais da secreção glandular da próstata ventral diante dos diferentes tratamentos empregados. Corados pela técnica de ácido periódico de Schiff (PAS). CN: controle intacto; CC: controle castrado; CP1: castrato + progesterona (1 mg/kg); CP3: castrato + progesterona (3 mg/kg); CP10: castrado + progesterona (10 mg/kg). Ep: epitélio; L: lúmen; S: estroma.

## Ácido Periódico de Schiff (PAS)



**Figura 4.** Próstatas de gerbilos adultos submetidos à imunomarcção para receptor de andrógeno (AR). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. [g, h] gráficos representativos da quantificação das imunomarcções para o AR. As letras a, b, c, d, indicam as diferenças estatísticas entre os grupos. Ep: epitélio; L: lúmen; S: estroma; Cabeça de seta: células marcadas no estroma; Seta: células marcadas no epitélio prostático.

## Receptor de Andr3geno (AR)



## CONCLUSÕES GERAIS

---

1. A glândula prostática masculina (lobo ventral) e femina do gerbilo da Mongólia possuem respostas semelhantes à castração cirúrgica e suplementação de progesterona, estradiol e progesterona;
2. A progesterona possui características anabólicas sobre a próstata, semelhantes à testosterona e estradiol, porém com um menor potencial;
3. A administração de progesterona pós-castração, independentemente do equilíbrio entre a testosterona e o estradiol, promove o desenvolvimento de hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais prostáticas;
4. Os receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  e o receptor de progesterona são regulados positivamente pela progesterona;
5. A proliferação e o índice apoptótico das células prostáticas são potencialmente regulados pela progesterona, principalmente nos tratamentos conjuntos com a testosterona e o estradiol;
6. A ação da progesterona na próstata é dose-dependente, podendo induzir (baixas concentrações) ou inibir (altas concentrações) os receptores de andrógeno, regulando assim a ação dos andrógenos sobre a estrutura epitelial e secreção da glândula prostática;
7. A reposição associada de hormônios demonstrou que a progesterona possui características supressoras sobre os efeitos anabólicos da testosterona e também do estradiol sobre a glândula prostática, muito embora essa capacidade seja limitada;
8. Enfim, a progesterona parece contribuir também para o equilíbrio hormonal que regula a fisiologia prostática, exercendo um papel de caráter protetivo, regulando a proliferação celular, apoptose, crescimento e atividade secretora da próstata masculina e feminina.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abrahamsson PA, di Sant'Agnese PA. 1993. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Andro*, 14(5):307-9.
- Addiego F, Belzer EG, Comolli J, Moger W, Perry JD, Whipple B. 1981. Female ejaculation: a case study. *J Sex Res*, 17:1-13.
- Andersen M.L. & Tufik S. (2006) Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res. Rev.* 51, 136-43.
- Andersen ML, Tufik S. 2006. Does male sexual behavior require progesterone?. *Brain Res Rev*, 51(1):136-43.
- Aron D.C., Finding J.W. & Tyrrell J.B. (2004) Glucocorticoids and adrenal androgens. In: F.S. Greenspan. Ed D.G. Gardner. *Basic and Clinical Endocrinology*, Lange Medical Books pp 362–411.
- Auger AP. 2001. Ligand-independent activation of progesterin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction*, 122(6):847-55.
- Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR. 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology*, 136:4368–4376.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of Brown Norway rat prostate. *Endocrinol*, 142(9); 4066-4075.
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. 2004. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11(3):537-51.
- Bass R., Perry B., Langenstroer P., Thrasher J.B., Dennis K.L., Tawfik O. & Holzbeierlein J. (2009) Effects of short-term finasteride on apoptotic factors and androgen receptors in prostate cancer cells. *J. Urol.* 181, 615-9.
- Bese T, Vural A, Ozturk M, Dagistanli F, Demirkiran F, Tuncdemir M, Arvas M, Sanioglu C, Kosebay D. 2006. The effect of long-term use of progesterone therapy on proliferation and apoptosis in simple endometrial hyperplasia without atypia. *Int J Gynecol Cancer*, 16(2):809-13.
- Biancardi M.F., Santos F.C., Madi-Ravazzi L., Góes R.M., Vilamaior P.S., Felisbino S.L. & Taboga S.R. (2010) Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female

prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype. *Anat. Rec. (Hoboken)* 293, 2163-75.

