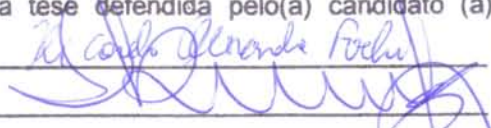


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ricardo Alexandre Fochi

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA FEMININA
DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL: ESTUDOS
ESTRUTURAIS E CARACTERIZAÇÃO
DO PERFIL SECRETOR**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Campinas, 2009

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

F681a	Fochi, Ricardo Alexandre Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral: estudos estruturais e caracterização do perfil secretor / Ricardo Alexandre Fochi. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Sebastião Roberto Taboga. Co-orientadora: Fernanda Cristina Alcântara dos Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Próstata feminina. 2. Ciclo estral. 3. Gerbilo. 4. Reconstrução. 5. Fosfatase ácida. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Santos, Fernanda Cristina Alcântara dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (pbg/ib)
--------------	--

Título em inglês: Morphofunctional aspects of the gerbil female prostate during the estrous cycle: structural analysis and characterization of the secretory profile.

Palavras-chave em inglês: Female prostate; Estrous cycle; Gerbil; Reconstruction; Acid phosphatase.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Sebastião Roberto Taboga, Marcelo Martinez, Sérgio Luis Felisbino.

Data da defesa: 17/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 17 de Fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino



Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela oportunidade concedida, depositando em mim a sua confiança e credibilidade, disponibilizando a sua indispensável orientação, o seu grande incentivo, a partir do qual descobri a paixão pela pesquisa, e principalmente pela sua amizade.

À minha amiga e co-orientadora Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos pela disposição, paciência, competência, apoio e incentivo ao longo de todo o meu mestrado.

Aos Professores Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, Dr. Marcelo Martinez e Dr. Sérgio Luis Felisbino pelas sugestões e correções na análise prévia desta tese de mestrado.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular pela imensa contribuição para o enriquecimento e aperfeiçoamento dos meus conhecimentos prévios, assim como pelo meu preparo ao ofício de educador.

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

À Lílíam Panagio, secretária do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, que com sua imensa competência e dedicação, me deu suporte e auxílio ao longo do mestrado.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Maria, Ana Paula, Daniele, Lara, Manoel, Sabrina, Sérgio e Silvana, que me deram apoio e ajuda desde a iniciação científica, e suportaram todas as minhas piadinhas.

Ao indispensável técnico de laboratório Luiz Falleiros Júnior, por todo o seu suporte, e auxílio durante a minha permanência no laboratório, e acima de tudo pela sua amizade.

Aos meus grandes amigos Diego, Filipi, Rodrigo, Rafael e Wanderley pelo incentivo, carinho e apoio, contribuindo para a realização dos meus ideais.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP pelo auxílio técnico e pela bolsa de estudos concedida tanto na iniciação científica quanto no mestrado.

Em especial, agradeço

Aos meus queridos pais, Renato e Sônia pelo imenso amor e carinho, paciência, suporte e apoio por toda minha vida, os quais são o alicerce do ser humano em que me transformei, possibilitando a realização de todos os meus sonhos.

Ao meu irmão Renato pelo companheirismo, amizade, ajuda e alegria de uma vez ter sido criança.

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

À minha querida avó Érica Fochi pelo amor e alegria dedicada aos filhos e netos: que Deus a abençoe nestes momentos tão difíceis da sua vida.

A meu grande amor Mãe, por trazer felicidade aos meus dias e ser minha companheira em todos os momentos, possibilitando o meu crescimento como ser humano e me inspirando como pesquisador.

A Deus, que me deu a vida, e com seu imenso amor nunca me desamparou nos momentos mais difíceis, dando-me a certeza de que: *”tudo posso naquele que me fortalece”*.

*O passado é história, o amanhã é
mistério, o hoje é uma dádiva, por isso se
chama PRESENTE. (provérbio chinês)*

SUMÁRIO

I – RESUMO.....	8
II – ABSTRACT.....	10
III – INTRODUÇÃO	
1. Desenvolvimento embrionário da glândula prostática.....	12
2. Próstata feminina: histórico e aspectos morfofisiológicos.....	17
3. Regulação hormonal da glândula prostática.....	21
4. Ciclo Estral de roedores.....	23
IV – OBJETIVO.....	27
V – ARTIGO 1.....	28
Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands)	
VI – ARTIGO 2.....	37
Avaliação tridimensional da estrutura glandular e atividade fosfatásica ácida no epitélio secretor da próstata feminina do gerbilo da Mongólia (<i>Meriones unguiculatus</i>) durante o ciclo estral	
VII – CONCLUSÕES GERAIS.....	58
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
IX – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	66
X – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	67

RESUMO

A próstata não é um órgão exclusivo do sistema reprodutor masculino, estando presente em fêmeas de diversas espécies de roedores e também na espécie humana. A próstata feminina tem sido considerada homóloga à próstata ventral masculina, sendo composta por um pequeno conjunto de glândulas e ductos entremeados a um estroma fibromuscular. Em fêmeas adultas de gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a próstata apresenta uma localização parauretral, mostrando íntimo contato com a parede da uretra proximal e mediana. Em machos, a atuação dos reguladores hormonais, principalmente andrógenos e estrógenos, que influenciam a fisiologia prostática são bastante conhecidos. Em fêmeas, no entanto, os fatores que influenciam a atividade prostática são pouco conhecidos, embora já se saiba que as alterações hormonais comuns à senescência estejam associadas à instalação de lesões prostáticas. É sabido também que as oscilações hormonais que ocorrem durante o ciclo reprodutivo das fêmeas influenciam a morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor. Embora se saiba que a próstata feminina seja um órgão funcional e sensível à ação de hormônios esteróides, não é conhecido, até o momento, se as oscilações hormonais que ocorrem durante o ciclo reprodutivo podem alterar a biologia desta glândula. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos morfofuncionais da próstata feminina durante o ciclo estral de gerbilos da Mongólia, o qual é constituído por quatro fases distintas, a saber: proestro, estro, diestro I e diestro II. Para isso, foram empregadas análises morfológicas, morfométrico-esterológicas, sorológicas, imunocitoquímicas e enzimáticas. Os resultados obtidos com este estudo demonstraram que as oscilações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral alteram a estrutura e funcionalidade da próstata feminina do gerbilo. Estas alterações compreendem um crescente desenvolvimento prostático e aumento da atividade secretória, em relação à secreção do antígeno prostático específico (PSA) e às glicoproteínas PAS positivas, durante as fases de proestro e estro, e uma gradual diminuição da atividade secretória e do desenvolvimento glandular nas fases de diestro I e II. O mesmo ocorreu com a atividade fosfatásica ácida prostática presente em todo o ciclo, a qual mostrou uma menor frequência de ácinos com ausência de marcação na fase estro e uma maior frequência nas

fases subsequentes (diestro I e II). Acredita-se, com base nos dados coletados, que estas oscilações cíclicas na morfofisiologia prostática sejam determinadas pelos picos hormonais de estrógeno no diestro II e pelos altos níveis de progesterona no estro, os quais interagem com os níveis constantes de andrógenos durante todo o ciclo estral.

ABSTRACT

The prostate is not an exclusive organ of the male reproduction system, found in females of several rodents' species and also in humans. The female prostate has been considered homologue to the male ventral prostate and it is formed by a small cluster of glands and ducts inserted into a fiber muscular stroma. In adult female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), the prostate presents a paraurethral location, showing close contact with the wall of urethra in its proximal and median regions. In males, the hormone action, mainly androgens and estrogens that influence the prostate physiology are well known. In females, however, the factors that influence the prostate activity are little known, although it is known that the hormonal changes, common to senescence, are associated with the genesis of prostate lesions. It is also known that hormonal oscillations that occur during the female's reproductive cycle influence the morphophysiology of several organs of the reproductive system. Although the female prostate is a functional organ and sensitive to the action of steroid hormones, it is not known, until now, if hormonal oscillations that occur during the reproductive cycle can alter the biology of this gland. Thus, the aim of this work was to evaluate the morphofunctional aspects of the female prostate during the Mongolian gerbil estrous cycle, which consists of four distinct phases, considering proestrus, estrus, diestrus I and diestrus II. For this, were employed morphological, morphometric-stereological, serological, and enzyme immunocytochemistry analysis. The data showed that hormonal oscillations during the estrous cycle alter the structure and function of the gerbil female prostate. These changes include an increased prostate development and an increased secretory activity, in relation to the secretion of prostate specific antigen (PSA) and PAS positive glycoproteins, during the estrus and proestrus stages, and a gradual reduction in secretory activity and of the glandular development in the diestrus I and II stages. The same occurred with prostatic acid phosphatase activity, present throughout the cycle, which showed a lower frequency of acini with lack of marking in estrus phase and a higher frequency in subsequent phases (diestrus I and II). It is believed, based on collected data, that these morphophysiological cyclical changes in prostate are determined by

hormonal peak of estrogen in diestrus II and the high levels of progesterone in estrus, which interact with the constant levels of androgens throughout the estrous cycle.

1. Desenvolvimento embrionário da glândula prostática

O sistema urogenital em desenvolvimento contém estruturas epiteliais de origem mesodérmicas (ductos mesonéfricos ou de Wolf e ductos paramesonéfricos ou de Müller) e endodérmicas (seio urogenital - UGS) que estão associadas ao tecido conjuntivo indiferenciado do embrião, o mesênquima (Cunha et al., 2002; Marker et al., 2003; Staack et al., 2003).

Os estágios iniciais de desenvolvimento gonadal são idênticos em embriões masculinos e femininos, sendo esta fase denominada como estágio indiferenciado ou ambissexual da diferenciação sexual. Em camundongos, as gônadas masculinas e femininas passam a ser distinguíveis morfologicamente apenas aos 13 dias de gestação (Staack et al., 2003).

Em machos de camundongos, após o 13º dia de gestação as células mesenquimatosas do rudimento gonadal se agregam e se condensam em cordões epiteliais que se tornam os túbulos seminíferos. A partir do 14º dia de gestação, as células de Leydig dos testículos fetais diferenciam-se e passam a secretar testosterona (Pointis et al., 1980). A testosterona evita a morte celular programada do ducto mesonéfrico, estimulando o seu desenvolvimento para formar o epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal e ductos eferentes. Paralelamente, as células de Sertoli iniciam a produção da substância inibidora Mülleriana (MIS), que provoca a regressão do ducto paramesonéfrico.

Em fêmeas, os ovários fetais são relativamente inativos na função endócrina, não sendo requeridos para o desenvolvimento embrionário do trato urogenital feminino. Na ausência de estímulos androgênicos, o ducto mesonéfrico regride e, na ausência de MIS, o ducto paramesonéfrico se desenvolve, originando os ovidutos, cornos uterinos, canal cervical e porção superior da vagina (Staack et al., 2003).

A próstata desenvolve-se a partir do UGS, que é um tubo endodérmico derivado do intestino primitivo e que termina na cloaca. O septo uroretal divide a cloaca em UGS ventralmente e em canais retal e anal dorsalmente. A subdivisão da cloaca ocorre de

maneira que os ductos de mesonéfricos e paramesonéfricos terminam no UGS. Posteriormente, o UGS é subdividido em vesícula urinária e em UGS definitivo. Em camundongos, os dois derivados do UGS são claramente demarcados entre o 13º e 14º dias de gestação (Staack et al., 2003).

O UGS é composto por uma camada epitelial (UGE) derivada da endoderme, que é circundada por uma camada mesenquimal (UGM) originada da mesoderme. Esta estrutura é encontrada na base da vesícula urinária em desenvolvimento e surge nos machos e nas fêmeas após 13 dias de concepção nos camundongos e ratos, e após 7 semanas de gestação em humanos. O UGS é morfológicamente indistinguível em machos e fêmeas até o 17º-18º dia de gestação em camundongos e até a 10º-12º semanas em humanos. A partir desse período, inicia-se a morfogênese prostática, um processo que é iniciado e dependente de andrógenos (Marker et al., 2003).

Em machos, o evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos do epitélio do seio urogenital (UGE) em direção ao mesênquima circundante do seio urogenital (UGM). Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento. Entretanto, no período neonatal, conforme esses cordões crescem invadindo o UGM, eles começam a bifurcar-se em ramos laterais, originando três lobos prostáticos distintos: o lobo ventral, o lobo dorsolateral e a glândula coaguladora ou lobo anterior (Marker et al., 2003). Simultaneamente ao processo de morfogênese de ramificação ductal, ocorre a canalização ductal (formação do lúmen) e a citodiferenciação epitelial e estromal (Wang et al., 2001).

Sendo a morfogênese prostática dependente de hormônios esteróides, os andrógenos são necessários para iniciar o desenvolvimento prostático, para continuar o seu crescimento embrionário e neonatal e, posteriormente, para iniciar a atividade secretória prostática na puberdade (Isaacs et al., 1994). No entanto, a ação androgênica não é exercida diretamente sobre as células epiteliais. Sob a influência de andrógenos, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática. Assim, com a diferenciação das células epiteliais, os níveis de receptores androgênicos (AR) aumentam e a expressão de receptores estrogênicos epiteliais (ER β) e estromais (ER α) é induzida.

Interações epitélio-mesenquimais desempenham um papel chave no direcionamento do crescimento e do desenvolvimento da próstata, sendo que a sinalização parácrina do mesênquima para o epitélio é essencial para a embriogênese prostática. Desse modo, a ação de andrógenos sobre as células mesenquimais resulta em fatores parácrinos específicos que atuam sobre as células epiteliais induzindo a sua proliferação (Thomson et al., 2001). Por outro lado, também existe uma sinalização parácrina do epitélio para o mesênquima. Esta sinalização regula a diferenciação do mesênquima que circunda os brotos em formação em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward et al., 1996). Assim, durante a morfogênese prostática, o AR é necessário no mesênquima e não no epitélio, sendo que sua expressão precede o surgimento dos brotos prostáticos. Nas células epiteliais, a função do AR se restringe à regulação de proteínas secretórias e, talvez, à diferenciação celular (Donjacour e Cunha, 1993).

Em embriões de fêmeas de ratos e humanos, a ausência de testosterona 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, sendo subdividido em três zonas: o mesênquima periuretral, a zona mesenquimal que sofre diferenciação em músculo liso e a zona que contém o 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 diferenciação de parte do mesênquima do UGS em músculo liso é crucial para a morfogênese prostática em machos e fêmeas, pois é este evento que regula a sinalização parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002).

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. Esta camada separa o VMP do epitélio uretral, impedindo que os brotos epiteliais prostáticos que estão emergindo da uretra entrem em contato direto com o VMP. Desse modo, a espessa camada de músculo liso impede a interação do VMP com os brotos prostáticos em formação, bloqueando a comunicação parácrina entre o epitélio e o mesênquima (Thomson et al., 2002). Em machos, na presença de andrógenos, a formação

do músculo liso é inibida ou atrasada e os brotos prostáticos emergem da uretra e podem penetrar no VMP. Assim, a interação parácrina epitélio-mesênquima é estabelecida, ocasionando a ramificação e expansão da próstata ventral. O modelo ilustrativo da indução prostática em machos e fêmeas foi proposto por Thomson e colaboradores e pode ser observado na figura 1.

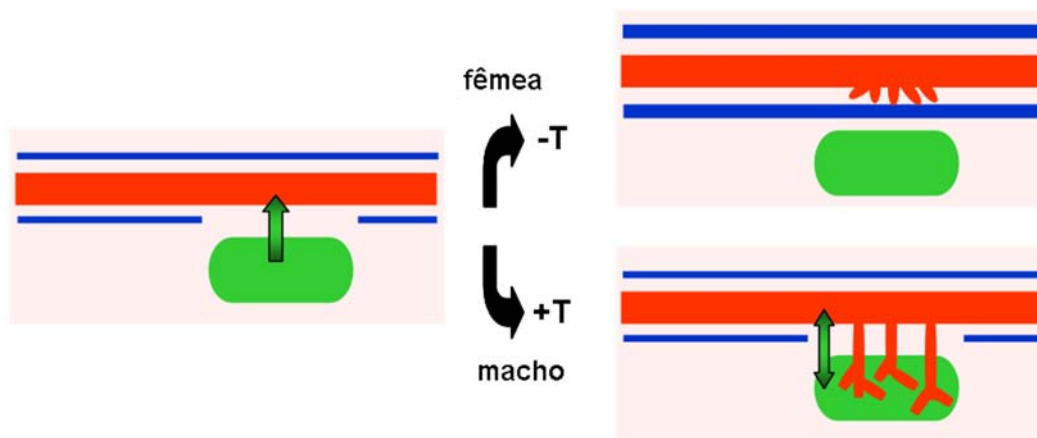


Figura 1. Modelo descritivo da indução da próstata ventral em embriões femininos e masculinos de ratos. Do lado esquerdo pode-se observar o VMP (verde) durante os estágios iniciais de indução prostática (17-18 dias de gestação). Observe que a camada de músculo liso (azul) é descontínua e permite a sinalização 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-mesênquima. 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).

