



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Nayara Fernanda da Costa Castro

Aspectos celulares da remodelação tecidual da próstata de
gerbilos frente à orquiectomia

São José do Rio Preto
2017

Nayara Fernanda da Costa Castro

Aspectos celulares da remodelação tecidual da próstata de gerbilos
frente à orquiectomia

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq- Processo 131528/2015-7.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

São José do Rio Preto
2017

Castro, Nayara Fernanda da Costa.

Aspectos celulares da remodelação tecidual da próstata de gerbilos frente à orquiectomia / Nayara Fernanda da Costa Castro. -- São José do Rio Preto, 2017

59 f. : il., tab.

Orientador: Patrícia Simone Leite Vilamaior

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citologia. 2. Células estromais - Citologia. 3. Próstata. 4. Gerbilos - Morfologia. 5. Orquiectomia. 6. Macrófagos. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Nayara Fernanda da Costa Castro

Aspectos celulares da remodelação tecidual da próstata de gerbilos
frente à orquiectomia

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq- Processo 131528/2015-7.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Ana Paula Girol
FIPA/FAMECA- Catanduva

Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
UFG – Goiânia

São José do Rio Preto
03 de março de 2017

Dedico

*Aos meu pais, Sandra e Valter, que pelo seu amor incondicional me fizeram acreditar que poderia ir
sempre além.*

A minha irmã Nathália, por todo o carinho, força e amizade.

*Ao meu noivo Marcos, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando em todos os
momentos.*

Agradecimentos

À Deus por ter aberto as portas, por me abençoar com a vida, a saúde e a família maravilhosa que tenho.

À minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior, pelos ensinamentos, conselhos, atenção, confiança, dedicação e por sempre me receber em sua sala para tirar dúvidas e, sem medir esforços, me auxiliar nas dificuldades encontradas durante o dia-a-dia no laboratório. Agradeço muito por ter me acolhido como aluna de Iniciação Científica e Mestrado, além de orientadora, é uma grande amiga.

Ao professor Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por permitir o uso do laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP para a realização do presente estudo, pelos ensinamentos e atenção durante todo esse período.

Ao programa de pós-graduação em Biociências do IBILCE/UNESP e ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida durante esse período.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alexandre Fochi e à Profa. Dra. Eliana Morielle Versute, que compuseram a banca do meu exame de qualificação, pelas correções e sugestões, que auxiliaram no enriquecimento do meu trabalho.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Paula Girol, Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Prof. Dr. Rodrigo Zieri, respectivamente, por aceitarem o convite e dedicarem um pouco do seu tempo para ler e contribuir com seus conhecimentos e experiências para o enriquecimento do meu trabalho.

Ao técnico e amigo do laboratório Luiz Roberto Falleiros Júnior, pela atenção, ensinamentos, amizade e por tornar a rotina laboratorial muito mais divertida com o seu bom humor de sempre.

À Profa. Dra. Rejane Maira Góes por disponibilizar seu laboratório para a realização das análises dos níveis séricos hormonais.

À Profa. Dra. Lilian Castiglioni por me receber tão bem em sua sala e dedicar um pouco do seu tempo em corrigir as análises estatísticas deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Carol Negrin, Camila, Carolzinha, Cíntia, Douglas, Ellen, Guilherme, Júlia, Luiz Henrique, Maê, Mariele, Mari Zanatelli, Mari Marcielo, Ricardo, Sarah, Silvana e Vanessa pelas orientações, parcerias, conselhos e as boas risadas dadas ao longo da rotina laboratorial.

À minha querida amiga e “amada” Cássia, pela amizade, companheirismo, por me auxiliar no experimento, nas imunos, por compartilhar sua vida comigo e ter a paciência de sempre me ouvir e me aconselhar. Espero muito que nossa amizade dure por toda a vida.

Aos meus queridos e muito amados pais, Sandra e Valter, por todo carinho, amor, apoio, incentivo e por me fazerem acreditar que com dedicação, foco, esforço e muito estudo, conseguiria chegar onde cheguei. Agradeço à Deus todos os dias por me abençoar com pais maravilhosos, amo muito vocês!

À minha irmã Nathália, pelo companheirismo, apoio, amizade e por me ajudar em todos os momentos.

Ao meu amigo, companheiro e noivo Marcos, pela paciência, compreensão e por sempre estar ao meu lado, me incentivando e apoiando nos meus estudos e nas minhas decisões.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Resumo

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital dos mamíferos cujo desenvolvimento ocorre sob influência de andrógenos, hormônios esteroides responsáveis por induzir a diferenciação e a maturação do sistema reprodutor masculino e por atuar no desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas. A privação dos andrógenos pode ocorrer por meio da orquiectomia (castração cirúrgica), a fim de suprimir os níveis de testosterona e promove, na glândula prostática, a atrofia das células epiteliais. E as células musculares lisas passam a atuar na adaptação do compartimento estromal que interage e contribui para a redução da atividade das estruturas epiteliais. Nesse compartimento é possível observar a presença de vários tipos celulares, como os macrófagos, que são responsáveis por atuar ativamente na homeostase do sistema reprodutivo. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar as modificações decorrentes da remodelação tecidual resultantes da privação de andrógenos na próstata ventral de gerbilos, com ênfase na distribuição e ocorrência dos macrófagos. Foram utilizados gerbilos (*Meriones unguiculatus*) machos adultos divididos nos grupos: controle e castrados (eutanasiados no 3º, 7º e 14º dia após a orquiectomia). O lobo ventral da próstata desses animais foi removido, pesado e processado para microscopia de luz. Foram realizadas análises estereológicas, morfométricas, sorológica, imunoistoquímicas e imunofluorescência. Os dados obtidos indicam que a castração promoveu o rearranjo dos diferentes tipos celulares e influenciou em alterações na proporção relativa dos compartimentos teciduais da próstata ventral. Assim, os resultados obtidos poderão contribuir para o maior entendimento da ação das células estromais no processo de remodelação tecidual frente a realização da orquiectomia, principalmente em gerbilos, em que os efeitos a curto prazo (três dias), ainda não tinham sido relatados.

Palavras-chave: próstata; orquiectomia; macrófagos.

Abstract

*The prostate is an accessory gland of the genital system of the mammals and its development occurs under the influence of androgens, steroid hormones which are responsible for inducing the differentiation and maturation of the male reproductive system, operating in the development of the male secondary sex characteristics. Deprivation of androgens may occur through orchiectomy (surgical castration) in order to suppress testosterone levels. Orchiectomy promotes atrophy of the epithelial cells in the prostate gland and the smooth muscle cells are adapted to operate in the stromal compartment to reduce the epithelial structures activity. In the stromal compartment it is possible to observe various cell types, including macrophages that work actively in the homeostasis of the reproductive system tissues. Thus, this study aims to evaluate the changes resulting from tissue remodeling resulting from androgen deprivation in the ventral prostate of gerbils, with emphasis on the distribution and occurrence of macrophages. Adult male gerbils (*Meriones unguiculatus*) were divided into groups: control and castrated (euthanized at 3th, 7th and 14th days after orchiectomy). In these animals, the ventral lobe of the prostate was removed, weighed and processed for light microscopy. Stereological, morphometric, serological, immunohistochemistry and immunofluorescence analysis was performed. The data indicated that castration promoted a rearrangement of the different cell types and influenced alterations in the relative proportion of the tissue compartments of the ventral prostate. Thus, the results may contribute to a better understanding of the stromal cells actions in the tissue remodeling process, especially in gerbils, in which the short-term effects (three days) had not been reported.*

Key words: prostate; orchiectomy; macrophages.

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Morfofisiologia da próstata	13
1.2. A próstata do gerbilo	15
1.3. Regulação hormonal da próstata.....	16
1.4. Células estromais na próstata	18
2. Objetivos	22
2.1. Objetivos gerais.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Animais.....	23
3.2. Delineamento experimental.....	23
3.3. Análise biométrica	23
3.4. Processamento histológico e análise histoquímica	24
3.5. Análise morfométrica e estereológica.....	24
3.6. Nível sérico hormonal.....	25
3.7. Análise imunoistoquímica e imunofluorescência	25
3.8. Verificação de apoptose das células epiteliais e estromais.....	27
3.9. Análise estatística.....	28
4. Resultados	29
4.1. Análise biométrica	29
4.2. Morfologia.....	29
4.3. Morfometria e estereologia.....	29
4.4. Nível sérico hormonal.....	30
4.4. Imunoistoquímica	30
4.5. Método de TUNEL.....	32
5. Discussão	44
6. Conclusão	49
7. Referências Bibliográficas.....	50

Lista de ilustrações

Figura 1. Complexo prostático de gerbilo macho adulto.....	16
Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental	24
Figura 3. Análise biométrica dos animais divididos nos grupos Controle, Ca3d, Ca7d e Ca14d	33
Figura 4. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos controle e castrados corados por Tricrômico de Gömori e submetidos à imunofluorescência para α -actina.....	34
Figura 5. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à técnica de Reticulina de Gömori.....	35
Figura 6. Análise morfométrica da altura do epitélio e da espessura das CML da próstata ventral de gerbilos dos grupos experimentais	36
Figura 7. Análise estereológica do volume absoluto médio do epitélio, lúmen, estroma muscular, estroma não muscular, colágeno e vasos sanguíneos da próstata ventral de gerbilos dos grupos Controle, Ca3d, Ca7d, Ca14d	37
Figura 8. Nível sérico hormonal de testosterona (ng/ml) dos machos adultos pertencentes aos grupos experimentais.....	37
Figura 9. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para AR	38
Figura 10. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para MMP-2.....	39
Figura 11. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para MMP-9.....	40
Figura 12. Identificação imunoistoquímica de macrófagos M1 por meio do anticorpo anti-CD68	41
Figura 13. Imunomarcção de macrófagos M2 pelo anticorpo anti-CD 163.....	42
Figura 14. Identificação de apoptose em cortes histológicos da próstata ventral pelo método de TUNEL	43

Lista de tabelas

Tabela 1. Descrições dos protocolos realizados em cada técnica de imunoistoquímica e imunofluorescência.....	27
---	-----------

Lista de abreviações

ABC: Kit do complexo avidina-biotina
Anti-CD 68: Anticorpo utilizado para marcar M1
Anti-CD 163: Anticorpo utilizado para marcar M2
AR: Receptores de andrógenos (Androgen Receptor)
BSA: Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)
Ca3d: Grupo eutanasiado no terceiro dia após a orquiectomia
Ca7d: Grupo eutanasiado no sétimo dia após a orquiectomia
Ca14d: Grupo eutanasiado no décimo quarto dia após a orquiectomia
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
C: Grupo controle
CML: Células musculares lisas
DAB: Diaminobenzidina
DHT: Diidrotestosterona
DHEA: Dehidroepiandrosterona
Ep: Epitélio
ER α / ERS1: Receptor de Estrógeno alfa
ER β /ERS2: Receptor de Estrógeno beta
FIT-C: Fluorescein isothiocyanate
g: Grama
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna
IL: Interleucina
Kg: Kilograma
L: Lúmen
MEC: Matriz Extracelular
M1: Macrófago do tipo 1

M2: Macrófago do tipo 2
M2a: Macrófago alternativo
M2b: Macrófago do tipo 2
M2c: Macrófago desativado
MMP: Metaloproteinases de Matriz Extracelular
MMP-2: Metaloproteinase da Matriz Extracelular do tipo 2
MMP-9: Metaloproteinase da Matriz Extracelular do tipo 9
n: Número amostral
NK: Células Natural Killer
PBS: Tampão Salino Difosfato
RPM: Rotação por Minuto
S: Estroma
SDHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona
SC: Santa Cruz
TAM: Macrófago associado a tumor
T: Testosterona
TBS: Tampão Salino Trifosfato
TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF β : Fator Transformador de Crescimento Beta 1
TIMP: Inibidor de Metaloproteinase
TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*
UGS: Seio Urogenital
°C: Grau Celsius
 μ m: Micrômetro
 μ l: Microlitro

1. Introdução

1.1. *Morfofisiologia da próstata*

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital dos mamíferos composta por dois compartimentos distintos, o epitelial, o estromal e o luminal. Estes compartimentos interagem mutuamente via receptores androgênicos e essa interação é importante para o desenvolvimento, para a diferenciação durante a embriogênese e para a manutenção da próstata durante a vida adulta (HAYWARD et al., 1997; CUNHA et al., 2004; BERRY et al., 2008; KRUSLIN et al., 2015).

A ação hormonal na glândula prostática é determinada não somente pela concentração de andrógenos, mas também por estrógenos e outros hormônios e pela presença de fatores, como os de crescimento e os proteicos (HSING et al., 2002; GOFFIN et al., 2011; HERRERA-COVARRUBIAS et al., 2015).

Comparações do desenvolvimento prostático em humanos e roedores mostram que a morfogênese ocorre de maneira análoga (TIMMS et al., 1994; ROCHEL et al., 2007). Nos humanos o desenvolvimento prostático ocorre na fase pré-natal, enquanto em alguns roedores o desenvolvimento ocorre desde a fase pré-natal e continua no período neonatal completando-se até a maturidade sexual (VILAMAIOR et al., 2006; SANCHES et al., 2014).

Na maioria dos roedores, a próstata é formada por quatro lobos distintos, bilateralmente simétricos, que circundam a uretra na base da bexiga urinária, são eles: anterior (também chamado de glândula coaguladora), dorsal, lateral e ventral. Esses lobos apresentam características particulares de ramificação de ductos e de produção de secreções proteicas (SUGIMURA et al., 1986; ROCHEL et al., 2007). O lobo ventral é utilizado com frequência em estudos relacionados com a biologia prostática, pelo fato de ser mais dependente de andrógenos que os demais (GÓES et al., 2007; MONTICO et al., 2013).

A interação parácrina que se estabelece entre o epitélio e o estroma ao seu redor é fundamental durante a morfogênese prostática e na homeostase do órgão adulto de humanos e de roedores (CUNHA et al., 1985; HAYWARD et al., 1997). Esses compartimentos interagem diretamente um com o outro, essa

relação é conhecida como interação epitélio/estroma (ROCHEL-MAIA et al., 2011).

Desequilíbrios na interação homeostática entre epitélio e estroma prostáticos podem iniciar e promover carcinogênese nesse órgão (SUNG & CHUNG, 2002) e durante esses processos, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e pela manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino estimulado por andrógenos (CUNHA et al., 2002).

A morfogênese de brotamento na próstata de ratos e gerbilos da Mongólia ocorre entre os dias 19 e 20 e entre os dias 20 e 21 de gestação, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pelo fato do gerbilo possuir um maior tempo de gestação (SANCHES et al., 2014). Além disso, estudos relatam que em ratos, os ácinos funcionais estão presentes no 10º dia de vida (PRINS & PUTZ, 2008). Porém, a presença destes ácinos funcionais nos gerbilos ocorre no 30º dia de vida (SANCHES et al., 2016).

Normalmente o mesênquima e o seio urogenital expressam receptores de andrógenos (AR) que atuam no desenvolvimento das glândulas do trato genital masculino. A expressão de fatores de crescimento parácrinos no mesênquima também é responsável pela morfogênese glandular e pelo crescimento das células epiteliais na próstata em desenvolvimento (HAYWARD et al., 1996a, b).

A próstata madura tem organização estrutural complexa, sendo constituída por compartimentos teciduais distintos como o compartimento luminal ou lúmen, o compartimento epitelial e o compartimento estromal (RISBRIDGER et al., 2005; ROCHEL et al., 2007). O compartimento epitelial consiste de quatro tipos de células: basal, secretora, intermediária e neuroendócrina que são dependentes dos hormônios esteroides e respondem diferentemente a cada um deles (DE MARZO et al., 1998, RUMPOLD et al., 2002).