Brenner R.M., West N.B. & McClellan M.C. (1990) Estrogen and progestin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol. Reprod.* 42, 11-9.

Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, McMahon JA, McMahon AP, Weinberg RA. 2000. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev*, 14(6):650-4.

Brown T., Clark A. & MacLusky N. (1987) Regional sex differences in progesterone receptor induction in the rat hypothalamus: effects of various doses of estradiol benzoate. *J. Neurosci.* 7, 2529–2536.

Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Murillo E, Ramirez E, Lira A. 2001. New progesterone esters as 5alpha-reductase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 49(9):1081-4.

Campos SG, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol*, 91(5):394-407.

Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR. 1997. Elastic system of the ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*, 32: 27-34.

Clark MM, Crews D, Galef BG. 1991. Concentrations of sex steroids hormones in pregnant and fetal Mongolian gerbils. *Physiol Behav*, 49:239.

Cooke G.M., Pothier F. & Murphy B.D. (1997) The effects of progesterone, 4,16-androstadien-3-one and MK-434 on the kinetics of pig testis microsomal testosterone-4-ene-5alpha-reductase activity. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 60, 353-9.

Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*, 39(8):1312-24.

Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation*, 72(5):198-208.

Corradi LS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. 2009. Increased androgen receptor and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc Res Tech*, 72(12):939-50.

- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol*, 51:7-11.
- Cunha GR. 1972a. Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat Rec*, 172(2):179-95
- Cunha GR. 1972b. Tissue interactions between epithelium and mesenchyme of urogenital and integumental origin. *Anat Rec*, 172(3):529-41.
- Cunha GR, Bigsby RM, Cooke PS, Sugimura Y. 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ*, 17(3):137-48.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev*, 8: 338-362.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat (Basel)*, 155(1):63-72.
- Cunha G.R., Hayward S.W. & Wang Y.Z. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, 70, 473–485.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Steroid Biochem Mol Biol*, 92(4):221-36.
- Cunha G.R. 2008. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation*, 76, 578-86.
- Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. 2004. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biology International*, 28:335-344.
- Custódio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec (Hoboken)*, 291(4):463-74.
- de Graaf R. 1672. De mulierum organis generationi inservientibus. Tractatus novus demonstrans tani homines et animália caetera omnia, quac vivípara dicuntur, haud minus quam vivípara ab ovo origenem ducere. Leyden: [no ed.]. 66p.
- De Maria R, Divari S, Spada F, Oggero C, Mulasso C, Maniscalco L, Cannizzo FT, Bianchi M, Barbarino G, Brina N, et al. 2010. Progesterone receptor gene expression in the accessory sex glands of veal calves. *Vet Rec*, 167(8):291–296.

- De Marzo AM, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. 1998. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol*, 153(3):911-9.
- Diamandis EP, Yu H. 1997. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am*, 24:275- 282.
- Divari S, Mulasso C, Uslenghi F, Cannizzo FT, Spada F, De Maria R, Brina N, Biolatti B. 2011. Progesterone receptor up-regulation: a diagnostic tool for the illicit use of oestrogens in adult beef cattle. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(12):1677-86.
- Dohler K. & Wuttke W. (1974) Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*. 94, 1003–1008.
- Donjacour AA, Thomson AA, Cunha GR. 2003. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol*, 261(1):39-54.
- Ellem S.J. & Risbridger G.P. (2009) The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1155, 174-86.
- Fajer A.B., Holzbauer M. & Newport H.M. 1971. The contribution of the adrenal gland to the total amount of progesterone produced in the female rat. *J. Physiol*, 214, 115-26.
- Farnsworth WE. 1999. Prostate stroma: physiology. *Prostate*, 38(1):60-72.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*, 103(1):41-50.
- Feek CM, Tuzi NL, Edwards CR. 1989. The adrenal gland and progesterone stimulates testicular steroidogenesis in the rat in vivo. *J Steroid Biochem*, 32(4):573-9.
- Fernandez-Valdivia R, Mukherjee A, Ying Y, Li J, Paquet M, DeMayo FJ, Lydon JP. 2009. The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveologenesis in the mammary gland of the virgin mouse. *Dev Biol*, 328(1):127-39.
- Ficher M, Steinberger E. 1971. In vitro progesterone metabolism by rat testicular tissue at different stages of development. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 68(2):285-92.
- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. 2002. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat*, 184:341-345.