A formação de brotos prostáticos é um processo constitutivo de machos e fêmeas, porém a ramificação e expansão desses brotos são reguladas por andrógenos. 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 (cerca de 15% a 25% do tamanho da próstata ventral masculina), ela apresenta um epitélio secretor diferenciado e funcional (Zaviačič et al., 2000a; Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004). Como a próstata de fêmeas cresce e desenvolve-se em um

ambiente com baixos níveis de andrógenos (apenas 5% do total de precursores androgênicos produzidos no organismo masculino), acredita-se que outros fatores além desses hormônios possam atuar no desenvolvimento e manutenção da função dessa glândula em adultos (Timms et al., 1999).

Dentre os fatores parácrinos que atuam sobre a morfogênese prostática, pode-se citar os fatores de transcrição da família homeobox NKx3.1, Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13, os fatores da família FGF (FGF-7 e -10) (Huang et al., 2004), a glicoproteína Sonic hedgehog (Shh), o receptor para Shh, patch (ptc), os fatores de transcrição da família Gli e BMP-4 (Pu et al., 2004). O gene NKx3.1 é expresso no epitélio do seio urogenital (UGE) antes do início do brotamento prostático e parece desempenhar um papel na diferenciação epitelial e determinação prostática (Bieberich et al., 1996). Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13 são expressos no mesênquima do seio urogenital, estando envolvidos no desenvolvimento prostático. Estes fatores são expressos em altos níveis durante a vida fetal, porém seus níveis declinam após o nascimento. FGF-10 e FGF-7 são produzidos pelas células do mesênquima do seio urogenital e interagem com o mesmo receptor (FGFR2iib), que é expresso pelas células do epitélio do seio urogenital. Em conjunto, esses fatores apresentam papel crítico no direcionamento da expansão e ramificação dos brotos prostáticos (Huang et al., 2004). A glicoproteína Shh é secretada pelas células do epitélio do seio urogenital na interface mesenquimal da próstata em desenvolvimento, ativando o seu receptor patch (ptc), que é expresso nas células mesenquimais. A ligação Shh-ptc desencadeia uma cascata de sinais moleculares que resulta no aumento dos níveis de fatores de transcrição Gli que, por sua vez, mediam os efeitos de Shh. Em vertebrados, são conhecidos três tipos de transcritos Gli (Gli-1, -2, -3) que são redundantes e compartilham a mesma função.

Acredita-se que o gene Shh esteja envolvido na iniciação do brotamento e expansão prostática. Além disso, Shh parece regular muitos outros genes envolvidos no desenvolvimento prostático, incluindo Hoxa-13, Hoxd-13 e NKx3.1 (Pu et al., 2004). As proteínas morfogenéticas BMP-4 são membros da família TGF- β e, em geral, agem inibindo a proliferação durante o desenvolvimento prostático. Na próstata de camundongos, o RNAm para BMP-4 está localizado no mesênquima, sendo que seus níveis declinam no período pós-natal. Na figura 2, propõem-se um modelo pelo qual esses fatores parácrinos

atuam em conjunto para dirigir a morfogênese prostática de roedores no período pós-natal (Huang et al., 2004).

2. Próstata feminina: histórico e aspectos morfofisiológicos

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 à 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 (Zaviačič 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; Zaviačič, 1993; Zaviačič et al., 1993; 1997a; b; 2000a; b). Destes trabalhos, destacam-se os de Zaviačič 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 (Zaviačič, 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: 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 (Zaviačič, 1993; 1999). Evidências indicam que a frutose produzida por esta glândula escoa 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 espermatozóides, 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 (Zaviačič 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 extraprostáticas para sua expressão (Diamandis e Yu, 1997; Yu e Berkel, 1999; Galadari et al., 2004; Kocak, 2004; Sauter et al., 2004).

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 a próstata feminina e o ponto G são as mesmas estruturas (Addiego et al., 1981; Hines, 2001).

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.

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 (Zaviačič 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).

Experimentos com material humano são muito limitados, pois a próstata feminina só pode ser obtida a partir de necrópsias de mulheres que sofreram morte cerebral (Zaviačič, 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.

A adoção do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*, Gerbilinae, Muridae), (figura 3), como modelo experimental tem trazido resultados muito satisfatórios, uma vez que a próstata feminina deste roedor apresenta grande homologia com a próstata feminina humana (figura 4) e com a próstata ventral do gerbilo macho (Taboga et al., 2001). 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).



Figura 3. Gerbilo da Mongólia
(*Meriones unguiculatus*)

Anatomicamente, a próstata feminina do gerbilo é composta por um conjunto de glândulas e ductos que se concentram em ambos os lados da uretra mediana. Os ductos estão inseridos na musculatura envolvente da uretra, e se abrem em vários pontos da luz uretral (Santos et al., 2003).

A porção secretora da próstata de fêmeas adultas do gerbilo é revestida por um epitélio que varia de cúbico simples a colunar pseudoestratificado. 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 (figura 4) (Santos et al, 2003). As glândulas e os ductos prostáticos estão associados a um estroma fibromuscular composto por células musculares lisas e fibroblastos, fibras de colágeno e elásticas, e muitos vasos sanguíneos (Santos et al., 2001).

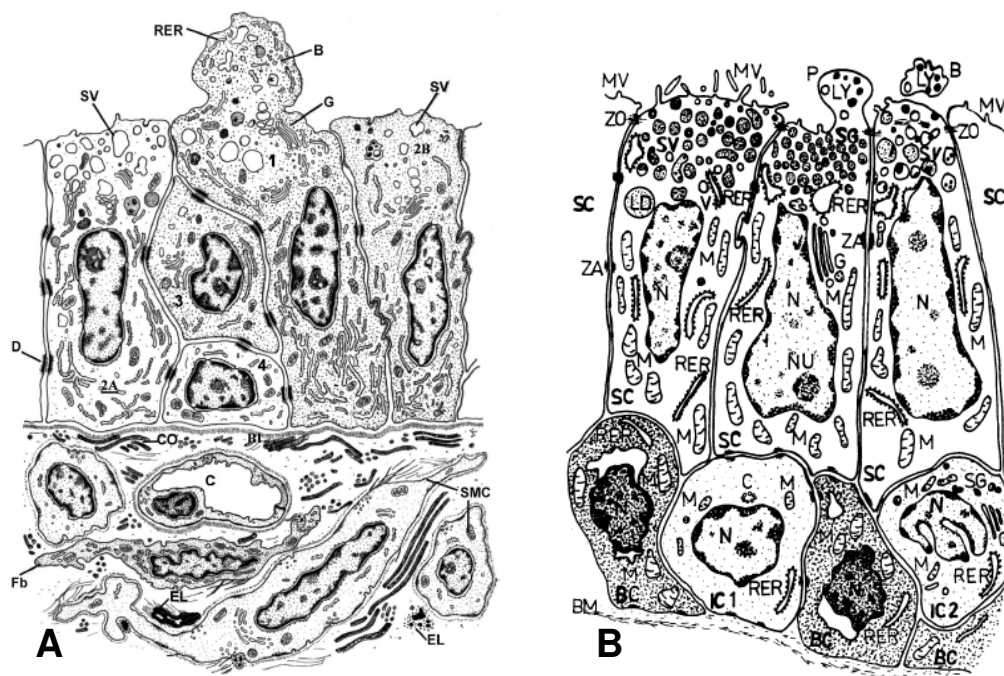


Figura 4. Aspectos ultra-estruturais da próstata feminina do gerbilo (A – Santos et al., 2003) e humana (B - Zaviáčič et al., 2000a). A próstata feminina adulta do gerbilo apresenta grande semelhança com a humana. Os mesmos tipos epiteliais são observados em ambas as espécies. O compartimento estromal da próstata feminina do gerbilo é denso, sendo composto por células musculares lisas (SMC) e fibroblastos (Fb), além de muitas fibras de colágeno (CO) e elásticas (EL) A – 1: célula secretora apócrina; 2A: célula secretora merócrina clara; 2B célula secretora merócrina típica; 3: célula intermediária; 4: célula basal. B – SC: célula secretora; BC: célula basal; IC1 e IC2 células intermediárias. B: “blebs” apicais; BL: lâmina basal; BM: membrana basal; C: capilar; D: desmossomos 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.

As características morfofuncionais da próstata feminina adulta normal do gerbilo demonstram que esta glândula é madura e fisiologicamente ativa, embora a produção de andrógenos no organismo feminino seja muito reduzida (Santos et al., 2003). Desse modo, acredita-se que outros fatores como, por exemplo, os estrógenos, influenciem a fisiologia prostática. Assim, torna-se fundamental compreender os fatores que regulam a diferenciação, crescimento e secreção da próstata feminina, uma vez que alterações nestes fatores podem levar à instalação de lesões malignas.

Desta maneira, torna-se inviável considerar a próstata feminina como um órgão vestigial e insignificante. Embora a próstata feminina seja menos desenvolvida que a masculina, ela é um órgão ativo nos processos de secreção e merece os cuidados que qualquer outro órgão do organismo feminino, uma vez que alterações em sua fisiologia podem comprometer a saúde e a qualidade de vida das mulheres. Assim, são necessários estudos que permitam o melhor entendimento dos processos que mantêm a homeostase dessa glândula, visto que pouco se sabe a respeito dos eventos fisiológicos que mantêm a funcionalidade da próstata feminina tanto em condições normais quanto em patológicas.

3. Regulação hormonal da glândula prostática

Os fatores que regulam o desenvolvimento e atividade da próstata feminina são pouco conhecidos, embora se saiba que a glândula prostática seja classicamente dependente de andrógenos durante toda a sua fase de desenvolvimento. Muitos estudos têm sugerido que os hormônios esteróides também desempenham um importante papel na manutenção da fisiologia prostática (Zaviačič et al., 2000a, b; Santos et al., 2003).

Assim como a próstata de machos pós-púberes, a próstata feminina do gerbilo adulto pode ser considerada como um órgão maduro, uma vez que apresenta um epitélio glandular diferenciado. No entanto, ela é menos desenvolvida que a próstata masculina, devido aos baixos níveis androgênicos presentes no organismo feminino (Zaviačič et al., 2000b).

No organismo feminino existe uma baixa concentração de testosterona circulante, que é produzida pelos ovários e pela glândula adrenal (Staub e Beer, 1997). A

glândula adrenal secreta primariamente os precursores androgênicos, como por exemplo, o sulfato de diidroepiandrosterona (DHEA-S), a diidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona, que são convertidos pelos tecidos periféricos em suas formas fisiologicamente ativas. Os andrógenos secretados pelos ovários são a androstenediona, a DHEA e a testosterona. Comparados à glândula adrenal, os ovários produzem aproximadamente 25% do total de testosterona circulante no organismo de fêmeas em idade reprodutiva. Na espécie humana, com a conversão dos precursores androgênicos em testosterona, a produção diária desse hormônio em mulheres adultas pode chegar a 0,35mg. Isso demonstra que os níveis de testosterona circulante no organismo feminino são muito inferiores aos apresentados pelo organismo masculino, que são de aproximadamente 7mg/dia (Staub e Beer, 1997). Embora o nível de testosterona circulante em fêmeas seja menor que nos machos, no tecido prostático a sua concentração é igual à de machos, indicando que o desenvolvimento prostático em fêmeas é amplamente dependente de andrógenos.

Receptores para testosterona têm sido identificados nos ovários, ovidutos e útero, indicando que os andrógenos exercem um significativo papel na regulação e desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino (Staub e Beer, 1997). Estudos imunocitoquímicos demonstraram que os receptores para andrógenos também estão presentes na próstata feminina humana, podendo estar relacionados com a manutenção da estrutura desta glândula no organismo feminino (Wernet, 1992).

Tratamentos experimentais em gerbilos fêmeas adultas com cipionato de 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., 2003, 2006; Leite et al., 2004). Indicando que a administração de T pode causar alterações importantes na próstata de gerbilos fêmeas.

Embora a próstata seja um tecido andrógeno-dependente, a sua fisiologia e patologia também é influenciada pelo E2. Ambos os receptores de estrógeno (ER α e ER β), são expressos no estroma e no epitélio, respectivamente. Atualmente, muitos trabalhos têm investigado a influência do estrógeno sobre o metabolismo da próstata de machos (Timms et al., 1999; Härkönen & Mäkelä, 2004; García-Flórez et al., 2005; Risbridger et al., 2003; Scarano et al., 2003, 2006), uma vez que este hormônio está envolvido na modulação dos efeitos dos andrógenos, na proliferação glandular e na etiologia de doenças prostáticas.

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). Em tratamentos com as drogas antiestrogênicas letrozol e tamoxifeno foi observado que estas causam importantes alterações na fisiologia prostática de fêmeas de gerbilo (Santos et al., 2008). O tratamento com estas drogas desencadeou processos de hiperplasia e hipertrofia glandular, neoplasias intra-epiteliais com arranjo pseudocribiformes e vacuolização das células prostáticas, fatos estes que acarretaram diminuição acentuada da atividade glandular.

4. Ciclo Estral de roedores

O termo “estro” foi utilizado pela primeira vez por Heape (1900) como uma adaptação latina para a palavra grega *oistros*, tendo o significado de excitação, ou frenesi com o intuito de descrever o “período especial no qual ocorre o desejo sexual da fêmea” (Freeman, 1994). Ele também utilizou os termos: *anestro*, período de ausência de procriação, no qual os órgãos reprodutivos estão quiescentes; *proestro*, no qual acontece a excitação sexual do animal; *metaestro*, na ausência de fecundação, na qual cessam as alterações do trato reprodutor ocorridas no estro; e *diestro*, no qual o trato reprodutor prepara-se para receber o ovócito (Westwood, 2008).

Em ratos a ciclagem ocorre imediatamente após a abertura do orifício vaginal, o qual acontece por volta dos dias 32 e 36 pós-natal. Esses animais apresentam inicialmente ciclos irregulares antes de se estabilizarem em um padrão recorrente de ciclos ovulatórios, cada um com duração de 4 ou 5 dias (Goldman et al., 1985).

A avaliação das mudanças ocorridas na estrutura das células epiteliais da vagina vem sendo empregada há bastante tempo como o melhor método para documentar o ciclo reprodutivo de roedores de laboratório, por ser relativamente pouco invasivo, servindo também como um indicador do estado funcional do eixo hipotalâmico-pituitário-ovariano. A aparência dessas células está tipicamente correlacionada com o estado da mucosa vaginal, útero, e ovários e está ligado às alterações nas concentrações circulantes dos esteróides sexuais e gonadotrofinas (Goldman et al., 2007). Em ratos com ciclo padrão de 4 dias, o proestro é identificado pela presença de grupos de células epiteliais circulares e nucleadas, as quais freqüentemente apresentam um aspecto granuloso sob o microscópio. Esta fase perdura por 1 dia sendo seguido do estro, rotineiramente identificado pela presença de um grande número de células cornificadas (ou queratinizadas). A predominância de células cornificadas perdura por 1 dia ou 2 dias, naqueles animais com ciclo de 4 dias ou 5 dias respectivamente. Metaestro é o termo usado para descrever o período transicional durante o período inicial do primeiro dia do diestro (diestro I), sendo que o esfregaço é constituído de uma combinação de leucócito, células cornificadas e células circulares. O segundo dia do diestro (diestro II) pode apresentar massas pequenas de células nucleadas, as quais anunciam a fase seguinte (proestro). Alguns ratos com ciclo estral de 5 dias pode exibir três dias consecutivos de diestro (Goldman et al., 2007).

Martson e Chang (1965) reportaram que o ciclo estral dos gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) pode variar de 4 a 7 dias. Em contraste, Barfield e Beeman (1968) demonstraram que o ciclo varia de 4 a 6 dias. Nishino e Totsukawa (1996) observaram que em torno de 67,9% das fêmeas analisadas apresentavam um ciclo com duração de 4-6 dias, sendo então confirmado que este período é mais comum para esta espécie de roedor. Estes autores dividiram o ciclo estral do gerbilo em 5 estágios, através da análise do esfregaço vaginal (figura 5). O *estágio I – proestro* – é marcado quase totalmente pela presença, no

esfregaço vaginal, de células epiteliais nucleadas; o *estágio II – estro (espalhado)* – caracterizado por células cornificadas espalhadas; *estágio III – estro (aglomerado)* – caracterizado por aglomerações de células cornificadas; *estágio IV – metaestro* – formado quase inteiramente por leucócitos, um pouco de células queratinizadas e infiltração de células epiteliais; e por fim o *estágio V – diestro* – o esfregaço vaginal é formado quase totalmente por leucócitos, ocasionalmente é observado muco, geralmente há poucas células. De acordo com a morfologia das células presentes no esfregaço vaginal, os estágios II e III podem ser reunidos em apenas um, sendo chamado “estro” e o estágio IV e V podem também ser chamados de diestro I e diestro II, respectivamente.