O estroma prostático é um arranjo complexo de células musculares lisas (CML) e fibroblastos imersos em uma matriz extracelular (MEC) ao redor dos ácinos e ductos prostáticos. As CML são responsáveis pela produção de fatores autócrinos e parácrinos que contribuem para a homeostase da próstata (VILAMAIOR et al., 2000; TUXHORN et al., 2001) atuando no epitélio, por meio do estímulo por andrógenos e outros sinais de regulação, e contribuem para

homeostase da glândula (VILAMAIOR et al., 2000). Essas células também produzem fibras colágenas (MÜNTZING, J, 1981; IZUMIYA & NAKADA, 1997), fibras elásticas (CARVALHO et al., 1996), proteoglicanos (KOFOED et al., 1990; TERRY & CLARK, 1996a; TERRY & CLARK, 1996b), microfibrilas (CARVALHO et al., 1997) e outras macromoléculas. Todos esses componentes são responsivos, de modo diferente, à privação de andrógenos (VILAMAIOR et al., 2000).

1.2. A próstata do gerbilo

O gerbilo da Mongólia é um roedor murídeo pertencente à subfamília *Gerbillinae* e espécie *Meriones unguiculatus*. Este animal tem se revelado um modelo valioso para o estudo da próstata (SANTOS E TABOGA, 2006; SANTOS et al., 2007; FOCHI et al., 2008; CAMPOS et al., 2010), pois esta glândula apresenta-se anatomicamente semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e à fusão de seus lobos, características ausentes no rato e no camundongo, onde os lobos ventral, dorsal e dorso-lateral são distintos (Figura 1) (PRICE, 1963).

Nos gerbilos adultos (90-120 dias), a próstata apresenta ácinos com epitélio prismático simples e caracteristicamente secretor. Entre as porções glandulares, há estroma conjuntivo vascularizado, com relativamente poucas fibras reticulares, colágenas e elásticas, além de células musculares lisas bem compactadas, dispostas ao redor de cada ácino. Essas características teciduais e a disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares são também muito semelhantes às encontradas na próstata humana (PEGORIM DE CAMPOS et al., 2006, ROCHEL et al., 2007).

Com base nas semelhanças morfofuncionais já conhecidas, é importante simular situações experimentais, a fim de conhecer as respostas da próstata às diferentes condições, o que permite ampliar o conhecimento da histofisiologia dessa glândula de grande importância para a homeostase e funcionalidade do sistema genital masculino. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre o epitélio e o estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares, bem como suas inter-relações na

próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia dessa glândula.

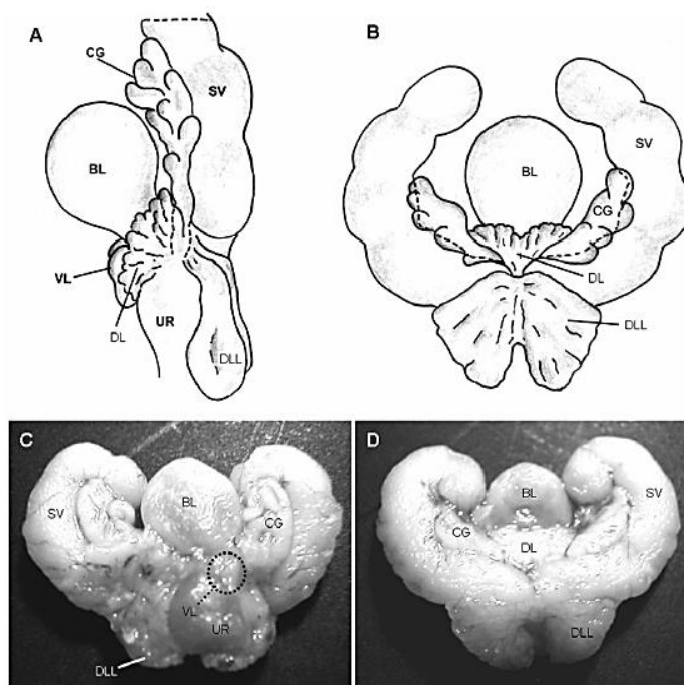


Figura 1. Complexo prostático de gerbilo adulto. Vista lateral (A), dorsal (B, D) e ventral (C). Bexiga urinária (BL), glândula coagulatória (CG), lobo dorsal (DL), lobo dorso lateral (DLL), lobo ventral (VL), vesícula seminal (SV), uretra (UR) (ROCHEL et al., 2007).

1.3. Regulação hormonal da próstata

Os andrógenos desempenham papel central na regulação do crescimento da próstata de mamíferos, apresentando capacidade de estimular a proliferação e inibir a morte das células epiteliais (ISAACS, 1984; KYPRIANOU & ISAACS, 1987; BANERJEE et al., 2001). Esses hormônios esteroides são responsáveis por induzir a diferenciação e a maturação do sistema reprodutor masculino e por atuar no desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas (HSING et al., 2002). O desenvolvimento prostático é mediado pela regulação hormonal, primeiramente, por andrógenos que coordenam o crescimento e a diferenciação por meio de sua interação com o AR (GREEN et al., 2012).

O AR é membro da família de receptores hormonais esteroides que tem sua ativação realizada por fatores de transcrição nuclear (EVANS, 1988; TAPLIN & BALK, 2004). Além do AR, outros receptores nucleares de esteroides, como o

ER α ou ERS1 (receptor de estrógeno alfa) e o ER β ou ERS2 (receptor de estrógeno beta), são determinantes para o desenvolvimento da próstata; sendo expressos em locais e em momentos específicos durante a organogênese prostática (MCPHERSON et al., 2007).

A produção de andrógenos é regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (CUNHA et al., 2001), sendo que a testosterona (T) é o representante predominante dessa categoria de hormônios. As células de Leydig dos testículos são responsáveis por produzir mais de 95% da T circulante no organismo (HSING et al., 2002). Na próstata estima-se que aproximadamente 60% do total de andrógenos são de origem testicular e o restante é originado pelas glândulas adrenais (LABRIE et al., 2005; LABRIE, 2011).

Embora a T seja o principal andrógeno circulante do plasma, na próstata, o andrógeno predominante é o hormônio Di-hidrotestosterona (DHT), formado a partir de T por ação da enzima 5 α -redutase. A T e a DHT ligam-se ao mesmo tipo de receptor – o AR, porém desencadeiam efeitos fisiológicos distintos (HSING et al., 2002). O Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Sulfato-Dehidroepiandrosterona (SDHEA) são dois precursores de esteroides produzidos pelas glândulas adrenais que são convertidos em andrógenos nos tecidos periféricos, como por exemplo, na próstata (KYPRIANOU & ISAACS, 1987; LABRIE et al., 2005; LABRIE, 2011; ZONG & GOLDSTEIN, 2013). As glândulas adrenais são responsáveis pela produção de cerca de 5% de T, que permanece circulando pelo organismo mesmo após a remoção dos testículos. Porém, essa porcentagem de T é insuficiente para garantir a homeostase no epitélio e no estroma prostático (ANTONIOLI et al., 2004).

As terapias de privação de andrógenos são de grande aplicabilidade em casos de câncer de próstata (MALIK et al., 2015; QI et al., 2015). Estima-se que aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata receberão como um dos tratamentos a privação de andrógenos, seja pela castração química ou cirúrgica (MENG et al., 2002; ALIBHAI et al., 2015).

A privação dos andrógenos pode ocorrer por meio da castração química ou cirúrgica (orquiectomia), o que resulta na supressão dos níveis de andrógenos testiculares. Estudos indicam que a orquiectomia associada à administração de drogas antiandrogênicas, como a flutamida, leva a resultados significantes no

tratamento de tumores (GALBRAITH & DUCHESNE, 1997; CAMPOS et al., 2010).

Investigações relatam que após a castração, o epitélio regride e as CML passam a atuar na adaptação do compartimento estromal para redução da atividade das estruturas epiteliais, tornando-se mais espessas, e ocorre redução na quantidade de secreção presente no lúmen. Além disso, as CML desempenham a função primordial na indução da morte epitelial, impedindo a produção de fatores de sobrevivência ou pela liberação de sinais de morte por células estromais (KURITA et al., 2001; ANTONIOLI et al., 2004; VILAMAIOR et al., 2005; FELISBINO et al., 2007).

Essa atrofia epitelial ocorre de modo semelhante tanto em animais submetidos à castração química como cirúrgica. O trabalho de GÓES et al. (2007) demonstrou que, em gerbilos, o lobo ventral da próstata é mais responsivo à condição de privação de andrógenos em um curto período de tempo.

Existem algumas enzimas proteolíticas que podem mediar as alterações que ocorrem na matriz extracelular durante a regressão prostática causada pela orquiectomia, como exemplo as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (WILSON, 1995a; WILSON et al., 1995b). As MMPs são classes de proteases extracelulares capazes de degradar os componentes da matriz extracelular e da membrana basal. Dentre os diversos tipos de MMPs, existem as metaloproteinases da matriz extracelular dos tipos 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), ambas são muito estudadas pelo fato de realizarem a degradação do colágeno do tipo IV presente na membrana basal (AIMES & QUIGLEY, 1995; JUSTULIN et al., 2010). Na próstata, esses tipos de enzima são produzidos pelas células epiteliais e estromais e participam do processo de remodelação tecidual durante o desenvolvimento e a manutenção da próstata normal e em situações patológicas (WILSON et al., 1995b; JUSTULIN et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

1.4. Células estromais na próstata

O estroma prostático é essencial para o desenvolvimento, a manutenção e a diferenciação do epitélio. Nesse compartimento são encontradas as fibras colágenas e as elásticas, os proteoglicanos, as microfibrilas, além de diversas

células que contribuem para a homeostase da próstata, como os fibroblastos, as células musculares lisas, as células endoteliais vasculares, os telócitos e os macrófagos (que também podem ser encontrados na região intraepitelial) (VILAMAIOR et al., 2000, CORRADI et al., 2013).

Os macrófagos são células plásticas grandes, de superfície irregular, morfologia e função variáveis, encontradas em todos os tecidos, e caracterizadas por citoplasma extenso, com numerosos vacúolos (GEISSMAN et al., 2010; PARHAM, 2011). Desempenham papel decisivo na imunidade inata e adaptativa e são cruciais na eliminação de patógenos, controle da resposta inflamatória e no processo de reparação e homeostase tecidual (VARIN & GORDON, 2009).

Essas células apresentam como precursores os monócitos circulantes. Em geral, os macrófagos podem ser divididos em subpopulações, cuja classificação é baseada na localização anatômica e na função. Os osteoclastos, os macrófagos alveolares e as células de Kupffer, são alguns exemplos de macrófagos teciduais residentes (GORDON & TAYLOR, 2005).

As funções de reparação e homeostase dos macrófagos podem ser subvertidas por insultos crônicos e resultar numa associação causal dessas células com estados patológicos (SICA et al., 2008; STEFATER et al., 2011; FANG et al., 2013; WYNN et al., 2013). Algumas dessas células são conhecidas como macrófagos associados à tumores (TAMs), e interagem com diferentes tipos celulares como os fibroblastos, células tronco mesenquimais, células endoteliais e tumorais, de modo a estimular a proliferação e promover a angiogênese (MANTOVANI et al., 2015).

Os macrófagos também realizam a fagocitose de células em apoptose. Tal processo ocorre pelo reconhecimento dos ligantes destas células apoptóticas por receptores presentes no citoplasma dos macrófagos. Deste modo, a remoção das células em apoptose ocorre antes da lise celular e impede a liberação de tóxicos intracelulares e conteúdo de células apoptóticas ao redor do tecido, com o propósito de evitar uma possível inflamação (FADOK et al., 1998; GORDON, 2003; CHAWLA, 2010; GORDON, 2016).

De acordo com a sua atuação imunológica, os macrófagos podem ser classificados em M1 e M2. Os macrófagos M1, também classificados como macrófagos clássicos, são direcionados para impedir a propagação das células tumorais. Para isso, induzem as células Th1(CD4-Th1) que ativam as células

CD8 e NK (células Natural Killer) a produzirem vários tipos de interleucinas, com destaques para a IL-1 β , IL-12, IL-23 e fator de necrose tumoral alfa (TGF β 1) (MANTOVANI et al., 2004). Os macrófagos são células, geralmente, caracterizadas pela presença de antígenos, alta atividade inflamatória, microbicida e tumoricida, elevada secreção de IL-6, IL-12, IL-23, óxido nítrico, citocinas pró inflamatórias e baixa produção de IL-10 (MANTOVANI et al., 2004; CARDOSO et al., 2015).

Por outro lado, os macrófagos M2 estimulam as células Th2 (CD4-Th2) que, por sua vez, ativam os linfócitos B a produzirem anticorpos específicos que são responsáveis por regular as inflamações, mas não possuem a capacidade de eliminar as células tumorais (MANTOVANI et al., 2004; COUSSENS et al., 2013; MARTINEZ & GORDON, 2014). Além disso, esses macrófagos podem estar relacionados com eventos de reparação, de remodelação tecidual e de progressão tumoral (CARDOSO et al., 2015).

Os macrófagos M2 podem ser subdivididos em M2a ou macrófagos alternativos, que são estimulados por IL-4 ou IL-13, M2b ou macrófagos do tipo 2 (ativados pela exposição ao complexo imune e receptores *Toll-Like* - TLRs, ou IL-1R) e M2c ou macrófagos desativados, que podem ser estimulados por hormônios glicocorticoides e IL-10. A ativação destes M2c pode ser induzida por diversos fatores, dentre eles a presença de células apoptóticas a serem removidas por fagocitose (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ & GORDON, 2014).

Em contraste com a resposta pró-inflamatória e antimicrobiana dos M1, os M2 exibem alta atividade anti-inflamatória e apresentam papel importante na remodelação dos tecidos. Estes macrófagos são responsáveis pela produção de fatores de crescimento, como exemplo o TGF β 1 que pode estimular os fibroblastos e as células epiteliais. Além disso, existem macrófagos que são derivados da estimulação por TGF β 1 e atuam na regeneração e no reparo tecidual, na diferenciação de miofibroblastos e na expressão de inibidores de metaloproteinases (TIMPs), que bloqueiam a degradação da matriz extracelular (MURRAY & WYNN, 2011).

Em geral, os macrófagos estão envolvidos na maioria das doenças e são alvos terapêuticos atraentes, pois sua função pode ser aumentada ou inibida de modo a alterar a evolução de uma determinada doença (WYNN et al., 2013).

Além disso, exercem papel importante na regulação do eixo hipotalâmico hipofisário e atuam ativamente na homeostase do sistema reprodutivo (COHEN et al., 1997). Assim, conhecer o papel desse tipo celular nos processos de remodelação tecidual pode contribuir para o maior entendimento da histofisiologia da glândula prostática.

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as modificações decorrentes da remodelação tecidual resultantes da privação de andrógenos na próstata ventral de gerbilos, com ênfase na distribuição e ocorrência dos macrófagos.

2.2. *Objetivos específicos*

Analisar os parâmetros biométricos, morfológicos, morfométricos e estereológicos da próstata ventral de gerbilos machos adultos controles e submetidos à orquiectomia.

Avaliar a frequência da imunorreatividade das células epiteliais e estromais para marcadores de receptor de andrógenos presentes na próstata ventral.

Quantificar o número total de macrófagos M1 e M2 nas regiões intraepiteliais e estromais do lobo ventral prostático.