- Flores E, Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, García G, Ramírez E. 2003. Effect of a novel steroid (PM-9) on the inhibition of 5alpha-reductase present in *Penicillium crustosum* broths. *Steroids*, 68(3):271-5.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod*, 79(6):1084-91.
- Foidart JM, Colin C, Denoo X, Desreux J, Béliard A, Fournier S, de Lignières B. 1998. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells. *Fertil Steril*, 69(5):963-9.
- Freestone SH, Marker P, Grace OC, Tomlinson DC, Cunha GR, Harnden P, Thomson AA. 2003. Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. *Dev Biol*, 264(2):352-62.
- Gadkar-Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. 2005. Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Front Biosci*, 10:2118-30.
- Galadari I, Al-Mazroei M, Alkaabi J. 2004. Prostatic specific antigen and idiopathic hirsutism in females. *Int J Dermatol*, 43:275-277.
- Galena HJ, Terner C. 1974. Conversion of progesterone to androgens by non-flagellate germinal cells isolated from seminiferous tubules of rat testis. *J Endocrinol*, 60(2):269-76.
- Gallardo F, Mogas T, Baró T, Rabanal R, Morote J, Abal M, Reventós J, Lloreta J. 2007. Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. *J Comp Pathol*, 36(1):1-8.
- Gann P.H., Hennekens C.H., J. Ma, Longcope C. & Stampfer M.J. (1996) Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1118-26.
- García-Flórez M, Oliveira CA, Carvalho HF. 2005. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol*, 38(4):487-497.
- Gavin BJ, McMahon AP. 1992. Differential regulation of the Wnt gene family during pregnancy and lactation suggests a role in postnatal development of the mammary gland. *Mol Cell Biol*, 12(5):2418-23.
- Gräfenberg E. 1950. The role of the urethra in female orgasm. *Int J Sexol*, 3:145-148.
- Graham J.D. & Clarke C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18, 502-19.

- Gross SA, Didio LJA. 1987. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J Submicrosc Cytol*, 19:77-84.
- Guyton AC, Hall J. 2006. Textbook of medical physiology. 11ed. Pennsylvania: Elsevier Philadelphia, 1115pp.
- Härkönen PL, Mäkelä SI. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 92:297-305.
- Harmelin A, Danon T, Kela I, Brenner O. 2005. Biopsy of the mouse prostate. *Lab Anim*, 39(2):215-20.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 155(2):94-103.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol*, 79 (Suppl 2):18-26.
- Hayward SW, Cunha GR. 2000. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am*, 38:1-14.
- Hines TM. 2001. The G-spot: A modern gynecologic myth. *Am J Obstet Gynecol*, 185:359-362.
- Hiramatsu, M., Maehara, I., Orikasa, S. and Sasano, H. 1996. Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in prostatic hyperplasia and carcinoma. *Histopathology*, 28,163-168.
- Hopwood D, Levison DA. 1976. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol*, 119(3):159-66.
- Horsfall DJ, Mayne K, Ricciardelli C, Rao M, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD. 1994. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest*, 70 (Suppl.): 753-793.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate*, 52:213-235.
- Huber JC, Ott J. 2009. The dialectic role of progesterone. *Maturitas*, 62(4):326-9.
- Hudson DL, Guy AT, Fry P, O'Hare MJ, Watt FM, Masters JRW. 2001. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: Identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem*, 49(2):271-278.

- Huffman JW. 1948. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am J Obstet Gynecol*, 55:86-101.
- Huffman JW. 1951. Clinical significance of the paraurethral ducts and glands. *Arch Surg*, 62:615-625.
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson JA. 2004. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(25):9375-80.
- Ing N.H. & Tornesi M.B. 1997. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod*, 56:1205-15.
- Ismail PM, Amato P, Soyal SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW, Lydon JP. 2003. Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis - as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids*, 68(10-13):779-87.
- Jo T, Terada N, Saji F, Tanizawa O. 1993. Inhibitory effects of estrogen, progesterone, androgen and glucocorticoid on death of neonatal mouse uterine epithelial cells induced to proliferate by estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46(1):25-32.
- Kalra PS, Kalra SP. 1977. Circadian periodicities of serum androgens, progesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: the effects of hypothalamic deafferentation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology*, 101(6):1821-7.
- Karr JP, Wajzman Z, Madajewicz S, Kirdani RY, Murphy GP, Sandberg AA. 1979. Steroid hormone receptors in the prostate. *J Urol*, 122(2):170-5.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 9(5):1603-14.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. 2005. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119
- Kloosterboer HJ, Vonk-Noordegraaf CA, Turpijn EW. 1988. Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. *Contraception*, 38(3):325-32.
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS. 2002. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem*, 277(10):8531-7.