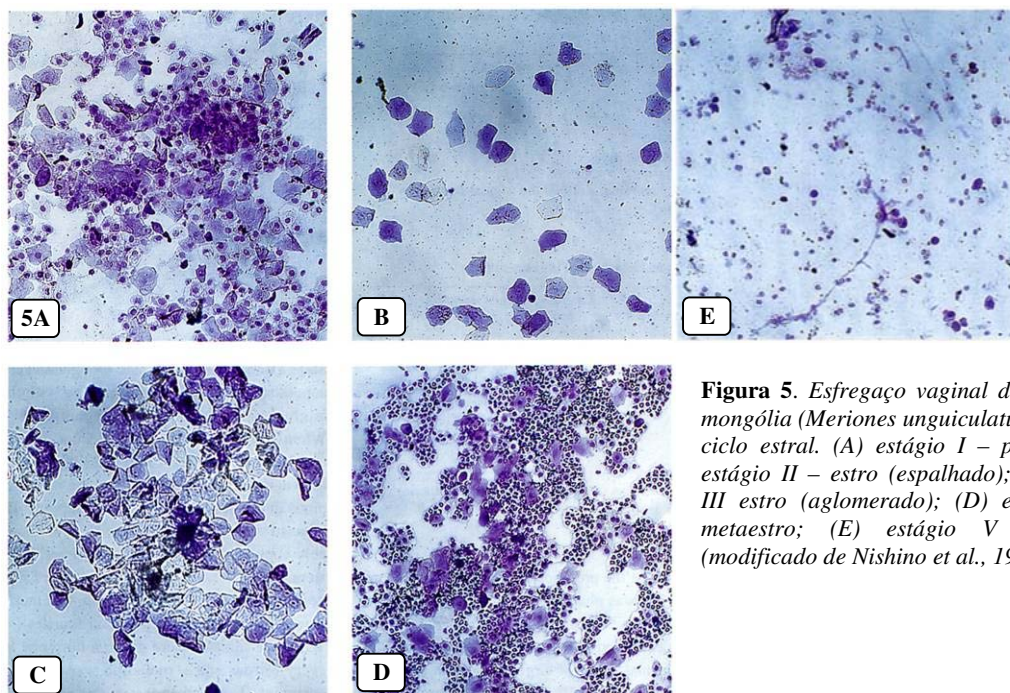


Figura 5. Esfregaço vaginal de gerbilo da mongólia (*Meriones unguiculatus*) durante o ciclo estral. (A) estágio I – proestro; (B) estágio II – estro (espalhado); (C) estágio III estro (aglomerado); (D) estágio IV – metaestro; (E) estágio V – diestro. (modificado de Nishino et al., 1996).

Diferentemente dos machos, as fêmeas adultas de mamíferos têm a manutenção de suas atividades sexuais e reprodutivas controladas de maneira cíclica, principalmente através dos hormônios esteróides estrógeno (E2) e progesterona (P4). Em fêmeas de roedores o ciclo estral, de forma semelhante ao ciclo menstrual em humanos, é caracterizado por oscilações cíclicas dos hormônios estrógeno, progesterona, hormônio

folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Assim, o organismo feminino está fortemente sujeito às oscilações hormonais decorrentes do seu ciclo reprodutivo normal, as quais influenciam a morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor. Embora se saiba que a próstata feminina é um órgão funcional e sensível à ação de hormônios esteróides, não é conhecido, até o momento, se essas oscilações hormonais que ocorrem durante o ciclo reprodutivo podem alterar a biologia desta glândula. Desta forma, são de extrema importância estudos que visem analisar as possíveis influências exercidas pelo ciclo reprodutivo feminino sobre a morfofisiologia da glândula prostática.

O presente estudo investigou as modificações estruturais e da atividade secretora das células próstaticas, ocorridas nas fêmeas adultas (90 dias de idade) do gerbilo *Meriones unguiculatus* durante todas as fases do ciclo estral (proestro, estro, diestro I e diestro II). Desta forma, este trabalho teve como proposta:

1. A avaliação, por métodos histoquímicos, do padrão de secreção da próstata feminina ao longo do ciclo estral, procurando estabelecer relações com os níveis séricos hormonais femininos.
2. A análise, por imunohistoquímica, das diferenças na expressão dos receptores androgênicos AR e das serinoproteinases tipo-PSA.
3. A avaliação das variações na expressão da atividade da fosfatase ácida prostática, no epitélio secretor, ao longo do ciclo estral.
4. Efetuar a reconstrução tridimensional da glândula prostática, a partir de cortes histológicos seriados, nas diferentes fases do ciclo estral.

Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene paraurethral glands).

*As oscilações hormonais durante o ciclo estral influenciam a morfofisiologia da próstata feminina (glândula parauretral de Skene) do Gerbilo (*Meriones unguiculatus*).*

Trabalho publicado na Biology of Reproduction

Hormonal Oscillations During the Estrous Cycle Influence the Morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Female Prostate (Skene Paraurethral Glands)¹

Ricardo A. Fochi,⁴ Ana P.S. Perez,⁴ Carlos V. Bianchi,⁵ Sabrina S. Rochel,⁴ Rejane M. Góes,⁵ Patrícia S.L. Vilamaior,⁶ Sebastião R. Taboga,^{2,5} and Fernanda C.A. Santos^{3,5}

Department of Cell Biology,⁴ Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo 13084-864, Brazil
Department of Biology,⁵ Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), São Paulo 15054-000, Brazil
Biological Sciences and Veterinary Medicine School,⁶ Rio Preto University Center (UNIRP), São Paulo, Brazil

ABSTRACT

72 The hormonal oscillations that occur during the female reproductive cycle influence the morphophysiology of several organs of the reproductive system. The female prostate is a functional organ sensitive to the action of steroidal hormones, but it is not known whether the hormonal oscillations that occur during the reproductive cycle can alter the biology of this gland. Thus, the present work aims to evaluate the morphofunctional aspects of the female prostate during the gerbil estrous cycle. For this purpose, morphological, morphometric-stereological, serological, and immunocytochemical analyses were carried out. The results of the present study show that the hormonal oscillations that occurred during the estrous cycle altered both the structure and functionality of the gerbil female prostate. These alterations include increased prostatic growth and augmented secretory activity during the proestrus and estrus phases and a gradual decrease of the secretory activity and glandular development in the diestrus I and II phases. These cyclical oscillations appear to be determined by the hormonal peaks of estrogen in diestrus II and by the high levels of progesterone during estrus, since the androgen levels remained constant throughout the estrous cycle.

estrous cycle, female prostate, morphology, progesterone, prostate, steroid hormones

INTRODUCTION

The female prostate, also called *Skene paraurethral glands* in women or simply *paraurethral glands* in other mammals, is an accessory gland found in the female genital system, and it has been described as morphofunctionally similar to the male prostate gland and with a histological pattern distinct from

other accessory reproductive glands, such as paraurethral and/or bulbourethral glands in males [1–8]. In addition, the embryonic development of both the male and female prostate is homolog, arising from the urogenital sinus, whereas the secretory maturity of the female prostate has been assumed to precede the male gland secretory development considering several phases of the postnatal period [5].

In Mongolian gerbil females, the occurrence of a morphofunctionally developed prostate is greater compared with other rodents, which makes this species a very good model for studies of this gland. Thus, the female prostate of this current experimental model is characterized by a set of acini and ducts that open into the urethra [6, 7]. These acini are lined with a differentiated secretory epithelium active in the production of a glycoproteic prostatic-specific antigen (PSA)-positive fluid [6]. Although there are several studies that evaluated the morphology of the female prostate in humans and rodents [8], little is known about the factors that regulate the prostatic morphophysiology.

Experimental studies involving the administration of androgens [6, 9] and anti-estrogenic agents [10] in the gerbil female prostate showed that this gland expresses androgenic and estrogenic receptors, and that it is sensitive to alterations in the serum levels of these hormones.

The female organism is naturally subjected to hormonal oscillations that occur during the reproductive cycle. It is well known that these changes affect the structure of several organs in the reproductive system [11, 12]. However, no research has yet evaluated whether the hormonal alterations during the reproductive cycle can influence the biology of the female prostate gland. This question is fundamentally important to understanding prostatic morphophysiology, especially because disruption of the ovarian cyclicity during aging can be related to the installation of several prostatic disorders in women [13, 14]. Hence, the present work aimed to evaluate the morphofunctional aspects of female prostate considering the estrous cycle of the Mongolian gerbil once the histological and histochemical parameters have been described neglecting these cyclic phases.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Forty 3-mo-old female gerbils (*Meriones unguiculatus*, Gerbillinae: Muridae) were employed in this study. The animals were maintained under conventional conditions of temperature and humidity (25°C, 40%–70% relative humidity, 12L:12D), with free access to chow and water. Daily vaginal smears were collected at 1000 h for 12 consecutive days to determine estrous cycle phases. Females with regular cycles of 4 to 6 days were divided into four groups: proestrus, estrus, diestrus I, and diestrus II (n = 10 animals per group) [12]. After being anesthetized by CO₂ inhalation, the animals were weighed

¹Supported by grants from the Brazilian agencies The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP; grants 06/06876-1, 06/06932-9, 07/00711-3, 06/06953-6, and 06/06924-6) and the Brazilian National Research and Development Council (CNPq; grant 301111/05-7 research fellowship to S.R.T.).

²Correspondence: Sebastião Roberto Taboga, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil 15054-000. FAX: 55 17 32212390; e-mail: taboga@ibilce.unesp.br

³Correspondence: Fernanda C.A. Santos, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brazil 15054-000. FAX: 55 17 32212390; e-mail: fer-alcantara@hotmail.com

Received: 14 May 2008.

First decision: 2 June 2008.

Accepted: 14 July 2008.

© 2008 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. http://www.biolreprod.org

TABLE 1. Body and UPT weights, and relative UPT weight of adult gerbil females during all the phases of the estrous cycle (n = 10 animals/group).

Parameter	Groups			
	Proestrus	Estrus	Diestrus I	Diestrus II
Body weight	61.9 ± 10.8	60.9 ± 9.2	57.8 ± 9.9	55.8 ± 8.6
UPT weight	0.11 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.03 ^b	0.09 ± 0.02 ^{a,b}
UPT relative weight*	0.0018 ± 0.0007 ^a	0.0016 ± 0.0003 ^a	0.0014 ± 0.0004 ^b	0.0015 ± 0.0006 ^{a,b}

*The relative UPT weight corresponds to the ratio between the UPT weight and the body weight.

^{a,b} Different superscripts letters indicate significant differences between the phases of the estrous cycle ($P \leq 0.05$).

and immediately decapitated. Blood samples were collected for serological analysis. The tissues (urethra plus prostatic tissue [UPT]) were dissected out, weighed, and fixed according to different protocols, as specified below. The urethra plus adjacent tissues were dissected out using an Olympus SD-ILK stereoscopic microscope (Olympus Optical Co. Ltd.) to remove the adipose tissue and isolate the prostatic tissue plus the associated urethral segment. The separation of these components was performed by sectioning them at the base of bladder to obtain a block containing the entire UPT. Animal handling and experiments were performed according to the ethics guidelines of the São Paulo State University, following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health).

Serological Analysis

Circulating serum estradiol (E_2), progesterone (Pr), testosterone, and PSA levels were determined by immunochemical assays. The PSA levels were evaluated indirectly because it is well known that rats and mice do not express PSA [15]. A previous work using the gerbil model described this analysis considering a PSA-like protein or a kallikrein family serinoprotein that shows cross-reactivity with the antibodies employed in the present work [6, 10]. After the animal's decapitation, 10 samples were collected from each experimental group, and the serum was separated by centrifugation (3000 rpm) and stored at -20°C for subsequent hormone assay. Measurements were performed by chemiluminescence immunoassay in the automatic analyzer Vitros-ECi (Johnson & Johnson, Rochester, NY). The sensitivity was 0.1–3814 pg/ml for E_2 , 0.1–150 ng/ml for testosterone, 0.15–60 ng/ml for Pr, and 0.1–100 ng/ml for human PSA. For testosterone, estradiol, and human PSA, the respective intraassay variations were 1%, 1.1%, and 0.97%, whereas the interassay variations were 2.1%, 1.5%, and 1.75%.

Structural Analysis

The urethra and adhering tissues were fixed by immersion for 24 h in Karnovsky solution (5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) or in 4% paraformaldehyde. After fixation, the tissues were washed under running tap water, dehydrated in an ethanol series, cleared in xylene, embedded in paraffin (Histosec; Merck, Darmstadt, Germany) or glycol methacrylate resin (Historesin embedding kit; Leica, Nussloch, Germany), and cut into 3- μm sections with an automatic rotatory microtome (RM2155; Leica). Sections were stained with hematoxylin-eosin for general morphological analysis [19]. Neutral carbohydrates were identified by the periodic acid-Schiff (PAS) test [19]. The specimens were analyzed with a Zeiss-Jenaval (Jena, Germany) or Olympus BX60 (Hamburg, Germany) light microscope, and the images were digitized using the software Image-Pro Plus version 4.5 for Windows (Media Cybernetics).

Immunocytochemistry

Sections of 4% paraformaldehyde-fixed female prostates were subjected to immunocytochemistry for the detection of androgen receptor (AR) and PSA, as described previously in protocols applied to the prostate [6, 17]. Primary antibodies for AR (rabbit polyclonal immunoglobulin G [IgG], N-20) and PSA (mouse monoclonal IgG, A67-B/E3; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were employed at a dilution of 1:100. Peroxidase-conjugated specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and 3,3'-diaminobenzidine were used as secondary antibodies and peroxidase substrate, respectively. Sections were counterstained with Harris hematoxylin.

Morphometric and Stereological Analysis

Random prostatic fields from hematoxylin-eosin sections were analyzed by Image-Pro Plus version 4.5 for Windows. The stereological analyses were

carried out using Weibel multipurpose graticulate with 130 points and 60 test lines [18] to compare the relative proportion (relative volume) of each prostatic tissue component (epithelium, lumen, muscular stroma, and nonmuscular stroma) as described by Huttunen et al. [19] for prostatic tissue. Thirty microscopic fields were chosen at random. In summary, the relative values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. Absolute volumes could not be determined because it was not possible to separate the female prostate from adhering tissue and determine its weight.

The number of acinar profiles per prostate was estimated by counting of acini number present in the most central region of the prostates examined at each stage of the estrous cycle. The number of secretory, clear, and basal epithelial cells per acinus was counted, and the individual contribution of each cell type is expressed as a percentage. This count was based on the evaluation of 30 acini per group. Morphometric analysis also included the determination of epithelial cell thickness, smooth muscle cell and collagen layer thickness, nucleus:cytoplasm ratio, nuclear area (μm^2), and nuclear perimeter (μm). We employed 200 measurements per group for these parameters.

Statistical Analysis

All of the statistical tests were performed with Statistica 6.0 software (StarSoft Inc., Tulsa, OK). The quantitative results are expressed as mean $\pm$ standard error, and the analysis of variance and Tukey honest significance difference tests were applied, with $P \leq 0.05$ considered statistically significant.

RESULTS

Biometric Analysis

The statistical analyses of the gerbil adult female weights (Table 1) indicate an absence of significant differences in the body weight among the phases of the estrous cycle. However, the absolute weight of the UPT and its relative weight were significantly higher ($P \leq 0.05$) during proestrus and estrus.

Hormonal Serum Dosage

The serum levels of E_2 , Pr, testosterone, and PSA in all estrous cycle phases are shown in Figure 1. Serum E_2 levels (Fig. 1a) remained constant through proestrus (23.6 ± 4.9 pg/ml), estrus (31 ± 26.1 pg/ml), and diestrus I (27.6 ± 16.4 pg/ml) before reaching their maximum concentration peak during the diestrus II phase (116.2 ± 63.5 pg/ml; $P \leq 0.05$). The progesterone levels (Fig. 1b) were significantly higher during the estrus phase (89.7 ± 38.8 ng/ml), and they remained low ($6\text{--}13$ ng/ml) during the other phases. The serum testosterone concentration (Fig. 1c) remained low through all phases of the estrous cycle, and it did not surpass the average of $0.5\text{--}0.8$ ng/ml. The PSA levels (Fig. 1d) were similar during the phases of proestrus (0.15 ± 0.1 ng/ml), diestrus I (0.11 ± 0.05 ng/ml), and diestrus II (0.16 ± 0.05 ng/ml), but they were significantly ($P \leq 0.05$) higher during estrus (0.4 ± 0.2 ng/ml).

Number of Acinar Profiles per Sectional Area

The number of profiles of acini per sectional area varied significantly ($P \leq 0.05$) throughout the estrous cycle (Fig. 2).