Analisar a expressão das metaloproteinases da matriz extracelular do tipo 2 e 9 e fibras musculares na próstata dos animais dos grupos experimentais.

Verificar a presença de células apoptóticas epiteliais e estromais na próstata ventral desses gerbilos.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Nesse experimento foram utilizados 28 gerbilos (*Meriones unguiculatus*) machos adultos, com 90 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de São José do Rio Preto (SP), mantidos, no mesmo biotério, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os procedimentos envolvidos foram apreciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP (Proc. No. 123/2015 – CEUA Anexo 1).

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram divididos nos grupos: controle intacto e castrados, cada um com n=7. Após completarem 90 dias de vida, os animais do grupo castrado foram anestesiados para a realização da orquiectomia com 1ml/Kg da solução contendo Ketamina e Xilasina na proporção de 10:3, respectivamente. Em seguida foram mantidos em observação e eutanasiados no 3º (Ca3d), no 7º (Ca7d) e no 14º (Ca14d) dia após a castração, sendo que cada um desses dias representa um grupo dos animais castrados. Os animais do grupo controle foram eutanasiados ao final do experimento.

3.3. Análise Biométrica

Ao fim do experimento, os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados por meio de superdosagem de anestésico (três vezes a dose utilizada para cirurgia) administrados por via subcutânea, em seguida, foram pesados e decapitados para a coleta do sangue corpóreo (pelo rompimento dos vasos cervicais) e da próstata. Após a dissecação, o complexo prostático e a próstata ventral foram retirados e pesados. Para obtenção dos pesos relativos foi feita a razão entre o peso do complexo prostático e o peso corpóreo e entre o peso da próstata ventral e o peso corpóreo.

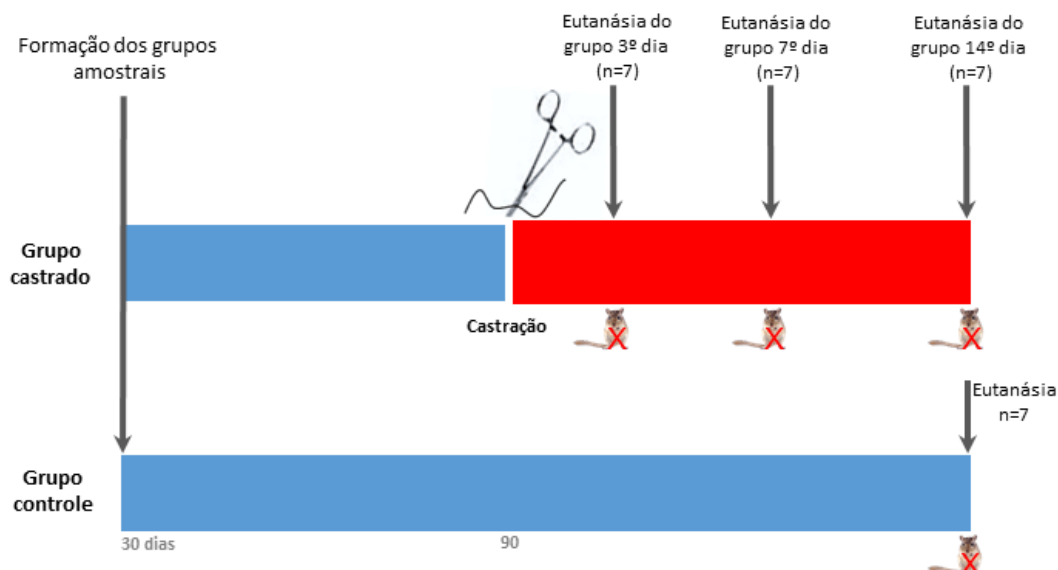


Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental proposto para o projeto.

3.4. Processamento histológico e análise histoquímica

Após a pesagem, a próstata ventral dos animais foi fixada em paraformaldeído 4%, lavada em água, desidratada em etanol, clarificada em xilol e, então, incluída em Histosec (Merck). O lobo ventral da próstata foi seccionado a 3-5µm e corado pelas seguintes técnicas histoquímicas:

Reticulina de Gömori: para estudo das fibras reticulares do estroma prostático (BEHMER et al., 1976).

Tricrômico de Gömori: para estudo das células musculares lisas e do colágeno (BEHMER et al., 1976).

3.5. Análise morfométrica e estereológica

A morfometria foi realizada para se obter a altura/espessura das células epiteliais e das células musculares lisas, respectivamente. Foram realizadas, no mínimo, 200 medidas por grupo obtidas a partir de 6 imagens capturadas de uma lâmina de cada animal, coradas pela técnica de Tricrômico de Gömori, com o auxílio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa *Image-Pro-Plus* (Media Cybernetics).

As análises estereológicas foram realizadas para a obtenção do volume relativo dos diferentes compartimentos prostáticos dos quatro grupos em estudo. Para isso, foram capturados, a partir de lâminas coradas pela técnica de Tricrômico de Gömori, no mínimo, 30 campos aleatórios sendo 5 campos para

cada animal de cada grupo, por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa *Image-Pro-Plus (Media Cybernetics)*.

As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por WEIBEL, 1978 e aplicado à próstata por HUTTUNEN et al., (1981). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foram calculadas a frequência relativa dos compartimentos epitelial e luminal, estroma muscular, estroma não muscular, colágeno e vasos sanguíneos da próstata ventral.

3.6. Nível sérico hormonal

O sangue dos animais dos grupos experimentais foi coletado no momento da decapitação. O soro foi centrifugado (3000 rpm) durante 20 minutos e estocado à -80°C até o momento das análises dos níveis séricos hormonais. As dosagens hormonais foram realizadas em duplicata com o uso de ELISA e kit de alta sensibilidade (*Monobind Inc. Lake Forest, CA 92630, USA*) para a T, seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (*Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System-BioTek Instruments, VT, USA*).

3.7. Análise imunoistoquímica e imunofluorescência

Para avaliar os efeitos resultantes da castração na próstata de gerbilos machos foram verificadas as possíveis alterações na expressão de receptores hormonais em células epiteliais e estromais, a caracterização das fibras musculares, a presença e a quantidade de macrófagos e localização de duas metaloproteinases da matriz extracelular por meio da utilização dos seguintes anticorpos:

Receptor de andrógeno: Anti-AR (*rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA*). Diluição 1:75.

Marcador de fibras musculares: anti- α -actina (camundongo monoclonal IgG, sc-32251, *Santa Cruz Biotechnology CA, EUA*). Diluição 1:100.

Marcador para macrófago do tipo 1: anti-CD 68 (*goat polyclonal IgG M-20, sc-7084, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA*). Diluição 1:50.

Marcador para macrófago do tipo 2: anti-CD 163 (*rabbit polyclonal IgG M-96, sc-33560, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA*). Diluição 1:50.

Marcadores para metaloproteínases da matriz extracelular: anti-MMP-2 (mouse monoclonal, sc-13595, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-MMP-9 (mouse monoclonal, sc-21733, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Diluição 1:50.

Procedimentos gerais para imunistoquímica: os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 92°C por 45 minutos. Em seguida, foram lavados em tampão por 3 vezes durante 5 minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi realizado com H₂O₂, por 15 minutos, e depois os cortes foram lavados em tampão por 3 vezes, durante 5 minutos. Os anticorpos primários anti-AR, anti-CD68, anti-CD163, anti-MMP-2 e anti-MMP-9 foram diluídos em BSA 1% em seguida os cortes foram incubados *overnight* à 4°C. Posteriormente, foram lavados em tampão por 3 vezes durante 5 minutos, e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase (*Rabbit ABC Staining System SC-2018 – Santa Cruz Biotechnology CA, EUA*). O material foi revelado com diaminobenzidina (*DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA*) por aproximadamente 1 minuto e contra corados pela Hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em etanol, clarificadas e montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. A descrição de cada protocolo utilizado pode ser visualizada na tabela 1.

A análise dos dados imunistoquímicos foi realizada para a obtenção da frequência de células epiteliais e estromais positivas para o AR e do número total de macrófagos do tipo 1 e 2 na próstata ventral dos animais. Para isso, foram contadas, no mínimo, 4.000 células de cada compartimento, por grupo experimental, em cortes seriados submetidos à imunistoquímica para o AR e contabilizados o número total de macrófagos em lâminas escaneadas. As imagens foram capturadas por meio do fotomicroscópio *Olympus BX60* e do scanner de lâminas (*Olympus BX-UCB*). As contagens das células foram realizadas no software *Image-Pro-Plus (Média Cybernetics)*.

Procedimentos gerais para imunofluorescência: Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 92°C por 50 minutos, seguida de três lavagens em tampão. Posteriormente houve o bloqueio de ligações inespecíficas, seguido da incubação

com o anticorpo primário (anti α -actina) diluído em BSA 1%, à 4°C, *overnight*. O anticorpo secundário anti-mouse, contendo o fluorocromo FITC (sc- 2010, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA), foi diluído a 1:200 em BSA 1% e os cortes incubados por 2 horas, seguido de três lavagens em tampão, por 10 minutos cada lavagem. Em seguida, foi utilizado um meio de montagem apropriado contendo DAPI (Ultracruz Mounting Medium: sc-24941, para fluorescência com DAPI, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA). As imagens foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M2. A descrição do protocolo utilizado pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1. Descrições dos protocolos realizados em cada técnica de imunoistoquímica e imunofluorescência.

Imunoistoquímica e Imunofluorescência	Recuperação antigênica	Tampão de lavagem	Bloqueio da peroxidase endógena	Inibição de ligações inespecíficas	Complexo avidina biotina	Polímero <i>Leica</i>
Anti-AR	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS + tween	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	X	Não utilizou
Anti- CD 68	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS + tween	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	X	Não utilizou
Anti- CD163	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS + tween	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 1 hora	X	Não utilizou
Anti- MMP-2/ Anti- MMP-9	TRIS – EDTA com tween por 14 minutos no micro-ondas com potência baixa e 7 minutos em potência média	TBS + tween	20 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	Não utilizou	X
Anti- α actina	50 minutos em tampão citrato (pH 6) à 98°C	PBS	Não utilizou	Leite em pó a 5% por 1 hora		Não utilizou

3.8. Verificação de apoptose das células epiteliais e estromais

As células apoptóticas presentes no epitélio e estroma foram detectadas utilizando-se o ensaio da fragmentação de DNA associado à morte celular, baseado na reação de TUNEL, segundo as instruções do kit (*ApoTag Plus in*

situ, Apoptosis Detection Kit, Millipore, 57101, CA, USA). Os cortes histológicos foram desparafinizados, lavados em PBS por 5 minutos e incubados com a proteinase K por 20 minutos. Em seguida, foram lavados 2 vezes de 2 minutos em água destilada e submetidos aos procedimentos para inativação da peroxidase endógena (H_2O_2 a 3% em PBS, durante 5 minutos). Posteriormente, foram lavados 2 vezes de 5 minutos em PBS, mantidos no *Equilibration buffer* durante 20 minutos e sequencialmente incubados com a enzima *deoxynucleotidil terminal transferase* (TdT), por 40 minutos, a 37°C. Após o término da reação, os cortes foram lavados em *stop/wash buffer* por 10 minutos, incubados com anti-digoxigenin peroxidase por 30 minutos, revelados pela diaminobenzidina (DAB) e contra corados pela Hematoxilina de Harris.

3.9. Análise estatística

A análise estatística dos dados biométricos, morfométricos, estereológicos, sorológicos e imunoistoquímicos foi realizada em planilhas e gráficos do software *GraphPad Prism 5.00*. Para a comprovação da significância dos resultados foram utilizados os testes one-way ANOVA, seguido de Tukey (*post hoc*) (dados paramétricos) e o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*) (dados não paramétricos) para comprovações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Análise biométrica

A análise dos dados biométricos dos animais utilizados no experimento permitiu observar que não houve diferença de peso corpóreo quando se compara os grupos controle com os grupos castrados, apenas a pequena redução no grupo Ca3d (Figura 3A). Porém, na análise do peso relativo do complexo prostático foi possível verificar redução significativa nos grupos Ca7d e Ca14d em relação ao Ca3d e no Ca14d quando comparado ao grupo controle (Figura 3B). Quanto ao peso relativo da próstata ventral, foi possível observar a redução nos grupos castrados em relação ao controle, que foi estatisticamente significativa apenas no Ca14d quando comparado ao grupo controle (Figura 3C).

4.2. Morfologia

Por meio da análise morfológica da próstata dos gerbilos foi possível notar que o lobo ventral é formado pelo conjunto de ácinos envoltos por estroma fibromuscular. O epitélio é prismático simples no grupo controle e com a castração passou a ser cúbico (Figura 4 B-D). O estroma é composto por CML (Figura 4), fibroblastos, fibras reticulares e colágenas (Figura 5).

A organização estromal também pode ser observada pela análise das fibras reticulares e colágenas (Figura 5). Nos grupos Ca7d e Ca14d é possível observar o aumento aparente na proporção dessas fibras que se distribuem de modo aleatório, apresentando organização diferente do grupo controle (Figura 5 F, H).

4.3. Morfometria e estereologia

A análise morfométrica mostrou diferenças em relação à altura das células epiteliais e à espessura da CML, entre os grupos controle e castrados (Figura 6). Houve diminuição estatisticamente significativa na altura do epitélio de todos os grupos castrados em relação ao controle e do Ca7d quando comparado ao Ca14d (Figura 6A). Essa redução também foi observada na espessura das CML dos animais pertencentes aos grupos castrados e foi

estatisticamente significante nos grupos Ca3d e Ca7d quando comparados ao controle e Ca7d em relação ao Ca14d (Figura 6B).

A partir da análise estereológica observou-se que o compartimento epitelial da próstata dos animais pertencentes ao grupo Ca7d diminuiu significativamente em relação aos demais grupos (Figura 7A). Em relação ao volume relativo do lúmen, foi observada redução estatisticamente significante desse compartimento apenas no grupo Ca14d quando comparado ao C e ao Ca7d (Figura 7B). Porém, por meio da comparação do volume relativo do estroma muscular nos diferentes grupos, foi possível verificar que nos animais castrados, o estroma muscular ocupa volume relativo maior que nos animais do grupo controle. Já a análise do volume relativo do estroma não muscular permitiu observar o declínio no volume desse compartimento nos grupos Ca3d, Ca7d e Ca14d em relação ao controle, que foi estatisticamente significativo apenas quando se comparou o grupo Ca3d com o controle e com o Ca14d (Figura 7D).

Também foi realizada a estimativa do volume relativo das fibras colágenas e foi observado o aumento em todos os grupos castrados. Esse aumento foi estatisticamente significativo nos grupos Ca7d e Ca14d em relação ao grupo controle e Ca3d (Figura 7E). Ainda pela análise estereológica, foi possível verificar a redução no volume relativo dos vasos sanguíneos em todos os grupos experimentais, Ca3d, Ca7d e Ca14d, em relação ao controle (Figura 7F).

4.4. *Nível sérico hormonal*

Os resultados obtidos a partir da análise dos níveis séricos de T nos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais, permitem observar a diminuição estatisticamente significante da T circulante nos grupos castrados em relação ao controle (Figura 8).