- Kocak M. 2004. Serum levels of prostate-specific antigen and androgens after nasal administration of gonadotropin releasing hormone-agonist in hirsute women. *Gynecol Endocrinol*, 18:179-185.
- Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. 1999. Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol*, 77(2):188-93.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(12):5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3):863-70.
- Kumar VL, Wadhwa SN, Kumar V, Farooq A. 1990. Androgen, estrogen, and progesterone receptor contents and serum hormone profiles in patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Surg Oncol*, 44(2):122-8.
- Kumar VL, Majumder PK. 1995. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*, 27(3):231-43.
- Kurita T., Lee K.J., Cooke P.S., Taylor J.A., Lubahn D.B. & Cunha G.R. 2000. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod*, 62:821-30.
- Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BV, Isaacs JT, Dahiya R, Cunha GR. 2001. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive systems. *Cell Death Differ*, 8:192-200.
- Kyprianou N, Bruckheimer EM, Guo Y. 2000. Cell proliferation and apoptosis in prostate cancer: significance in disease progression and therapy. *Histol Histopathol*, 15(4):1211-23.
- Labrie C, Simard J, Zhao HF, Pelletier G, Labrie F. 1990. Synthetic progestins stimulate prostatic binding protein messenger RNAs in the rat ventral prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 68(2-3):169-79.
- Lagrange A.H. & Kelly M.J. Neuroactive steroid. In: Henry H.L., Norman A.N. (Eds.), *Encyclopedia of Hormones*, vol. 3. Academic Press, pp. 8-22.
- Lamm ML, Catbagan WS, Laciak RJ, Barnett DH, Hebner CM, Gaffield W, Walterhouse D, Iannaccone P, Bushman W. 2002. Sonic hedgehog activates mesenchymal Gli1 expression during prostate ductal bud formation. *Dev Biol*, 249(2):349-66.



- Lange CA. 2008. Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids*, 73(9-10):914-21.
- Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT. 1997. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31:131-138.
- Lee C. 1981. Physiology of castration-induced regression in rat prostate. *Prog Clin Biol Res*, 75A:145-59.
- Van Leenders GJ, Schalken JA. 2003. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 46 Suppl:S3-10.
- Lessey B.A., Killam A.P., Metzger D.A., Haney A.F., Greene G.L. & McCarty Jr K.S. (1988) Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 67, 334-40.
- Lösel R, Wehling M. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1):46-56.
- Luetjens C.M., Didolkar A., Kliesch S., Paulus W., Jeibmann A., Böcker W., Nieschlag E. & Simoni M. (2006) Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *J. Endocrinol.* 189, 529-39.
- Lydon J.P., DeMayo F.J., Funk C.R., Mani D., Hughes A.R., Montgomery Jr C.A., Shyamala G., Conneely O.M. & O'Malley B.W. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253:165-174.
- Martin L, Finn CA, Carter J. 1970. Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J Reprod Fertil*, 21(3):461-9.
- Massa R, Martini L. 1972. Interference with the 5 $\alpha$ -reductase system. A new approach for developing antiandrogens. *Gynecol Invest*, 2(1):253-70.
- McCrea LE. 1952. Malignancy of the female urethra. *Urol Surv*, 2:85-149.
- McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. 2008. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation*, 76(6):660-70.
- Montgomery BT, Young CY, Bilhartz DL, Andrews PE, Prescott JL, Thompson NF, Tindall DJ. 1992. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*, 21(1):63-73.