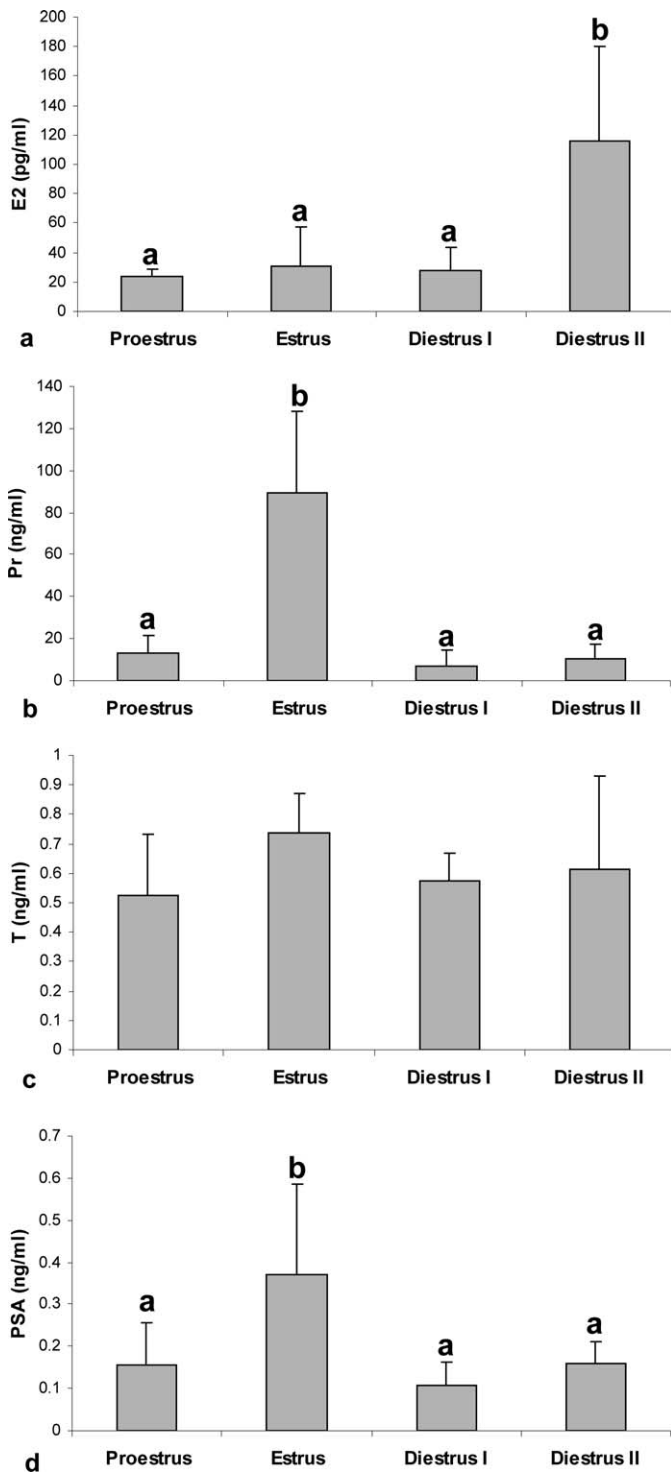


FIG. 1. Serum levels of estrogen (E2; **a**), progesterone (Pr; **b**), testosterone (T; **c**), and protein reactive to the antigen specific to the prostate (PSA; **d**) during all the phases of the estral cycle ($n = 10$ samples/group). The values mentioned correspond to the average and to the standard deviation. Different lowercase letters (a, b) represent significant differences between the analyzed groups ($P \leq 0.05$).

During proestrus, it was possible to observe, on average, 16.3 ± 7.9 acinar profiles per sectional area, and in estrus there was a decrease in these acini to 11.4 ± 4.0 . In diestrus I, it was possible to observe 14.4 ± 4.7 acinar profiles, and by the end of the cycle (diestrus II) the number of these profiles had peaked at 23.4 ± 5.6 .

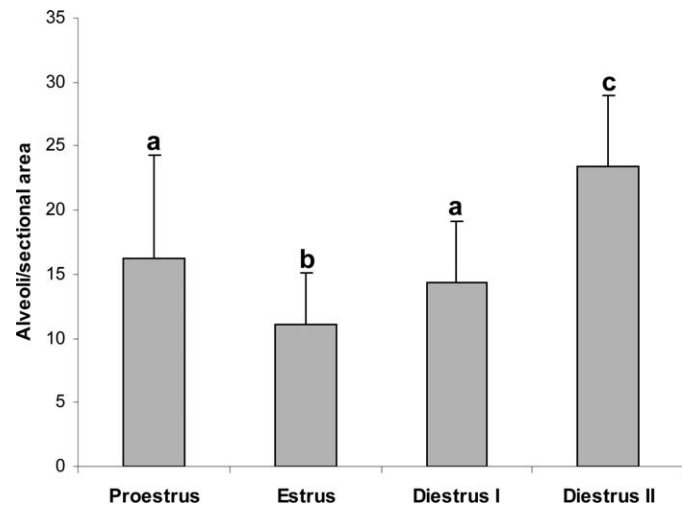


FIG. 2. Number of acini profiles per sectional area of the female prostate during all phases of the estral cycle ($n = 30$ sections per group). The values mentioned correspond to the average and to the standard deviation, respectively. Different lowercase letters (a, b, c) represent significant differences between the analyzed groups ($P \leq 0.05$).

Morphological and Morphometric Aspects

The structural characteristics of the gerbil female prostate (Fig. 3 and Table 2) varied according to the phase of the estrous cycle.

In proestrus, the gland (Fig. 3, a–c) was characterized by acini with ample lumen and columnar epithelium ($12.9 \pm 4.0 \mu\text{m}$) surrounded by a continuous layer of smooth muscle cells ($7.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$). During estrus (Fig. 3, d–f), there was an expansion of acini reaching a greater secretory epithelium thickness ($16.1 \pm 5.1 \mu\text{m}$) in comparison to the other phases. Additionally, in estrus the smooth muscle cell layer became thicker ($9.4 \pm 3.1 \mu\text{m}$), whereas the periacinar stroma became denser in cells and fibers. These data are pointed in Table 2 and were statistically significant according to Tukey test ($P \leq 0.05$).

The female prostates in diestrus I (Fig. 3, g–i) presented small acini lined with cubic epithelium ($9.4 \pm 3.3 \mu\text{m}$). The surrounding muscle layer became thinner ($5.9 \pm 2.4 \mu\text{m}$), and the stroma appeared more developed. In diestrus II (Fig. 3, j–l), the prostatic acini showed a regressive aspect, with cellular “debris” occupying the interior of their lumens (Fig. 3j). However, the secretory epithelium compartment became folded and significantly thicker ($13.4 \pm 4.6 \mu\text{m}$) compared with diestrus I, presenting columnar cells similar to those observed in proestrus (Table 2).

Stereology

Throughout the estrous cycle, relative volumes of female prostate tissue compartments (Table 2) presented significant oscillations ($P \leq 0.05$). The epithelial compartment remained constant (26%–30%) in proestrus, estrus, and diestrus II, but presented a considerable decrease in diestrus I ($18.3\% \pm 6.7\%$). The lumen presented higher development during estrus ($38\% \pm 15.5\%$) and shrank in diestrus II ($14.5\% \pm 6.3\%$). The volume of muscular stroma remained constant in proestrus, estrus, and diestrus I (14%–19%), but grew during diestrus II ($26.8\% \pm 12.2\%$). The volume of nonmuscular stroma was higher in diestrus I ($38.2\% \pm 15.3\%$) and remained constant (24%–31%) during the rest of the cycle.

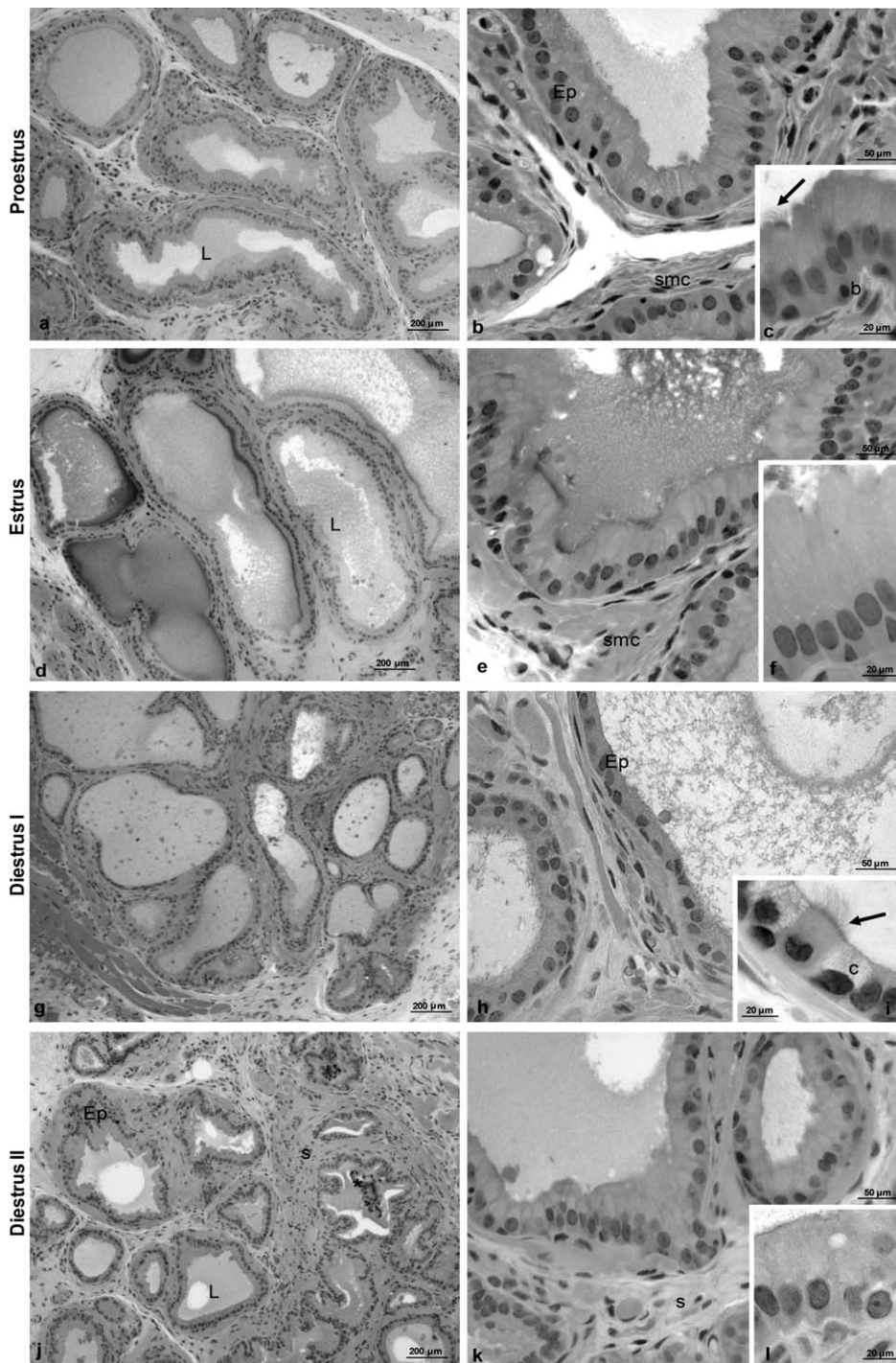


FIG. 3. Histological sections of the gerbil female prostate during all phases of the estral cycle. Staining: hematoxylin-eosin. Ample lumens (L) and fully developed epithelia (Ep) can be observed during proestrus (a–c) and estrus (d–f). Diestrus I (g–i) is characterized by the decrease of both the lumen volume and the epithelium height. Cell “debris” (*) is observed in the lumen of the glands during the diestrus II (j–l) phase. Observe the epithelial folding in the diestrus II phase. Arrows show ciliated cells. smc, Smooth muscle cell; s, stroma; b, basal cell; c, clear secretory cell. Bars = 20 μ m (c, f, i, l), 50 μ m (b, e, h, k), and 200 μ m (a, d, g, j).

212

213

Frequency of Female Prostate Cell Types During the Estrous Cycle

The dark (Table 2) or typical secretory cells were the dominant cell type during all estrous cycle phases, amounting to about 75%–80% of the female prostatic cells. A minor proportion of this cell type was observed during diestrus II, which was a phase characterized by a greater expression of basal and ciliated cells. The proportion of clear cells remained low throughout the cycle, and they did not exceed 1.3%. Proliferating cells were also rare, and the smaller mitotic figures were observed in estrus, but they did not surpass $0.2\% \pm 0.02\%$.

Karyometry

The karyometric analysis of the gerbil female prostate (Table 2) shows that there were slight nuclear alterations during the estrous cycle ($P \leq 0.05$). These changes include a slight rise in the nuclear area during estrus and a decrease in nuclear perimeter during diestrus phases I and II. Diestrus I showed a greater nuclear:cytoplasmic area ratio.

Secretory Activity of the Female Prostate

Figure 4 shows the glycoprotein (PAS-positive) secretion pattern and the expression of the serineprotease reactive to

TABLE 2. Descriptive statistics of stereology, frequency of epithelial cells, and morphometry and kariometry of the adult gerbil female prostate in different phases of the estrous cycle.*

Parameter	Groups			
	Proestrus	Estrus	Diestrus I	Diestrus II
Stereology (%) [†]				
Epithelium	29.2 ± 7.0 ^a	25.9 ± 9.5 ^a	18.3 ± 6.7 ^b	28.3 ± 5.7 ^a
Lumen	21.1 ± 11.7 ^a	38.0 ± 15.5 ^b	29.1 ± 15.9 ^a	14.5 ± 6.3 ^c
Muscular stroma	19.6 ± 5.1 ^a	13.9 ± 3.8 ^a	14.4 ± 8.2 ^a	26.8 ± 12.2 ^b
Nonmuscular stroma	30.1 ± 12.9 ^a	22.2 ± 13.3 ^a	38.2 ± 15.3 ^b	30.4 ± 9.6 ^a
Frequency of epithelial cell types (%) [‡]				
Secretory cells	80.3 ± 6.8 ^a	81.3 ± 7.8 ^a	77.9 ± 5.9 ^a	74.1 ± 7.4 ^b
Clear secretory cells	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.5
Basal cells	17.7 ± 6.4 ^a	17.7 ± 7.7 ^a	19.3 ± 5.4 ^a	22.2 ± 6.7 ^b
Ciliated cells	0.2 ± 0.2 ^a	0	0.3 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.2 ^b
Proliferative cells	1.1 ± 0.5 ^a	0.2 ± 0.2 ^b	1.3 ± 0.5 ^a	1.5 ± 0.5 ^a
Morphometry (thickness [μm]) [§]				
Secretory cell	12.9 ± 4.0 ^a	16.1 ± 5.1 ^b	9.4 ± 3.3 ^c	13.4 ± 4.6 ^a
Smooth muscle layer	7.1 ± 2.9 ^a	9.4 ± 3.1 ^b	5.9 ± 2.4 ^c	9.1 ± 3.5 ^b
Karyometry [§]				
Nuclear area (μm ²)	14.5 ± 3.5 ^a	15.9 ± 3.3 ^b	13.6 ± 3.8 ^a	13.8 ± 3.1 ^a
Nuclear perimeter (μm)	15.2 ± 3.2 ^a	15.8 ± 1.7 ^a	14.7 ± 2.0 ^b	14.7 ± 1.7 ^b
Nucleus/cytoplasm ratio	0.20 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.07 ^b	0.22 ± 0.05 ^a

* Values are mean ± SD.

[†] n = 30 areas in 5 animals/group.[‡] n = 30 acini/group.[§] n = 200 measurements in 5 animals/group.^{a,b,c} Different superscripts letters indicate significant differences between the phases of the estrous cycle ($P \leq 0.05$).

human anti-PSA antibody. In proestrus (Fig. 4, a and b) and in estrus (Figs. 43,f) it was possible to observe a great amount of PSA-positive secretion in the glandular lumen and in the cytoplasm of some dark secretory cells. Clear secretory cells are PSA negative. Glycoprotein secretion decreased considerably during diestrus I and II, since it was observed in small amounts in the lumen and in the apical portion of the secretory cells.

The human anti-PSA antibody-reactive serineprotease was expressed in large amounts in the glandular lumen and in the apical portion of the secretory epithelial cells during the proestrus phase (Fig. 4, c and d). During the estrus (Fig. 4, g and h), diestrus I (Fig. 4, k and l), and diestrus II (Fig. 4, o and p) phases, PSA staining was observed in the supranuclear cytoplasm of isolated clusters of secretory epithelial cells.

Expression of ARs

Immunocytochemical analyses showed that ARs are expressed during all estrous cycle phases (Fig. 5). In the epithelium, AR expression occurs in the basal, proliferative, ciliated, and dark secretory cells. The clear secretory cells do not express AR (Fig. 5a). In the stroma, ARs are expressed by fibroblasts and smooth muscle cells.

The AR expression pattern is similar during the proestrus, diestrus I, and diestrus II phases, in which the occurrence of this receptor is greatest in the epithelial compartment (Fig. 5, a, b, e–h). During the estrus phase, AR expression is highest in the stromal compartment (Fig. 5, c and d).