4.5. *Imunoistoquímica*

A realização da técnica de imunoistoquímica possibilitou verificar a presença de receptores androgênicos (AR), de macrófagos M1 e M2 e das MMPs do tipo 2 e 9 na próstata ventral dos animais dos grupos experimentais. A imunistoquímica para AR permitiu observar a presença de imunorreatividade no núcleo das células epiteliais prostáticas e das células estromais nos grupos

experimentais. Nos grupos Ca3d e Ca14d foi observado o aumento significativo na frequência das células AR positivas no epitélio em relação ao grupo controle. Também foi observada maior frequência relativa das células AR positivas no epitélio do grupo Ca3d quando comparado ao Ca7d (Figura 9G). Em relação a frequência dessas células no estroma prostático, foi observado aumento nos grupos Ca3d, Ca7d e Ca14d em comparação ao controle e no grupo Ca7d comparado ao Ca3d (Figura 9H).

A imunistoquímica para MMP-2 permitiu observar marcações em várias regiões da próstata ventral (Figura 10 A-L). No grupo controle foi observada a presença dessas enzimas apenas na secreção prostática, presente no lúmen, e nas células endoteliais (Figura 10 A, C). No grupo Ca3d foram notadas marcações na secreção, presente no lúmen, e no núcleo das células epiteliais (Figura 10 D, E). Nos animais pertencentes ao grupo Ca7d é possível verificar a presença dessas enzimas no epitélio, estroma e na região luminal (Figura 10 F-H). E no grupo Ca14d, a secreção luminal e algumas células estromais também estão marcadas (Figura 10 I-K).

O marcador para MMP-9 possibilitou analisar a presença dessas enzimas em regiões distintas do lobo ventral prostático (Figura 11 A-M). Nos animais do grupo controle foram observadas marcações no epitélio e nas células endoteliais presentes no estroma (Figura 11 A-C). No grupo Ca3d foi possível verificar regiões marcadas no epitélio e na secreção presente no lúmen (Figura 11 E-H). No grupo Ca7d observou-se a presença de marcações nas células endoteliais, epiteliais e estromais (Figura 11 I, J). E nos animais do grupo Ca14d foi possível visualizar marcações no compartimento epitelial da próstata ventral (Figura 11 K-M).

Por meio da utilização de marcadores anti-CD 68 e anti-CD 163 foi possível a identificação dos macrófagos, permitindo observar as diferentes populações de macrófagos M1 e M2, respectivamente. Com o auxílio do marcador anti-CD 68 verificou-se a presença dos macrófagos M1 nas regiões intraepiteliais e nos compartimentos estromais dos diferentes grupos experimentais (Figura 12 A-I). Pela realização da estimativa do número de macrófagos M1, observou-se o aumento significativo no número destas células no grupo Ca3d em relação aos demais no compartimento epitelial (Figura 12 J).

No compartimento estromal, houve um pequeno aumento destes fagócitos no grupo Ca3d quando comparado com os outros grupos (Figura 12 K).

O marcador anti-CD 163 permitiu observar a presença dos macrófagos M2 no estroma e na região intraepitelial prostática (Figura 13 A-I). Na análise do número de macrófagos M2 observou-se a tendência ao aumento da quantidade dessas células no compartimento epitelial em todos os grupos castrados (Figura 13 J). No entanto, na região estromal, houve pequeno declínio dos macrófagos nos grupos Ca3d e Ca14d em relação ao controle e aumento no grupo Ca7d quando comparados ao controle (Figura 13 K).

4.6. Método de TUNEL

A realização do método de TUNEL permitiu verificar a presença de apoptose das células epiteliais e estromais da próstata ventral em todos os grupos experimentais. Porém, após a análise dos compartimentos prostáticos, é possível verificar marcações que visualmente são mais frequentes nos grupos castrados em relação ao controle (Figura 14 A-L).

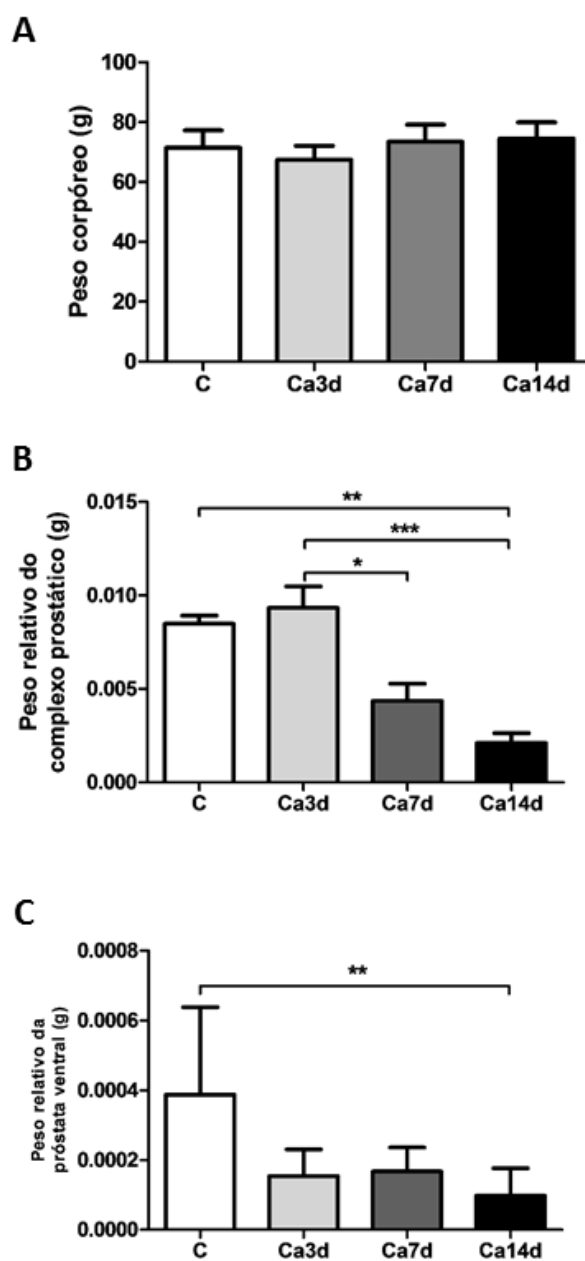


Figura 3. Análise biométrica. Peso corpóreo (g) (A). Peso relativo do complexo prostático (g) (B). Peso relativo da próstata ventral (g) (C). Os dados foram submetidos ao teste one-way ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) (A) e ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*) (B, C). Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). $n=7$ animais por grupo.

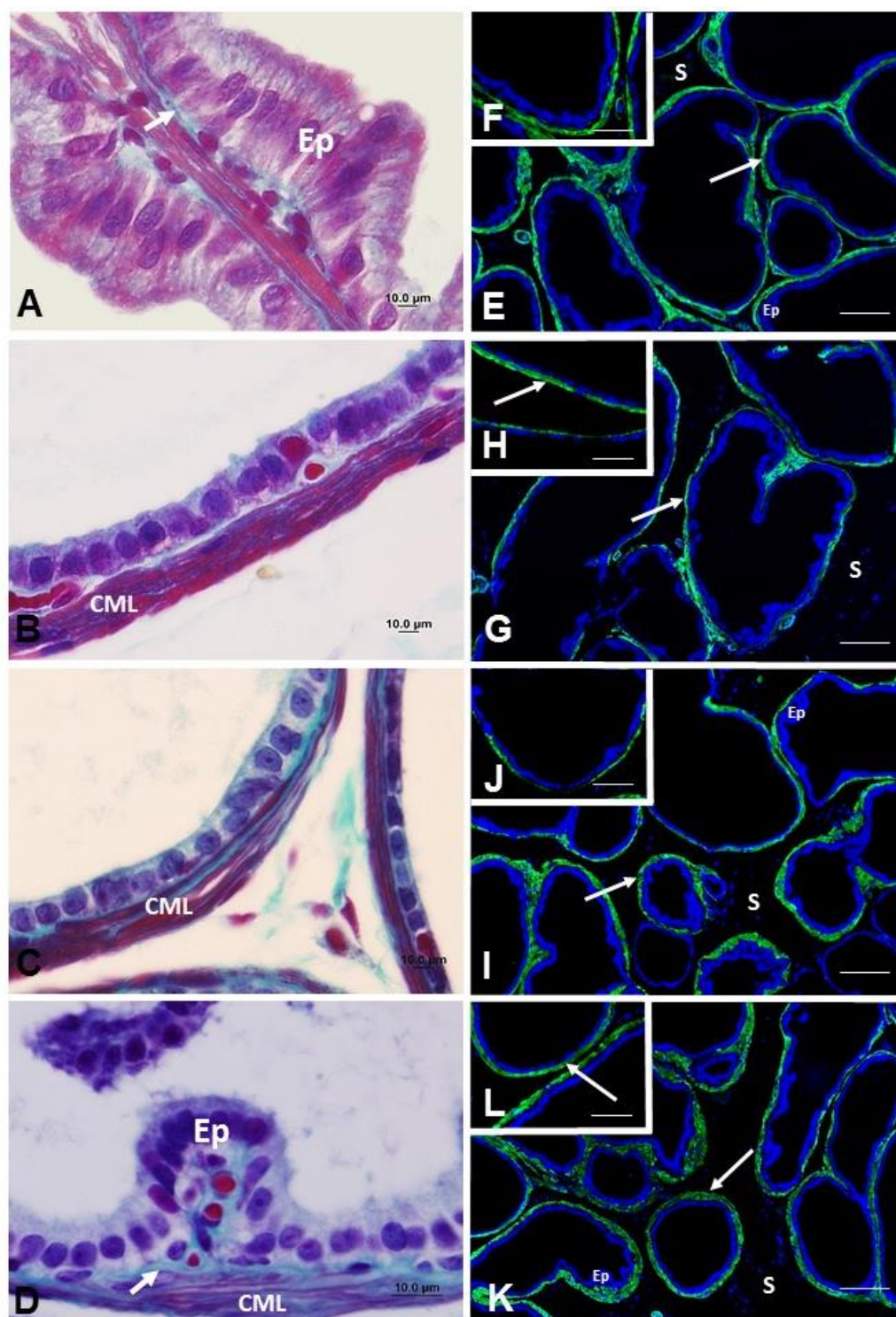


Figura 4. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos corados por Tricrômico de Gömori (A-D) e submetidos à imunofluorescência para α -actina (alfa actina de músculo liso). Controle (A, E, F), Ca3d (B, G, H), Ca7d (C, I, J) e Ca14d (D, K, L). Epitélio (Ep), camada de células musculares lisas (CML), fibras colágenas em azul (seta menor) e musculatura lisa em verde fluorescente (setas maiores). Aumento de 10x (E, G, I, K) e de 63x (F, H, J, L).

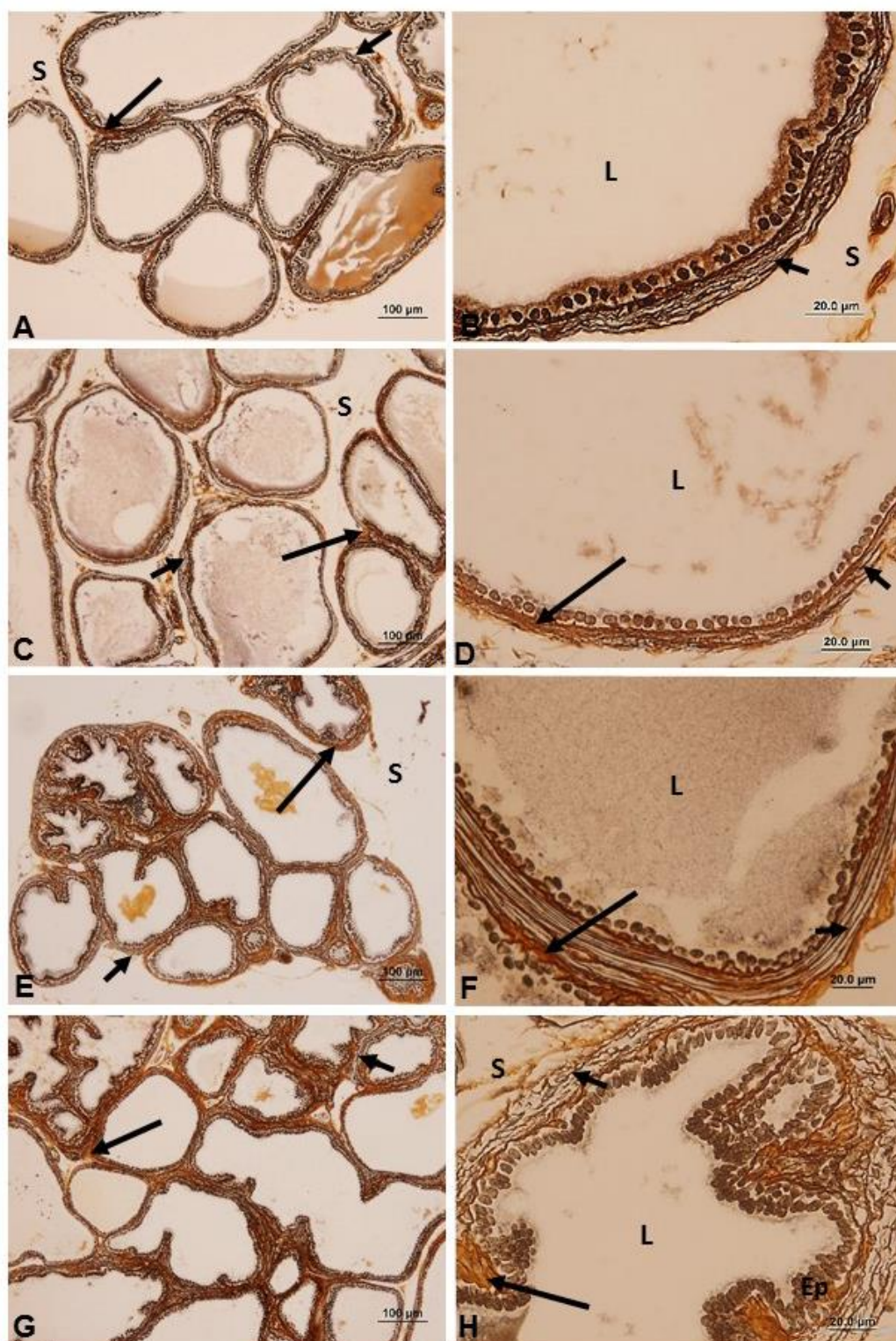


Figura 5. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à técnica de Reticulina de Gömöri. Controle (A, B), Ca3d (C, D), Ca7d (E, F) e Ca14d (G, H). Epitélio (Ep), lúmen (L), estroma (S), fibras colágenas (setas maiores) e fibras reticulares (setas menores).

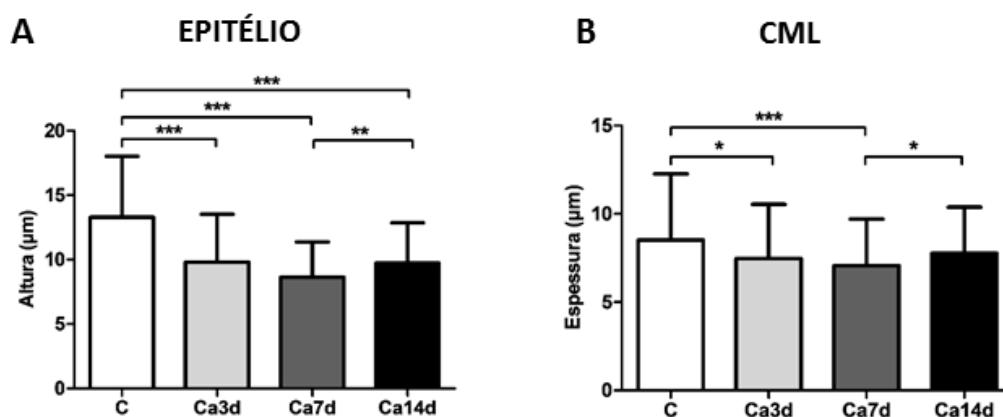


Figura 6. Análise morfométrica da altura do epitélio (A) e da espessura das CML (B) da próstata ventral de gerbilos dos grupos experimentais. As análises estatísticas foram baseadas no teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*). Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). $n=7$ animais por grupo.

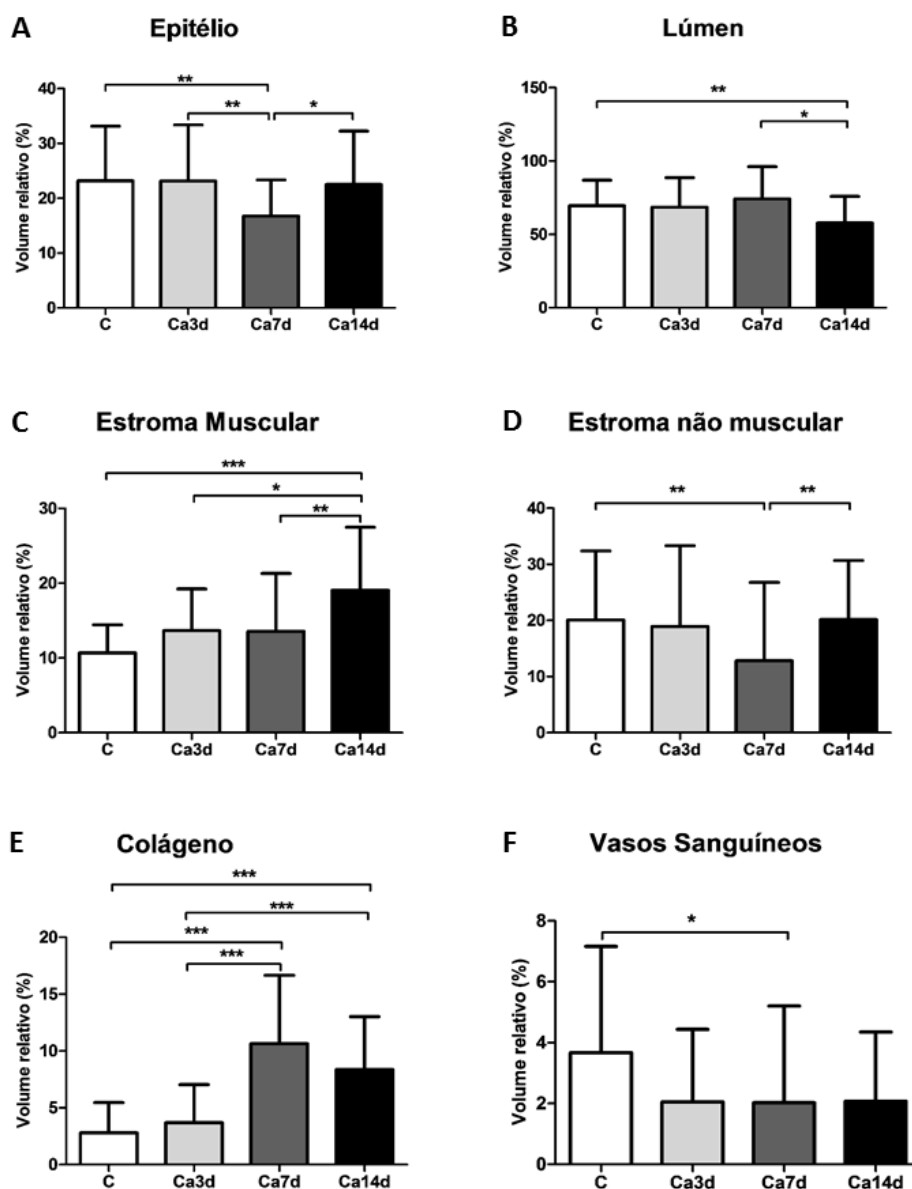


Figura 7. Análise estereológica do volume absoluto médio do epitélio (A), lúmen (B), estroma muscular (C), estroma não muscular (D), colágeno (E) e vasos sanguíneos (F) da próstata ventral de gerbilos dos grupos Controle, Ca3d, Ca7d, Ca14d. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*), Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P <0,05; **P <0,01; *** P <0,001). n=7 animais por grupo.

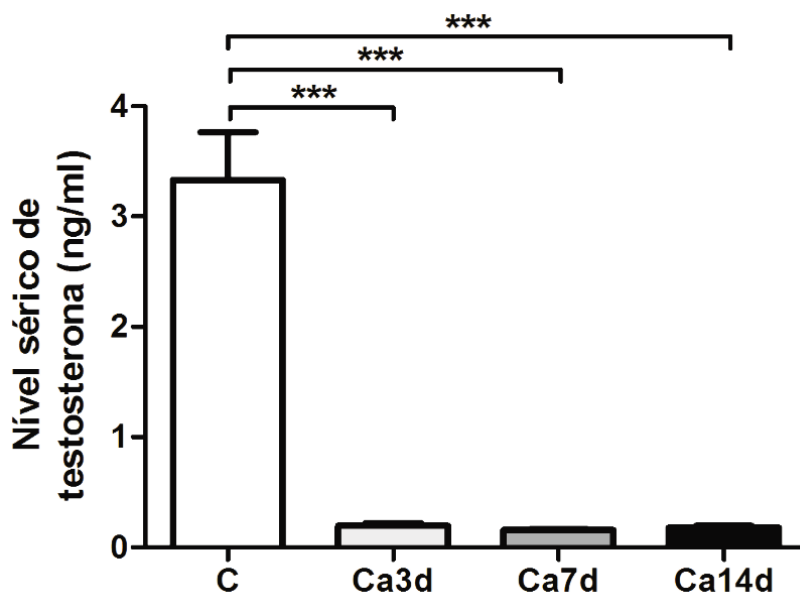


Figura 8. Nível sérico hormonal de testosterona (ng/ml) dos machos adultos pertencentes aos grupos experimentais. As análises estatísticas foram baseadas de one-way ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*). Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*** P <0,001). n=7 animais por grupo.

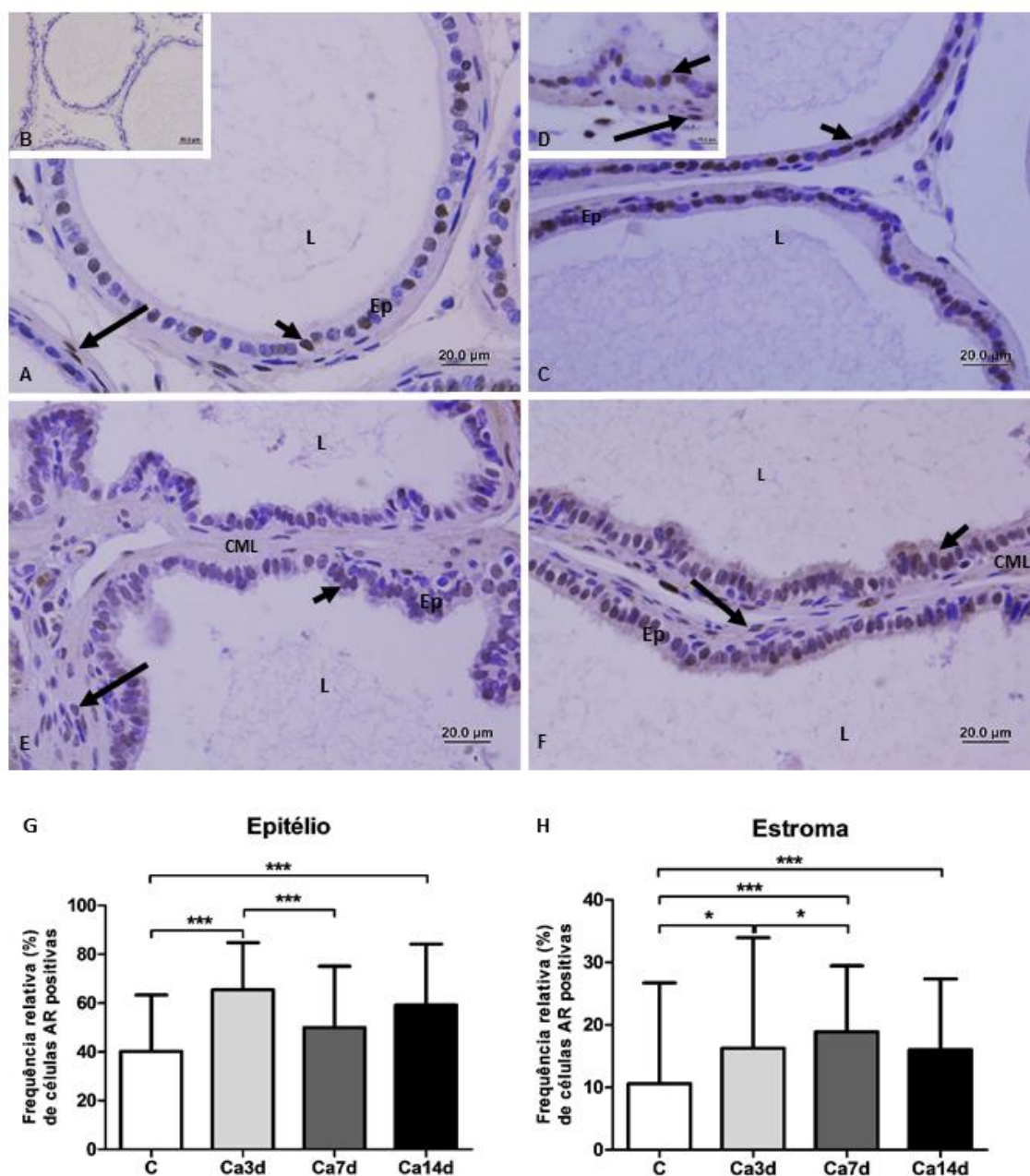


Figura 9. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para identificação do receptor de andrógeno (anti-AR). Controle (A). Controle negativo de reação (B). Ca3d (C, D). Ca7d (E). Ca14d (F). Epitélio (Ep), camada de células musculares lisas (CML), lúmen (L) e marcação para AR nos núcleos das células epiteliais (setas menores) e estromais (setas maiores). Frequência relativa (%) das células AR positivas presentes no epitélio (G) e no estroma da próstata ventral (H). As análises estatísticas foram baseadas de teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*). Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). $n=7$ animais por grupo.

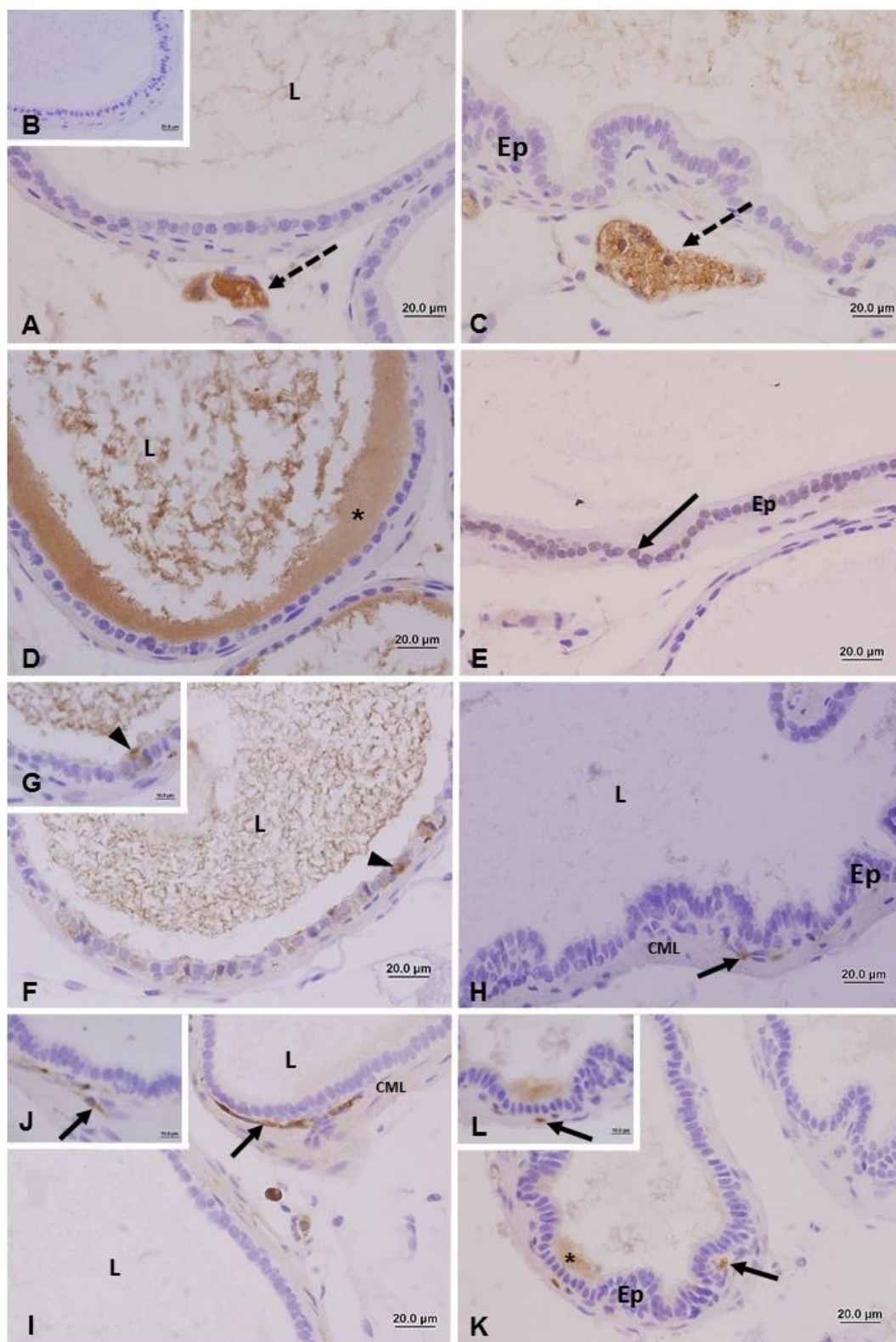


Figura 10. Cortes histológicas da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para identificação da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo 2 (anti-MMP-2). Controle (A, C). Controle negativo de reação (B). Ca3d (D, E). Ca7d (F, G, H). Ca14d (I, J, K, L). Epitélio (Ep), camada de células musculares lisas (CML), lúmen (L) e marcação para MMP-2 nos vasos sanguíneos (setas pontilhadas), nos núcleos das células epiteliais (setas maiores), no ápice do epitélio (ponta de seta), na secreção presente no lúmen (asterisco) e no estroma (setas menores).

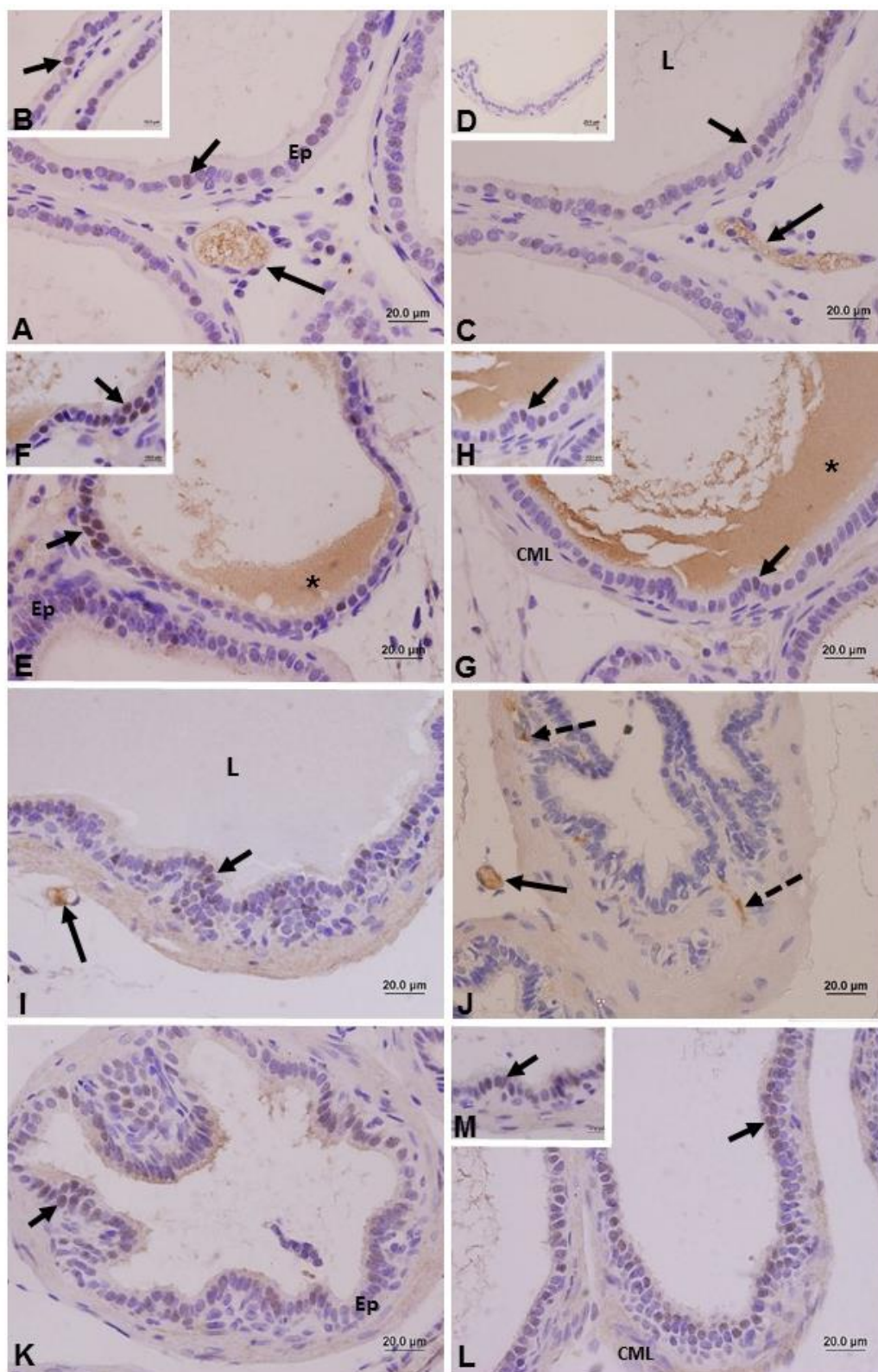


Figura 11. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos submetidos à imunoistoquímica para identificação da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo 9 (anti-MMP-9). Controle (A, B, C). Controle negativo de reação (D). Ca3d (E, F, G, H). Ca7d (I, J). Ca14d (K, L, M). Epitélio (Ep), camada de células musculares lisas (CML), lúmen (L) e marcação para MMP-9 nos vasos sanguíneos (setas maiores), nos núcleos das células epiteliais (setas menores), no estroma (setas pontilhadas) e na secreção presente no lúmen (asterisco).

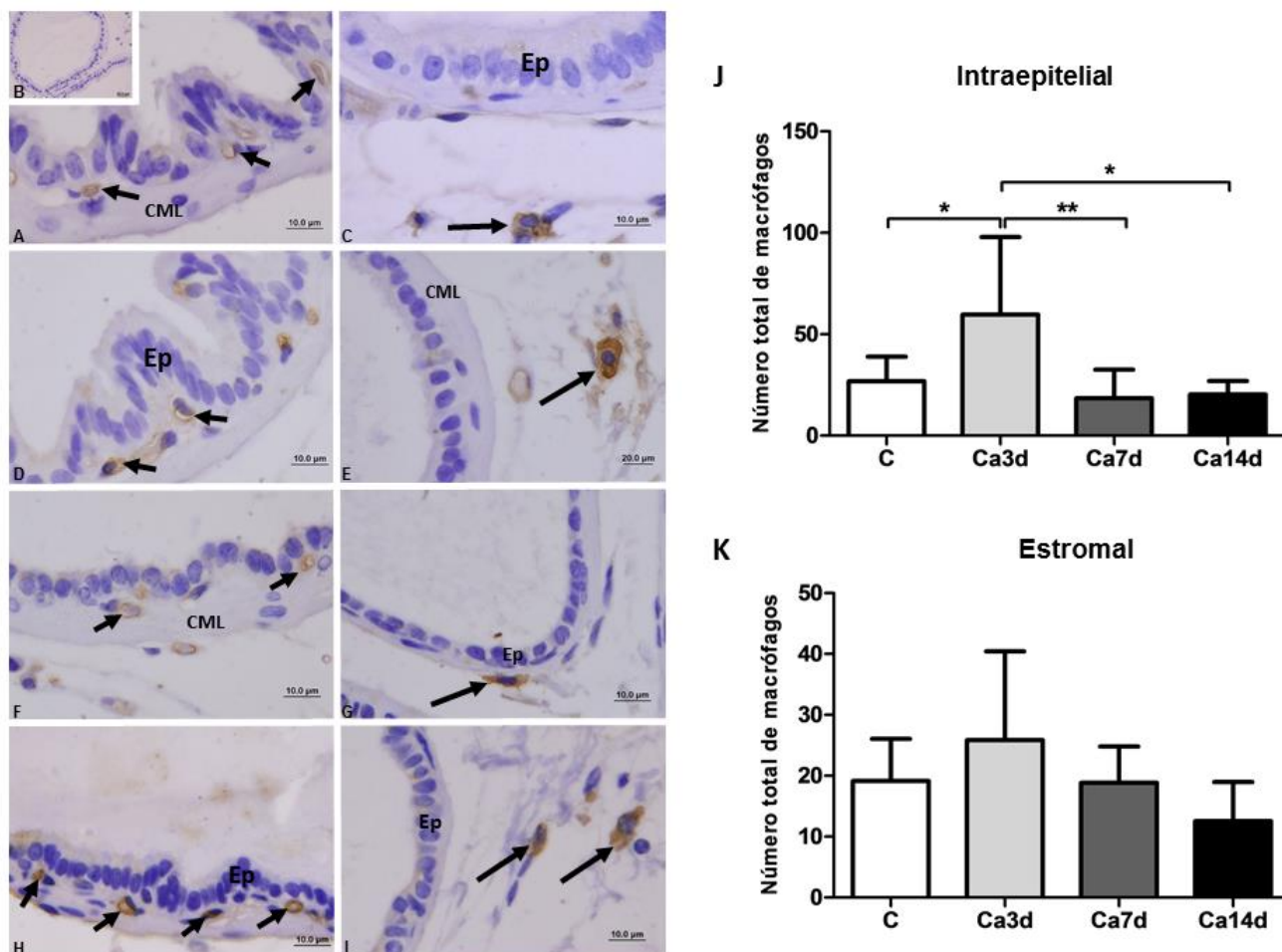


Figura 12. Identificação imunoistoquímica de macrófagos M1 por meio da reação com o anticorpo anti-CD68. Controle (A, C). Controle negativo de reação (B). Ca3d (D, E). Ca7d (F, G). Ca14d (H, I). Epitélio (Ep.), camada de células musculares lisas (CML), macrófagos intraepiteliais (setas menores) e macrófagos estromais (setas maiores). Quantificação dos macrófagos por corte histológico marcado com anticorpo anti-CD 68 no epitélio (J) e no estroma (K). Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*) (J) e ao teste de one-way ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) (K). Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (*P < 0,05; **P < 0,01). n=7 animais por grupo.

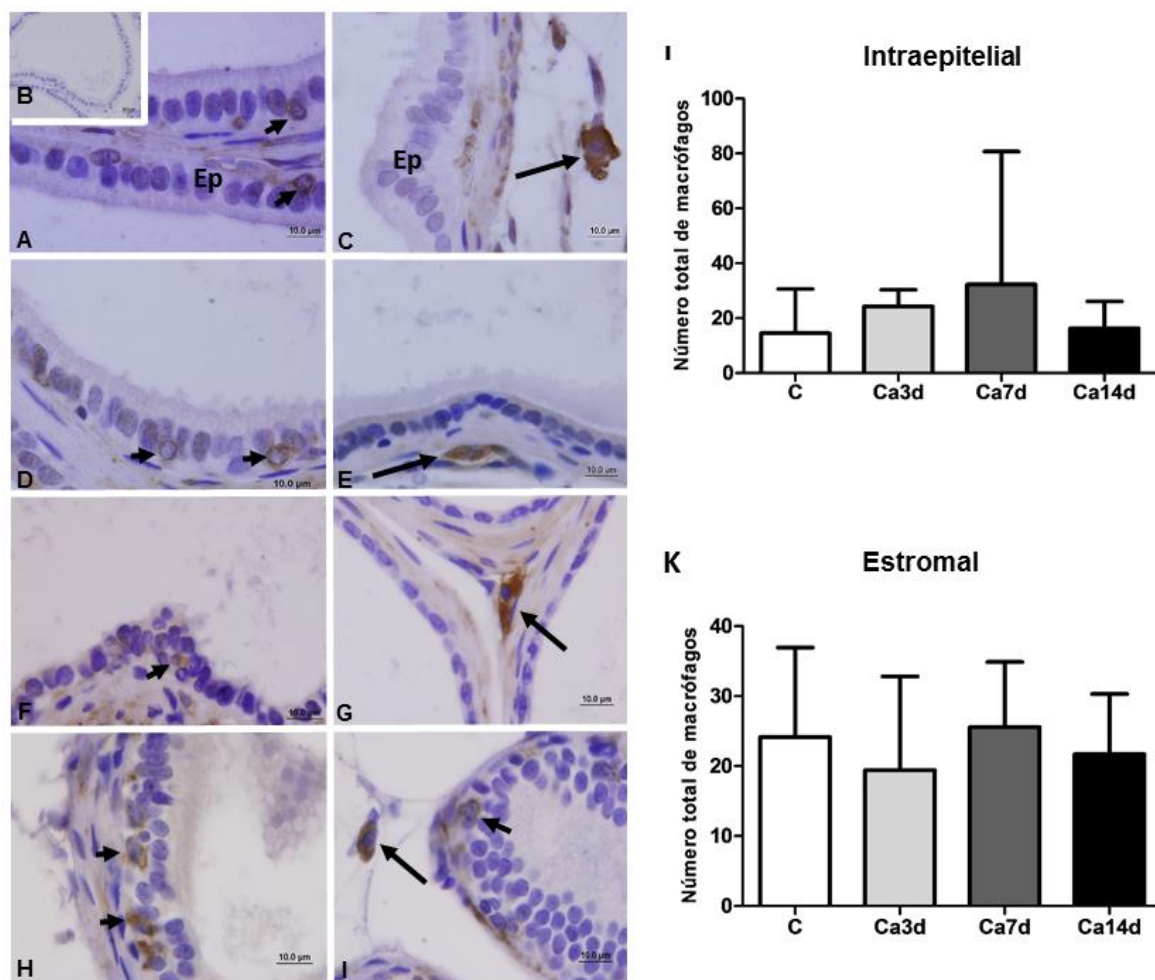


Figura 13. Imunomarcacão de macrófagos M2 pelo anticorpo anti-CD 163. Controle (A, C). Controle negativo de reação (B). Ca3d (D, E). Ca7d (F, G). Ca14d (H, I). Epitélio (Ep.), camada de células musculares lisas (CML), macrófagos intraepiteliais (setas menores) e macrófagos estromais (setas maiores). Quantificação dos macrófagos por corte histológico marcado com anticorpo anti-CD 163 no epitélio (J) e no estroma (K). Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*) (J) e ao teste de one-way ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) (K). n=7 animais por grupo.

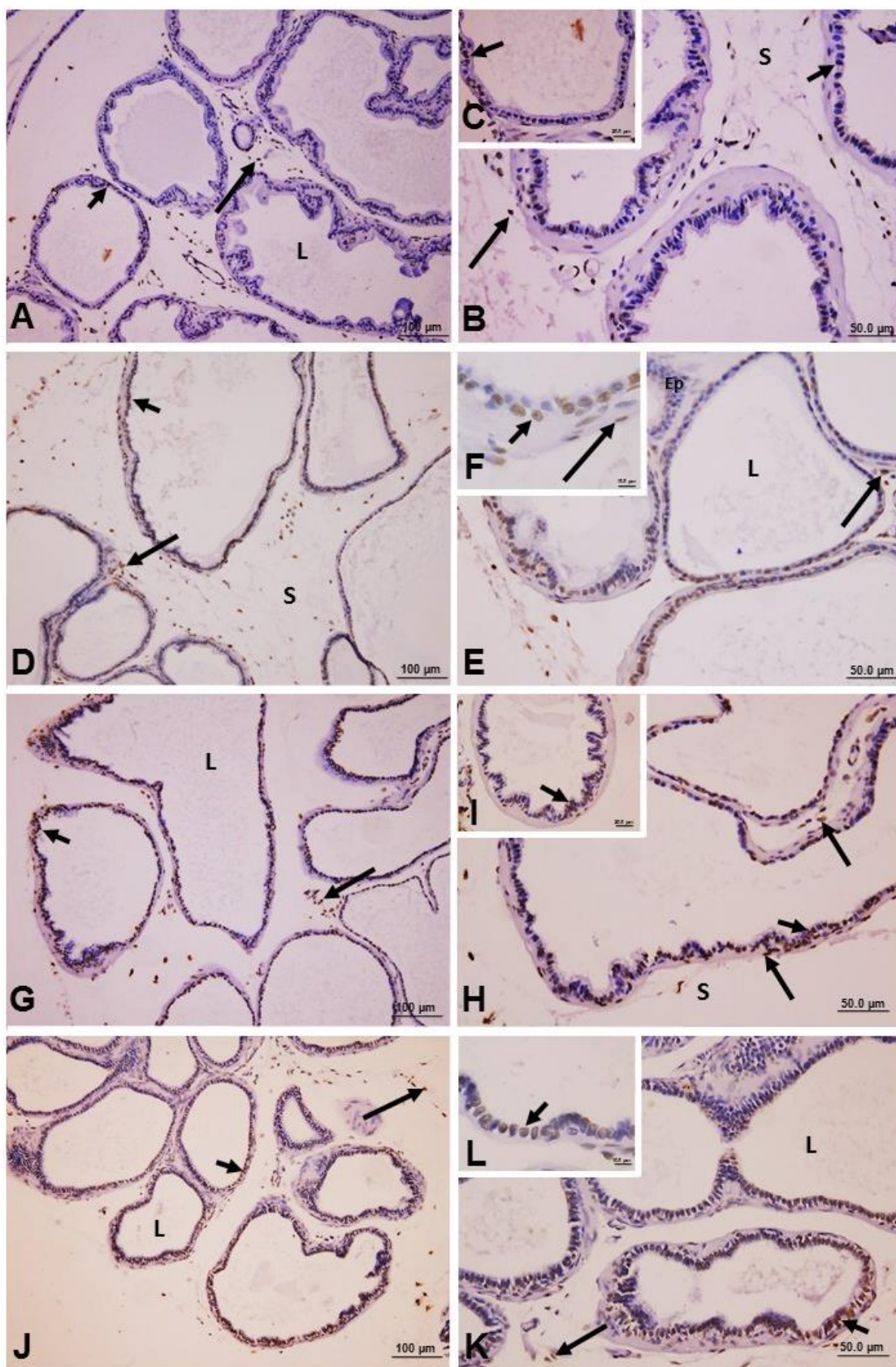


Figura 14. Identificação de apoptose em cortes histológicos da próstata ventral pelo método de TUNEL. Controle (A, B, C). Ca3d (D, E, F). Ca7d (G, H, I). Ca14d (J, K, L). Epitélio (Ep.), estroma (S), lúmen (L), marcações no epitélio (setas menores) e no estroma (setas maiores).