- Morfin RF, Bercovici JP, Charles JF, Floch HH. 1975. Testosterone and progesterone metabolism and their interaction in the human hyperplastic prostate. *J Steroid Biochem*, 6(9):1347-52.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392(1):49-53.
- Mowszowicz I, Bieber DE, Chung KW, Bullock LP, Bardin CW. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinology*, 95(6):1589-99.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. 2004. Reproductive tissue-selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 128(2):139-46.
- Murakami R., Shughrue P.J., Stumpf W.E., Elger W. & Schulze P.E. (1990) Distribution of progestin-binding cells in estrogen-treated and untreated neonatal mouse uterus and oviduct: autoradiographic study with [125I] progestin. *Histochemistry*. 94, 155-9.
- Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H. 2005. In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12:101-107.
- Naville D, Keeney DS, Jenkin G, Murry BA, Head JR, Mason JJ. 1991. Regulation of expression of male-specific rat liver microsomal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol*, 5(8):1090-100.
- Nayfeh SN, Baggett B. 1966. Metabolism of progesterone by rat testicular homogenates. I. Isolation and identification of metabolites. *Endocrinology*, 78(3):460-70.
- Nemeth JA, Lee C. 1996. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate*, 28(2):124-8.
- Netter FH, 1965. Reproductive system – The Ciba collection of medical illustration. 5ed. CIBA,., New York, 286p.
- Nicholson TM, Ricke WA. 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*, 82(4-5):184-99.
- Nishino N, Totsukawa K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45(3):283-8.
- Nishino T, Ishibashi K, Hirtreiter C, Nishino Y. 2009. The prostate growth stimulation by progesterone is due to androgenic products and progesterone receptor-mediated mechanisms. *Pharmazie*, 64(9):587-9.

- Oettel M, Mukhopadhyay AK. 2004. Progesterone: the forgotten hormone in men?. *Aging Male*, 7(3):236–57.
- Ohta Y., Sato T. & Iguchi T. 1993. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. *Biol Reprod*, 48:205-13.
- Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. 2007. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. *Cell Biol Int*, 31(3):235-45.
- Oliveira S.M., Santos F.C.A., Corradi L.S., Góes R.M, Vilamaior P.S. & S.R. Taboga. 2011. Microscopic evaluation of proliferative disorders in the gerbil female prostate: evidence of aging and the influence of multiple pregnancies. *Micron*, 42:712-7.
- Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. 2005. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5):1484-9.
- Omoto Y. 2008. Estrogen receptor-alpha signaling in growth of the ventral prostate: comparison of neonatal growth and postcastration regrowth. *Endocrinology*, 149:4421-7.
- Parczyk K., Madjno R., Michna H., Nishino Y. & Schneider M.R. 1997. Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 63:309-16.
- Pelletier A, Labrie F, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F. 2001. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450 (c17) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol*, 171:373–383.
- Peluso, JJ. 2006 . Multiplicity of Progesterone’s Actions and Receptors in the Mammalian Ovary. *Biol Reprod*, 75(1):2-8.
- Pérez-Ornelas V, Cabeza M, Bratoeff E, Heuze I, Sánchez M, Ramírez E, Naranjo-Rodríguez E. 2005. New 5alpha-reductase inhibitors: in vitro and in vivo effects. *Steroids*, 70(3):217-24.
- Preslock JP. 1980. A review of in vitro testicular steroidogenesis in rodents, monkeys and humans. *J Steroid Biochem*, 13(8):965-75.
- Price, D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr*, 12:1-27.

Prins GS, Birch L, Greene GL. 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, 129(6):3187-99.

Prins GS, Birch L. 1993. Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology*, 132(1):169-78.

Prins GS, Birch L. 1995. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, 136(3):1303-14.

Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS. 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res*, 61(16):6089-97.

Prins GS, Korach KS. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3):233-44.

Prins GS, Putz O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, 6(6):641-59.

Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P. 2003. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 84(4):393-410.

Rajaram RD, Brisken C. 2012 Paracrine signaling by progesterone. *Mol Cell Endocrinol*, 357(1-2):80-90.

Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Samloff IM, Stamey TA 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.*, 136: 1148-1152.

Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM. 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(3):233-45.

Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. 2008. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J*, 22(5):1512-20.

Risbridger G.P., Wang H., Frydenberg M., Cunha G.R. 2001. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology*, 142:2443–2450.

Risbridger GP, Ellem SJ, McPherson SJ. 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol*, 39(3):183-8.

Rittmaster RS. 1994. Finasteride (review article). *The New England Journal of Medicine*, 330(2): 120-125.

Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)*, 290(10):1233-47.

Rochel-Maia SS, Santos FC, Alonso-Magdalena P, Góes RM, Vilamaior PS, Warner M, Gustafsson JÅ, Taboga SR. 2013. Estrogen receptors alpha and Beta in male and female gerbil prostates. *Biol Reprod*, 88(1):7.