DISCUSSION

The results obtained from the present study indicate that the gerbil female prostate activity presents cyclical dynamics during the estrous cycle. These dynamics include increasing prostatic growth and a rise in secretory activity during the proestrus and estrus phases, as well as a gradual diminishment of secretory activity and a decline in glandular development during diestrus phases I and II. These cyclical oscillations

appear to be determined by the E₂ and Pr hormonal peaks, since the serum testosterone levels remained constant throughout the estrous cycles of these animals.

In female Wistar rats (with a 4-day estrous cycle) and mice (with a 6- to 7-day estrous cycle), the estrous cycle is characterized by the occurrence of an E₂ peak followed by a Pr peak, both during proestrus. In humans (28-day menstrual cycle), the E₂ cycle occurs by the end of the follicular phase, and the progesterone peak occurs in the middle/end of the luteal phase of the menstrual cycle [20]. However, the serum hormonal profile of female gerbils, whose estrous cycle varies from 4 to 6 days, differed from the one observed in humans, rats, and mice, in that the gerbil Pr peak occurred during estrus and the E₂ peak during diestrus II.

By the end of the estrus (diestrus II) cycle, the female prostate presented a regressive aspect, with a large number of small acini containing little interior secretion. The secretory epithelium was moderately tall. Due to the greater occurrence of basal and ciliated cells, the proportion of secretory cells during this phase was the smallest of the entire estrous cycle.

The natural occurrence of ciliated cells in the gerbil female prostate was described in previous studies [9]. The role that these cells play in the female prostate remains unknown but, based on the hormonal results obtained in the present work, it is clear that their expression is influenced by the balance between the E₂ and Pr levels. Studies that evaluate the effects of hormonal oscillation during the reproductive cycle on the ciliogenesis of uterine tube epithelium showed that the estrogens induce cytodifferentiation and the growth of ciliated epithelial cells [11]. Thus, the greater expression of ciliated cells in the gerbil female prostate during diestrus II may be associated with the E₂ peak that occurred during this phase.

After finishing a cycle in a state of low secretory activity, the female prostate initiates a new estrous (proestrus) cycle with low E₂ and Pr serum levels and showing high glandular development. The prostatic acini became larger, showing wide lumens full of PSA-positive glycoprotein secretion.

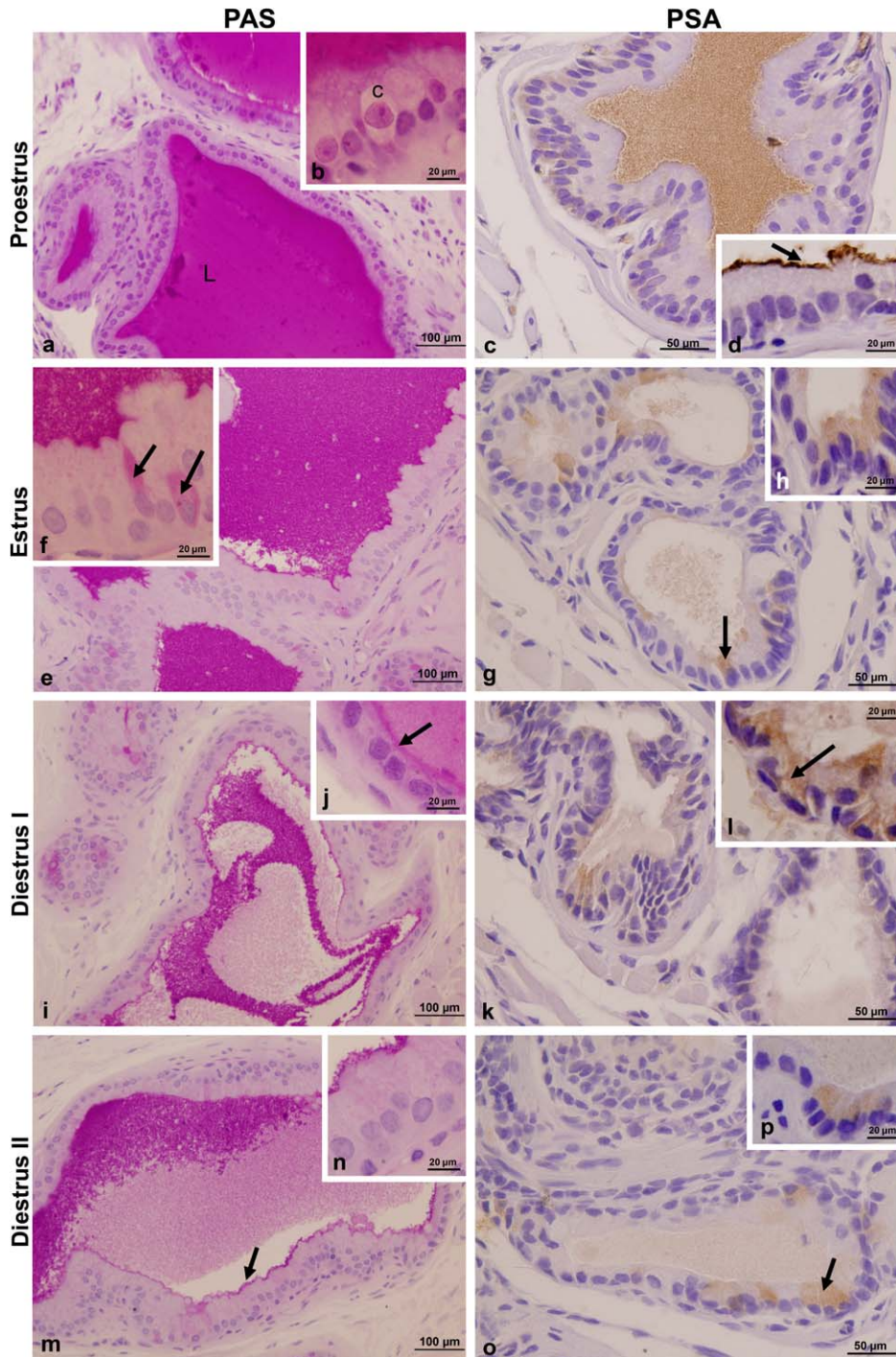


FIG. 4. Histological sections of the gerbil female prostate subjected to the reaction of PAS and the immunostaining serineprotease reactive to the human anti-PSA antibody (PSA). Counterstaining: Harris hematoxylin. In the PAS reaction (a, b, e, f, i, j, m, n), a great amount of PAS-positive secretion is observed in the lumen (L) and in the cytoplasm of the dark secretory cells (arrows) during the proestrus (a, b) and estrus (e, f) phases. Clear secretory cells (c) are PAS negative. During diestrus I (i, j) and diestrus II (m, n), there is a small amount of secretion in the lumen and in the apical portion of the secretory cells (arrows). In PSA immunostaining (c, d, g, h, k, l, o, p), it is possible to observe secretion in the glandular (*) lumen and in the apical portion of the secretory cells (arrows). In estrus (g, h), diestrus I (k, l), and diestrus II (o, p), the PSA staining occurs in the supranuclear cytoplasm of isolated clusters of secretory epithelial cells (arrows). Bars = 20 μ m (b, d, f, h, j, l, n, p), 50 μ m (c, g, k, o), and 100 μ m (a, e, i, m).

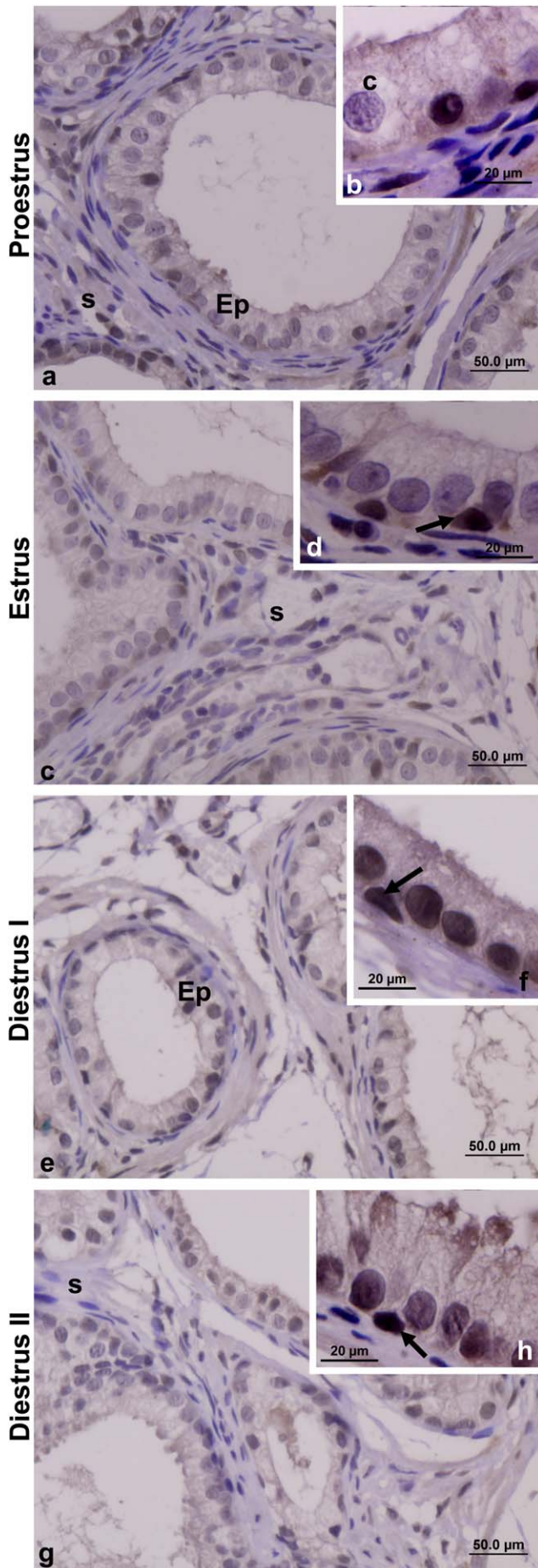
214

215

The next phase (estrus) was characterized by a peak of serum progesterone levels. During this phase, the female prostate development was maximal. The acini became less numerous but larger and more filled with secretion. The epithelial cells reached the maximum height and presented a typically secretory phenotype. During this phase, the AR expression was intense, mainly in stromal cells and epithelial basal cells. This staining pattern was differentiated from the other phases of the estrous cycle by more frequent and intense staining of secretory cells and basal cells within the epithelial compartment. Immunocytochemical studies with male rats showed lack of AR expression in basal cells [21]. However, male gerbils express AR-positive basal cells [22] similar to the

ones observed in females during the estrous cycle. In male gerbils, the basal cells are associated with the maintenance and regeneration of prostatic epithelium. These cells appear to play the same role in the gerbil female prostate, since the estrous cycle hormonal oscillations directly alter the proportion of cell types in prostatic epithelium.

Another remarkable feature of the estrus phase was that the serum PSA concentration reached values almost three times higher than the values observed during the other cycle phases. The PSA and PSA-reactive serineprotease are produced not only by the prostatic cells but also by the breast and other tissues in males and females [23]. This expression is stimulated by androgens and progesterone, and it is inhibited by estrogens



[24]. Studies on PSA expression during the human menstrual cycle showed that the serum concentration of this serineprotease is highest in the middle/end of the follicular phase. This higher serum PSA concentration was directly related to the progesterone peak that occurs in the middle/end of the luteal phase [25]. These results obtained with women are similar to those obtained by the present study using female gerbils and provide another indication of the influence that the estrous cycle exercises on prostatic physiology. Although PSA expression is not exclusive to prostatic tissue, its higher serum concentration can be associated with the intense prostatic activity that took place during estrus in the gerbils. Thus, the greater prostatic development observed during estrus, which is the period of sexual receptivity and ovulation, can be associated with a higher production of the female prostatic fluid, which will contribute to fertilization success.

Although estrus was characterized as a phase of intense prostatic development, diestrus I represented a period of declining glandular activity. The prostatic acini became smaller and presented little secretion in their interior. The prostatic epithelium became lower but intensely AR positive. The hormonal profile during this phase was characterized by a brisk drop of serum Pr levels, whereas the E_2 and testosterone levels remained constant.

Based on the results obtained by the present study, it is possible to conclude that the morphophysiological alterations that occurred in the female prostate during the estrous cycle are related to oscillations of serum E_2 and Pr levels and to the interaction of both of these hormones with constant androgen levels. The role that these estrogens play in the prostate has been studied in male rodents, and it is related to the modulation of androgen effects [26]. Recent studies have demonstrated the important role of these estrogens in prostatic development and homeostasis, and they also have proven that they present different actions that are mediated by epithelial (ESR2, also known as $ER\beta$) and stromal (ESR1, also known as $ER\alpha$) receptors [27]. Nevertheless, there are no studies so far that evaluate the effect of progesterone on the female prostate or the interaction between progesterone and estrogens in this gland. Previous work has described that ARs are expressed predominantly in the human and nonhuman primate endometrial stroma throughout the menstrual cycle. Under normal cyclic conditions, stromal AR levels seem to be upregulated by E_2 and suppressed by Pr [28]. In this manner, more studies that investigate the specific role that the progesterone/androgen/estrogen interaction plays in the female prostate are necessary, especially concerning why the imbalance among these hormones has been associated with the installation of prostatic disorders in aging women [13, 14, 29] and female rodents [30].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior for his technical assistance, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory. Acknowledgment is also due to Mrs. Ricardo S. Sobreira and James Welsh for English language revision of this paper. This paper is part of the thesis presented by R.A.F. to the Institute of Biology,

FIG. 5. Immunocytochemical reactions to AR. Counterstaining: Harris hematoxylin. During the proestrus (a, b), diestrus I (e, f), and diestrus II (g, h) phases, the AR expression is higher in the epithelium, whereas during the estrus phase (c, d), its expression is more evident in the stromal compartment. Arrows show basal cells. EP, Epithelium; s, stroma; c, clear secretory cells. Bars = 20 µm (b, d, f, h) and 50 µm (a, c, e, g).

UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a Master in Science degree.

REFERENCES

- Gross SA, Didio LJ. Comparative morphology of the prostate in adult male and female of *Praomys (mastomys) natalensis* studies with electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* 1987; 19:77–84.
- Zaviačič M, Jakubovská V, Belošovič J, Breza J. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embriol (Berl)* 2000; 201:51–61.
- Zaviačič M, Zaviačič T, Ablin RJ, Breza J, Holoman K. The female prostate: history, functional morphology and sexology implications. *Sexologies* 2001; 11:44–49.
- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat* 2002; 184:341–345.
- Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol Int* 2004; 28:335–344.
- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 2006; 75:370–379.
- dos Santos FC, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 2003; 35:447–457.
- Zaviačič M. The Female Prostate: From Vestigial Skene's Paraurethral Glands and Ducts to Woman's Functional Prostate, 1st ed. Bratislava, Slovakia: Slovak Academic Press; 1999.
- Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res* 2007; 328:617–624.
- Santos FC, Custódio AM, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. Anti-estrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil female prostate and varies (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 2008; (in press).
- Goldberg JM, Friedman CI. Effect of hormonal manipulation on human fallopian tubal epithelium in vitro. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:132–135.
- Nishino N, Totsukawa K. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim* 1996; 45:283–288.
- Sloboda J, Zaviačič M, Jakubovský J, Hammar E, Johnsen J. Metastasizing adenocarcinoma of the female prostate (Skene's paraurethral glands). Histological and immunohistochemical prostate markers studies and first ultrastructural observation. *Pathol Res Pract* 1998; 194:129–136.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol* 2005; 12:117–119.
- Olsson AY, Lilja H, Lundwall A. Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics* 2004; 84:147–156.
- Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques, 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2002.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate. *Cell Biol Int* 2005; 29:809–816.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1978; 12:131–155.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat* 1981; 3:357–370.
- Staley K, Scharfman H. A woman's prerogative. *Nat Neurosci* 2005; 8:697–698.
- Prins GS, Birch L. Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology* 1993; 130:3066–3073.
- Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 2008; (in press).
- Schmidt S, Franke M, Lehmann J, Loch T, Stöckle M, Weichert-Jacobsen K. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology* 2001; 57:717–720.
- Galadari I, Al-Mazroei M, Alkaabi J. Prostatic-specific antigen and idiopathic hirsutism in females. *Int J Dermatol* 2004; 43:275–277.
- Zarghami N, Grass L, Sauter ER, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in serum during the menstrual cycle. *Clin Chem* 1997; 43:1862–1867.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res* 2005; 322:173–181.
- Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 2008; 73:233–244.
- Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HOD, Baird DT, Brenner RM. Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometrium. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86:2668–2679.
- Sharifi-Aghdas F, Ghaderian N. Female paraurethral cysts: experience of 25 cases. *BJU Int* 2004; 93:353–356.
- Custódio AMG, Santos FCA, Campos SGP, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. Aging effects on the Mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec* 2008; 291:463–474.