5. Discussão

Os dados obtidos reforçam a sensibilidade ou a dependência da próstata de gerbilos aos níveis de andrógenos circulantes. Estudos relatam que a queda desse hormônio influencia na remodelação da glândula prostática após a orquiectomia (CORRADI et al., 2004).

As análises revelaram que houve redução do volume relativo das células epiteliais após sete dias da privação de hormônios. Também foi verificada a diminuição na altura do epitélio da próstata ventral em todos os grupos castrados, que passou a ser cúbico ou cilíndrico baixo. As alterações epiteliais encontradas provavelmente correspondem a diminuição na atividade secretora e perda das células epiteliais via apoptose, um dos fatores que acarreta na atrofia da glândula prostática (ANTONIOLI et al., 2004; FELISBINO et al., 2007). Essa atrofia condiz com os resultados da análise biométrica, em que foi observada a redução do peso relativo do complexo prostático e da próstata ventral dos animais castrados.

As análises realizadas indicam que houve a diminuição da espessura das CML nos grupos castrados em relação ao grupo controle. Também foi observado o aumento do volume relativo do estroma muscular prostático em todos os grupos castrados, principalmente no Ca14d comparado ao controle. Estudos anteriores em próstatas de gerbilos machos castrados também relatam o aumento do volume das CML e sugerem que este aumento ocorra como consequência de um rearranjo desses tipos celulares (GÓES et al., 2007).

A diminuição da espessura da camada de CML pode ser causada pela redução da expressão de alguns componentes críticos, como as proteínas contráteis, que atuam no processo de contração. A atrofia celular é caracterizada pelo acúmulo de grânulos grandes de lipofuscina no citoplasma e pela diminuição do volume da célula (ANTONIOLI et al., 2004). Pesquisas indicam que as CML apresentam receptores ativos de andrógenos e juntamente com os fibroblastos são elementos importantes na reorganização do estroma após a castração (PRINS et al., 1991; ANTONIOLI et al., 2004).

Entretanto, quando se analisa o volume relativo dos compartimentos teciduais, o estroma muscular mostra-se aumentado na condição de remoção de hormônios comparado à condição controle. Esta observação pode significar que,

mesmo ocorrendo redução da espessura das CML, o fato de haver redução da altura das células epiteliais, faz com que, na proporção entre os compartimentos, o estroma muscular ocupe maior volume na condição da glândula remodelada após a orquiectomia.

As CML estão associadas diretamente com as fibras colágenas, essa intensa associação pode indicar que essas fibras desempenham um papel ativo na reorganização da matriz extracelular frente a involução das estruturas epiteliais devido a depleção dos andrógenos (VILAMAIOR et al., 2000). Os dados apresentados neste estudo corroboram estas observações, pois indicam que a castração proporcionou intensa reorganização das fibras colágenas e reticulares, que se tornaram mais dispersas nos grupos castrados, principalmente nos períodos mais longos estudados neste trabalho, 7 e 14 dias, em relação ao controle.

A partir da análise dos níveis séricos da T foi possível confirmar a diminuição da T circulante nos animais submetidos à orquiectomia, assim como já observado em muitos estudos (KYPRIANOU & ISAACS, 1987; BANERJEE et al., 2000; ANTONIOLI et al., 2004; FELISBINO et al., 2007; LABRIE, 2011). Além disso, alguns pesquisadores relatam que, em humanos, a concentração de andrógenos presentes na circulação sanguínea reduz cerca de 59% após a orquiectomia. Mas 41% desses hormônios ainda está presente no organismo mesmo após a eliminação dos andrógenos testiculares (LABRIE, 2011). Outros trabalhos observaram que 50% de DHT ainda permanecia na próstata de pacientes orquiectomizados (YOON et al., 2008; LABRIE, 2011). Acredita-se, portanto, que mesmo após a castração, a produção de andrógenos permanece ativa pela síntese desses hormônios nos tecidos periféricos e também por uma maior atividade das glândulas adrenais.

Com relação aos dados observados nas reações imunoistoquímicas para o AR, foi possível observar a presença de imunomarcações no núcleo das células epiteliais e estromais na próstata dos animais controles e castrados. A expressão desse receptor depende da fase do desenvolvimento e dos diferentes segmentos dos lobos prostáticos (BANERJEE et al., 2001). Muitos estudos mostram que após a castração, a expressão de AR reduz, principalmente, no lobo ventral da próstata de roedores (HUSMANN et al., 1990; BANERJEE et al., 2001; CORDEIRO et al., 2008).

Porém, existem trabalhos que relatam que cerca de 24 - 48 horas após a castração cirúrgica, a expressão de AR na próstata ventral de ratos não diminui (HUSMANN et al., 1990; SHAN et al., 1990; PRINS & BIRCH, 1993). Nossos resultados corroboram essas informações, pois também não foi encontrada uma redução na frequência de AR no núcleo das células epiteliais e estromais da próstata ventral. O aumento desses receptores pode ocorrer como uma estratégia, considerando a dependência dos andrógenos, para a manutenção da glândula a fim de evitar ou retardar o processo de atrofia.

Husmann e colaboradores (1990) demonstraram que, em ratos, a maioria dos ARs está presente no núcleo das células prostáticas de animais intactos e castrados. Assim, sugerem que o AR se mantém no núcleo mesmo na ausência de ligante. Segundo esses autores, essas constatações foram possíveis devido ao uso de diferentes anticorpos N-terminais, assim, como o que foi utilizado no presente trabalho.

As MMPs do tipo 2 e 9 parecem aumentar nos diferentes compartimentos da próstata dos animais castrados em relação aos controles. Esse aparente aumento pode ser explicado pelo fato dessas enzimas desempenharem papel importante na degradação da matriz extracelular durante o processo de remodelação tecidual, como a orquiectomia (JUSTULIN et al., 2010; FANG et al., 2013).

Os resultados da imunomarcação para os macrófagos demonstraram a presença dos macrófagos M1 e M2 nas regiões intraepiteliais e nos compartimentos estromais dos diferentes grupos experimentais. Estas células fazem parte do sistema fagocitário e, nos mamíferos adultos, podem ser encontrados em todos os tecidos, exibindo grande diversidade morfológica e funcional (WYNN et al., 2013).

Essas células são atraídas devido a privação de andrógenos, que pode ser considerada uma reação inflamatória, e participam da remodelação estromal da próstata (ROCHEL-MAIA et al., 2011). No presente trabalho, foi possível notar o aumento destes fagócitos nos diferentes grupos experimentais em relação ao controle. Segundo Justulin et al. (2010) o processo de castração provoca o recrutamento de macrófagos e mastócitos que contribuem para o aumento das MMPs. Estas células fagocitárias também participam da regulação durante os eventos da remodelação da próstata atrófica (JUSTULIN et al., 2010).

Os resultados permitem observar o aumento significativo de M1 intraepiteliais no grupo Ca3d em relação aos demais grupos experimentais. Sabe-se que a castração provoca a perda de células epiteliais por apoptose (ANTONIOLI et al., 2004) especialmente nas primeiras 72 horas (BUTTYAN et al., 1999) e que estas células apoptóticas expressam alterações da superfície celular que permitem o reconhecimento, a fagocitose e a remoção por macrófagos. Essa remoção ocorre antes da lise celular e impede a liberação de tóxicos intracelulares e conteúdos de células apoptóticas ao redor do tecido, com o propósito de evitar uma possível inflamação (FADOK et al., 1998).

Essas células apoptóticas que são fagocitadas pelos macrófagos formam vacúolos conhecidos como “autofagossomos” ou “vacúolos autofágicos”. Alguns estudos sugerem que a formação desses vacúolos no epitélio prostático acarreta na atrofia da próstata após a castração (HELMINEN & ERICSSON, 1971; 1972; DAHL & KJAERHEIM, 1973; KWONG et al., 1999), que pode explicar o aumento de macrófagos intraepiteliais no grupo Ca3d.

Porém, houve o aumento, não significativo estatisticamente, de M2 na região intraepitelial nos grupos castrados em relação ao controle. Sugere-se que estes macrófagos sejam os M2c, que são induzidos por glicocorticoides e IL-10, e também estão relacionados ao processo de fagocitose de células apoptóticas (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ & GORDON, 2014). Os resultados observados indicam que estes fagócitos também estão atuando na reorganização da próstata, uma vez que este tipo celular pode secretar diferentes mediadores químicos e enzimas que participam ativamente da remodelação tecidual, como as MMPs do tipo 2 e 9 (MANTOVANI et al., 2004; FANG et al., 2013).

A apoptose é um processo biológico que resulta na fragmentação do núcleo e do citoplasma e formação de corpos apoptóticos ligados à membrana. Durante esse processo ocorre a ativação das nucleases, enzimas responsáveis por realizar a degradação do DNA em fragmentos menores. Essa fragmentação do DNA *in situ* pode ser identificada pelo método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (LAWRY, 2004; KYRYLKOVA, et al., 2012; COLLETA et al., 2015). Assim, a partir dessa técnica foi possível identificar células em apoptose presentes no compartimento epitelial e estromal nos diferentes grupos experimentais. Foi possível observar o

aparente aumento na ocorrência dessas células apoptóticas no epitélio e estroma da próstata ventral dos animais pertencentes aos grupos castrados em relação ao controle. Alguns estudos também relatam a perda de células epiteliais por apoptose em animais submetidos à orquiectomia (KWONG et al., 1999; ANTONIOLI et al., 2004).

Deste modo, mesmo já tendo sido explorada as implicações da remoção de andrógenos na próstata (CARVALHO et al., 1997; VILAMAIOR et al., 2000; ANTONIOLI et al., 2004; VILAMAIOR et al., 2005; FELISBINO et al., 2007; GÓES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; CORDEIRO et al., 2008; CAMPOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2011; ROCHEL-MAIA et al., 2011; CAMPOS et al., 2013; FOCHI et al., 2013; CAMPOS et al., 2014), em gerbilos, os efeitos a curto prazo (três dias), ainda não tinham sido relatados.

Considerando a relativa escassez de informações a respeito o papel dos macrófagos nos eventos envolvidos no processo de remodelação tecidual na próstata de animais utilizados frequentemente em estudos experimentais, este trabalho apresenta informações que podem contribuir para o maior entendimento desse tipo celular na remodelação da glândula prostática.

6. Conclusão

A privação de hormônios pela orquiectomia promove alterações no arranjo e na distribuição de células e de elementos da matriz extracelular. Os receptores de andrógenos aumentam na tentativa de evitar ou retardar o processo de atrofia da próstata. Além disso, devido ao aumento de macrófagos, especialmente do tipo 1, sugere-se um papel ativo dos macrófagos na fagocitose das células em apoptose e na regulação dos tecidos prostáticos frente à glândula atrófica. Assim, foi possível verificar que a privação de andrógenos resulta na reorganização tecidual prostática pela ação de diferentes enzimas e tipos celulares.

7. Referências Bibliográficas

AIMES, R. T. & QUIGLEY, J. P. Matrix Metalloproteinase 2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen regenerating the specific and $\frac{1}{4}$ length fragments. **Journal Biological Chemistry**, v. 270, p.5872–5876, 1995.

ALIBHAI, S.M.H.; BREUNIS, H.; TIMILSHINA, N.; NAGLIE, G.; TANNOCK, I.; KRAHN, M.; WARDE, P.; FLESHNER, N.E.; CANNING, S.D.; TOMLINSON, G. Long-Term Impact of Androgen-Deprivation Therapy on Physical Function and Quality of Life. **Cancer**, 2015.

ANTONIOLI, E.; DELLA-COLLETA H.H.M.; CARVALHO, H.F. Smooth Muscle Cell Behavior in the Ventral Prostate of Castrated Rats. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 50-56, 2004.

BANERJEE, S.; BANERJEE, P.P; BROWN, T.R. Castration-Induced Apoptotic Cell Death in the Brown Norway Rat Prostate Decreases as a Function of Age. **Endocrinology**, v.141, p.4066–4075, 2001.

BANERJEE, P.P.; BANERJEE, S.; BROWN, T.R. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown norway rat prostate. **Endocrinology**, v.142, p.821–832, 2000.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. **Manual de práticas para histologia normal e patológica**. EDART-EDUSP, SP., 329p, 1976.

BERRY, P.A.; MAITLAND, N.J.; COLLINS, A.T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 288, p.30–37, 2008.

BUTTYAN, R.; SHABSIGH, A.; PERLMAN, H.; COLOMBEL, M. Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, 1999.

CAMPOS, S.G.P.; GONÇALVES,B.F.; SCARANO, W.R.; CORRADI, L.S.; SANTOS, F.C.A.; CUSTODIO, A.M.G.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES,R.M.; TABOGA, S.R. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. **International journal of Experimental Pathology**, v. 91, p. 394–407, 2010.

CAMPOS, S.G.P.; GONÇALVES,B.F.; SCARANO, W.R.; GÓES, R.M., TABOGA, S.R. Phenotypic and metabolic aspects of prostatic epithelial cells in aged gerbils after antisteroidal therapy: Turnover in the state of chromatincondensation and androgen-independent cell replacement. **Acta Histochemica**, p.1-10, 2014.

CAMPOS, S.G.P.; GONÇALVES,B.F.; SCARANO, W.R.; RIBEIRO, D.L.; GÓES, R.M., TABOGA, S.R. Prostatic stromal cells of old gerbils respond to steroidal

blockades creating a microenvironment similar to reactive stroma. **Biomedicine & Aging Pathology**, v.1, p.97–106, 2011.

CARDOSO, A.P.; PINTO, M.L.; PINTO, A.T.; PINTO, M.T.; MONTEIRO, C.; OLIVEIRA, M.I.; SANTOS, S.G.; RELVAS, J.B.; SERUCA, R.; MANTOVANI, A.; MARREL, M.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.J. Matrix metalloproteases as maestros for the dual role of LPS- and IL-10-stimulated macrophages in cancer cell behaviour. **Bmc cancer**, p. 1-14, 2015.

CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. **Tissue Cell**, v.29, p. 163–170, 1997.

CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. The elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchidectomy. **Prostate**, v.32, p.27–34, 1996.

CHAWLA, A. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. **Circulation Research**, v. 106, p.1559-1569, 2010.

COHEN, P.E.; ZHU, L.; POLLARD, J.W. Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmp/csfmp) mice disrupts estrous cycles and ovulation. **Biology of Reproduction**, v. 56, p.110–118, 1997.

COLLETA, S.J.; ANTONIASSI, J.Q.; ZANATELLI, M.; SANTOS, F.C.A.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Acute exposure to bisphenol A and cadmium causes changes in the morphology of gerbil ventral prostates and promotes alterations in androgen-dependent proliferation and cell death. **Environmental Toxicology**, v. 32, p. 48-61, 2015.

CORDEIRO, R.S.; SCARANO, W.R.; CAMPOS, S.G.P.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. **Micron**, v.39, p.1312–1324, 2008.