Rotello RJ, Hocker MB, Gerschenson LE. 1989. Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol*, 134(3):491-5.

Rotello RJ, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE. 1992. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol*, 140(2):449-56.

Rubin R, Baserga R. 1995. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab Invest*, 73(3):311-31.

Rumpold H, Mascher K, Untergasser G, Plas E, Hermann M, Berger P. 2002. Trans-differentiation of prostatic stromal cells leads to decreased glycoprotein hormone alpha production. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(11):5297-303.

Saegusa M, Okayasu I. 1998. Progesterone therapy for endometrial carcinoma reduces cell proliferation but does not alter apoptosis. *Cancer*, 83(1):111-21.

Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM. 1979. Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am. J. Anat*, 156: 15-35.

Sanford EJ, Paulson DF, Rohner TJ Jr, Santen RJ, Bardin CW. 1977. The effects of castration on adrenal testosterone secretion in men with prostatic carcinoma. *J Urol*, 118(6):1019-21.

Santos F.C.A., Carvalho H.F., Góes R.M. & Taboga S.R. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell*, 35:447-457.

Santos FCA, Leite RP, Góes RM, Taboga SR. 2005. Tamoxifen effects on the gerbil female prostate. *Braz J Morphol Sci Suppl*, 3:51-52.

Santos F.C.A., Taboga S.R. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Animal Reprod*, 3:3-18.

Santos F.C., Leite R.P., Custodio A.M., Carvalho K.P., Monteiro-Leal L.H., Santos A.B., Goes R.M., Carvalho H.F. & Taboga S.R. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75:370-9.

Santos F.C., Custodio A.M., Campos S.G., Vilamaior P.S., Góes R.M. & Taboga S.R. 2008. Antiestrogen Therapies Affect Tissue Homeostasis of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate and Ovaries. *Biol Reprod*, 79:674-85.

Santos F.C., Rochel-Maia S.S., Fochi R.A., Justulin Jr L.A., Santos S.A., Vilamaior P.S., Felisbino S.L., Góes R.M. & S.R. Taboga. 2011. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol*, 173:419-27.

Satoh H, Mori K, Furuhashi K. 2001. Morphological and immunohistochemical characteristics of the heterogeneous prostate-like glands (paraurethral gland) seen in female Brown-Norway rats. *Toxicol Pathol*, 29(2):237-41.

Satterfield MC, Hayashi K, Song G, Black SG, Bazer FW, Spencer TE. 2008. Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus. *Biol Reprod*, 79(6):1226-36.

Sauter ER, Daly M, Linahan K, Ehya H, Engstrom PF, Bonney G, Ross EA, Yu H, Diamandis E. 1996. Prostate-specific antigen levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5(12):967-70.

Sauter ER, Babb J, Daly M, Engstrom PF, Ehya H, Malick J, Diamandis E. 1998. Prostate-specific antigen production in the female breast: association with progesterone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(4):315-20.

Scarano WR, de Sousa DE, Campos SG, Corradi LS, Vilamaior PS, Taboga SR. 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, 89(1):25-37.

Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. 2006. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288(11):1190-200.

Schacter L., Rozenzweig M., Canetta R., Kelley S., Nicaise C. & Smaldone L. 1989. Megestrol acetate: clinical experience. *Cancer Treat Rev* 16, 49-63.

Schmidt S, Franke M, Lehmann J, Loch T, Stöckle M, Weichert-Jacobsen K. 2001. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology*, 57:717-720.