3D evaluation of the glandular structure and acid phosphatase activity in the secretory epithelium of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate during estrous cycle

*Avaliação tridimensional da estrutura glandular e atividade fosfatásica ácida no epitélio secretor da próstata feminina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) durante ciclo estral*

Trabalho a ser submetido à revista Cell and Tissue Research

Avaliação tridimensional da estrutura glandular e atividade fosfatásica ácida no epitélio secretor da próstata feminina do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) durante ciclo estral

*Ricardo A. Fochi¹; Fernanda C. A. Santos²; Rejane M. Góes²; Patrícia S. L. Vilamaior³;
Sebastião R. Taboga^{2*}*

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil. ²Departamento de Biologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil. ³Departamento de Ciências Biológicas, UNIRP, Centro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Título Resumido: Avaliação tridimensional e da atividade fosfatásica ácida da próstata de fêmeas de gerbilo

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Procs. No. 06/06876-1 e 07/00711-3) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc. No. 301111/05-7).

***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

A próstata feminina do gerbilo (*Meriones unguiculatus*) é semelhante à próstata feminina de humanos, e embora possua um tamanho reduzido, é uma glândula funcional com uma intensa atividade secretora. Uma forma de avaliar a sua atividade secretora é através da observação da fosfatase ácida prostática (PAP), a qual é uma enzima catalisadora da hidrólise de monoésteres ortofosfato. Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o perfil secretor quanto à atividade da PAP durante o ciclo estral de gerbilos, comparando-o com o seu aspecto macroscópico observado através da reconstrução tridimensional. Para isso foram utilizadas técnicas enzimáticas, utilizando o β -glicerofosfato como substrato, para análise da PAP bem como técnicas de reconstrução tridimensional através de cortes histológicos seriados. Os dados obtidos demonstraram que a próstata de fêmeas de gerbilo possui uma intensa atividade fosfatásica ácida durante todo o ciclo estral. Foi observado predominância de marcação acinar forte, com um pequeno aumento na fase de estro bem como uma redução de ácinos com ausência de marcação. Nas fases seguintes (diestro I e II) constatou-se uma redução de marcação acinar forte e intermediária, assim como um aumento de marcações fracas e ausentes. Quanto à reconstrução pôde-se observar que a próstata feminina do gerbilo possui um comportamento bifásico durante o ciclo estral, apresentando ácinos maiores com lumens amplos nas fases de proestro e estro em contraposição aos ácinos pequenos com lumens reduzidos presentes nas fases de diestro I e diestro II. Estas oscilações cíclicas parecem ser determinadas pelos picos hormonais de estrógeno no diestro II e pelos altos níveis de progesterona no estro, uma vez que os níveis de andrógenos permanecem constantes durante todo o ciclo estral.

Palavra-chave: próstata feminina, fosfatase ácida, reconstrução 3D, gerbilo, ciclo estral

Introdução

A próstata de fêmeas de gerbilos adultas possui uma localização parauretral, nas suas regiões proximal e medial, exibindo um íntimo contato com a sua parede muscular. Histologicamente, ela é formada pelas mesmas estruturas da próstata masculina: ácinos e ducto, os quais estão inseridos numa matriz músculo-fibrosa. Os seus ácinos são revestidos por um epitélio secretor, o qual varia de cúbico à colunar alto, formado por três tipos celulares: células secretoras típicas, células secretoras claras e células basais. Embora o seu volume seja muito reduzido em adultos, a próstata de gerbilos fêmeas têm se mostrado morfológicamente semelhante ao lobo ventral da próstata de machos. Os aspectos histoquímicos e ultra-estruturais dessa glândula permitem afirmar que ela é funcional e capaz de produzir secreções de natureza glicoprotéicas. Estudos envolvendo a administração de andrógenos e de agentes antiestrogênicos em próstata de gerbilos mostraram que esta glândula expressa receptores androgênicos (AR) e estrogênicos (ER), sendo sensíveis às oscilações dos níveis séricos destes hormônios (Santos et al., 2003, 2006, 2008).

O ciclo estral é o nome dado às mudanças fisiológicas naturais ocorridas no organismo feminino, induzidas pelos hormônios envolvidos na reprodução, da maioria das espécies de mamíferos, com exceção dos humanos. Em fêmeas de gerbilos este ciclo está dividido em quatro estágios regulares, que são: proestro, estro, diestro I e diestro II (Nishino et al., 1996). Fochi e colaboradores (2008) em estudo com gerbilos da Mongólia constataram que as flutuações hormonais, principalmente dos hormônios estrógeno e progesterona e de suas interações com a testosterona, decorrentes do ciclo estral são potencialmente capazes de promoverem alterações morfológicas e fisiológicas na próstata de fêmeas destes animais. Através de técnicas histoquímicas (PAS), quantitativas e imunocitoquímicas (AR e PSA) eles demonstraram que existe um comportamento bifásico na morfofisiologia prostática durante o ciclo, havendo um maior desenvolvimento desta glândula nas fases de proestro e estro, e uma regressão morfológica e secretora nas fases de diestro I e diestro II.

Embora este trabalho tenha demonstrado alguns aspectos da morfofisiologia prostáticas de fêmeas durante o ciclo estral, nada foi demonstrado em relação à atividade da enzima fosfatase ácida prostática (PAP) e nem dos aspectos macroscópicos da próstata durante as fases do ciclo. A fosfatase ácida é uma enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise de monoésteres ortofosfato sob condições ácidas (Suter et al., 2001). Existem cinco classes dessa enzima presentes nos humanos: lisossomal (LAP); eritrocítica (EAP); macrofágica (MAP); osteoclástica (OcAP) e prostática (PAP). Quanto à PAP, o monitoramento da sua atividade tem se mostrado muito útil como marcador histológico e sorológico de distúrbios prostáticos em machos, devido à sua atividade normal também estar alterada nestes casos (Bull et al., 2001). Zaviačič e colaboradores (1983, 1989) mostraram que esta enzima está presente tanto em mulheres idosas de 80 anos quanto em meninas no período infantil, muito antes da puberdade. Em machos a enzima PAP é importante na hidrólise da fosforilcolina presente no plasma seminal, sendo também considerado como um marcador do desenvolvimento de características sexuais secundárias (Spring-Mills and Hafez, 1980). O seu papel na próstata de fêmeas ainda não é totalmente compreendido. No entanto, não se pode descartar que ela apresente um papel similar à do macho, principalmente no que se diz respeito à aquisição das características sexuais secundárias (Zaviačič, 1999).

Desta maneira, este trabalho visa analisar as características secretórias da próstata de fêmeas do gerbilo da Mongólia, no que diz respeito à atividade da enzima PAP, observando também o aspecto tridimensional dessa glândula nas diversas fases do ciclo estral. Para isso foram empregadas técnicas enzimáticas e de reconstrução tridimensional a partir de imagens bi-dimensionais.

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Fêmeas adultas (*Meriones unguiculatus*), com 90 dias de idade e com ciclo estral regular de 4 dias foram utilizadas no presente estudo. Esses animais foram mantidos no

Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas campus de São José do Rio Preto - SP, sob condições de luminosidade e temperatura adequadas, e alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos empregados neste trabalho estão de acordo com as normas internas do Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Unesp e do COBEA.

O procedimento de ciclagem foi efetuado por análise histológica do epitélio da vagina. O material para análise foi coletado por esfregaço vaginal, sempre às 10:00 horas da manhã do dia do sacrifício. Os animais que se encontravam na fase de interesse foram imediatamente sacrificados.

Os animais foram anestesiados com Ketamina/xilazina e então submetidos à inalação de CO₂ e, depois de pesadas, foram decapitadas para a coleta do sangue para a dosagem hormonal. As próstatas (removidas juntamente com a uretra) foram fixadas ou congeladas de acordo com a metodologia adequada para cada uma das análises.

Dosagem hormonal sérica

Os níveis plasmáticos de estradiol (E2), progesterona (Pr), testosterona (T) e antígeno específico prostático (PSA - nesta dosagem o que se verificou é uma serinoprotease reativa ao anticorpo anti-PSA humano, segundo Santos et al., 2006) foram determinados por métodos imunoquímicos. Dez amostras de cada grupo experimental foram centrifugadas a 3000rpm e armazenadas a -20°C para posteriores análises. As medidas foram realizadas em aparelho automatizado Vitros ECi-Johnson & Johnson para análise quimioluminescente ultra-sensível. A sensibilidade do método foi de 0,1-150 ng/mL para testosterona, 0,1-3.814,0 pg/mL para estradiol e 0,1-100 ng/mL para PSA humano.

Citoquímica enzimática - Atividade da Fosfatase ácida prostática

Foram utilizados cinco animais para cada fase do ciclo estral. Os complexos prostáticos foram removidos e imediatamente imersos em nitrogênio líquido para seu congelamento. Criocortes de 10µm de espessura, obtidos em criostato Leica CM1850, foram coletados em lâminas de vidro. Para a detecção da atividade de fosfatase ácida prostática foi empregado o método clássico de Gömöri (1950) modificado por Custódio e

colaboradores (2004). Os criocortes foram fixados em formalina-cálcio a 10% por 5 minutos, e lavados em água destilada. Posteriormente, foram incubados no substrato da enzima (β -glicerofosfato de sódio diluído em tampão acetato pH 5,0) em câmara úmida por 110 min a 37°C. Para a detecção da atividade enzimática foi aplicado sulfeto de amônia a 1% sobre os cortes por 3 minutos. A contra-coloração dos cortes foi feita com metil-green por 7 minutos e a montagem em xarope de glicerina. O controle negativo foi obtido pela ausência do substrato no decorrer da reação.

Quatro graus de atividade de fosfatase ácida foram estabelecidos para ácinos individuais (forte, intermediário, fraco e ausente) e a frequência relativa dessas diferentes categorias foi determinada usando 6 campos por lâmina, totalizando 30 áreas por fase do ciclo estral.

Reconstrução tridimensional

Para a reconstrução tridimensional foi utilizado um animal para cada fase do ciclo estral. As próstatas coletadas foram fixadas por imersão em fixador Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 7,2, contendo 2% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído) durante 24 horas. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluídos em historesina (Historesin embedding Kit – Leica). Cortes transversais seriados de 3 μ m foram produzidos em micrótomo rotativo sendo posteriormente corados com Hematoxilina & Eosina.

O programa utilizado para o processamento, alinhamento e reconstrução 3D, das várias imagens obtidas dos cortes seriados foi o Reconstruct (Fiala JC, 2005). Para obtenção do modelo 3D após o alinhamento correto das imagens, a uretra, ductos e alvéolos prostáticos foram isolados em cada imagem e traçados manualmente através do programa. O software utilizado para renderização final da imagem 3D foi o Blender 2.46 (Blender Foundation, Copyright © 2001, 2008 by NaN Technologies BV, Amsterdam).

As digitalizações das imagens histológicas, bem como suas avaliações, foram feitas em microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens – Image Pro-plus 6.0 (Copyright© 1993-2006 Média Cybernetics, Inc.).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no software Statistica 6.0 (Copyright©StarSoft, Inc. 1984-1996, Tulsa, OK, USA). Os testes de hipóteses utilizados para comprovar a significância dos resultados, expressos como média $\pm$ erro padrão, foram a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Dosagem hormonal sérica

Os níveis séricos de E2, Pr, T e PSA em todas as fases do ciclo estral estão apresentados na Tabela I. Os níveis séricos de E2 mantiveram-se constantes nas fases de proestro, estro e diestro I, alcançando um pico máximo de concentração na fase de diestro II. Os níveis de progesterona foram significativamente mais elevados na fase de estro, e mantiveram-se baixos nas demais fases. A concentração de T no soro foi baixa em todas as fases do ciclo estral, não ultrapassando a média de 0,5 – 0,8 ng/ml. Os níveis de PSA foram semelhantes nas fases de proestro, diestro I e diestro II, sendo significativamente ($p \leq 0,05$) mais elevados no estro.

Citoquímica enzimática - Atividade da Fosfatase ácida prostática

A marcação citoquímica para fosfatase ácida prostática (PAP) foi observada em todas as fases do ciclo estral do gerbilo (figura 1).

Houve diferentes padrões de marcação nas quatro fases, com ácinos apresentando marcações fortes, intermediárias, fracas e alguns ausentes. Nas diferentes fases, a PAP se mostrou presente tanto na região supranuclear das células epiteliais, quanto ocupando todo o citoplasma dessas células (figura 1b). Os ácinos, com atividade fosfatásica ácida, considerados fortes possuíam marcações ao longo de todo citoplasma acinar (figuras 1a,b,e,h,k), os intermediários apresentavam interrupções com ausência de marcação ao longo de seu epitélio (figura 1g), os ácinos fracos apresentavam marcações dispersas ao

longo do seu epitélio (figuras 1d,k,n) e os ausentes não possuíam PAP (figura 1j,n). No diestro II pôde-se constatar também a presença de marcações no interior do lúmen de alguns ácidos (fig. 1l).

A análise quantitativa ilustrada na figura 2 demonstrou que em todas as fases houve a predominância de marcação forte em relação às marcações intermediária, fraca e ausente. Embora não tenham sido constatadas diferenças estatisticamente significativas das marcações ao longo do ciclo estral, pôde-se observar, morfológicamente, que nas fases de diestro I e II havia uma menor quantidade de ácidos com marcação intermediária e uma maior frequência de ácidos com ausência de marcação (figura 2). É importante ressaltar, também, que em estro foi observado a menor proporção de ácidos com ausência de marcação enquanto que em diestro II a maior proporção de ácidos com ausência de marcação para PAP.

Estrutura 3D

A reconstrução 3D da próstata feminina durante o ciclo estral pode ser observada nas figuras 3 e 4. Em todas as fases a próstata apresenta um conjunto de ductos inseridos ao longo da parede da uretra mediana proximal, perfazendo em média um total de 1,7 mm de comprimento. Os ácidos são alinhados paralelamente à uretra, mostrando tamanhos e espessuras variadas, sendo que no gerbilo da Mongólia os mesmos podem estar presentes tanto bilateralmente quanto unilateralmente. Ambos os conjuntos, ductos e alvéolos, se comunicam em algumas regiões da uretra (figuras 3 e 4). Nas fases de proestro (figura 4A) e estro (figura 4B), os alvéolos apresentam dimensões maiores em relação às fases de diestro I (figura 4C) e II (figura 4D). No material utilizado para a reconstrução tridimensional da fase diestro II foi encontrado somente glândula prostática unilateral (figuras 3D e 4D). Ainda nesta fase, é possível observar a presença de ductos isolados, os quais não se comunicam com os ácidos prostáticos. É importante ressaltar que a grande maioria dos complexos prostáticos estudados, que eram bilaterais, apresentava uma maior quantidade de ácidos prostáticos do lado direito do animal, sendo que aqueles que eram unilaterais possuíam apenas os ácidos do lado direito do animal (figura 4).

Discussão

Os resultados demonstraram que a próstata feminina do gerbilo da Mongólia apresenta um estado ativo em todo o ciclo estral. Este dado é importante, pois é a primeira vez que se demonstra atividade da fosfatase ácida na próstata durante o ciclo estral. O padrão elevado da marcação para PAP, observado durante o ciclo, corrobora com dados anteriormente apresentados, tanto para fêmeas da mesma espécie (Custódio et al. 2004) quanto para a próstata de humanos (Zaviacic et al. 1985, 1999). A mesma localização da atividade da PAP na região supranuclear das células epiteliais secretoras, assim como todo o citoplasma, já havia sido mostrada em outros estudos (Satoh et al. 2001; Custódio et al. 2004).

Embora existam duas formas bioquimicamente distintas de fosfatase ácida prostática, uma intracelular e outra secretada no interior do lúmen (Veeramini et al. 2005), a presença desta segunda forma não pôde ser evidenciada ao longo do ciclo, provavelmente devido ao tratamento do tecido para a técnica citoquímica, assim como a sua hidrólise proteolítica no fluído prostático. A reação positiva, observada no lúmen de alguns ácinos em diestro II deve-se à presença de “debris” celulares, provenientes das células secretoras epiteliais, comumente observados neste período do ciclo (Fochi et al., 2008). A formação desses “debris” celulares, os quais são destacamentos de células secretoras do epitélio da próstata, é provavelmente um mecanismo que a glândula prostática possui para reduzir o tamanho dos seus ácinos em resposta aos estímulos atuantes no ciclo estral.