CORRADI, L.S.; GÓES, R.M.; CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. Inhibition of 5- α -reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. **Differentiation**, v. 72, p.198–208, 2004.

CORRADI, L.S.; JESUS, M.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; GÓES, R.M.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. **Journal of Cellular and Molecular Medicine (in press)**, 2013.

COUSSENS, L.M.; ZITVOGE, L.; PALUCKA, A.K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? **Science**, v. 339, p. 286-291, 2013.

CUNHA, G.R.; BIGSBY, R.M.; COOKE, P. S.; SUGIMURA, Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell differentiation**, v.17, p. 137-148, 1985.

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

CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P.C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y.Z.; DONJACOUR, A.A.; KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 92, p. 221–236, 2004.

CUNHA, G.R.; WANG, Y.Z.; HAYWARD, S.W.; RISBRIDGER, G.P. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, p.285-296, 2001.

DAHL, E.; KJAERHEIM, A. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat. II. The postcastration involution of the ventral, lateral and dorsal prostate. **Acta endocrinologica**, v. 144, p. 167–178, 1973.

DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; EPSTEIN, J.I.; COFFEY, D.S. Prostate Stem Cell Compartments: expression of the Cell Cycle Inhibitor p27Kip1 in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Cells. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p.911-919, 1998.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, 1988.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF β , PGE $_2$, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 890-898, 1998.

FANG, L.Y.; IZUMI, K.;LAI, K.P; LIANG, L.; LI, L.; MIYAMOTO, H.; LIN,W.; CHANG, C. Infiltrating Macrophages Promote Prostate Tumorigenesis via Modulating Androgen Receptor-Mediated CCL4–STAT3 Signaling. **Cancer Research**, v.73, n.18, 2013.

FELISBINO, S.L.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. Epithelial-stromal transition of MMP-7 immunolocalization in the rat ventral prostate following bilateral orchiectomy. **Cell Biology International**, v.31, p. 1173-1178, 2007.

FOCHI, R.A.; PEREZ, A.P.S.; BIANCHI, C.V.; ROCHEL, S.S.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R.; SANTOS, F.C.A. Hormonal oscilations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). **Biology of Reproduction**, v.79, p.1084-1091, 2008.

FOCHI, R.A.; SANTOS, F.C.A.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Progesterone as a morphological regulatory factor of the male and female gerbil prostate. **International journal of Experimental Pathology**, v.94, p.373–386, 2013.

GALBRAITH, S.M. & DUCHESNE, G.M. Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. **European Journal of Cancer**, v. 33, p.545–554, 1997.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes macrophages and dendritic cells. **Science**, v.327, 2010.

GÓES, R.M.; ZANETONI, C.; TOMIOSSO, T.C.; RIBEIRO, D.L.; TABOGA, S.R. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. **Micron**, v. 38, p.231–236, 2007.

GOFFIN, V.; HOANG, D.T.; BOGORAD, R.L.; NEVALAINEN, M.T. Prolactin regulation of the prostate gland: a female player in a male game. **Nature Reviews Urology**, v.8, p. 597-607, 2015.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p. 23-35, 2003.

GORDON, S. Phagocytosis: An immunobiologic process. **Immunity Review**, v.44, p.463-475, 2016.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v.5, 2005.

GREEN, S.M.; MOSTAGHEL, E.A.; NELSON, O.S. Androgen action and metabolism in prostate câncer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 360, p. 3–13, 2012.

HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; HAUGHNEY, P.C.; CUNHA, A.R.; FOSTER, B.A.; DAHIYA, R.; PRINS, G.S.; CUNHA, G.R. Stromal development in ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. **Acta Anatomica**, v. 155, p.94-103, 1996 (a).

HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; HAUGHNEY, P.C.; CUNHA, A.R.; FOSTER, B.A.; DAHIYA, R.; PRINS, G.S.; CUNHA, G.R. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. **Acta Anatomica**, v.155, p.81-93, 1996 (b).

HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A.; CUNHA, G.R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **British Journal of Urology**, v. 79, p.18-26, 1997.

HELMINEN, H.J.; ERICSSON, J.L.E. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 36, p.708–724, 1971.

HELMINEN, H.J.; ERICSSON, J.L.E. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Evidence for focal irreversible damage to epithelium, and heterophagic digestion in macrophages. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 39, p.443–455, 1972.

HERRERA-COVARRUBIAS, D.; CORIA-AVILA, G.A.; XICOTÉNCATL, P.C.; FERNÁNDEZ-POMARES, C.; MANZO, J.; ARANDA-ABREU, G.E.; HERNÁNDEZ, M.E. Long-term administration of prolactin or testosterone induced similar precancerous prostate lesions in rats. **Experimental Oncology**, v.37, p.13-18, 2015.

HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. **Prostate**, v.52, p.213-235, 2002.

HUSMANN, D.A.; WILSON, C.M.; MCPHAUL, M.J.; TILLEY, W.D.; WILSON, J.D. Anti-peptide antibodies to two distinct regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the nuclei of target cells in the rat and human prostate. **Endocrinology**, v. 126, p. 2359-2368, 1990.

HUTTUNEN, E.; ROMPPANEN, T.; HELMINEN, H.J. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **Journal of Anatomy**, v.3, p.357-370, 1981.

ISAACS, J.T. Antagonistic effect of androgens on prostatic cell death. **Prostate**, p. 5545-557, 1984.

IZUMIYA, K.; NAKADA, T. Inhibitors of collagen synthesis and hypophysectomy: effects on androgen induced growth of ventral prostate in rats. **Archives of Andrology**, v.38, p.231–241, 1997.

JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; DELLA-COLETA, H.H.M.; TABOGA, S.R.; FELISBINO, S.L. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. **International Journal of Andrology**, 33, 696–708, 2010.

KOFOED, J.A.; TUMILASCI, O.R.; CURBELO, H.M.; FERNANDES LEMOS, S.M.; ARIAS, N.H.; HOUSSAY, A.B. Effect of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. **Prostate**, v.16, p.93–102, 1990.

KRUSLIN, B.; ULAMEC, M.; TOMAS, D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v.15, p.1-8, 2015.

KURITA, T.; WANG, Y.Z.; DONJACOUR, A.A.; ZHAO, C.; LYDON, J.P.; O'MALLEY, B.W.; ISAACS, J.T.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. **Cell death and differentiation**, v.8, p. 192-200, 2001.

KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. In: Odontogenesis. **Humana Press**, pp. 41–47, 2012.

KYPRIANOU, N. & ISAACS, J.T. Biological significance of measurable androgen levels in the rat ventral prostate following castration. **The Prostate**, v. 10, p. 313-324, 1987.

KWONG, J.; CHOI, H.L.; HUANG, Y.; CHAN, F.L. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. **Cell Tissue Research**, v.298, p. 123-136, 1999.

LABRIE, F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. **Nature Reviews Urology**, v. 8, p. 73–80, 2011.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; BÉLANGER, A.; LIN, S.X.; SIMARD, J.; PELLETIER, G.; LABRIE, C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? **Journal of Endocrinology**, p.169–196, 2005.

LAWRY, J. Detection of apoptosis by the TUNEL assay. **Methods in Molecular Medicine**, v.88, p. 183-190, 2004.

MALIK,R.; KHAN, A.P.; ASANGANI, I.A.; CIESLIK.M.; PRENSNER, J.R.; WANG, X.; IYER, M.K.; JIANG, X.; BORKIN, D.; ESCARA-WILKE,J.; STENDER, R.; WU, Y.M.; NIKNAFS, Y.S.; JING, X.; QIAO, Y.; PALANISAMY, N.; KUNJU, L.P.; KRISHNAMURTHY, P.M.; YOCUM, A.K.; MELLACHERUVU, D.; NESVIZHSKII, A.I.; CAO, X.; DHANASEKARAN, S.M.; FENG, F.Y.; GREMBECKA, J.; CIERPICKI, T.; CHINNAIYAN, A.M. Targeting the MLL complex in castration-resistant prostate cancer. **Nature Medicine**, p. 1-11, 2015.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, p. 435-445, 2015.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **TRENDS in Immunology**, v.25 n.12, 2004.

MARTINEZ, F.O. & GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, p. 1-13, 2014.

MCPHERSON, S.J.; ELLEM, S.J.; SIMPSON, E.R.; PATCHEV, V.; FRITZEMEIER, K.H.; RISBRIDGER, G.P. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. **Endocrinology**, v. 148, n.2, p.566-574, 2007.

MENG, M.V.; GROSSFELD, G.D.; SADETSKY, N.; MEHTA, S.S.; LUBECK, D.P.; CARROLL, P.R. Contemporary patterns of androgen deprivation therapy use for newly diagnosed prostate cancer. **Urology**, p.7-11, 2002.

MONTICO, F.; HETZL, A.C.; CÂNDIDO, E.M.; CAGNON, V. H. A. Angiogenic and tissue remodeling factors in the prostate of elderly rats submitted to hormonal replacement. **The anatomical record**, v. 296, p. 1758-1767, 2013.

MÜNTZING, J. Androgen and collagen as growth regulators of the rat ventral prostate. **Prostate**, v.1, p.71–78, 1981.

MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p. 723-737, 2011.

OLIVEIRA, S.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; CORRADI, L.S.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. **Cell Biology International**, v. 31, p. 235-245, 2007.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Editora Artmed, Porto Alegre, 2011. 588p.

PEGORIM DE CAMPOS, S.G.; ZANETONI, C.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **The Anatomical Record**, v. 288, p. 723-733, 2006.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **National Cancer Institute Monograph**, v.12, p.1-27, 1963.

PRINS, G.S. & BIRCH, L. Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. **Endocrinology**, v. 132, p. 169-178, 1993.

PRINS, G.S. & BIRCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. **Endocrinology**, v. 129, p. 3187-3199, 1991.

QI, J.; FAN, L.; HUSSAIN, A. Implications of ubiquitin ligases in castration resistant prostate cancer. **Wolters Kluwer Health**, v.3, 2015.

RISBRIDGER, G.P.; ALMAHBOBI, G.A.; TAYLOR, R.A. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. **Cell and Tissue Research**, v.322, p.173-181, 2005.

ROCHEL, S.S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Lobe identity in the Mongolian Gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **The Anatomical Record**, v.290, p.1233-1247, 2007.

ROCHEL-MAIA, S.S.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; FELISBINO, S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. MMP-2 and TIMP-2 in the prostates of male and female mongolian gerbils: effects of hormonal manipulation. **Histology and Histopathology**, v.26, p. 1423-1434, 2011.

RUMPOLD, H.; UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 1001-1004, 2002.

SANCHES, B.D.A.; BIANCARDI, M.F.; SANTOS, F.C.A.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Budding Process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in mongolian gerbil. **Microscopy research and technique**, v. 77, p. 458-466, 2014.

SANCHES, B.D.A.; MALDARINE, J.S.; ZANI, B.C.; BIANCARDI, M.F.; SANTOS, F.C.A.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. The expression of the androgen receptor and estrogen receptor 1 is related to sex dimorphism in the

gerbil prostate development. **The anatomical record**, v. 299, p.1130–1139, 2016.

SANTOS, F.C.A.; FALLEIROS-JR, L. R.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. **Cell and Tissue Research**, v.328, p.617-624, 2007.

SANTOS, F.C.A.; ROCHEL-MAIA, S.S.; FOCHI, R.A.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; SANTOS, S.A.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; FELISBINO, S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. MMP-2 and MMP-9 localization and activity in the female prostate during estrous cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v.173, p. 419-427, 2011.

SANTOS, F.C.A.; TABOGA, S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Animal Reproduction**, v.3, p.3-18, 2006.

SHAN, L.; RODRIGUEZ, M.; Rodriguez, M.; JANNE, O. Regulation of androgen receptor protein and mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. **Molecular Endocrinology**, v. 4, p.1636-1646, 1990.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M. G.; BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v.18, p.349–355, 2008.

STEFATER, J. A.; REN, S.; LANG, R. A.; DUFFIELD, J. S. Metchnikoff's policemen:macrophages in development,homeostasis and regeneration. **Trends in Molecular Medicine**, v.17, n.12, p. 743-752, 2011.

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

SUNG, S.Y. & CHUNG, W. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. **Differentiation**, v.70, p. 506-521, 2002.

TAPLIN, M.E. & BALK, S.P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.91, p. 483–490, 2004.

TERRY, D.E.; CLARK, A.F. Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 653–658, 1996. (b)

TERRY, D.E.; CLARK, A.F. Influence of testosterone on chondroitin sulphate proteoglycan in the rat prostate. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 645–651, 1996. (a)

TIMMS, B.G.; MOHS, T.J.; DIDIO, J.A. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **The Journal of Urology**, v.151, p.1427–1432, 1994.

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

VARIN, A. & GORDON, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. **Immunobiology**, v.214, p. 630–641, 2009.

VILAMAIOR, P.S.L.; FELISBINO, S.R.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for the smooth muscle cells. **Prostate**, v.45, p.253–8, 2000.

VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. **Cell biology international**, v.29, p. 809-816, 2005.

VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical Record**, v.288, p. 885-892, 2006.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v.12, p.131-155, 1978.

WILSON, M. J. Effect of castration on metalloprotease activities in the lateral, dorsal and anterior lobes of the rat prostate. **Archives of andrology**, v.35, p.119-125, 1995 (b).

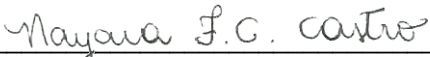
WILSON, M.J. Proteases in prostate development, function, and pathology. **Microscopy Research and Technique**, v. 30, p. 305-318, 1995 (a).

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v.496, p. 445-455, 2013.

YOON, F.H.; GARDNER, S.L.; DANJOUX, C.; MORTON, G.; CHEUNG, P.; CHOO, R. Testosterone recovery after prolonged androgen suppression in patients with prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 180, p.1438-1444, 2008.

ZONG, Y. & GOLDSTEIN, A.S. Adaptation or selection—mechanisms of castration-resistant prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v.10, p. 90–98, 2013.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 03/03/2017.


Nayara Fernanda da Costa Castro

Anexo 1. Certificado emitido pelo Comitê de ética, para realização do presente estudo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

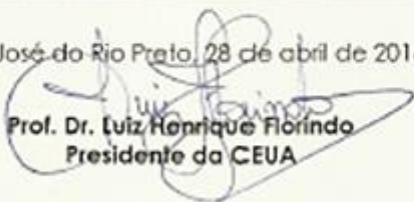
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto/disciplina de pesquisa intitulado **"Aspectos celulares da remodelação tecidual da próstata de gerbilos frente à orquiectomia"**, protocolo nº. 123/2015 - CEUA, sob a responsabilidade da Professora Doutora Patrícia Simone Leite Vilamaior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS [CEUA], do IBILCE/UNESP, em reunião de 01 de outubro de 2015.

Vigência do Projeto	01 de outubro de 2015 a 28 de fevereiro de 2017
Espécie/linhagem	Gerbilo da Mongólia (<i>Meriones unguiculatus</i>)
Nº de animais	40 (quarenta)
Peso/idade	70 gramas 90 dias
Sexo	40 machos
Origem	Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 28 de abril de 2016.



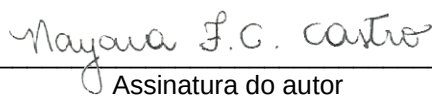
Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Rua Cristóvão Colombo, 226G - Jardim Nazareth - CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil
 Tel: (17) 3221-2420 / 3221-2563

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10/03/2017



Assinatura do autor