- Schubach G. 2002. The G-spot is the female prostate. *Am J Obstet Gynecol*, 186: 850.
- Schulze H, Claus S. 1990. Histological localization of estrogen receptors in normal and diseased human prostates by immunocytochemistry. *Prostate*, 16:331–43.
- Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gadkar S, Puri C. 2005. Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(1):474-83.
- Shao R, Weijdegård B, Ljungström K, Friberg A, Zhu C, Wang X, Zhu Y, Fernandez-Rodriguez J, Egecioglu E, Rung E, Billig H. 2006 . Nuclear progesterone receptor A and B isoforms in mouse fallopian tube and uterus: implications for expression, regulation, and cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(1):E59-72.
- Shapiro E, Huang H, McFadden DE, Masch RJ, NG E, Lepor H, Wu XR. 2004. The prostatic utricle is not a Müllerian duct remnant: immunohistochemical evidence for a distinct urogenital sinus origin. *J Urol*, 172:1753-1756.
- Sharifi-Aghdas F, Ghaderian N. 2004. Female paraurethral cysts: experience of 25 cases. *BJU Int*, 93:353-356.
- Shehata R. 1980. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat*, 107:286-288.
- Simanainen U, Allan CM, Lim P, McPherson S, Jimenez M, Zajac JD, Davey RA, Handelsman DJ. 2007. Disruption of prostate epithelial androgen receptor impedes prostate lobe-specific growth and function. *Endocrinology*, 148(5):2264-72.
- Simanainen U, Allan CM, Lim P, McPherson S, Jimenez M, Zajac JD, Davey RA, Handelsman DJ. 2007. Disruption of prostate epithelial androgen receptor impedes prostate lobe-specific growth and function. *Endocrinology*, 148(5):2264-72.
- Sisk C.L. & Meek L.R. 2001. Sexual and reproductive behaviors. *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8 Unit 8.2.
- Skene AJC. 1880. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am J Obstetr Diss Women Child*, 13:265-270.
- Slayden OD, Hirst JJ, Brenner RM. 1993. Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterin treatment. *Endocrinology*, 132(4):1845-56.
- Slyater MV, Anzano MA, Kadomatsu K, Smith JM, Sporn MB. 1994. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res*, 54(6):1440-5.

- Sloboda J, Zaviačič M, Jakubovský J, Hammar E, Johnsen J. 1998. Metastasizing adenocarcinoma of the female prostate (Skene's paraurethral glands). Histological and immunohistochemical prostate markers studies and first ultrastructural observation. *Pathol Res Pract*, 194:129-136.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol*, 92: 281-286.
- Soyal S, Ismail PM, Li J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Lydon JP. 2002. Progesterone's role in mammary gland development and tumorigenesis as disclosed by experimental mouse genetics. *Breast Cancer Res*, 4(5):191-6.
- Staub NL, Beer MD. 1997. The role of androgens in female vertebrates. *Gen Compar Endocrinology*, 108: 1-24.
- Steers WD. 2001. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*, 58 (6 Suppl 1):17-24.
- Steinberger E, Ficher M. 1968. Conversion of progesterone to testosterone by testicular tissue at different stages of maturation. *Steroids*, 11(3):351-68.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod*, 34(5):973-83.
- Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. 2009. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53(8):946-55.
- Tcholakian RK, Steinberger A. 1978. Progesterone metabolism by cultured Sertoli cells. *Endocrinology*, 103(4):1335-43.
- Tepper SL, Jagirdar J, Heath D, Geller SA. 1984. Homology between the female paraurethral (Skene's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med*, 108(5):423-425.
- Terada N, Yamamoto R, Takada T, Miyake T, Terakawa N, Wakimoto H, Taniguchi H, Li W, Kitamura Y, Matsumoto K. 1989. Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium. *J Steroid Biochem*, 33(6):1091-6.
- Thomson AA, Foster BA, Cunha GR. 1997. Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development*, 124(12):2431-9.
- Thomson AA. 2001. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121:187-95.



- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*, 129:1905-1912.
- Timme TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, 134(3):1039-45.
- Timms BG, Petersen SL, Vom Saal FS. 1999. Prostate gland growth during development is stimulated in both male and female rat fetuses by intrauterine proximity to female fetuses. *J Urology*, 161:1694-1701.
- Timms BG. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*, 76(6):565-77.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*, 166(6):2472-83.
- Vermeulen A., Kaufman J.M., Goemaere S. & Van Pottelberg I. 2002. Estradiol in elderly men. *Aging Male*, 5:98–102.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int*, 29(9):809-16.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288(8):885-92.
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scraze G, Waterfield M, Chambon P. 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(23):7889-93.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 17(2):159-63.
- Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68:270-279.
- Wang J., Eltoum I.E. & Lamartiniere C.A. 2007. Genistein chemoprevention of prostate cancer in TRAMP mice. *J. Carcinog.* 6, 3.
- Weisser H, Krieg M. 1997. Kinetic analysis of androstenedione 5 alpha-reductase in epithelium and stroma of human prostate. *Steroids*, 62(8-9):589-94.