As oscilações regulares na atividade da PAP, observadas ao longo do ciclo estral do gerbilo da Mongólia, podem ser entendidas correlacionando-se o seu padrão de expressão aos níveis séricos constantes de testosterona, já que a sua expressão é influenciada positivamente pelos níveis androgênicos (Tenniswood et al., 1976 e 1978; Oliveira et al., 2006, Fochi et al. 2008). Embora a concentração de testosterona tenha sido baixa em todo ciclo, a expressão de receptores androgênicos (AR) é constante (Fochi et al., 2008), sendo sua quantidade, provavelmente, suficiente para a manutenção do alto grau de marcação para PAP (Granadian et al., 1997). Embora o papel do estrógeno na morfologia prostática seja bastante conhecido (Risbridger et al., 2005; Santos et al., 2008), a sua influência sobre a

atividade fosfatásica ácida não é totalmente compreendida. Dulińska e colaboradores (2002), utilizando cultura celular de células da próstata, observaram que a adição de estrógeno no meio de cultura destas células resulta em um aumento na expressão da PAP, sendo intensificado quando somado a 5- α -dihidrotestosterona. A predominância de marcação forte para PAP, assim como a presença de uma menor frequência de ácinos com ausência de marcação na fase de estro, coincide com as características morfológicas deste período e do seu anterior, os quais mostraram um maior desenvolvimento prostático (Fochi et al., 2008), demonstrado também pela reconstrução 3D. Paralelamente às alterações morfológicas, a expressão de PAP manteve-se intensa no decorrer do ciclo, mesmo nas fases em que se constatou uma regressão morfológica da glândula prostática, diestro I e II (Fochi et al., 2008), observada também pela reconstrução 3D, a qual possivelmente seja a responsável pela maior quantidade de ácinos com ausência de marcação observada neste período. Como relatado anteriormente, os picos de progesterona em estro e de estradiol em diestro II podem estar relacionados com as modificações na morfologia prostática no decorrer do ciclo (Fochi et al., 2008), observada também na reconstrução tridimensional, na qual em estro evidencia-se uma região acinar mais ampla em relação ao diestro II.

Através dos resultados obtidos é razoável concluir que as interações hormonais, principalmente entre estrógeno, progesterona e testosterona, comuns ao ciclo menstrual da mulher bem como ao ciclo estral de roedores, tem bastante influência na morfofisiologia prostática. Embora a influência que o estrógeno exerce sobre os andrógenos, modulando os seus efeitos (Prins e Korach, 2008), seja bastante estudada, o papel da progesterona nestas interações, e por consequência no comportamento morfológico e secretor da próstata, é pouco conhecida. Desta maneira, são de extrema importância estudos que visem entender as interações entre esses três principais hormônios, os quais resultarão na maior compreensão das desordens prostáticas ocorridas durante o envelhecimento da mulher e de fêmeas de roedores.

Referências Bibliográficas

- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelnos PN. 2001. Demystified acid phosphatases. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 55:65-72.
- 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.
- Dulińska J, Laidler P, Labedź M. 2002. Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors. *Acta Biochim Pol*, 49(2): 357-368.
- Fiala JC (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microscopy* 218:52-61.
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene's paraurethral glands). *Biol Reprod*, 79(6):1084-91.
- Granadian R, Lewis JG, Chisholm GD. 1997. Androgen concentration in prostate and serum of the male and female *Praomys* (*Mastomys*) *Natalensis*. *Invest Urol*, 15:212-214.
- Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. 2006. 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):235-245.
- Prins GS, Korach KS. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73:233-244.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res*, 322: 173-181.
- Santos FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory

- activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75(3): 370-379.
- Santos FCA, Custódio AMG, Campos SGP, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. 2008. Anti-estrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil female prostate and ovaries (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, *In press*.
- Sato 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*, 29:237-241.
- Spring-Mills E, Hafez ESE. 1980. Male accessory sex glands. *Br J Urol*, 53:263-5.
- Sternberg SS. 1996. *Histology for pathologists*. 1 ed. Hong Kong: Lippincott-Raven, 1216p.
- Tenniswood M, Bird CE, Clark AF. 1976. Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can J Biochem*, 54:350-357.
- Tenniswood MP, Abrahams PP, Bird CE, Clark AF. 1978. Effects of castration and androgen replacement on acid phosphatase activity in the adult rat prostate gland. *J Endocrinol*, 77:301-308.
- Veeramani S, Yuan TC, Chen SJ, Lin FF, Petersen JE, Shaheduzzaman S, Srivastava S, MacDonald RG, Lin MF. 2005. Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12(4):805-22.
- Zaviačič M, Brozman M, Holomán IK, Zaviaciová A, Oberucová J. 1983. New observations on the paraurethral (Skene's) ducts and glands in females. *Bratisl Lek Listy*, 79(5):533-44.
- Zaviačič M. 1985. The adult human female prostate homologue and the male prostate gland: a comparative enzyme-histochemical study. *Acta Histochem*, 77:19-31.
- Zaviac M, Porubský J, Vierik J, Holomán IK. 1989. Enzymes of the female prostate during the fertile age and after menopause. Comparative histochemical study. *Cesk Gynekol*, 54(10):755-60.

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

Legenda das Figuras

Figura 1 - Criocortes da próstata feminina do gerbilo, nas quatro fases do ciclo estral, submetidos à reação para fosfatase ácida prostática. Contracoloração: Metil-Green. Em todas as fases houve uma predominância de marcação forte (F), sendo poucas vezes observado ausência (A) de reatividade. Foram constatados alguns ácinos com marcação intermediária (I) e fraca (Fr) entremeados aos ácinos com forte reatividade. No diestro II foi evidenciada presença de reatividade nos “debris” celulares (seta) presentes nos lumens de alguns ácinos. A marcação para esta enzima foi encontrada no ápice das células secretoras (cabeça de seta) ou ocupando todo o citoplasma (seta dupla). A ausência de marcação nos ácinos prostáticos das lâminas do controle negativo (*) confirmou a funcionalidade da técnica.

Figura 2 – Percentual dos diferentes padrões da atividade da fosfatase ácida prostática nas fases de proestro, estro, diestro I e diestro II. Os valores correspondem à média $\pm$ o erro padrão da média. Observar que durante todo o ciclo existe predominância de marcação acinar forte para a fosfatase ácida, mostrando que a glândula prostática é ativa durante todo o ciclo. Observar também que em estro encontra-se a menor frequência de ácinos com ausência de marcação, enquanto que em diestro II encontra-se a maior frequência de ácinos com ausência de marcação e uma frequência baixa de ácinos com marcação intermediária.

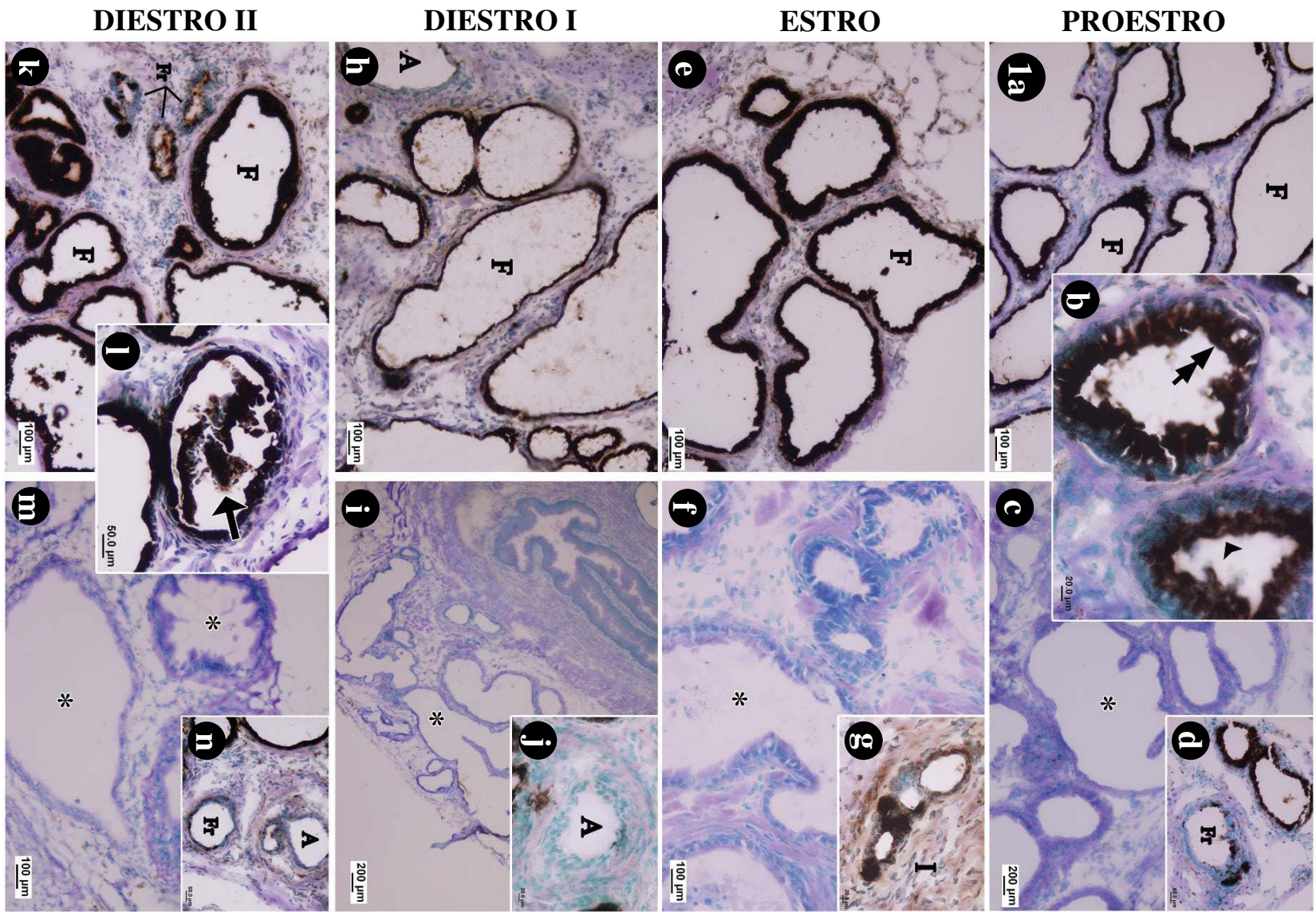
Figura 3 – Reconstrução Tridimensional da próstata de gerbilo fêmea adulta (*Meriones unguiculatus*) durante o ciclo estral – visão longitudinal. (A) e (B) visão longitudinal da próstata feminina do gerbilo nas fases de proestro e estro, respectivamente; (C) e (D) visão longitudinal da próstata feminina do gerbilo nas fases de diestro I e diestro II, respectivamente. As setas mostram os ductos prostáticos (azul) inseridos na parede da uretra (amarelo), os quais se comunicam com a glândula prostática (cabeça de seta) em algumas regiões. A estrutura em vermelho representa o epitélio da uretra. Na fase diestro II, embora a glândula prostática esteja representada unilateralmente, é comum, também, a presença de próstata bilateral. Observar nessa mesma fase a presença de ductos isolados

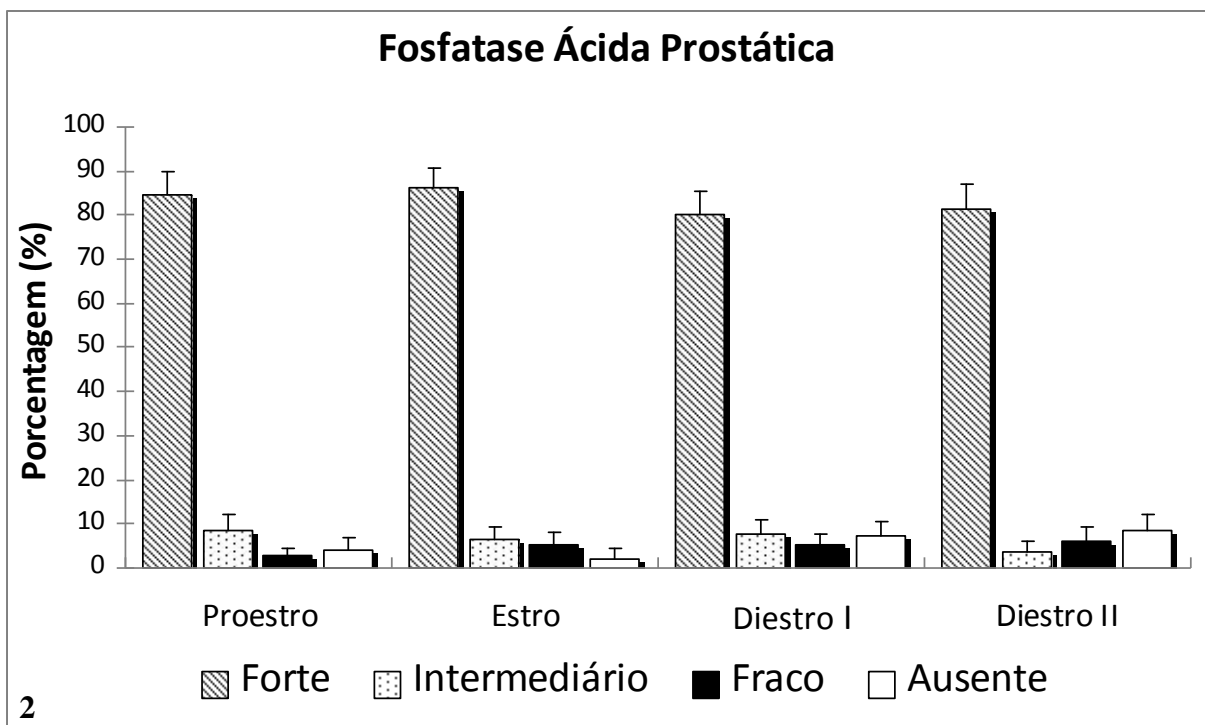
(seta larga), os quais não se comunicam com regiões acinares, evidenciando uma possível tentativa de desenvolvimento da glândula prostática nesta região. Todas as barras de escala representam 800 μm ; Cr = região cranial e Ca = região caudal.

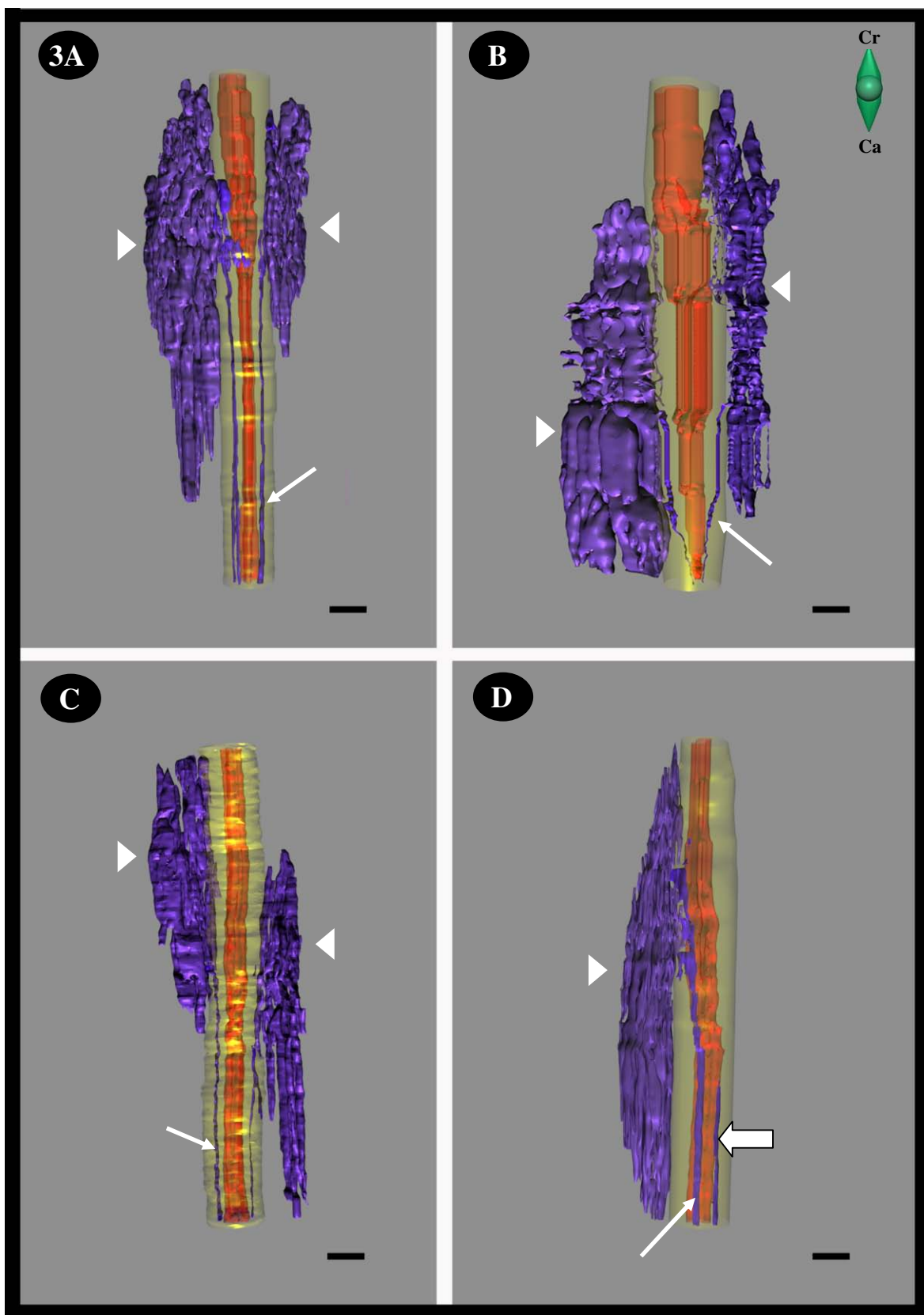
Figura 4 – Reconstrução Tridimensional da próstata de gerbilo fêmea adulta (*Meriones unguiculatus*) durante o ciclo estral – visão transversal. (A) e (B) visão transversal da próstata feminina do gerbilo nas fases de proestro e estro, respectivamente; (C) e (D) visão transversal da próstata feminina do gerbilo nas fases de diestro I e diestro II, respectivamente. As setas mostram os ductos prostáticos (azul) inseridos na parede da uretra (amarelo), os quais se comunicam com a glândula prostática (cabeça de seta) em algumas regiões. A estrutura em vermelho representa o epitélio da uretra. Observar que em estro a glândula prostática apresenta ácinos mais amplos, e desta forma mais volumosos que nas demais fases do ciclo estral, sendo que em diestro I observa-se uma regressão da glândula com um pequeno aumento na fase subsequente. Todas as barras de escala representam 800 μm ; D = lado direito do animal e E = lado esquerdo do animal.