Wernet N, Albrecht M, Sesterhenn I, Goebbels R, Bonkhoff H, Seitz G, Inniger R, Remberger K. 1992. The "female prostate": location, morphology, immunohistochemical characteristics and significance. *Eur Urol*, 22:64-69.

Wiebe JP, Lewis MJ. 2003. Activity and expression of progesterone metabolizing 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid oxidoreductase and 3alpha(beta)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 3:9.

Wiebe JP. 2006. Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 13:717-38.

Williams WM. 1974. *The anatomy of the Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus)*. West Brookfield, MA: Tumblebrook Farm, Inc. 107 p.

Williams-Ashman HG. 1984. Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol Cell Biochem*, 58(1-2):51-61.

Wimpissinger F, Stifter K, Grin W, Stackl W. 2007. The female prostate revisited: perineal ultrasound and biochemical studies of female ejaculate. *J Sex Med*, 4(5):1388-93.

Winneker RC, Fensome A, Zhang P, Yudt MR, McComas CC, Unwalla RJ. 2008. A new generation of progesterone receptor modulators. *Steroids*, 73(7):689-701.

Worth NF, Campbell GR, Rolfe BE. 2001. A role for rho in smooth muscle phenotypic regulation. *Ann NY Acad Sci*, 947:316-22.

Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. 1999. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, 140(10):4509-15.

Wright F, Kirchhoffer MO, Giacomini M. 1979a. Natural anti-androgen progesterone. *Ann Endocrinol (Paris)*, 40(3 Suppl):282-93.

Wright F, Kirchhoffer MO, Mauvais-Jarvis P. 1979b. Antagonist action of dihydroprogesterone on the formation of the specific dihydrotestosterone-cytoplasmic receptor complex in rat ventral prostate. *J Steroid Biochem*, 10(4):419-22.

Wu CT, Altuwaijri S, Ricke WA, Huang SP, Yeh S, Zhang C, Niu Y, Tsai MY, Chang C. 2007. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(31):12679-84.

Yatkin E., Bernoulli J., Talvitie E.M. & Santti R. (2009) Inflammation and epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. *Int. J. Androl*. 32, 399-410.

Yu H, Berkel H. 1999. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc*, 151(4):209-13.

Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. 1994. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem*, 27(2):75-9.

Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque MA, Roagna R, Ponzzone R, Sismondi P. 1995. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res*, 55(10):2104-10.

Zarghami N, Grass L, Diamandis EP. 1997. Steroid hormone regulation of prostate-specific antigen gene expression in breast cancer. *Br J Cancer*, 75(4):579-88.

Zaviacic M. 1993. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *J Sex Res*, 30:148-151.

Zaviacic M, Sidlo J, Borovský M. 1993. Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene's paraurethral glands and ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423:503-505.

Zaviacic M. 1999. The Female Prostate: From vestigial Skene's paraurethral glands and ducts to woman's functional prostate. 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press, 171p.

Zaviacic M, Ablin RJ. 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in human female. *Histol Histopathol*, 15:131-142.

Zaviačič M, Jakubovská V, Belošovič J, Breza J. 2000a. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embriol (Berl)*, 201(1):51-61.

Zaviacic M, Zajíčková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviacic T, Holomán K, Breza J. 2000b. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *J Histotechnol*, 23:61-69.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA SOBRE A PRÓSTATA DO GERBILO (*Meriones unguiculatus*): INTERAÇÕES COM O ESTRÓGENO E COM A TESTOSTERONA.":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

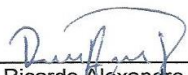
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

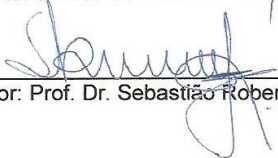
( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( X ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , Protocolo nº 002/09, Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Campus de São José do Rio Preto, SP.

( ) 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.*

  
\_\_\_\_\_  
Aluno: Ricardo Alexandre Fochi

  
\_\_\_\_\_  
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Influência da progesterona sobre a próstata do gerbilo (*Meriones unguiculatus*): interações com o estrógeno e com a testosterona" (protocolo no. 002/09 CEEA), cujo executor é Ricardo Alexandre Fochi, sob responsabilidade de Sebastião Roberto Taboga, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, em reunião de 27/03/2009.

São José do Rio Preto, 13 de abril de 2009.



Profa. Dra. Rejane Máira Góes  
Presidente da CEEA