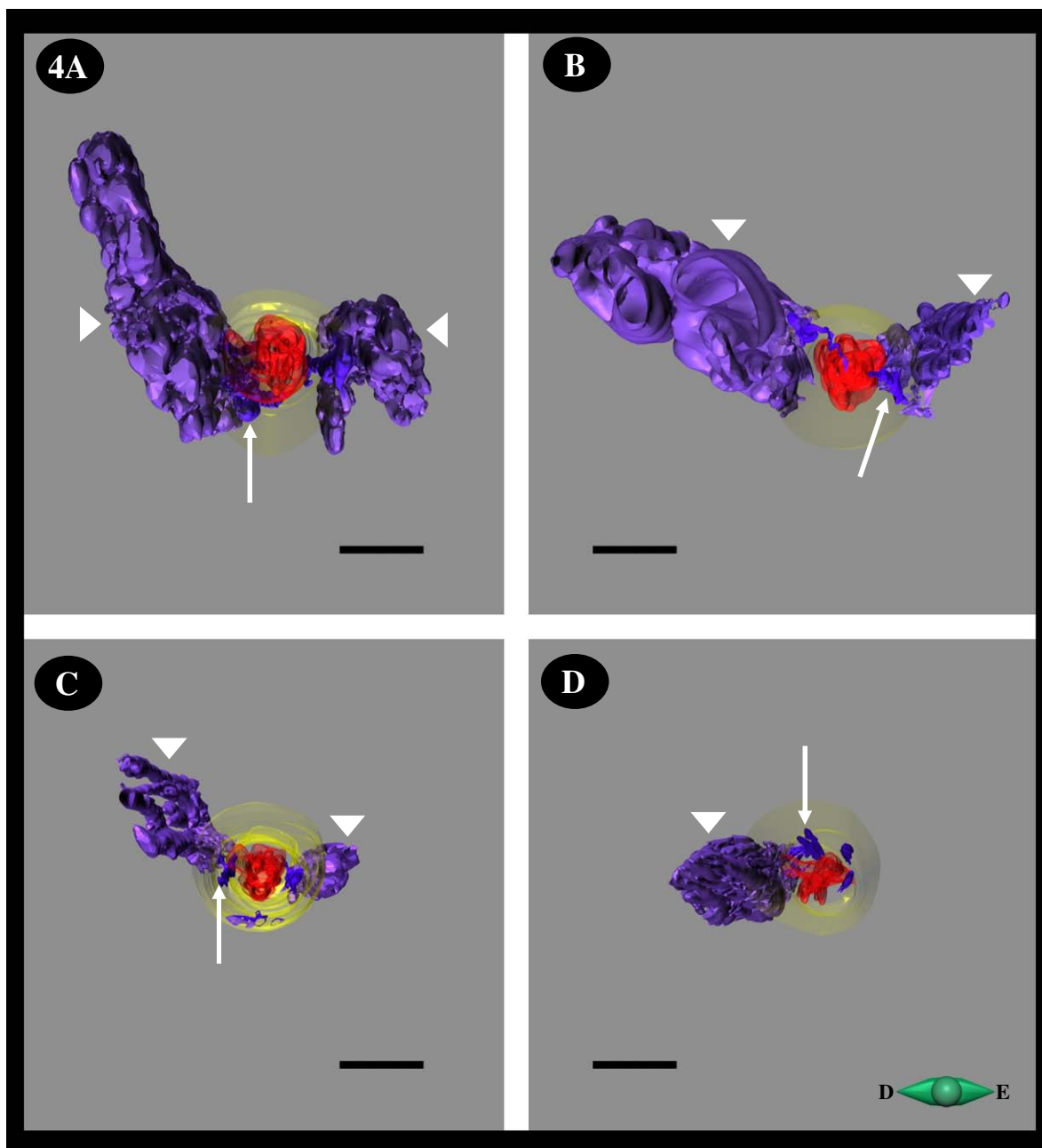
Tabela I - Níveis séricos de estrógeno, progesterona, testosterona e proteína reativa ao antígeno específico da próstata (PSA) em todas as fases do ciclo estral (n = 10 amostras por grupo). Os valores mencionados correspondem à média e ao desvio padrão. (a,b) representam diferenças significativas entre os grupos analisados ($p \leq 0,05$).

	<i>FASES DO CICLO ESTRAL</i>			
	<i>Proestro</i>	<i>Estro</i>	<i>Diestro I</i>	<i>Diestro II</i>
Estradiol (pg/ml)	23,60 ± 4,93 ^a	31,00 ± 26,06 ^a	27,60 ± 16,44 ^a	116,20 ± 63,54 ^b
Progesterona (ng/ml)	13,06 ± 8,26 ^a	89,72 ± 38,81 ^b	6,62 ± 7,81 ^a	10,13 ± 7,33 ^a
Testosterona (ng/ml)	0,53 ± 0,21	0,74 ± 0,13	0,58 ± 0,09	0,62 ± 0,32
PSA (ng/ml)	0,16 ± 0,10 ^a	0,37 ± 0,21 ^b	0,11 ± 0,05 ^a	0,16 ± 0,05 ^a









CONCLUSÕES GERAIS

1. As oscilações hormonais decorrentes do ciclo estral do gerbilo desencadearam modificações morfológicas na glândula prostática. Nas fases de proestro e estro os ácinos prostáticos apresentaram um epitélio secretor mais alto, constituídos por células colunares, e um lúmen mais amplo e com maior quantidade de secreção. Nas demais fases do ciclo, diestro I e diestro II, os ácinos se mostraram menores e menos desenvolvidos, com um epitélio secretor de revestimento mais baixo, constituído por células cúbicas, e um lúmen menor e com pouca secreção. O aspecto regredido mais intenso foi observado na fase de diestro II, na qual foi possível observar pregueamentos dos ácinos prostáticos e presença de “debris” celulares no interior do lúmen.
2. Em todas as fases do ciclo estral foi observada a presença de atividade fosfatásica ácida prostática (PAP). Durante todo o ciclo houve predominância de marcação acinar forte para esta enzima, constatando-se uma menor proporção de ácinos com ausência de marcação na fase estro, havendo também uma menor proporção de ácinos com marcação intermediária e uma maior quantidade de ácinos com ausência de marcação nas fases de diestro I e II.
3. A reconstrução tridimensional demonstrou que a próstata feminina possui uma localização parauretral, com seus ductos inseridos na musculatura da uretra, os quais se conectam com os ácinos em algumas regiões. A sua estrutura sofre modificações durante o ciclo estral, havendo um maior desenvolvimento desta glândula nas fases de proestro e estro (principalmente), nas quais os seus ácinos se mostraram maiores e com lúmen mais amplo em relação às fases diestro I e II.
4. A próstata feminina do gerbilo mostrou ser influenciada pelo ciclo estral, possuindo um comportamento bifásico durante o ciclo, com um maior desenvolvimento secretório e morfológico nas fases de proestro e estro e uma regressão nas fases diestro I e diestro II, nas quais os ácinos são menores e o epitélio é formado por células cúbicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addiego F, Belzer EG, Comolli J, Moger W, Perry JD, Whipple B. 1981. Female ejaculation: a case study. *J Sex Res*, 17:1-13.
- Bancroft JD, Gamble M. 2002. *Theory and practice of histological techniques*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone.
- Barfield MA, Beeman EA. 1968. The oestrous cycle in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Reprod Fertil*, 17(2):247-51.
- Bieberich CJ, Fujita K, He WW, Jay G. 1996. Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem*, 271:31779-31782.
- Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SGP, Santos FCA, Vilamaior PSL, 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, *In press*.
- 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 AMG, Santos FCA, Campos SGP, Vilamaior PSL, 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*, *In press*.
- de Graaf R. 1672. De mulierum organis generationi inservientibus. Tractatus novus demonstrans tani homines et animália caetera omnia, quac vivípara dicuntut, haud minus quam vivípara ab ovo originem ducere. *Leyden*, 66p.
- Diamandis EP, Yu H. 1997. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am*, 24(2):275-282.
- Dulińska J, Laidler P, Labedź M. 2002. Comparative analysis of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA levels in hyperplastic prostate stimulated with steroid hormones and growth factors. *Acta Biochim Pol*, 49(2): 357-368.

- Fiala JC (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microscopy* 218:52-61.
- 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*. *Annals Anat*, 184:341-345.
- Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene's paraurethral glands). *Biol Reprod*, 79(6):1084-91.
- Galadari I, Al-Mazroei M, Alkaabi J. 2004. Prostatic-specific antigen and idiopathic hirsutism in females. *Int J Dermatol*, 43:275-277.
- Goldberg JM, Friedman CI. 1995. Effect of hormonal manipulation on human fallopian tubal epithelium in vitro. *J Assist Reprod Genet*, 12:132-135.
- Goldman JM, Walker RF, Cooper RL. 1985. Aging in the rat hypothalamic-pituitary-ovarian axis: The involvement of biogenic amines in the loss of reproductive cyclicity. In: Parvez H, Parvez S, Gupta D, editors. *Neuroendocrinology of hormone-transmitter interaction. Utrecht: V.N.U. Science Press*. p 127–152.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(2):84-97.
- Gräfenberg E. 1950. The role of the urethra in female orgasm. *Int J Sexol*, 3:145-148.
- Granadian R, Lewis JG, Chisholm GD. 1997. Androgen concentration in prostate and serum of the male and female *Praomys* (*Mastomys*) *Natalensis*. *Invest Urol*, 15:212-214.
- 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 (1): 77-84.
- Heape, W. (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. *Q J Microsc Sci* 44, 1–70.

- Hines TM. 2001. The G-spot: A modern gynecologic myth. *Am J Obstet Gynecol*, 185(2): 359-362.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 2004. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*, 25: 330-337.
- Huffman JW. 1948. The detailed anatomy of the paraurethral ducts in the adult human female. *Am J Obstet Gynecol*, 55:86-101.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anatomy*, 3: 357-370.
- Kato H, Kobayashi S, Islam AM, Nishizawa O. 2005. Female para-urethral adenocarcinoma: histological and immunohistochemical study. *Int J Urol*, 12:117-119.
- 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(4):179-185.
- McCrea LE. 1952. Malignancy of the female urethra. *Urol Surv*, 2:85-149.
- Nishino N, Totsukawa K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Anim*, 45(3):283-288.
- Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. 2006. 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):235-245.
- Olsson AY, Lilja H, Lundwall A. 2004. Taxon-specific evolution of glandular kallikrein genes and identification of a progenitor of prostate-specific antigen. *Genomics*, 84:147–156.
- 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*, 130:3066-3073.
- Prins GS, Korach KS. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73:233-244.

- Pu Y, Huang L, Prins GS. 2004. Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol*, 273:257-275.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res*, 322: 173-181.
- 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 FCA, Leite RP, Custódio AMG, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, 75(3): 370-379.
- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3(1):3-18.
- Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2007. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624.
- Santos FCA, Custódio AMG, Campos SGP, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. 2008. Anti-estrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil female prostate and ovaries (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod*, In press.
- 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*, 29:237-241.
- Sauter ER, Klein G, Wagner-Mann C, Diamandis EP. 2004. Prostate-specific antigen expression in nipple aspirate fluid is associated with advanced breast cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 28:27-31.
- 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(4): 850.

- 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.
- Skene AJC. 1880. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Amer J Obstetr Diss Women Child*, 13:265-270.
- 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.
- Staley K, Scharfman H. 2005. A woman's prerogative. *Nature Neuroscience*, 8(6):697-698.
- Tenniswood M, Bird CE, Clark AF. 1976. Acid phosphatases: androgen dependent markers of rat prostate. *Can J Biochem*, 54:350-357.
- Tenniswood MP, Abrahams PP, Bird CE, Clark AF. 1978. Effects of castration and androgen replacement on acid phosphatase activity in the adult rat prostate gland. *J Endocrinol*, 77:301-308.
- 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.
- Veeramani S, Yuan TC, Chen SJ, Lin FF, Petersen JE, Shaheduzzaman S, Srivastava S, MacDonald RG, Lin MF. 2005. Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12(4):805-22.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate. *Cell Biol Int*, 29: 809-816.
- Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*, 12: 131-155.

- 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 Urology*, 22:64-69.
- Westwood FR. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*, 36(3):375-84.
- Yu H, Berkel H. 1999. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc*, 151(14): 209-213.
- Zarghami N, Grass L, Sauter ER, Diamandis EP. 1997. Prostate-specific antigen in serum during the menstrual cycle. *Clin chemistry*, 43(10):1862-1867.
- Zaviačič M, Brozman M, Holomán IK, Zaviacicová A, Oberucová J. 1983. New observations on the paraurethral (Skene's) ducts and glands in females. *Bratisl Lek Listy*, 79(5):533-44.
- Zaviačič M. 1985. The adult human female prostate homologue and the male prostate gland: a comparative enzyme-histochemical study. *Acta Histochem*;77:19-31.
- Zaviacic M, Porubský J, Vierik J, Holomán IK. 1989. Enzymes of the female prostate during the fertile age and after menopause. Comparative histochemical study. *Cesk Gynekol*, 54(10):755-60.
- Zaviačič M. 1993. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. *The Journal of Sex Research*, 30(2): 148-151.
- Zaviačič 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.
- Zaviačič M, Ružicková M, Blažeková J, Zaviačič T, Itoh Y, Okutani R, Kawai T. 1997a. Immunohistochemical distribution of rabbit polyclonal antiurinary protein 1 antibody in the female (Skene's gland) and male prostate: new marker for neuroendocrine cells? *Acta Histochem*, 99:267-275.
- Zaviačič M, Danihel L, Ružicková M, Blažeková J, Itoh Y, Okutani R, Kaway T. 1997b. Immunohistochemical localization of human protein 1 in the female prostate (Skene's Gland) and the male prostate. *Histochem J*, 29(3):219-227.

- Zaviačič M. 1999. *The Female Prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate*. 1.ed. Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press, 171p.
- Zaviačič 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(1):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.
- Zaviačič M, Zajíčková M, Blazeková J, Donárová L, Svetoslav S, Miroslav M, Zaviačič T, Holomán K, Breza J. 2000b. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. *Journal of Histotechnology*, 23(1):61-69.
- Zaviačič M, Zaviačič T, Ablin RJ, Breza J, Holoman K. 2001. The female prostate: history, functional morphology and sexology implications. *Sexologies*, 11(41):44-49.



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências

**CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

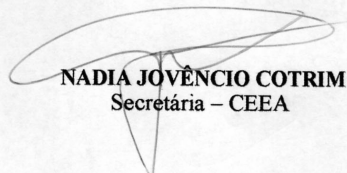
Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 16/07-CEEA, sobre “*Aspectos morfofuncionais da próstata feminina do gerbilo durante o ciclo estral*”, sob a responsabilidade de **SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), nesta data.

Botucatu, 30 de março de 2007.


Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA


NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA PRÓSTATA FEMININA DO GERBILO DURANTE O CICLO ESTRAL: Estudos estruturais e caracterização do perfil secretor**

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

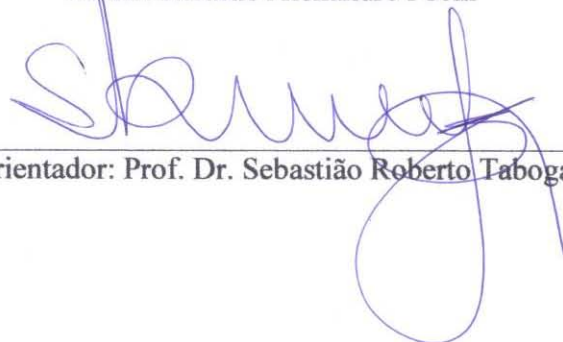
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 16/07-CEEA).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno: Ricardo Alexandre Fochi



Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP