

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**MÔNICA SOUSA CAMPOS**

**Efeitos da exposição prolongada ao bisfenol-A sobre a próstata de gerbilos adultos**

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Alcântara

## **MÔNICA SOUSA CAMPOS**

### **Efeitos da exposição prolongada ao bisfenol-A sobre a próstata de gerbilos adultos**

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

#### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Professor titular

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Massumi Itoyama

Professora Assistente

UNESP- São José do Rio Preto

Prof. Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito

Professor Adjunto

Universidade Federal de Goiás- Goiânia

São José do Rio Preto, 26 de janeiro de 2014.

Campos, Mônica Sousa.

Efeitos da exposição prolongada ao bisfenol-A sobre a próstata de gerbilos adultos / Mônica Sousa Campos. -- São José do Rio Preto, 2014

82 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

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

1. Biologia. 2. Gerbilos. 3. Próstata. 4. Bisfenol A.  
5. Andrógenos – Receptores. 6. Estrógenos - Receptores. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.  
III. Título.

CDU – 591.463.4

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

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Sebastião Roberto Taboga pela oportunidade que me foi oferecida, por ter acreditado no meu trabalho e, sobretudo pelo seu auxílio e confiança.

A minha co-orientadora Fernanda Cristina Alcântara por toda a sua dedicação, paciência e que me proporcionou dar os primeiros passos na pesquisa, por confiar no meu trabalho tornando possível a minha realização profissional.

Ao grande amigo Manoel Francisco Biancardi, pelos ensinamentos e dedicação durante os primeiros ensinamentos no laboratório até a etapa final da dissertação. Com certeza contribuiu diretamente para o meu crescimento e o gosto pela pesquisa.

A professora Mara Rúbia Marques pela receptividade na procura de um novo estágio e que me abriu as portas para novas possibilidades.

Ao departamento de Morfologia da Universidade Federal de Goiás pelo apoio técnico e que possibilitou que parte da realização da dissertação fosse feita em seus laboratórios.

Ao meu noivo Dorismar Sobrinho Pimentel que além de um grande amigo, fez parte de todos os meus planos e nas lutas diárias, me proporcionou sentir amada e sempre deu motivos para acreditar na sua admiração.

A toda a minha família que sempre esteve junto diante de todas as situações em especial meus pais João e Joana e as minhas irmãs Maria, Zildete, Águida, Olga

e meu irmão Roberto que sempre me apoiaram e sempre fizeram os meus dias melhores.

A minha sogra Maria que esteve presente com suas orações diárias e que sempre me colocava em suas intenções e amor fraterno.

Aos tios, primos e meus avós que mesmo distante participaram da realização desse grande sonho.

Aos companheiros de laboratório Rodrigo, Andrés, Marcos, Thelma, André, Liana, Túlio, Wendson, Fábio, Thelma que sempre estiveram dispostos a ajudar e compartilhar momentos agradáveis e de grande amizade.

Aos amigos Tiago, Elaine, Jane, Christina, Kelciane, Raquel, Évilla, Rosália, Lourdes, Rodrigo, Thelma, Martha e Vitória pela amizade e respeito que têm me proporcionado e que contribuiu diretamente para o meu crescimento.

Ao colega e técnico do Laboratório Luís Roberto Falleiros pela sua enorme disponibilidade em ajudar e servir, contagiando o local de trabalho com sua positividade e alto astral.

Aos professores da banca de mestrado a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Massumi Itoyama, Prof. Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito, Prof. Dr. Ricardo Fochi e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvana Pegorin de Campos, por todo trabalho e dedicação destinado à correção dessa dissertação.

À CAPES pelo incentivo através da bolsa e auxílios à pesquisa.

À seção de Pós-graduação e o Programa de Pós-graduação em Biologia Animal que me proporcionou realizar essa dissertação de mestrado.

Em especial ao meu melhor amigo e confidente em todas as horas, Deus, que pela sua intercessão sempre me guiou nas minhas escolhas e decisões, e nos momentos de dor e alegria me proporcionou amor e fraternidade. Só tenho a agradecer e retribuir seguindo os seus ensinamentos e participando ativamente dos seus preceitos.

E a todos aqueles que participaram de alguma forma nas minhas decisões deixo aqui a minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
INTRODUÇÃO	
1. Aspectos do desenvolvimento prostático.....	11
2. Morfofisiologia da próstata masculina e feminina.....	15
3. Características gerais dos disruptores endócrinos.....	17
OBJETIVO .....	21
CAPÍTULO I	
<i>Early life exposure to bisphenol-A induces ER<math>\alpha</math> activation an hyperplasia in adult gerbil female prostate .....</i>	22
CAPÍTULO II	
<i>Exposição prolongada ao bisfenol-A causa alterações morfológicas na próstata ventral de gebilos machos adultos.....</i>	49
CONCLUSÕES GERAIS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

## RESUMO

A próstata não é uma glândula exclusiva do sistema reprodutor masculino sendo encontrada em diversas fêmeas de mamíferos, incluindo humanos e roedores. A fisiologia prostática é regulada por hormônios esteroides, principalmente por andrógenos e estrógenos, os quais são essenciais durante a diferenciação, crescimento e manutenção da atividade secretora da glândula. No entanto, sensíveis interferências podem predispor a glândula a desenvolver lesões ao longo da vida. A proposta desse trabalho foi avaliar a próstata de fêmeas e machos de gerbilos adultos, expostos ao disruptor endócrino Bisfenol-A (BPA) associado à testosterona durante a puberdade até a fase adulta. Para isso, machos e fêmeas com um mês de idade receberam diariamente água com bisfenol-A nas concentrações de 40µg/kg/dia e 4000 µg/kg/dia. A droga foi diluída na água e os animais foram tratados até completarem quatro meses de idade. Aos três meses e sete dias os animais dos grupos expostos ao BPA e andrógenos receberam doses subcutâneas de cipionato de testosterona (1 mg/kg/dia) diluído em óleo mineral por um período de 21 dias. As próstatas foram coletadas para análise estruturais, citoquímicas e imunohistoquímicas. Os resultados mostraram que as próstatas de machos e fêmeas dos grupos tratados com BPA apresentaram alta taxa de proliferação celular, focos inflamatórios e crescimento hiperplásico. Nas fêmeas ocorreu uma maior ativação do receptor estrogênico alpha (ER $\alpha$ ), enquanto nos machos uma maior imunomarcagem do receptor androgênico (AR). Deste modo, pode-se concluir que a exposição ao BPA, mesmo a níveis ambientais, causa alterações morfofisiológicas na próstata de gerbilos machos e fêmeas. Esses aspectos são de grande interesse visto que é cada vez maior o número de substâncias químicas relatadas na literatura



capazes de alterar e predispor a glândula prostática a desenvolver patologias na vida adulta e senil.

**PALAVRAS CHAVE:** próstata ventral, Bisfenol-A, gerbilo, receptor de estrógeno alfa, receptor de andrógeno.

## ABSTRACT

The prostate is not an exclusive gland of male reproductive system, being found in several females of other mammals, including rodents and humans. The prostatic physiology is regulated by steroids hormones, mainly by androgens and estrogens, which are essential during the differentiation, growing and maintenance of the gland secretory activity. However, sensible interferences may predispose this gland to developing lesions throughout the life. Thus, the propose of this work was to evaluate the prostate of adult male and female gerbils that were exposed to the endocrine disruptor bisphenol-A (BPA) and also associated with testosterone from puberty to adult phase. To this, male and female with one month old received water with BPA (40µg/kg/day and 400 µg/kg/day) daily. The drug was diluted in water and the animals were treated until the fourth month of age. With three months and seven days the animals of some experimental groups exposed to BPA received subcutaneous injections of cypionate testosterone (1 mg/Kg/day) diluted in mineral oil during 21 days. Then, the prostates were collected for structural, cytochemical and immunohistochemical analysis. The results showed that the prostates of males and females of BPA-exposed groups had higher values of cell proliferating, inflammatory foci and hyperplasic growing. In the female it was observed a higher estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) activation, whereas in males we noted a higher immunomarking for androgen receptor (AR). Thus, the results have shown that the exposure to BPA, even in environmental dosages, promotes morphophysiological changes in both male and female gerbil prostate. These aspects are of great concern since it has been growing the number of chemical substances reported in literature

that have potential to alter and predispose the prostate gland to developing diseases in adult and senile life.

**KEYWORDS:** ventral prostate, bisphenol-A, gerbil, estrogen receptor alpha, androgen receptor.

# INTRODUÇÃO

## 1-Aspectos do desenvolvimento prostático

O desenvolvimento prostático é um processo complexo que envolve coordenação de múltiplas vias sinalizadoras incluindo fatores endócrinos, parácrinos, autócrinos e fatores de transcrição. É um processo contínuo, e o completo desenvolvimento pode ser categorizado em cinco estádios distintos que envolvem determinação, iniciação e brotamento, morfogênese de ramificação, diferenciação e maturação. Esse processo tem início durante a vida pré-natal e se estende após o nascimento (Prins et al., 2008).

Em todas as espécies de mamíferos, a glândula prostática se desenvolve a partir da endoderme do seio urogenital (UGS), uma estrutura derivada do intestino primitivo e que termina na cloaca (Cunha et al., 2004). O UGS é uma estrutura embrionária indiferenciada, formada por um componente epitelial (UGE) e outro mesenquimal (UGM). Essa estrutura é encontrada tanto em machos quanto em fêmeas de mamíferos em um estágio indiferenciado, aproximadamente no 13º dia embrionário (7 semanas de gestação em humanos) (Wilhelm e Koopman, 2006), sendo o ambiente hormonal em que estas estruturas se encontram um dos fatores determinantes para a formação dos órgãos reprodutivos característicos de cada sexo.

Diferentemente da maioria das glândulas sexuais acessórias dos machos, que se desenvolvem a partir dos ductos de Wolffian (tecido mesodérmico), a próstata tem uma herança endodérmica, pois se origina a partir do UGE, que representa uma porção de tecido epitelial do UGS (Prins e Putz, 2008). O tecido

mesenquimal (UGM) que envolve o epitélio do UGS é formado por três zonas distintas. A mais adjacente ao UGE é chamada de mesênquima periuretral e permanece como tecido mesenquimal durante os estágios pré-natais do desenvolvimento. Paralela a este mesênquima periuretral situa-se outra zona que, durante os estágios embrionários, se diferenciará em musculatura lisa. Por fim, a terceira zona do UGM é denominada de pé mesenquimal ventral (VMP), sendo formada por uma camada de mesênquima condensado adjacente à zona mesenquimal que originará a musculatura lisa uretral (Thomson et al., 2002).

O seio urogenital é morfologicamente indistinguível em fêmeas e machos até o 17<sup>o</sup> dia de gestação em camundongos e até 10-12<sup>o</sup> semana em seres humanos. A partir desse período inicia-se a morfogênese prostática, processo dependente de andrógenos produzidos pelos testículos fetais. Em machos, o evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos do epitélio do seio urogenital (UGE) em direção ao mesênquima circundante (UGM). O processo da morfogênese de ramificação em roedores dará origem a três lobos distintos: o lobo ventral, o lobo dorsolateral e a glândula coaguladora ou lobo anterior (Marker et al., 2005). Simultaneamente ao processo de morfogênese de ramificação ductal, ocorre a citodiferenciação epitelial, estromal e a formação do lúmen, que é iniciada a partir de cordões sólidos de células epiteliais da uretra terminal (Wang et al., 2001). O epitélio é reorganizado em dois tipos celulares: as células epiteliais basais, que se localizam ao longo da membrana basal e formam uma camada descontínua de células, e as células luminiais altas, que se diferenciam e se alinham no ducto luminal (Hayward et al., 1996).

O desenvolvimento prostático depende de hormônios esteroides, dessa forma, os andrógenos são necessários para continuar o seu crescimento embrionário e neonatal e posteriormente iniciar a atividade secretória prostática durante a puberdade. A ação androgênica não é exercida diretamente sobre as células epiteliais, e esse processo depende não somente de andrógenos, mas de uma sinalização regulada entre a população celular epitelial e mesenquimal (Cunha et al., 2004). Nesse sentido, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática. Dentre os fatores parácrinos que atuam sobre a morfogênese prostática, pode-se citar os fatores de transcrição da família homeobox NKx3.1, Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13, Wnt 2, Wnt 5a, Shh, dentre outros (Fig.1) (Prins e Putz, 2008). Esses genes são expressos por todas as estruturas em ramificação e há diferença tanto espacial quanto temporal dessas combinações. Em conjunto, esses fatores apresentam papel crítico no direcionamento da expansão e ramificação dos brotos prostáticos.

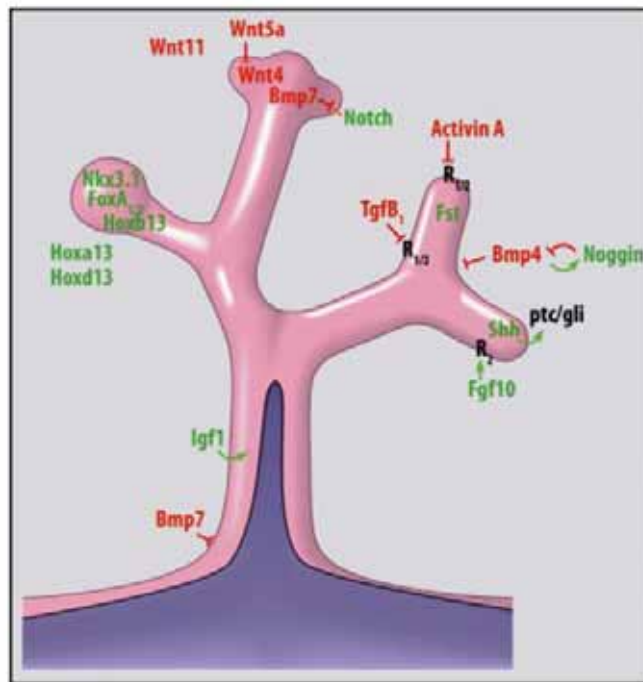


Figura 1. Representação esquemática do alongamento e ramificação dos ductos prostáticos, demonstrando a localização de múltiplos fatores de transcrição e seus respectivos receptores para formar o código morfogênético da próstata. Fatores em verde denotam moléculas estimulatórias, enquanto fatores em vermelho representam moléculas inibitórias. Setas demonstram vias estimulatórias parácrinas que emanam do epitélio ou mesênquima em direção à morfogênese de secreção. A barra em T denota inibição como uma função da morfogênese de secreção (segundo Prins et al., 2008).

Além do receptor androgênico (AR), outros receptores nucleares, como o receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) e o receptor de estrógeno beta ( $ER\beta$ ), são determinantes para o desenvolvimento da próstata. Esses receptores passam a ser expressos em locais e momentos específicos durante a organogênese prostática e durante o crescimento, maturação e manutenção da atividade secretora da glândula. Enquanto que o  $ER\alpha$  é expresso predominantemente no mesênquima, durante estágios iniciais do desenvolvimento, o  $ER\beta$  tem sua expressão localizada no epitélio durante as fases de diferenciação das células epiteliais prostáticas (Prins e Putz, 2008).

O crescimento e desenvolvimento da próstata se estendem até que a maturidade sexual seja atingida, e a manutenção de sua homeostase no indivíduo adulto é garantida por hormônios esteroides como a testosterona (Cunha et al., 1986; Marker et al., 2003). Os efeitos androgênicos em células alvo resultam da interação do hormônio com o AR presentes nestas células (Cunha et al., 1986).

## **2- Morfofisiologia da próstata masculina e feminina**

O termo próstata tem sua origem na palavra grega 'prohistani', usada em 335 a.c. por Herophilus da Alexandria e que significa 'estar em frente a', se referindo a sua localização frontal em relação bexiga urinária (Kirby et al., 1996). A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino que juntamente com a vesícula seminal contribui para a produção de nutrientes do fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e pH adequado desta secreção (Untergasser et al., 2005).

A próstata humana masculina apresenta estrutura compacta, diferentemente de roedores que apresenta lobos distintos. É dividida em três zonas: periférica, central e de transição. Estas zonas têm diferentes origens embrionárias e podem ser distinguidas através de análises histológicas, posição anatômica, funções biológicas e susceptibilidade a doenças prostáticas (Lee et al., 2011). Já em roedores, a próstata é dividida em lobos ventral, lateral e dorsal, além da glândula coaguladora (Timms, 2008).



No roedor gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), a próstata apresenta uma pequena diferença em termos de classificação dos lobos (ventral, dorsolateral, dorsal e glândula coaguladora) que, em termos gerais, são muito semelhantes aos de outros roedores (Rochel et al., 2007). Esses lobos estão distribuídos ao redor da bexiga e apresentam características de ramificação e produção de secreções distintas (Sugimura et al., 1986).

A próstata não é uma glândula exclusiva do sistema reprodutor masculino, sendo encontrada em diversas fêmeas de mamíferos, incluindo humanos e roedores (Brambell e Davis, 1940). Há muitos estudos que demonstram a ocorrência de próstata em fêmeas de algumas espécies de roedores tais como *Meriones unguiculatus* (Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004) , *Lagostomus maximus maximus* (Flamini et al., 2002), *Mastomys Erythroleucus* ( Brambell et al., 1940) e *Rattus novergicus* (Vilamaior et al., 2005). No entanto, ainda não se conhece detalhadamente quais são os eventos que levam à formação da próstata em fêmeas de alguns roedores e em mulheres. Nesse sentido, estudos em humanos tem demonstrado que a próstata feminina tem importante papel no processo reprodutivo e no comportamento sexual (Zaviacic, 1999).

No que diz respeito à localização anatômica, em fêmeas de gerbilo a próstata é composta por um conjunto de glândulas, semelhante à próstata ventral do macho, e estão distribuídas em ambos os lados da uretra, posição anatomicamente denominada de parauretral (Santos et al., 2006).

Histologicamente a próstata de gerbilo é uma glândula túbulo-alveolar formada por duas porções distintas, a acinar e a estromal. A região acinar compreende o compartimento glandular responsável pela síntese e secreção do

conteúdo prostático, ao passo que o estroma está relacionado a diversas funções como manutenção da estrutura e sustentação do tecido prostático, contração glandular, nutrição, e sinalização de diversos processos fisiológicos essenciais para a homeostasia glandular. Os ácinos são revestidos, majoritariamente, por células epiteliais secretoras e por células basais, ao passo que o estroma é composto, principalmente, por células musculares lisas e fibroblastos (Santos et al., 2006).

Essas características a níveis estruturais são muito semelhantes à próstata humana. Dessa forma, similaridade encontrada entre a próstata de roedor e a humana favorecem situações experimentais e correlações entre o homem, devido a grande importância dessa glândula no sistema reprodutor. Portanto é de suma importância essa associação, e o gerbilo da Mongólia apresenta-se como um modelo diferencial para se estudar os efeitos da administração de substâncias exógenas sobre a próstata, pois os resultados servirão como ferramenta para o entendimento do surgimento de lesões ao longo da vida desses animais.

### **3- Características gerais dos disruptores endócrinos**

Disruptores endócrinos são substâncias químicas exógenas que alteram o sistema endócrino, de forma a afetar diretamente o metabolismo de hormônios no organismo. Essas substâncias atuam via receptores nucleares, receptores não esteroides, através de vias enzimáticas envolvidas na biossíntese de esteroides e em diversos outros mecanismos relacionados ao sistema endócrino e reprodutivo (Fig.2) (Coster e Larebeke, 2012).

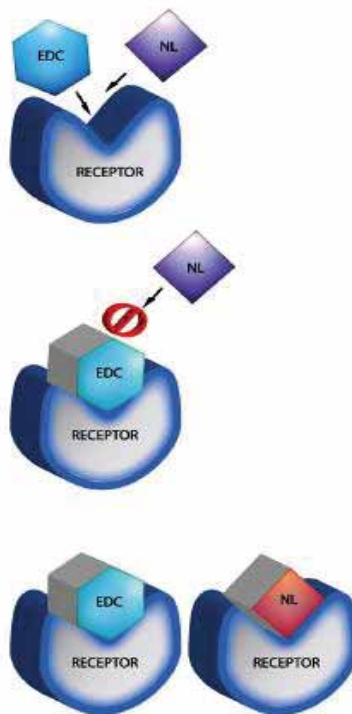


Figura 2. Representação de algumas interações dos disruptores endócrinos (EDCs) com hormônios naturais (NL). EDCs podem competir com os NLs através da ligação com um receptor hormonal (adaptado de Rogers et al., 2013).

Muitos destes disruptores endócrinos pertencem à classe dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos produzidos pelo homem. Atualmente são conhecidos uma infinidade de xenoestrógenos com ação de disruptor endócrino, como, por exemplo, o bisfenol-A (BPA), muito utilizado na fabricação de plásticos policarbonatos (Markey et al., 2005), o etinilestradiol utilizado nas pílulas contraceptivas (Timms et al., 2005), além de diversos compostos de pesticidas largamente utilizados na agricultura (Cooke et al., 2010). Dentre estes compostos, alguns se destacam pela sua ampla distribuição e pelos impactos que podem ter sobre a saúde dos seres humanos e também sobre o meio ambiente de forma geral.

Dentre estes, o BPA é uma das substâncias químicas de maior produção ao redor do mundo (Prins et al., 2008), sendo cada vez mais estudada, principalmente

pela sua ampla distribuição no ambiente e pelo seu potencial como disruptor endócrino. O BPA é um monômero (formado por dois anéis de fenol) muito utilizado na manufatura de plásticos policarbonatos. Como parte do polímero existente na grande maioria das embalagens plásticas, mamadeira de bebê, selantes dentais e resina que reveste a maioria das latas de conserva (Timms et al., 2005 ), o BPA pode ser facilmente liberado em solução em decorrência de repetidas lavagens, alterações de pH ou mesmo devido à um aumento de temperatura (Fig. 3) (Teilmann et al., 2002; Seta et al., 2006; Prins e Putz, 2008).

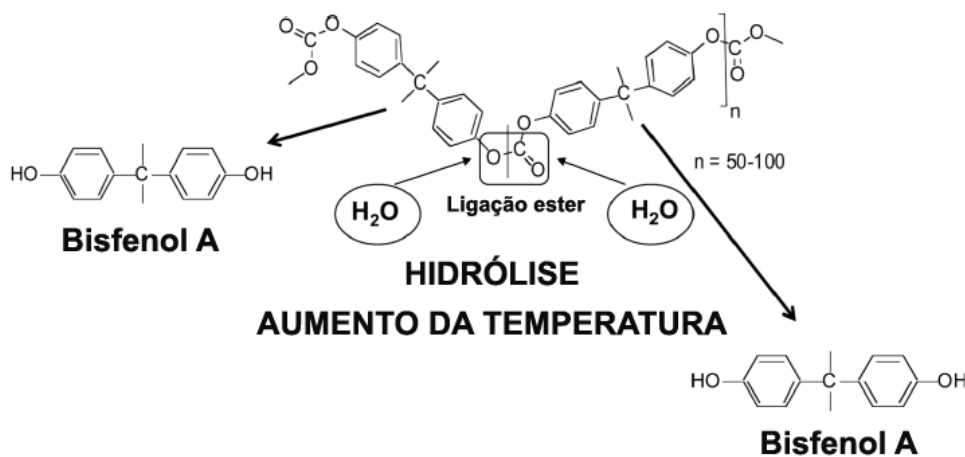


Figura 3. Representação de moléculas de policarbonato. O policarbonato é composto de moléculas de Bisfenol-A unidas pela ligação de ésteres. As ligações ésteres são suscetíveis à hidrólise quando expostas a altas temperaturas ou alterações de pH. Quando hidrolisado, o BPA é liberado no meio circundante (adaptado de Taylor et al., 2011).

O BPA tem sido estudado por exercer efeitos de disrupção endócrina na reprodução, desenvolvimento, metabolismo e câncer em humanos devido seu alto potencial estrogênico, o que chama a atenção de cientistas para esse fato (Rubin, 2011). Como a próstata é uma glândula altamente dependente de hormônios

esteroides como andrógenos e estrógenos, é de suma importância entender os mecanismos de ação dessa substância nesta glândula.

Por muitos anos a próstata tem sido um dos principais focos de pesquisa devido à importância clínica e a prevalência de doenças graves que afetam esse órgão. Devido a grande quantidade de receptores (ER) e (AR), tanto durante o desenvolvimento quanto na idade adulta e, obrigatoriamente dependente da sinalização androgênica, disruptores como BPA pode alterar essa sinalização e conseqüentemente interferir na atividade de diversas enzimas (Cooke et al., 2010; Mc Pherson et al., 2008).

Nesse contexto, estudos bioquímicos têm examinado a cinética do BPA com receptores de estrógeno (ER) e têm determinado que ele se liga tanto no ER $\alpha$  quanto ER $\beta$ , além de ser mais potente que o estradiol, hormônio da classe dos esteroides que têm importante papel durante a embriogênese e ao longo do desenvolvimento prostático (Gould et al., 1998; Lasnitzki e Mizuno, 1980). Esse mesmo disruptor em estudos recentes realizados em ratos adultos contribuiu para evidenciar que a exposição ao BPA influencia na expressão da enzima aromatase na próstata, conseqüentemente aumentando os níveis de estradiol local (Castro et al., 2013).

Exposições a disruptores estrogênicos resultam em um aumento na suscetibilidade da glândula prostática a desenvolver lesões neoplásicas com a idade, visto que os níveis aumentados de estradiol têm efeitos adversos e significantes neste órgão (Ellem e Risbridger, 2009; Prins e Putz, 2008).

Desta forma, é importante que se conheça os fatores que podem interferir na manutenção da homeostasia prostática durante a puberdade, favorecendo, desta

forma, o entendimento de alguns mecanismos que podem predispor esta glândula a desenvolver doenças durante a vida.

## **OBJETIVO**

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição ao bisfenol-A, desde a puberdade até o início da vida adulta, sobre a próstata de machos e fêmeas de gerbilos adultos (*Meriones Unguiculatus*), abordando os seguintes aspectos:

1-Avaliar a sensibilidade da glândula masculina e feminina ao disruptor endócrino BPA tanto em dose ambiental quanto em dose elevada.

2-Investigar como essa substância atua sobre a morfologia dos compartimentos prostáticos e dos seus respectivos tipos celulares.

3-Analisar o comportamento dos receptores nucleares AR e ER $\alpha$  nos compartimentos prostáticos mediante a exposição de BPA e andrógenos.

Para cumprir esses objetivos foram utilizados métodos morfológicos, citoquímicos e imunohistoquímicos. Os resultados dessa pesquisa foram divididos em dois artigos científicos, que estão apresentados nos próximos capítulos.

## **CAPÍTULO I**

Artigo: **Early life exposure to bisphenol-A induces ER $\alpha$  activation and hyperplasia in adult gerbil female prostate.**

## **Early life exposure to bisphenol-A induces ER $\alpha$ activation and hyperplasia in adult gerbil female prostate**

Mônica S. Campos<sup>1</sup>, André L. V. Galvão<sup>2</sup>, Daniel A. O. Rodríguez<sup>2</sup>, Manoel F. Biancardi<sup>3</sup>, Mara R. Marques<sup>2</sup>, Fernanda C. A. Santos<sup>2</sup>, Sebastião R. Taboga<sup>1,3</sup>

**Abridged title:** Female prostate disruption by bisphenol-A exposure

<sup>1</sup>*University Estadual Paulista – UNESP, Department of Biology, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054000, Brazil.*

<sup>2</sup>*Department of Morphology, Federal University of Goiás, Campus II Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.*

<sup>3</sup>*Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas, Av. Bertrand Russel s/n, Campinas, São Paulo, 13084864, Brazil.*

### **Corresponding author.**

Dr. Sebastião R. Taboga: *Department of Biology, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, São Paulo State University, 2265 Cristóvão Colombo Street, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, Brazil. E-mail address: [taboga@ibilce.unesp.br](mailto:taboga@ibilce.unesp.br). Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390.*



## ABSTRACT

The prostate physiology is highly dependent of estrogenic and androgenic homeostasis. Interferences in this equilibrium, especially in yearly periods of life, may disrupt the prostate and increase the susceptibility to the development of diseases with aging. Taking into account, and considering that there has been an increase of environmental chemicals with endocrine-disrupting potential such as the BPA, this study aimed evaluate the prostates of adult female gerbils exposed to BPA and BPA plus testosterone from pubertal to adult period. To this, we employed morphological, stereological, and immunohistochemical analyses. We found that long-term BPA exposure, even in environmental dosages, increases the proliferative status of the prostate, increases the number of ER $\alpha$ -positive stromal cells, and elicits the development of prostatic hyperplasic in adult female gerbils. Moreover, we also observed that the association with testosterone did not increase the proliferative status of the gland, which shows that low levels of BPA are enough to cause a estrogenic disruption of the prostate in yearly adult age. These evidences suggesting that this estrogenic endocrine disruptor has a potential of increasing the susceptibility to prostatic disorders with aging.

**Keywords:** female prostate, gerbil, bisphenol-A, endocrine-disrupting chemicals, estrogen receptor alpha.

## INTRODUCTION

Bisphenol-A is an endocrine disruptor largely used as a monomer for the production of polycarbonate which is employed in plastic baby bottles for babies, as component of epoxy resin in coating food cans and dental sealants [1, 2]. Its release from plastic occurs due some conditions as increased temperature, changes in pH, or due to repeated washings. Thus, BPA can be found in human plasma in high concentrations, besides being found both in the placenta and in fetal tissues [3, 4].

The extensive human exposure to BPA and its clinical potential has considerably attracted the attention of scientists, governments and the population in general. Several studies have reported adverse effects associated with exposure, even at low concentrations of BPA. Exposure of 50 µg/kg/day is the dose of daily intake acceptable and commonly considered "safe" by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the U.S. Environmental Protection Agency [5]. However, studies show that this chemical is a potential disruptor even at lower concentrations, because it is a toxic substance that elicits indirect effects on the tissues of the reproductive tract [6, 7].

The gerbil female prostate is similar to the ventral male prostate and presents a mature and differentiated glandular epithelium composed mainly of basal and secretory cells with high synthetic activity, showing paraurethral location [8, 9]. The prostate physiology is regulated by androgens, which is essential for the differentiation, prostate development, growth and maintenance of the secretory activity of the gland. Furthermore, prostate metabolism is influenced by other steroids, especially estrogens, which act by modulating the effects of androgens [10].

Studies with rodents showed that synthetic estrogens permanently disrupt prostatic growth and differentiation of the gland, resulting in injuries with aging [11, 12]. In this sense, recently published data suggest an important role for estrogen in prostate pathogenesis through multiple mechanisms, including genotoxicity, epigenotoxicidade, hiperprolactemia, chronic inflammation and events mediated by estrogen receptors [13].

In this context, biochemical studies have examined the kinetics of BPA with the estrogen receptors (ERs), and determined that it binds both with ER $\alpha$  and ER $\beta$  [14]. Recent evidences regarding these receptors in studies employing adult mice showed that BPA exposure affects the expression of the aromatase enzyme in the prostate, thereby increasing the levels of estradiol [15]. These interferences resulting from exposure to estrogenic disruptors increase susceptibility to neoplastic lesions, predisposing the gland to development diseases in adulthood [3].

Thus, our hypothesis is that the BPA has hazardous effects on the prostate increasing the susceptibility to the development of lesions during the life. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of long-term BPA exposure, from pubertal to adult life, on the prostate of female gerbils.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and experimental design**

The animals were provided by the Federal University of Goiás (UFG) (Goiânia-GO) maintained in polyethylene cages under controlled conditions of light and temperature, and provided with filtered water and rodent food *ad libitum*. Animal

handling and experiments were performed according to the ethical guidelines of the Federal University of Goiás (UFG) (ethical committee number 052/11 CEP) and in keeping with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (The National Academies Press, 2011, Washington, D.C., USA). During all experiments we provided filtered water in glass bottles to avoid exposing the animals to additional endocrine-disrupting chemicals such as bisphenol-A from plastic bottles.

In this experiment we used 25 females with one month of age. These animals were separated from their parents after weaning (with 30 days) and divided into five groups: Control (C) - 5 females were maintained under standard conditions until they reach 4 months of age; Low Bisphenol-A (LBPA) - 5 females received water with BPA at a concentration of 40 µg/kg/day until 4 months of age; Low Bisphenol-A plus testosterone ( LBPA + T ) - 5 females received water with BPA at a concentration of 40 µg/kg/day up to 4 months of age. At three months and 7 days, these animals were treated with subcutaneous injections of testosterone (1mg/kg ) diluted in 100 mL of mineral oil (nujol - Mantecorp ) once a week for 21 days; High bisphenol-A ( HBPA ) - 5 female received water with BPA at a concentration of 4 mg/kg/day until 4 months of age; High Bisphenol- A plus testosterone ( HBPA + T ) - 5 females received water with BPA at a concentration of 4 mg/kg/day up to 4 months of age. At three months and 7 days, these animals were treated with subcutaneous injections of testosterone (1 mg/kg) diluted in 100 mL of mineral oil (nujol - Mantecorp ) once a week for 21 days until 4 months of age, when they were killed. The average water consumption and weight of animals per cage were measured daily for the purpose of calculating the dilution of BPA in water.

All animals were killed by CO<sub>2</sub> inhalation followed by decapitation. Body and prostatic complex (PrC - urethra, vagina, and prostate structures) were weighed.

These fragments were dissected out using a Leica stereoscopic microscope (Leica, Germany) to remove adipose tissues and isolate the urethral segment plus the associated prostatic tissue.

### **Light microscopy**

PrC from female gerbils were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (buffered in 0.1 M phosphate, pH 7.2) or in methacarn (proportions: methanol 60%, chloroform 30% and acetic acid 10%) for three hours. After fixation, the tissue were washed in water, dehydrated in ethanol, clarified in xylene and embedded in paraffin (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany). All tissue fragments employed in this study were serially sectioned into 5  $\mu$ m slices with an automatic rotator microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). The sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for general morphological analysis. The specimens were analyzed with an Olympus BX60 light microscope (Olympus, Japan), and the images were digitalized using DP-BSW software v3.1 (Olympus, Japan) and a virtual slide system BX 61VS (Olympus, Tokyo, Japan).

### **Stereology**

The stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 130 points and 10 test lines [16] to compare the relative proportion (relative frequency) of each component of prostatic tissue (epithelium, lumen, muscle stroma and non-muscle stroma), as described by Huttunen [17]. We chose thirty microscopic fields at random from each experimental group (6 fields per animal;  $n =$

5). Briefly, we determined the relative values by counting the coincident points in the test grid and dividing them by the total number of points. Stereological analysis was performed using Image-Pro Plus software v6.1 for Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

## **Immunohistochemistry**

Tissue sections were subjected to immunohistochemistry for the detection of androgen receptor (AR), as described in protocols applied to the prostate [18], estrogen receptor-alpha (ER $\alpha$ ), and PCNA. Primary antibodies reactive to AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ER- $\alpha$  (rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology), and PCNA (mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were employed at a dilution of 1:100. Polymers (Post Primary Block and Polymer, Novocastra<sup>TM</sup>, RE7260-K, Newcastle Upon Tyne, UK; DAKO Envision<sup>tm</sup> + Dual link system-HRP, K4061; DAKO, North America, Inc., Carpinteria, California, USA) were used as secondary antibodies, according to the procedures described by the manufacturers. The sections were stained with diaminobenzidine and counterstained with Harris's hematoxylin. The histological sections were analyzed using an Olympus BX60 light microscope (Olympus, Japan).

## **ER $\alpha$ and PCNA quantification**

For ER $\alpha$  quantification, thirty microscopy fields (magnification of 400x) were used for each experimental group. In each field, the total number of positive stromal

cells was obtained as a relative frequency (%) in relation to the total number of negative stromal cells. Between positive and negative cells, we counted a mean of 5,300 stromal cells for each experimental group.

Regarding PCNA quantification, we employed thirty microscopy fields (magnification of 400x) for each experimental group. In each field, the total number of positive epithelial cells was obtained as a relative frequency (%) in relation to the total number of epithelial cells of the acini. The same was made for the positive stromal cells. Between positive and negative cells, we counted a mean of 4,000 epithelial cells and 2,000 stromal cells for each experimental group. All these analyses were performed using the image analysis system previously described.

### **Statistical analyses**

The hypothesis tests employed to determine statistical significance were the Kruskal-Wallis test for non-parametric distributions and ANOVA for parametric distributions. Further localization of the statistically significant differences between experimental groups was performed using Dunn's test for non-parametric distributions and Tukey's test for parametric distributions. The data were analyzed using Statistica 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) and BioEstat 5.0 (*free statistical program*) software. The level of significance was set at 5% ( $P \leq 0.05$ ). Values are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM).

## RESULTS

### Biometry

Biometric analysis of adult female gerbil indicated that there were no significant differences in body weight, prostatic complex and the relative weight of all groups presented (Table 1).

### Morphology and stereology

Analysis of prostate gerbil adult females demonstrated that BPA exposure caused morphological changes in epithelial and stromal compartments of the gland (Figure 1). The groups exposed to low environmental levels of BPA (LBPA: Fig. 1d, e, f and LBPA + T: Fig. 1g, h, i) and to high dosages (HBPA: Fig. 1j, k, l and HBPA + T: Fig. 1m, n, o) showed the same pattern of morphological changes, mainly characterized by intense epithelial development (Fig. 1e, h, k, n), epithelial and stromal hyperplasia (Fig. 1f, i, l, o) and inflammatory foci (Fig. 1e, l, n). However, these changes were more evident and constant in groups exposed to BPA and associated with the administration of androgens (LBPA + T and T + HBPA).

The prostatic epithelium, ranging from simple cuboidal to cylindrical in control animals (Fig. 1a- c) has become very proliferative and developed in all experimental groups (Fig. 1d -o). The most of prostatic hyperplastic alveolar assumed an appearance characterized by several areas of stratification (Fig. 1h, i, k, o). This epithelial growth was confirmed by stereological analysis, which showed that all



groups exposed to BPA had an increase from 2 to 2.3 times in the relative frequency of the epithelial compartment ( $p \leq 0.05$ , Table 1).

The BPA exposure also caused changes related to the increase of the stromal smooth muscle cells surrounding the alveoli, and inflammatory cells into the interalveolar stroma (Fig. 1 e, h, l, n). These changes were also confirmed by stereological analysis showing a significant increase in the relative frequency of the stromal compartment of all groups treated with BPA ( $p \leq 0.05$ , Table 1) .

## **Immunohistochemical analyses**

### **ER Alpha**

Immunostaining for ER $\alpha$  was detected in prostate stromal cells of the female gerbils (Fig. 2). The immunomarking become more numerous in all the groups submitted to treatment with BPA (Fig. 2d-n). By counting cells (Fig. 3), we detected that the treatment with BPA stimulated a significant increase in the frequency of ER $\alpha$ -positive cells in the stromal compartment of all analyzed females ( $p \leq 0.05$ ).

### **AR**

AR-positive cells were observed in epithelial and stromal compartments of the gerbil female prostate of all experimental groups (Fig. 2c, f, i, l, o). Apparently, the immunomarking for AR was similar in all groups, although it was more prominent in secretory epithelial cells. In the stroma, the immunomarking of this receptor occurred in fibroblasts and smooth muscle cells.

## **PCNA**

PCNA-positive cells were observed in all experimental groups (Fig. 4). However, these markings were more common in prostate glands of BPA-treated groups, especially in areas of hyperplasia and epithelial stratification (Fig. 4c and g). Employing PCNA quantification, the analysis showed a statistically significant increase of PCNA-positive cells in both epithelial and stromal compartments of all treated groups in comparison with control group (Fig. 5).

## **DISCUSSION**

This study demonstrated that long-term BPA exposure, even in environmental dosages, increases the proliferative index of the prostate, activates ER $\alpha$ , and favors the development of prostatic hyperplastic foci in adult female gerbils. These results, in a nutshell, demonstrate that the low levels of BPA are enough to cause an estrogenic interference on the prostate. Moreover, considering that the evidences of this study were obtained from adult gerbils, these data have shown that, even in yearly adult age, the BPA has a potential of increasing the susceptibility to prostatic disorders such as hyperplasia.

Recent studies have been shown the influence of estrogenic chemicals such as BPA on the reproductive organs [3, 19]. These studies demonstrated that estrogenic compounds such as BPA are involved with increasing of prostatic volume, urethral malformations, and increase of cell proliferation [19], besides being related with a high susceptibility to carcinogenesis [3].

Stereological analysis have shown a significant statistically increase of the epithelial compartment in all treated group, which was accompanied by luminal reduction. Although not significant statistically for all treated groups, in a general manner we observed an increase of the stromal compartment of all treated groups, characteristic more evident in HBPA group. These stereological data confirm a general increase of both epithelial and stromal compartments observed through the morphological analysis.

However, the most detachable finding of our study was the significant statistically increase of ER $\alpha$ -positive stromal cells in the prostate gland of all treated groups. These evidences clearly showed that the BPA, even in low dosages, has a estrogenic potential, which lead to an increase of stromal-positive cells in response to BPA influences. These evidences were clear when observing the histological slides, being confirmed by immunohistochemical quantification of the ER $\alpha$ -positive stromal cells.

Moreover, according to the quantification of the ER $\alpha$ -positive stromal cells, we did not observed any significant statistically difference between the treated groups, even when comparing BPA plus testosterone treated groups. Considering that part of the testosterone is aromatized in estradiol by the aromatase enzyme, we could expect a higher number of ER $\alpha$ -positive stromal cells in groups that received a supplementation with this androgen than in groups only exposed to BPA. Thus, these evidences suggest that the BPA, even in low dosages, are sufficient to saturate the ER $\alpha$  present in stromal cells.

Recent studies have been shown that both estrogen receptors subtypes (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) have opposing roles in the prostate [20, 21]. According to the literature, ER $\alpha$  are directly related with aberrant proliferation, inflammation, and as a

inducing of premalignant lesions [21]. On the other hand, ER $\beta$  is critical in regulating antiproliferative activity in the prostate [21], besides being involved in differentiation, extracellular matrix organization, and stromal-epithelial communication [20].

Besides all these aspects regarding estrogen receptors, it has long known that prostatic stromal cells are determinant for prostate epithelial physiology from yearly developmental periods to late phases during senescence [22, 23]. The main mechanisms of this physiology are mediated by mesenchymal-epithelial interactions, which drive the development of the gland and are directly responsible for the fate of the organ health [22, 23, 24]. Between these mesenchymal-epithelial interactions, the steroids receptors such as ERs and ARs play a fundamental role for the normal prostate morphogenesis [23, 25].

A literature review made by Cunha [26] reported the importance of stromal-epithelial interactions in the development of prostate lesions. According to the report, the presence of stromal cells expressing ER $\alpha$  are determinant for eliciting prostate carcinogenesis in mice treated with testosterone plus estradiol (T + E<sub>2</sub>), showing the critical influence of stromal microenvironment in benign versus malignant growth [26]. Although we did not observed the presence of malignant lesions in any treated group, the findings may be an indicator of a precursor status which may lead to a malignant condition with aging.

Thus, considering all these evidences, and based on our findings regarding ER $\alpha$ -positive stromal cells, we believe the BPA had a direct influence on the ER $\alpha$  of the stromal cells. Indeed, the increase of the proliferative index and the presence of several proliferative foci in the prostate of treated groups have shown that BPA exposure may disrupt prostate normal physiology and increase the susceptibility to the development of lesions.

Regarding proliferation analysis, we observed a significant statistically increase of the proliferative index in all treated group, as confirmed by quantification of PCNA-positive epithelial cells. These data are in accordance with the findings regarding morphological, stereological and ER $\alpha$  quantification. Since ER $\alpha$  is related with proliferation of the epithelial compartment, the increase of PCNA-positive epithelial cells complements the evidences showing the prostate of all treated groups are more proliferative.

The present study is the first study showing the effects of BPA exposure on the prostate of female rodents. Considering the concerning about the female prostate either in human or in rodents has been increasing lately [12, 27, 28, 29, 30], the present study opens new frontiers in researches approaching the effects of estrogenic chemicals on female prostate. However, although the present data have shown important evidences regarding the effects of BPA on the prostate of adult female gerbils, new studies are necessary to evaluate old animals subjected to the same treatments, since late ages are critical in terms of prostate pathophysiology.

Moreover, these findings show the importance of yearly periods of prostate development for the fate of the gland throughout the life. It has been increasing the number of the scientific literature showing the importance of yearly periods of the development and its association with the pathogenesis of prostatic diseases throughout the life [31, 32]. Considering the human beings are exposed to several EDCs, it is extremely important new studies of these substances in order to improve our knowledge underlying the mechanisms of action of these compounds.

## REFERENCES

- [1] Staples CA, Dom PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998; 36(10): 2149–173.
- [2] Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol A “safety”. *Am J Public Health* 2009; 99(3): S559–66.
- [3] Prins GS, Tang WL, Belmonte J, Ho SM. Perinatal Exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102:134-38.
- [4] Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110:703–7.
- [5] Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ.. The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biol Reprod* 2009; 81(5):807-13.
- [6] Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005; 72:1344–51.
- [7] Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006; 66(11):5624-32.
- [8] Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 2003; 35:447-57.
- [9] Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol Int* 2004; 28:335-44.

- [10] Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 2003; 253:165-74.
- [11] Prins GS. Neonatal estrogen exposure induces lobespecific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology* 1992; 130:3703–14.
- [12] Perez AP, Biancardi MF, Goes RM, dos Santos FA, Taboga SR. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. *Int J Exp Pathol* 2011; 92:121-30.
- [13] Nelles JL, Hu WY, Prins GS. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011; 6:437–51.
- [14] Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, McDonnell DP, Gaido KW. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 142:203–14.
- [15] Castro B, Sanchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 $\alpha$ - reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One* 2013; 8(2):55905.
- [16] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1978; 12:131-55.
- [17] Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat* 1981; 3:357-70.
- [18] Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 2008; 39(8):1312-24.
- [19] Timms BG, Kembra LH, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 61:200-8.

- [20] Morani A, Warner M, Gustafsson JÅ. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 2008; 264(2):128-42.
- [21] Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155:174–86.
- [22] Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 2008; 76:641-659.
- [23] Thomson, AA. Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis. *Differentiation* 2008; 76:587-98.
- [24] Cunha GR. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation* 2008; 76(6):578-86.
- [25] McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 2008; 76:660-70.
- [26] Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke W. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003; 107:1-10.
- [27] Biancardi MF, Perez APS, Góes RM, Santos FCA, Vilamaior PSL, Taboga SR. Prenatal testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil prostate. *Exp Biol Med* 2012; 237:1298-309.
- [28] Reis LO, Billis A, Ferreira FT, Ikari LY, Stellini RF, Ferreira U. Female urethral carcinoma: evidences to origin from Skene's glands. *Urol Oncol* 2011; 29(2):218-23.
- [29] Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod* 2006; 3: 3-18.
- [30] Zaviačič M. The Female Prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate. First ed. Bratislava, Slovakia: Slovak Academic Press; 1999.
- [31] Cunha GR, Ricke WA. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Differentiation* 2011; 82:168-72.



[32] Lee KL, Peehl DM. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004; 172:1784-91.

## LEGENDS

**Table 1.** <sup>1</sup>Body, female prostate and relative weight in C and BPA treated females ( $n = 5/\text{group}$ ). Relative weight corresponds to the ratio between the weight of the female prostate complex and the whole body. Values are means  $\pm$  standard error of mean. <sup>2</sup>Stereological data obtained for the female prostate during BPA treatments (mean  $\pm$  standard error of mean;  $n = 30$  fields in 5 animals/group). \*Statistically significant differences between control and treatments ( $p \leq 0.05$ ). Superscript letters (<sup>a,b</sup>) represent statistically significant differences between the experimental groups.

**Figure 1.** Histological sections of the gerbil female prostate stained with hematoxylin-eosin demonstrating general morphology of the gland. **(a-c)** Normal aspects of the C group, characterized by a wide lumen (L), with simple cubic or cylindrical epithelium (Ep) and stromal compartment (S) with cells, fibers and smooth (smc) muscle. **(d-o)** in all groups exposed to BPA the female prostate presented epithelial and stromal features of intense development, accompanied by proportional luminal narrowing. Several hyperplastic and inflammatory foci were observed throughout the gland. Observe an intense epithelial stratification in the glands of the females exposed to BPA (Figs. e, f, h, i, k, l, n, o). Urethra (u), vagina (v), alveoli (g), epithelium (ep), lumen (l), inflammatory foci (\*), control (C); low bisphenol-A (LBPA), bisphenol-A plus testosterone (LBPA + T); high bisphenol-A (HBPA), high bisphenol-A plus testosterone (HBPA + T).

**Figure 2.** Immunohistochemistry for estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and androgen receptor (AR) in gerbil female prostate. **(a-n)** The immunohistochemical analysis for

ER $\alpha$  showed pattern of nuclear staining in the stromal cells (S) of all examined groups (arrows). It is noted, however, that in all treated groups the immunomarking was more frequent and evident. (c-o) The immunomarking for AR was observed in the nucleus of the secretory epithelial cells (Ep) and in the nucleus of fibroblasts (Fb) and smooth muscle cells (smc) in stroma of all experimental groups (arrows).

**Figure 3.** Frequency of ER $\alpha$ -positive cells in the prostate of adult females subjected to different forms of exposure to BPA. Values are means  $\pm$  standard error of mean. Superscript letters (<sup>a,b</sup>) represent statistically significant differences between the experimental groups ( $p \leq 0.05$ );  $n = 30$  fields in 5 animals/group.

**Figure 4.** Immunohistochemistry for proliferation (PCNA) in the female prostate gland of all experimental groups. It can be observed immunomarking for PCNA (arrows) in epithelial and stromal cells, particularly in the regions of stratification in the prostate of the LBPA, LBPA + T, HBPA, and HBPA + T groups.

**Figure 5.** Frequency of PCNA-positive cells in the prostate of adult females subjected to different forms of exposure to BPA cells. Observe the increased number of PCNA-positive cells either in epithelial (a) or in stromal (b) compartments. Values are means  $\pm$  standard error of mean. Superscript letters (<sup>a,b,c</sup>) represent statistically significant differences between the experimental groups ( $p \leq 0.05$ );  $n = 30$  fields in 5 animals/group.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest to this work.

Table I	Groups				
	Control	LBPA	LBPA + T	HBPA	HBPA + T
<i><sup>1</sup>Biometry</i>					
Body weight (g)	56.8 ± 1.4	58.7 ± 8.4	59.7 ± 3.0	51.3 ± 2.0	51.1 ± 2.2
Female prostate complex (g)	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.1 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Female prostate relative weight (x10 <sup>-3</sup> )	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1
<i><sup>2</sup>Stereology (%)</i>					
Epithelium*	11.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	26.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	25.6 ± 1.5 <sup>b</sup>	27 ± 1.8 <sup>b</sup>	26.3 ± 1.3 <sup>b</sup>
Lumen*	58.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	40.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	36.6 ± 1.6 <sup>b</sup>	38.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	37.4 ± 2.0 <sup>b</sup>
Stroma*	30.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	33.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	37.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	34.6 ± 2.9 <sup>a</sup>	36.3 ± 2.5 <sup>b</sup>

Figure 1

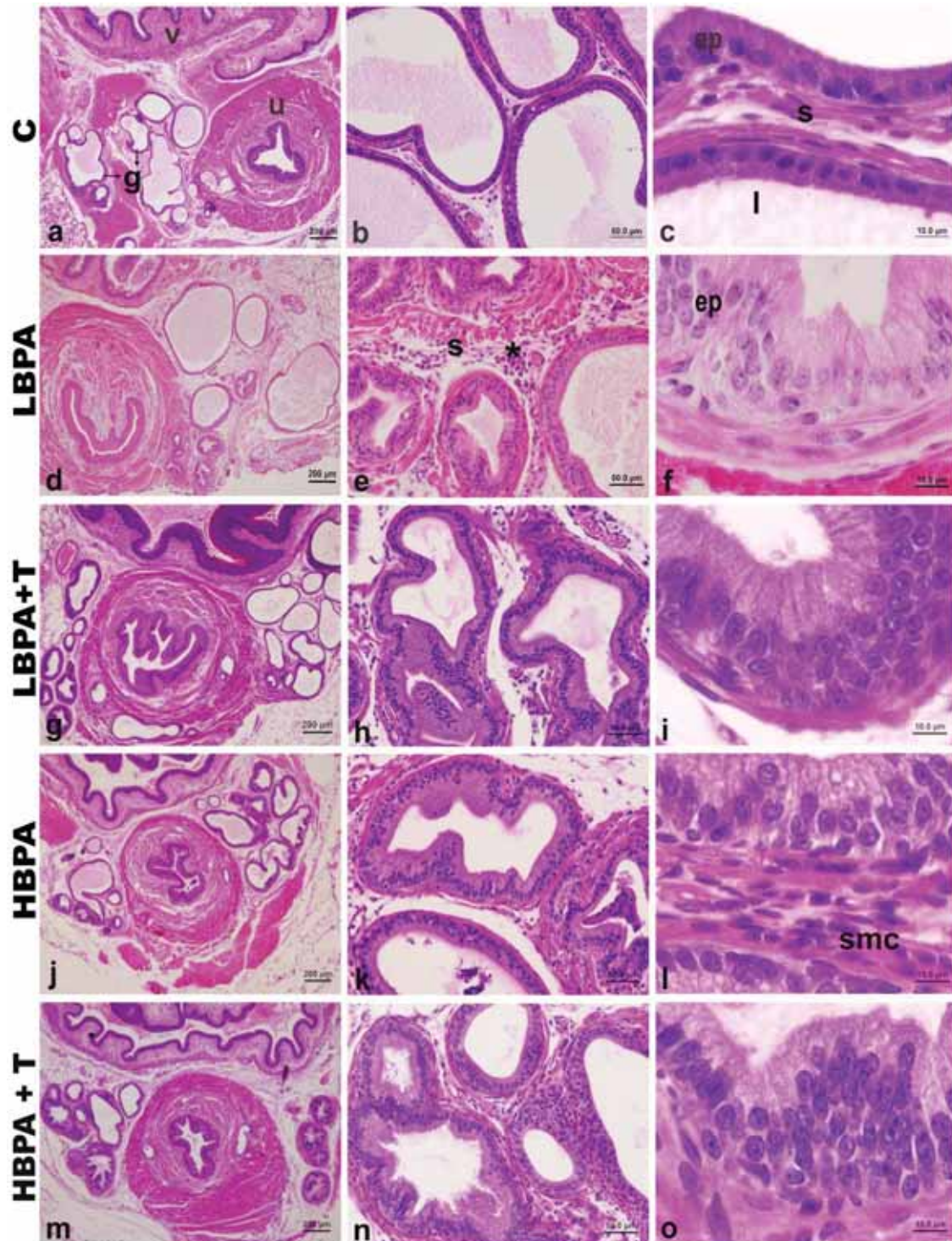




Figure 2

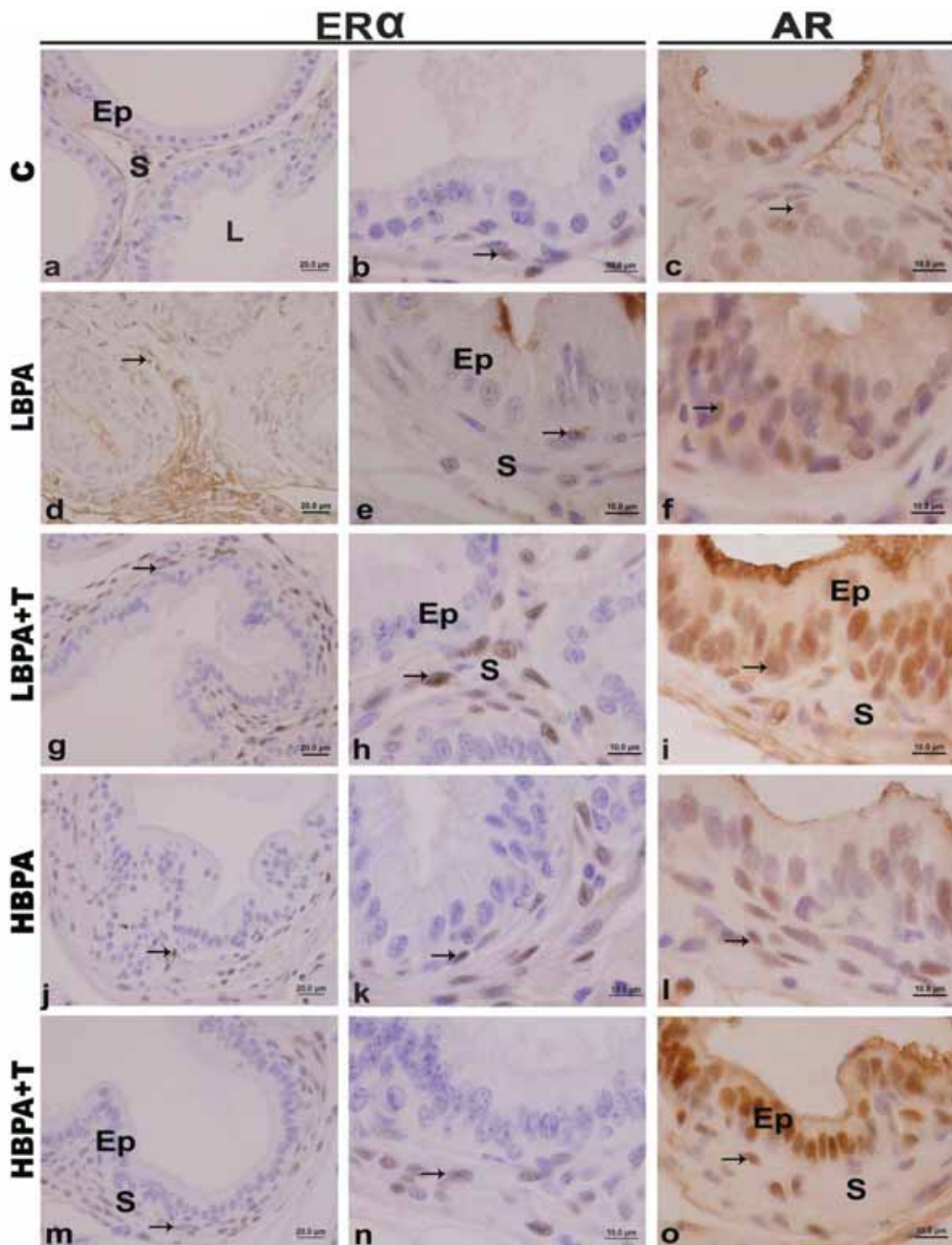


Figure 3

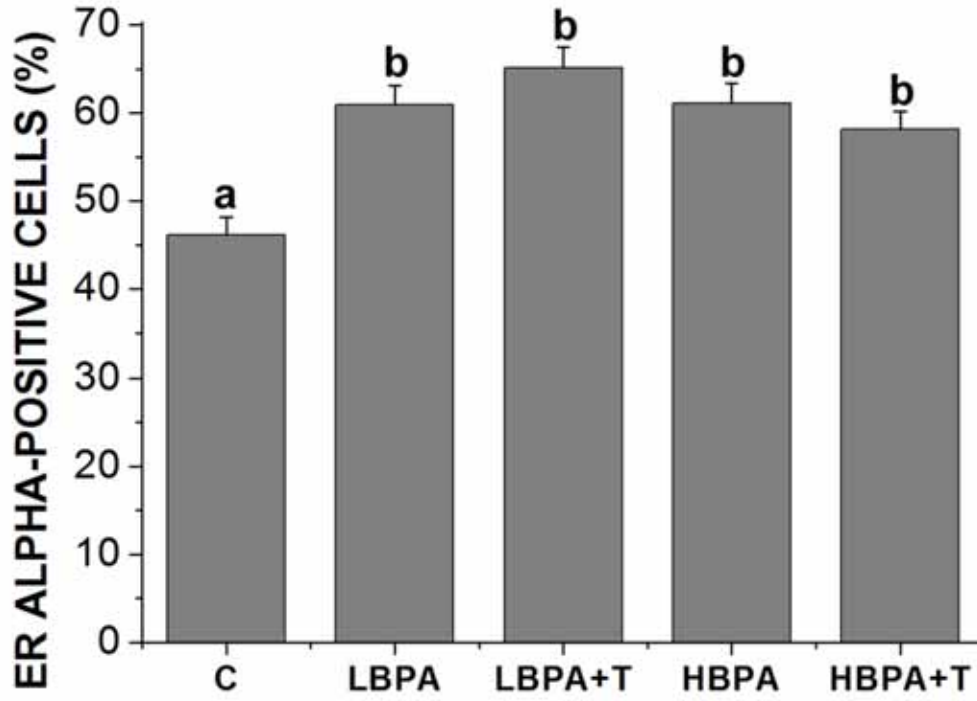


Figure 4

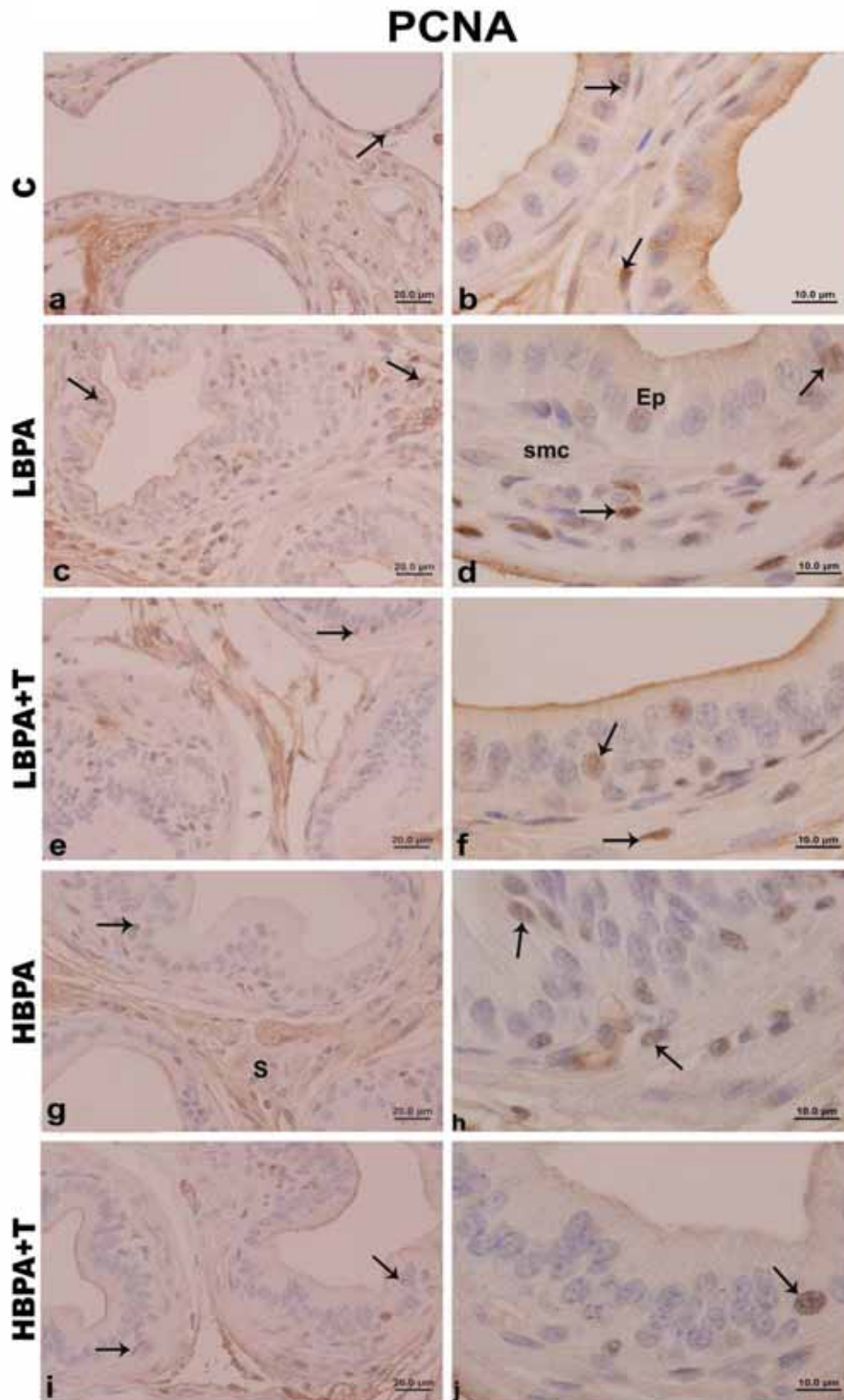
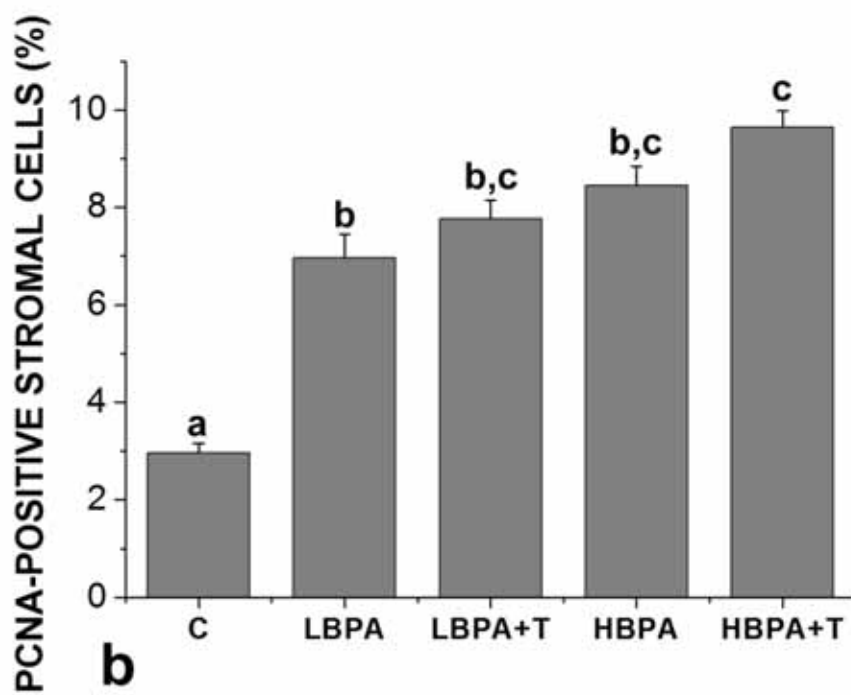
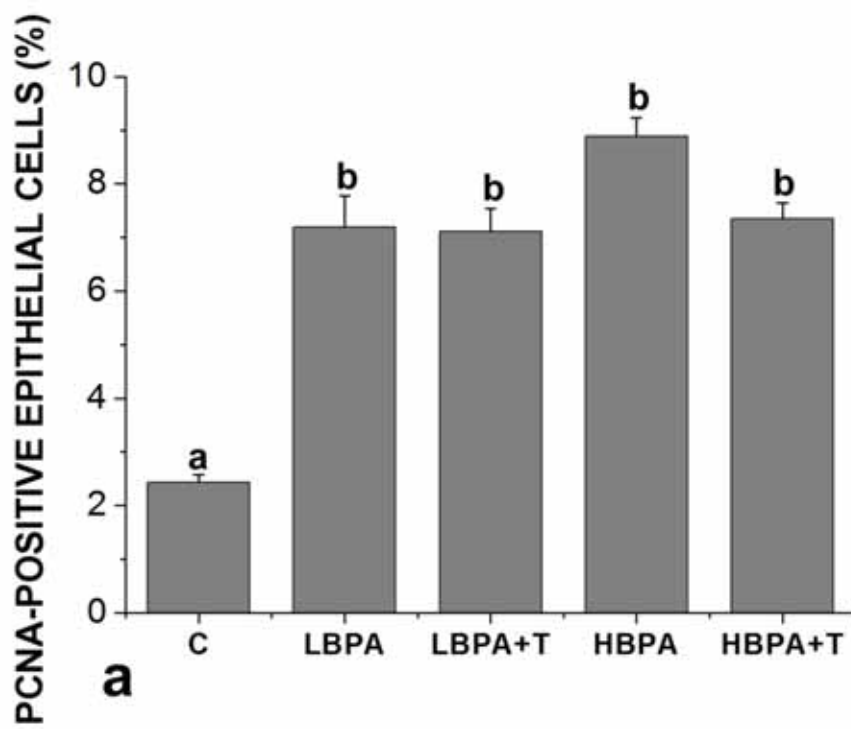




Figure 5



## **Capítulo II**

Artigo: **Exposição prolongada ao bisfenol-A causa alterações morfológicas na próstata ventral de gerbilos machos adultos.**

## **Exposição prolongada ao bisfenol-A causa alterações morfológicas na próstata ventral de gebilos machos adultos**

Mônica S. Campos<sup>1</sup>, André L. V. Galvão<sup>2</sup>, Rodrigo F. Lima<sup>2</sup>, Gláucia M. Cavasin<sup>2</sup>, Manoel F. Biancardi<sup>3</sup>, Fernanda C. A. Santos<sup>2</sup>, Sebastião R. Taboga<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Estadual Paulista – UNESP, Departamento de Biologia, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054000, Brasil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001970, Brasil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Av. Bertrand Russel s/n, Campinas, São Paulo, 13084864, Brasil.*

### **Correspondência:**

Dr. Sebastião R. Taboga: *Departamento de Biologia, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de São Paulo, 2265 Cristóvão Colombo Street, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, Brasil. E-mail address: [taboga@ibilce.unesp.br](mailto:taboga@ibilce.unesp.br). Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390.*

## RESUMO

O bisfenol-A (BPA) é um monômero de plástico policarbonato que está presente como parte do polímero existente na grande maioria das embalagens plásticas, mamadeiras de bebês, selantes dentais e resina que reveste a maioria das latas de conservas. Estudos têm demonstrado que o BPA pode ser facilmente liberado em decorrência de repetidas lavagens, alterações do pH, ou mesmo pelo aumento da temperatura. Esse disruptor tem ação estrogênica e também pode modificar a ação androgênica. Sendo a fisiologia prostática regulada por estrógenos e andrógenos, essas interferências podem predispor essa glândula a desenvolver desordens prostáticas, tais como hiperplasia. Sabendo que é cada vez maior a produção mundial de BPA, o objetivo desse trabalho foi avaliar a próstata ventral de gerbilos adultos expostos ao BPA associado à testosterona, desde a puberdade até a fase adulta. Para isso foram realizadas análises morfológicas, estereológicas e imunohistoquímicas. Os resultados demonstraram que a exposição ao BPA a longo prazo, mesmo em dosagem ambiental, aumentou a taxa de proliferação epitelial. Além disso, houve aumento do número de células epiteliais e estromais AR-positivas, e o surgimento de focos hiperplásicos e inflamatórios. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos que foram expostos apenas ao BPA e os que receberam BPA associado a testosterona. Isso demonstra que baixos níveis de BPA são suficientes para causar alterações prostáticas. Esses resultados sugerem que o BPA tem o potencial de aumentar a suscetibilidade da próstata em desenvolver doenças ao longo da vida.

**Palavras-chave: próstata ventral, bisfenol-A, gerbilo, receptor de andrógeno.**

## INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino que, juntamente com a vesícula seminal, contribui para a produção de nutrientes do fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e pH adequado desta secreção (Untergasser et al., 2005). Localiza-se na base da bexiga e envolve a porção proximal da uretra consistindo de numerosos alvéolos revestidos por epitélio cúbico que circunda o lúmen, e por um estroma fibromuscular (Risbridger et al., 2006).

A ação de estrógenos na próstata é um processo complexo. Estrógenos tem um importante papel na regulação do crescimento da próstata em todos os estágios da vida. O duplo papel mediado pela ação estrogênica, através dos subtipos de receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ , caracteriza ações tanto benéficas quanto adversas sobre a próstata. Nesse sentido, o controle desses mecanismos requer a necessidade de um nível ótimo desses hormônios para reduzir o número de patologias ao longo da vida (Ellem e Risbridger, 2009).

Dessa forma, o crescimento, desenvolvimento e manutenção da glândula prostática requerem finos ajustes entre andrógenos e estrógenos, e o desequilíbrio resultante da razão entre esses hormônios pode predispor a glândula a desenvolver patologias permanentes e irreversíveis (McPherson et al., 2008).

Ao longo das últimas décadas tem surgido mais evidências de que muitos produtos químicos naturais e sintéticos, comumente referidos como disruptores endócrinos (EDCs), podem alterar a ação de hormônios endógenos (Colborn et al., 1993). Um grande exemplo é o bisfenol-A (BPA), disruptor endócrino pertencente à classe dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos produzidos pelo homem.

Estudos revelaram que O BPA mimetiza a ação estrogênica (Rubin, 2011) e também pode modificar a ação androgênica (Teng et al., 2013; Lee et al., 2003).

O BPA está presente como parte do polímero existente na grande maioria das embalagens plásticas, mamadeira de bebê, selantes dentais e resina que reveste a maioria das latas de conservas (Timms et al., 2005 ). Esse disruptor pode ser facilmente liberado em solução em decorrência de repetidas lavagens, alterações de pH ou mesmo devido à um aumento de temperatura (Teilmann et al., 2002; Seta et al., 2006; Prins et al., 2008).

Por muitos anos a próstata tem sido um dos principais focos de pesquisa devido à importância clínica e a prevalência de doenças graves que afetam esse órgão. Estudos reforçam essa ideia demonstrando que há um potencial tóxico para esse disruptor, mesmo em dosagens ambientais (50 µg/kg/dia) “consideradas seguras” pela U.S. Food e Drug Administration (FDA) (Hunt et al., 2009). Essas evidências são demonstradas em experimentos conduzidos em animais experimentais, em que o BPA mesmo em dosagens ambientais tem forte potencial para predispor a glândula a desenvolver desordens prostáticas (Wu et al, 2011, Ho, et al., 2006, Sanches et al., 2013).

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um roedor que espontaneamente desenvolve desordens prostáticas, tais como neoplasia intraepitelial, adenocarcinomas e carcinomas microinvasivos (Pegorin et al., 2006), e a manipulação de disruptores endócrinos nesses animais pode influenciar a fisiologia de todos os órgãos regulados por hormônios. Dessa forma, os resultados obtidos a partir de estudos realizados com esses animais poderão contribuir pra um melhor entendimento dos fatores envolvidos com o surgimento de lesões prostáticas ao longo da vida dos mesmos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os

efeitos da exposição prolongada ao BPA, desde a puberdade até o início da vida adulta sobre a próstata ventral de gerbilos adultos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e delineamento experimental**

Os animais utilizados nesse experimento foram provenientes da Universidade Federal de Goiás (UFG) (Goiânia-GO), mantidos em caixas de polietileno sob condições controladas de luminosidade e temperatura, sendo fornecido aos animais água filtrada e ração *ad libitum*. O manuseio e o experimento foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Goiás (Comitê de ética, CEP numero 052/11) e de acordo com o Guia de Cuidados e utilização de Animais de Laboratório (Academia Nacional, 2011, Washington, D.C., Estados Unidos). Durante todos os experimentos foi fornecida água em garrafas de vidro com a finalidade de evitar a exposição dos animais aos químicos de disrupção endócrina encontrados em garrafas plásticas, tais como BPA.

Neste experimento foram utilizados 25 machos com um mês de idade. Esses animais foram separados dos pais após o desmame (com 30 dias) e divididos em cinco grupos experimentais:

- 1) Controle (C) - 5 machos com trinta dias de idade foram mantidos sob condições normais, até completarem 4 meses de idade;

- 2) Baixa concentração de BPA (LBPA)- 5 machos com trinta dias de idade receberam água com BPA na concentração de 40 µg/kg/dia até os 4 meses de idade;
- 3) Baixa concentração de BPA mais testosterona (LBPA + T)- 5 machos com trinta dias de idade receberam água com BPA na concentração de 40 µg/kg/dia até os 4 meses de idade. Aos três meses e 7 dias estes animais receberam doses subcutâneas de testosterona (1mg/Kg) diluída em 100 µl de óleo mineral (nujol- Mantecorp), uma vez por semana, durante 21 dias;
- 4) Alta concentração de BPA (HBPA)- 5 machos com trinta dias de idade receberam água com BPA na concentração de 4000 µg/kg/dia até os 4 meses de idade;
- 5) Alta concentração de BPA mais testosterona (HBPA + T)- 5 machos com trinta dias de idade receberam água com BPA na concentração de 4000 µg/kg/dia até os animais completarem 4 meses de idade. Aos três meses e 7 dias, estes animais receberam doses subcutâneas de testosterona (1mg/Kg) diluída em 100 µl de óleo mineral (nujol- Mantecorp), uma vez por semana, durante 21 dias, até completarem 4 meses de idade, data que foram sacrificados. A média de consumo de água e do peso dos animais por caixa foi aferida diariamente com o objetivo de calcular a diluição do BPA na água.

Os animais foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub> e imediatamente decapitados. O corpo e complexo prostático (CPr- uretra e estruturas prostáticas ) foram pesados. Esses fragmentos foram dissecados utilizando Microscópio Esteroscópio Leica (Leica, Germany) para remover tecido adiposo e isolar os seguimentos da uretra mais o tecido prostático associado.



## **Microscopia de Luz**

Os complexos prostáticos foram fixados por imersão em solução de paraformoldeído 4% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) ou em metacarn (proporções: 60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por três horas e vinte quatro horas respectivamente. Depois da fixação os tecidos foram lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol, embebidos em parafina (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany) e seccionados a 5µm em micrótomo rotatório automático (Leica RM2155, Nussloch, Germany). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Reticulina de Gomori para análises morfológicas gerais. Os tecidos foram analisados ao microscópio de luz Olympus BX 60 (Olympus, Japan) e as imagens foram digitalizadas no programa DP-BSW v.3.1 (Olympus, Japan) e em um sistema de slide virtual BX 61 VS (Olympus, Tokyo, Japan).

## **Estereologia**

As análises estereológicas foram realizadas no sistema de teste multipontos com 130 pontos e 10 linhas (Weibel, 1963) para comparar a frequência relativa de cada compartimento do tecido prostático (epitélio, lúmem, estroma muscular e estroma não muscular) como descrito por Huttunen et al. (1981). Para isso foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal;  $n = 5$ ). Os valores relativos foram determinados pela contagem dos pontos coincidentes sobre cada compartimento em estudo, seguido da divisão destes pelo número total de pontos do sistema teste. A análise estereológica foi realizada no

sistema analisador de imagens, com o programa Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

## **Immunohistoquímica**

Os cortes histológicos foram submetidos a reações de imunohistoquímica para detecção dos receptores de andrógeno (AR), segundo adaptação de protocolos já aplicados à próstata (Cordeiro et al. 2008), receptor- alfa de estrógeno (ER $\alpha$ ) e PCNA. Anticorpos primários para AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e PCNA (mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) foram aplicados em uma diluição de 1:100. Polímeros (Post Primary Block and Polymer, Novocastra TM, RE7260-k, Newcastle Upon Tyne, UK; DAKO Envision<sup>tm</sup> + Dual link system-HRP, K4061; DAKO, North America, Inc., Carpinteria, California, USA) foram utilizados como anticorpo secundário, de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

Os cortes foram corados com diaminobenzidina e contracorados com hematoxilina de Harris. Os cortes histológicos foram analisados ao microscópio de luz Olympus BX60 (Olympus, Japan).

## **Quantificação de AR e PCNA**

Para a quantificação de AR foram utilizados trinta micrografias (aumento de 40x) para cada grupo experimental. Em cada campo, o número total de células epiteliais AR-positivas foi obtido como uma frequência relativa (%) em relação o número total de células epitelial por micrografia. A mesma metodologia foi aplicada

às células estromais. Entre positivas e negativas, foram contadas, em média, 4000 células epiteliais e 2000 células estromais por cada grupo experimental.

Para a quantificação de PCNA, trinta campos microscópicos (magnificação de 400x) foram utilizados para cada grupo experimental. Em cada campo, o número total de células epiteliais positivas foi obtido como uma frequência (%) em relação ao número total de células epiteliais negativas. Entre células epiteliais positivas e negativas, foram contadas uma média de 5300 células estromais por cada grupo experimental. Todas essas análises foram realizadas utilizando o sistema de análise previamente descrito.

### **Análise estatística**

Os teste de hipóteses utilizado para comprovar a significância estatística foram o teste de Kruskal-Wallis para teste de distribuição não-paramétrica e ANOVA para distribuição paramétrica. Além disso, para a averiguação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, foram utilizados o teste de Student-Newman-Keuls's para distribuição não-paramétrica e o teste de Tukey para distribuição paramétrica. Os dados obtidos foram analisados no software Statistic 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) e o programa BioEstat 5.0 (programa de estatística gratuito). O nível de significância foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM).

## RESULTADOS

### Biometria

A análise biométrica dos machos adultos indicou diferenças significativas no peso corpóreo, entre os grupos LBPA, LBPA + T e HBPA + T (Tabela 1). O peso do complexo prostático aumentou nos grupos tratados atingindo maior valor no grupo LBPA e LBPA + T. A diferença no peso relativo do complexo prostático nos grupos tratados (LBPA e LBPA + T) foi estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle.

### Morfologia e estereologia

A análise das próstatas ventrais de machos adultos do gerbilo demonstrou que a exposição ao BPA causou alterações morfológicas nos compartimentos epitelial e estromal da glândula (Figura 1). Os grupos expostos a baixos níveis de BPA (LBPA: Fig. 1e, f e LBPA + T: Fig. 1g, h, i) e à super dosagens (HBPA: Fig. 1j, k, l e HBPA + T: Fig. 1m, n, o) apresentaram o mesmo padrão de alterações morfológicas, caracterizado principalmente por intenso desenvolvimento epitelial (Fig. 1e, h, k, m, n), hiperplasia epitelial (Fig. 1f, k, l, m) e a presença de focos inflamatórios (Fig. 1n).

O compartimento epitelial, que variou de simples cúbico a simples cilíndrico nos animais controle (Fig. 1a-c), tornou-se muito proliferativo e desenvolvido em todos os grupos experimentais (Fig. d-o).

A maioria dos alvéolos prostáticos assumiu um aspecto hiperplásico, com diversas áreas de estratificação (Fig. 1e, h, k, n). Esse crescimento epitelial e consequentemente a redução do compartimento luminal, foi confirmado pela análise estereológica, que demonstrou que todos os grupos expostos ao BPA apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle (Tabela 1).

A exposição ao BPA também causou alterações estromais relacionadas ao aumento de células musculares lisas ao redor dos alvéolos e de células inflamatórias no estroma interalveolar (Fig. 1e, f, h, k, l, o).

A técnica de Reticulina de Gomori demonstrou em todos os grupos tratados por BPA, houve um desarranjo das fibras reticulares (Fig. 2 c-j). No tratamento com LBPA + T nas regiões acometidas por hiperplasia, houve um remodelamento das fibras reticulares, tornando-se mais sinuosas e espessas (Fig. 2e, f). Nota-se a presença de várias camadas de fibras reticulares na base do epitélio na maioria dos grupos tratados (Fig. 2d, h, i, j). Grande quantidade de fibras colágenas foram observadas localizadas entre os alvéolos (Fig. 2f, h).

## **Imunohistoquímica**

### **AR- Receptor de andrógeno**

Células AR-positivas foram observadas nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de gerbilo de todos os grupos experimentais (Fig. 3a-j). As imunomarcações tornaram-se mais numerosas e intensas em todos os grupos submetidos ao tratamento com BPA (Fig. 3c-j). No estroma a imunomarcação deste receptor ocorreu nos fibroblastos e nas células musculares lisas. Através da

contagem de células (Fig. 4a, b), foi possível verificar que o tratamento com BPA estimulou um aumento significativo da frequência de células AR-positivas no compartimento epitelial e estromal de todos os grupos analisados ( $p \leq 0,05$ ). Nas imunomarcações do compartimento epitelial houve diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos tratados com BPA. Já em relação aos grupos tratados entre si, não houve diferença significativa. No compartimento estromal houve diferença significativa entre o grupo controle e todos os grupos tratados. Já em relação a todos os grupos tratados entre si houve uma maior imunomarcação no HBPA (Fig. 4a, b).

## **PCNA**

Células PCNA-positivas foram observadas em todos os grupos experimentais (Fig. 5a-j). Contudo, estas marcações foram mais frequentes nas glândulas prostáticas dos grupos tratados com BPA, em especial nas regiões de hiperplasia e estratificação epitelial (Fig. 5c, e, g). Através das contagens de células (Figs. 6) foi possível verificar que em todos os grupos tratados com BPA houve um aumento significativo da proliferação epitelial de maneira dose-dependente. Os grupos HBPA e HBPA + T foram mais proliferativos que o LBPA e o LBPA + T (Fig. 6).

## DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que o tratamento com BPA causou importantes alterações na próstata ventral de gerbilos machos adultos. Tanto doses ambientais quanto doses aumentadas de BPA foram capazes de alterar a taxa de proliferação celular prostática ativando dessa forma o receptor nuclear de andrógeno (AR) e ao mesmo tempo favoreceram o desenvolvimento de focos hiperplásicos e inflamatórios.

Os resultados obtidos demonstraram que doses ambientais (50 µg/kg/dia) (Iris, 1988) “consideradas seguras”, são suficientes para causar anormalidades na glândula prostática, evidenciando que mesmo em estágios precoces da vida, o BPA tem forte potencial para predispor a próstata a desenvolver desordens tais como hiperplasia na idade adulta. Isso reforça o que muitos estudos trazem sobre exposições a doses relevantes de BPA conduzidos em animais experimentais (Wu et al, 2011, Ho, et al., 2006).

As concentrações utilizadas podem diretamente afetar órgãos do sistema reprodutor masculino em geral, causando alterações estruturais e fisiológicas no epidídimo, vesícula seminal e testículo (Vom Saal et al., 1998). Essas evidências de que diversos impactos podem ser causados pelo BPA no sistema reprodutor demonstram a grande sensibilidade a esse disruptor, e o alto potencial químico que o mesmo exerce, fato que foi verificado em nosso estudo.

A análise estereológica demonstrou aumento estatisticamente significativo no compartimento epitelial de todos os grupos tratados, com conseqüente redução

no compartimento luminal. Por outro lado, houve aumento estromal estatisticamente significativo apenas no grupo LBPA + T.

O que mais chama atenção nos resultados foi o aumento significativo das células epiteliais e estromais AR-positivas na glândula prostática de todos os grupos tratados. Isso reforça que, mesmo em dosagens ambientais, além do potencial estrogênico que o BPA exerce, esse disruptor pode desempenhar atividade anti-androgênica (Teng et al., 2013). Além disso, de acordo com a quantificação de células epiteliais e estromais AR-positivas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados, mesmo quando comparamos os grupos BPA tratados com testosterona. Portanto, esses dados sugerem que o BPA mesmo em dosagem ambiental é suficiente para aumentar a atividade de receptor AR nos compartimentos estromal e epitelial.

Estudos demonstram que o receptor de andrógeno (AR) tem um papel central no crescimento e desenvolvimento da próstata. Quando ativado pelos hormônios androgênicos, testosterona (T) e dihidrotestosterona (DHT), esse receptor passa a exercer diferentes funções na fisiologia prostática. Dentre as ações exercidas por esses hormônios, participam do processo de diferenciação, crescimento, e estão diretamente envolvidos no surgimento de patologias, dentre elas a carcinogênese prostática (Wilson, 1996).

Nesse contexto, andrógenos sozinhos não são suficientes para induzir alterações prostáticas, visto que esses mecanismos requerem a participação de estrógenos (Morani et al., 2008). A ação de estrógenos é mediada por dois membros de receptores nucleares, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , cada um atuando em estágios específicos e desempenhando ações opostas. ER $\alpha$  medeia diversos efeitos adversos na próstata,



especificamente aberrante proliferação celular, inflamação e malignidade, em contrapartida ER $\beta$  regulam a proliferação do tecido prostático e atua potencialmente nos efeitos anti-inflamatórios (Ellem e Risbridger., 2009).

Ao lado disso, há uma vasta evidência de que o BPA é um mímico estrogênico, antagoniza a atividade do 17 $\beta$  estradiol, conseqüentemente altera o número de receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Essa interferência resulta diretamente com a atividade genética desses receptores, perturbando a atividade de enzimas e, portanto o metabolismo de vários tecidos (Richter et al. 2007; Gould et al., 1998). Nesse sentido há evidências, de que além da interação desse disruptor com receptor de estrógeno, o mesmo possa se ligar a receptores de andrógenos e inibir ou alterar a ação desses receptores. Essa interação ocorre diretamente com receptor de AR por múltiplas vias: antagonizando a sinalização com o receptor, evitando a translocação do AR para o núcleo e sua interação com seu coativador, e conseqüentemente transativação (Teng et al., 2013; Lee et al., 2003).

Ao lado disso, estudos realizados com roedores utilizando BPA em diferentes dosagens, tanto ambiental (50  $\mu$ g/Kg/dia) quanto em dosagens maiores, mostraram que essa exposição influenciou na expressão das enzimas 5 $\alpha$  redutase e aromatase, enzimas chave no desenvolvimento de patologias na próstata (Castro et al., 2013). Isso reforça a ideia que o BPA exerce efeitos de disrupção endócrina sobre a reprodução, metabolismo e desenvolvimento.

Portanto, considerando todas essas evidências, nossos resultados sugerem que o BPA tem um efeito direto sobre os receptores androgênicos prostáticos epiteliais e estromais. Assim, com aumento da taxa de focos proliferativos e

inflamatórios, este trabalho demonstra que a exposição ao BPA aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões ao longo da vida.

Em relação à análise de proliferação celular, foi observada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos tratados, confirmado pela quantificação de células epiteliais PCNA-positivas. Dessa forma, observou-se que existiu um efeito de exposição dose-dependente entre os grupos analisados, visto que a próstata ventral dos grupos HBPA e HBPA + T tornaram-se mais proliferativas que as dos grupos LBPA e LBPA + T.

Assim, através do presente estudo verificou-se que o BPA alterou a morfofisiologia da próstata ventral de gerbilos machos adultos, tanto em dose ambiental quanto em concentrações aumentadas. Nosso estudo abre uma linha de investigação para os riscos a esse disruptor endócrino, visto que as alterações induzidas por esse composto são de grande interesse para o entendimento dos processos que levam ao desenvolvimento de patologias prostáticas. Contudo, novos estudos são necessários para elucidar mecanismos de ação desse disruptor nesse órgão.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Castro B, Sanchez P, Torres MJ, Preda O, Moral RGD, Ortega E. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 $\alpha$ -Reductase Isozymes in Rat Prostate. *Plos one* 2013; 8: 55905

Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* 1993; 101: 378-384.

Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155:174–186.

Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, Mc Donnell DP, Gaido KW. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor  $\alpha$  in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 142: 203–14.

Ho SM, Tang WY, Fausto JB, Prins GS. Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res* 2006; 66: 5624-5632.

Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ. The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biol Reprod* 2009; 81(5): 807-13.

Iris. Bisphenol A. (CASRN 80-05-7). US-EPA Integrated Risk Information System Substance file. 1988. <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>.

Lee JH, Chattopadhyay S, Gong EY. Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicological sciences* 2003; 75: 40–46.

McPherson SJ, Ellem JS, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 2008; 76: 660-670.

Morani A, Warner M, Gustafsson. Biological functions and clinical implications of estrogen receptors in cancer. *J. Intern. Med* 2008; 264:128-142.

Pegorin SGC, Zanetoni C, Góes RM, Taboga SR. Biological Behavior of the Gerbil Ventral Prostate in Three Phases of Postnatal Development. *The anatomical record part* 2006; 288: 723–733.

Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 2008; 76: 641-659.

- Ridsbridger GP, Taylor RA. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2006; 3: 1149-1168.
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Kuntz DW, Saal FSV. In vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reprod Toxicol* 2007; 24(2): 199–224
- Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127: 27–34.
- Sánchez P, Castro B, Torres JM, Olmo A, Moral RDD, Ortega E. Bisphenol A Modifies the Regulation Exerted by Testosterone on 5 $\alpha$ -Reductase Isozymes in Ventral Prostate of Adult Rats. *BioMed Research International* 2013; 13.
- Seta DD, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessì-Filgheri F, Farabolini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006; 50(2): 301-307.
- Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J. Putative effects of endocrine disruptors on pubertal developmental in the human. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16:105-121.
- Teng C, Goodwin B, Shockley K, Xia M, Huang R, Norris J, Merrick BA, Jetten AM, Austin CP, Tice RR. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* 2013; 203: 556–564.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, Vom Saal FS. Oestrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS* 2005; 102: 7014–7019.
- Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005; 40: 121-128.
- Wilson JD. Role of dihydrotestosterone in androgen action. *Prostate Suppl* 1996; 6: 88-92.

Wu JH, Jiang XR, Liu GM, Liu XY, He GL, Sun ZYS. Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats. *Toxicol Ind Health* 2011; 27: 810-819.

## LEGENDAS

**Tabela 1.** <sup>1</sup>Peso corpóreo e peso relativo de machos do grupo controle e dos grupos tratados (n = 5 por grupo). O peso relativo corresponde a razão entre o peso do complexo prostático e o do corpo. Os valores mencionados correspondem a média ± o erro padrão da média. <sup>2</sup>Dados estereológicos obtidos da próstata ventral de machos durante o tratamento com BPA (média ± erro padrão da media; n=30 campos de 5 animais por grupo). \*Diferenças significativas entre controle e tratamentos (p ≤ 0.05). Letras sobrescritas (a,b,c,d) representam diferenças significativas entre os grupos experimentais; n=30 campos em 5 animais por grupo.

**Figura 1.** Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilo corados com hematoxilina-eosina demonstrando aspectos morfológicos da glândula. **(a-c)** Aspectos normais do grupo controle, caracterizado por um lúmem amplo (L), com epitélio cúbico simples (Ep) e um compartimento estromal (Es), com células, fibras e músculo liso (smc). **(d-o)** Em todos os grupos expostos ao BPA a próstata apresenta intenso desenvolvimento epitelial e estroma, acompanhado de proporcional redução luminal. Vários focos hiperplásicos podem ser observados ao longo da glândula. Note uma intensa estratificação epitelial nas glândulas expostas ao BPA (Figs. e, f, h, i, k, l, n, o). Foco inflamatório (\*); Controle (C), baixa concentração de BPA (LBPA); baixa concentração de BPA mais testosterona (LBPA + T); alta

concentração de BPA (HBPA); alta concentração de BPA mais testosterona (HBPA + T).

**Figura 2.** Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilo corados pela técnica de Reticulina de Gömöri. **(a, b)** Fibras reticulares finas regulares na base do epitélio e entre a musculatura lisa. Em todos os grupos tratados com BPA houve um aumento da quantidade de fibras reticulares, tornando-se dispersas e sinuosas em várias regiões do estroma. Vários focos de hiperplasia e várias camadas de fibras colágenas nas proximidades da membrana basal e em regiões mais profundas do estroma (Fig. 2d, e, f, g, h, j).

**Figura 3.** Imunohistoquímica para o receptor de andrógeno (AR) na próstata ventral de gerbilos machos. **(a-j)** A reação de imunohistoquímica para AR demonstrou padrões de marcação nuclear nas células epiteliais e estromais de todos os grupos analisados. **(c-j)** Nota-se, no entanto, que em todos os grupos tratados a imunomarcação foi mais frequente e evidente.

**Figura 4.** Frequência de células AR-positivas na próstata ventral de machos adultos submetidos a diferentes formas de exposição ao BPA. Valores apresentados são as médias  $\pm$  o erro padrão da média. Letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) representam diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $p \leq 0.05$ );  $n = 30$  campos de 5 animais por grupo.

**Figura 5.** Imunohistoquímica para proliferação celular (PCNA) na próstata ventral de gerbilos de todos os grupos experimentais. **(a-j)** Pode-se observar imunomarcação

para PCNA nas células epiteliais e estromais, principalmente nas regiões de estratificação epitelial dos grupos LBPA, LBPA + T, HBPA , e HBPA + T.

**Figura 6.** Frequência de células PCNA-positivas na próstata de machos adultos submetidos a diferentes formas de exposição ao BPA. Valores apresentados são as médias  $\pm$  o erro padrão da média. Letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) representam diferenças significativas entre os grupos experimentais ( $p \leq 0,05$ ); n=30 campos de 5 animais por grupo.

Table I	Groups				
	Control	LBPA	LBPA + T	HBPA	HBPA + T
<i><sup>1</sup>Biometry</i>					
Body weight* (g)	62.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	71.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	68.8 ± 1.9 <sup>b</sup>	64.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	68.5 ± 2.5 <sup>b</sup>
Male prostate* (g)	0.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.1 <sup>a</sup>
Male prostate relative weight* (x10 <sup>-2</sup> )	1.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.1 <sup>a</sup>
<i><sup>2</sup>Stereology (%)</i>					
Epithelium*	12.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	18.8 ± 1.1 <sup>b</sup>	21.6 ± 1.2 <sup>b</sup>	23.7 ± 1.2 <sup>c</sup>	26.9 ± 1.1 <sup>c</sup>
Lumen*	66.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	57.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	38.7 ± 2.1 <sup>c</sup>	48.3 ± 2.6 <sup>d</sup>	43.6 ± 12.4 <sup>c,d</sup>
Non-muscle stroma*	14.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	16.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	31.3 ± 1.7 <sup>b</sup>	20.1 ± 1.4 <sup>a</sup>	18.9 ± 1.2 <sup>a</sup>
Muscle stroma*	6.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	8.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.8 <sup>b</sup>



Figura 1

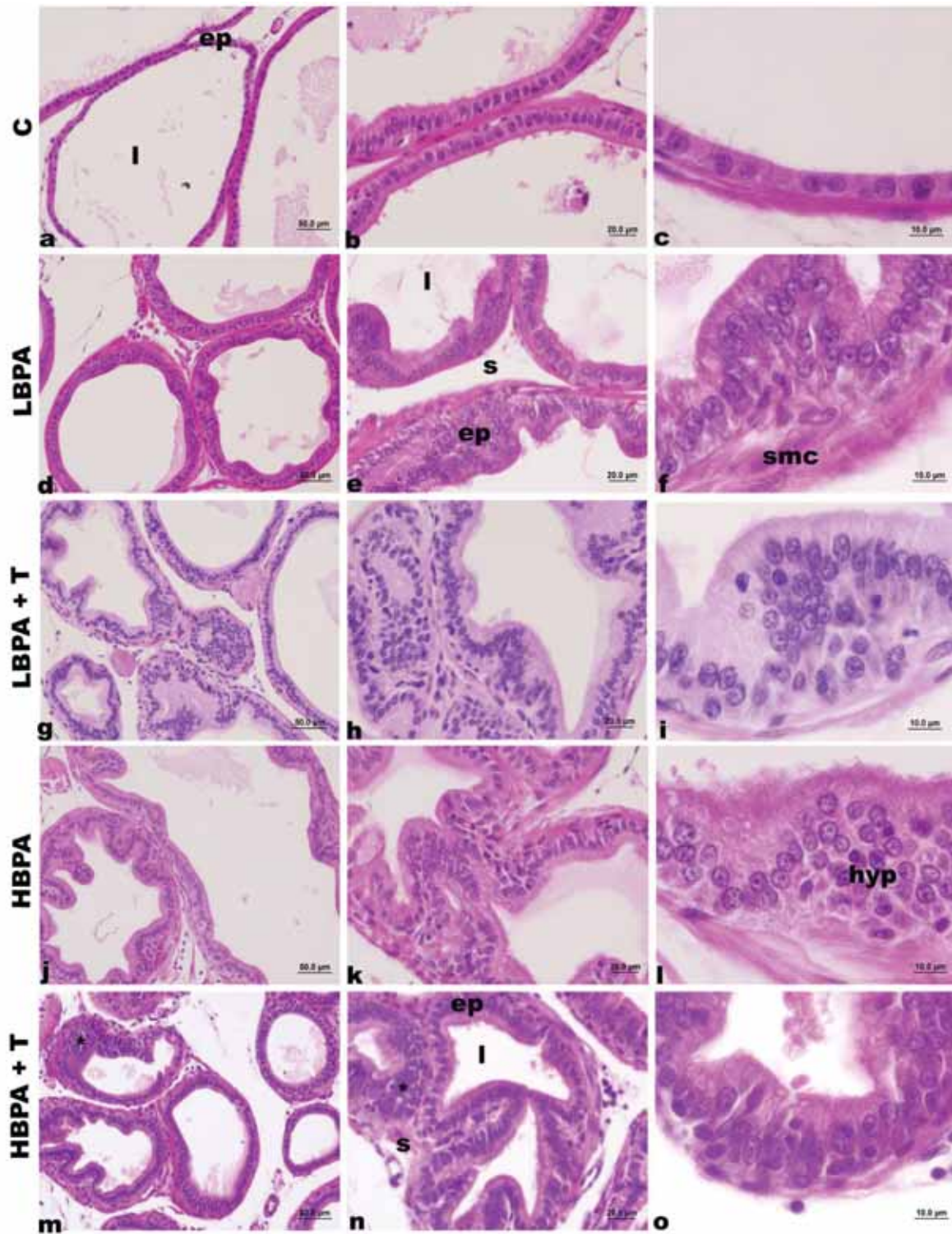


Figura 2

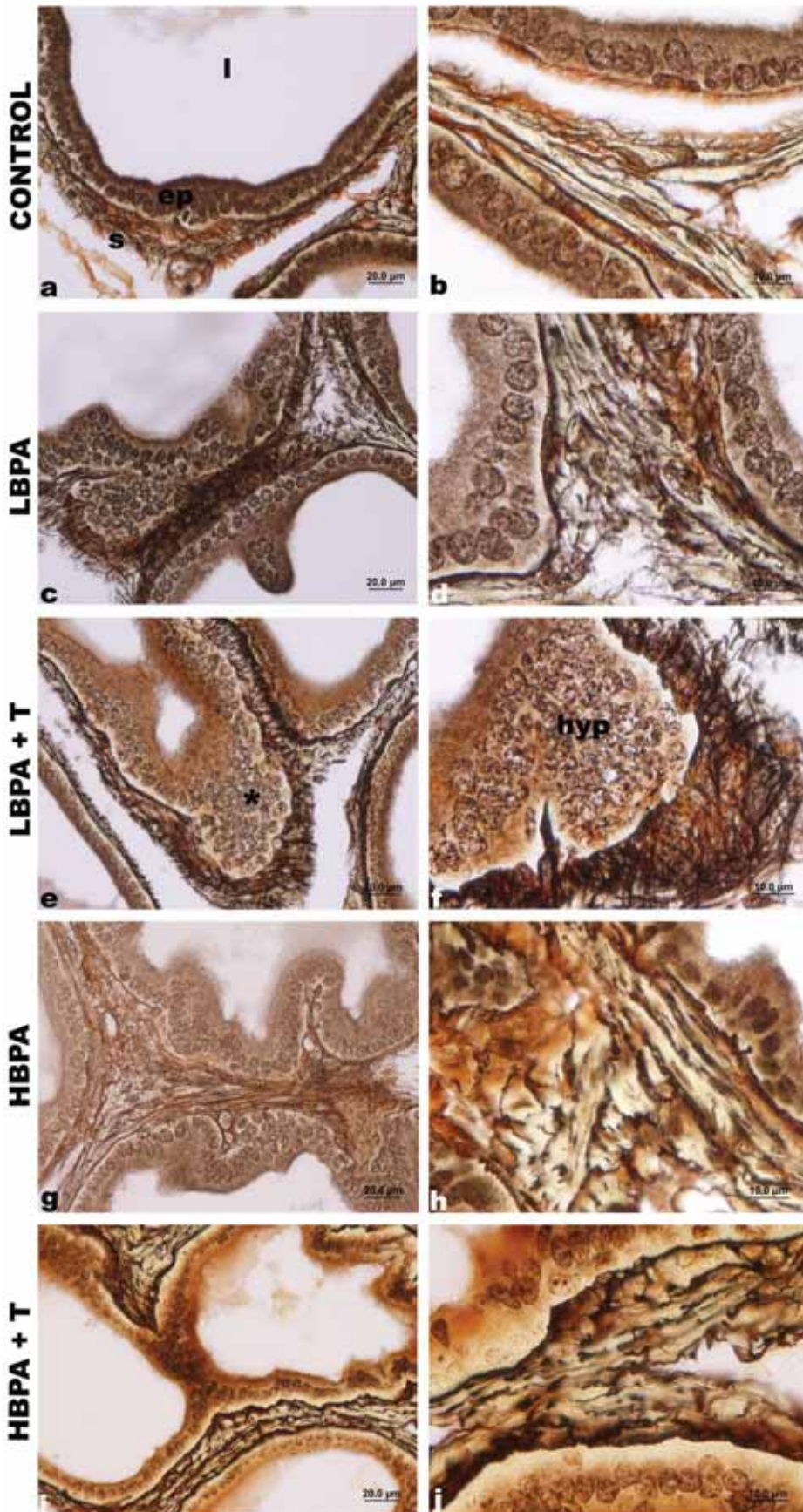




Figura 3

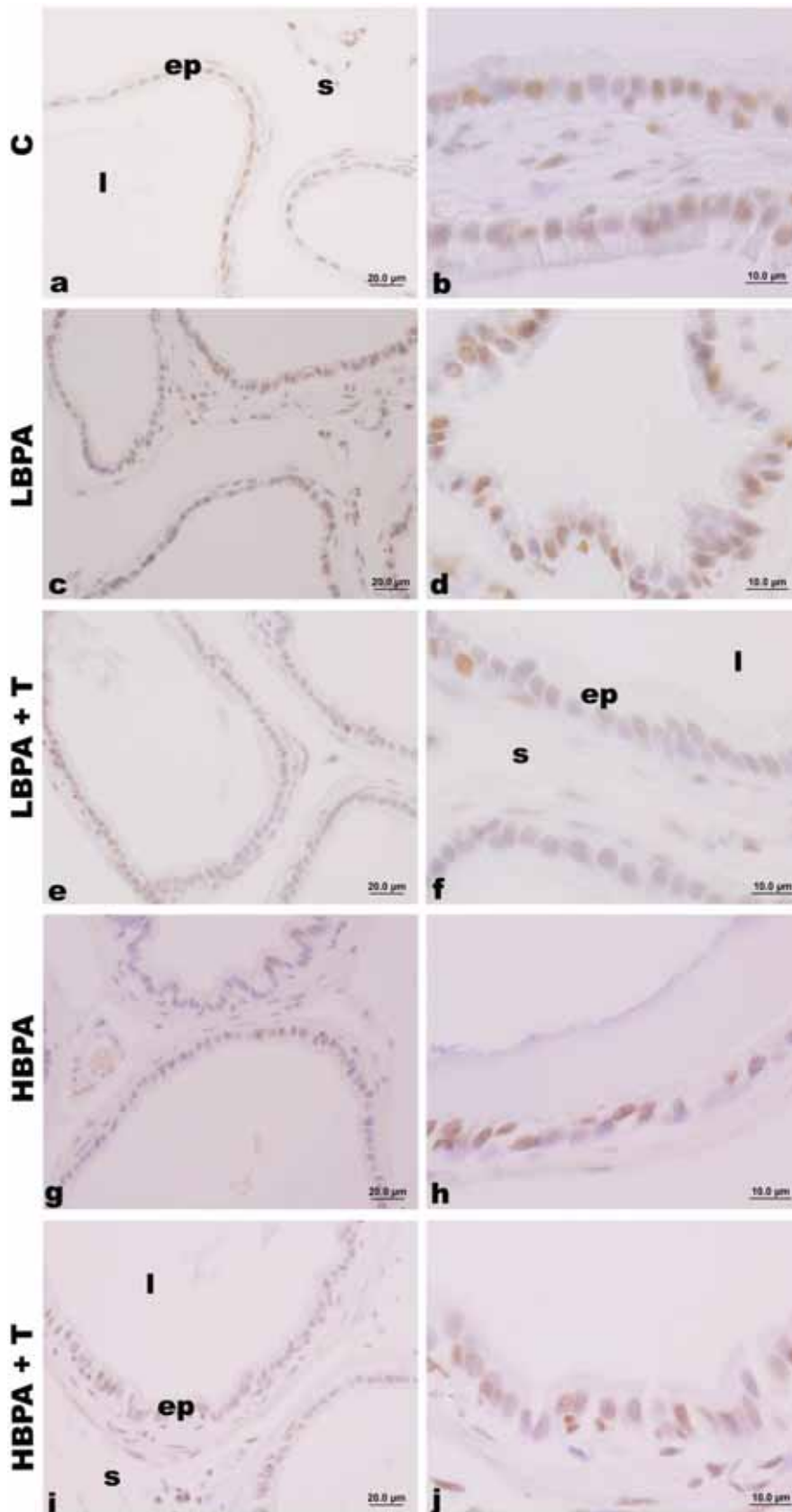


Figura 4

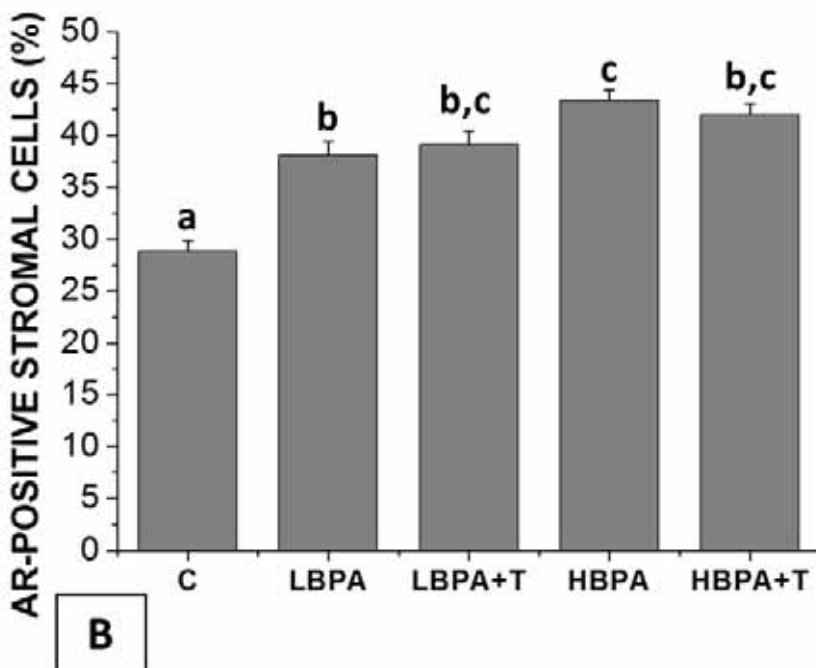
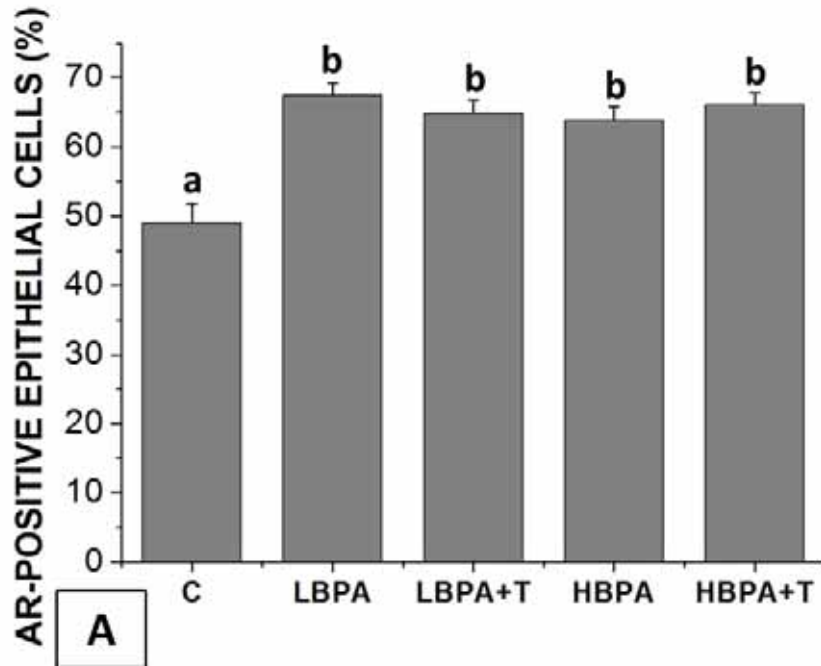


Figura 5

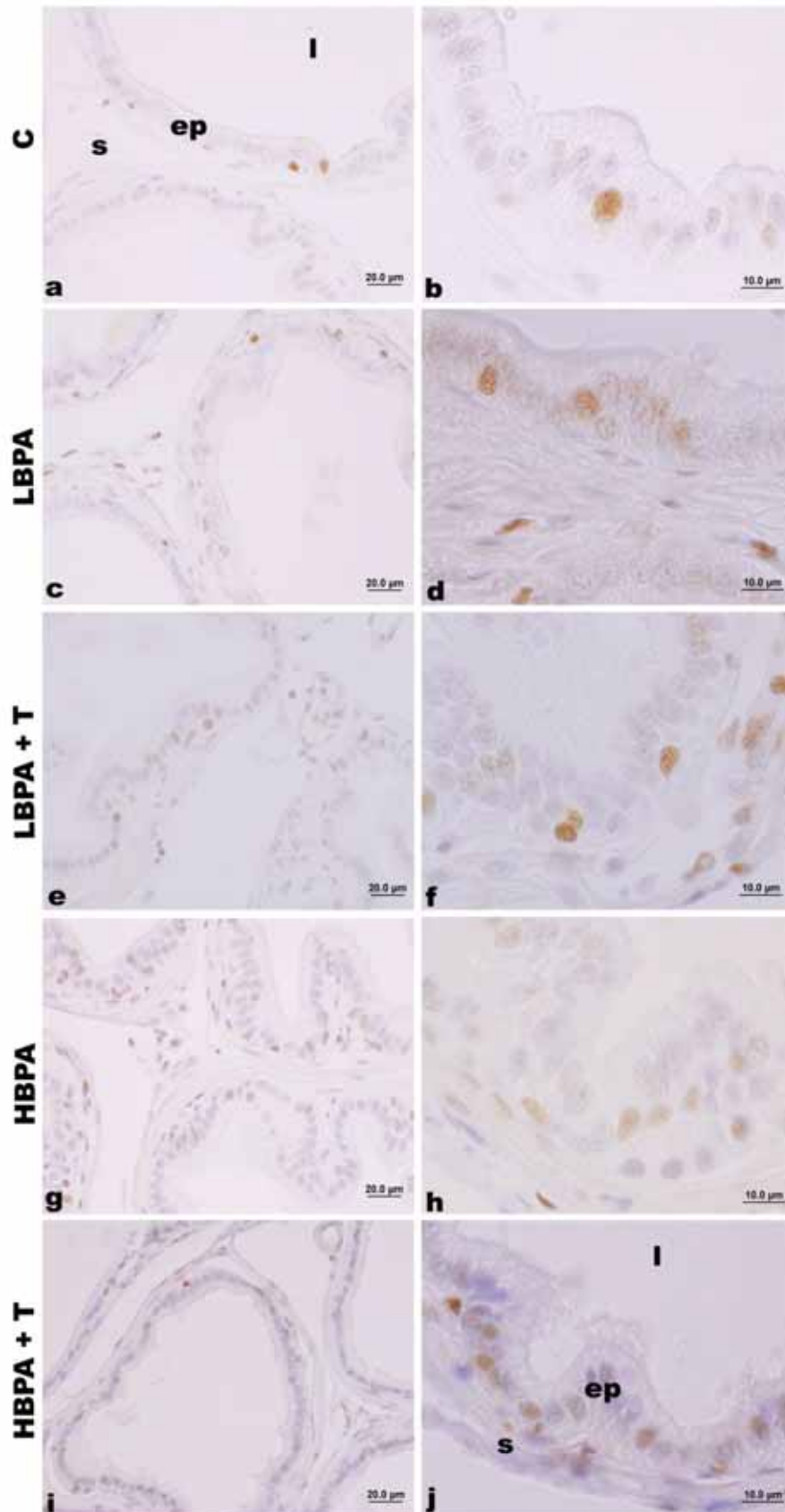
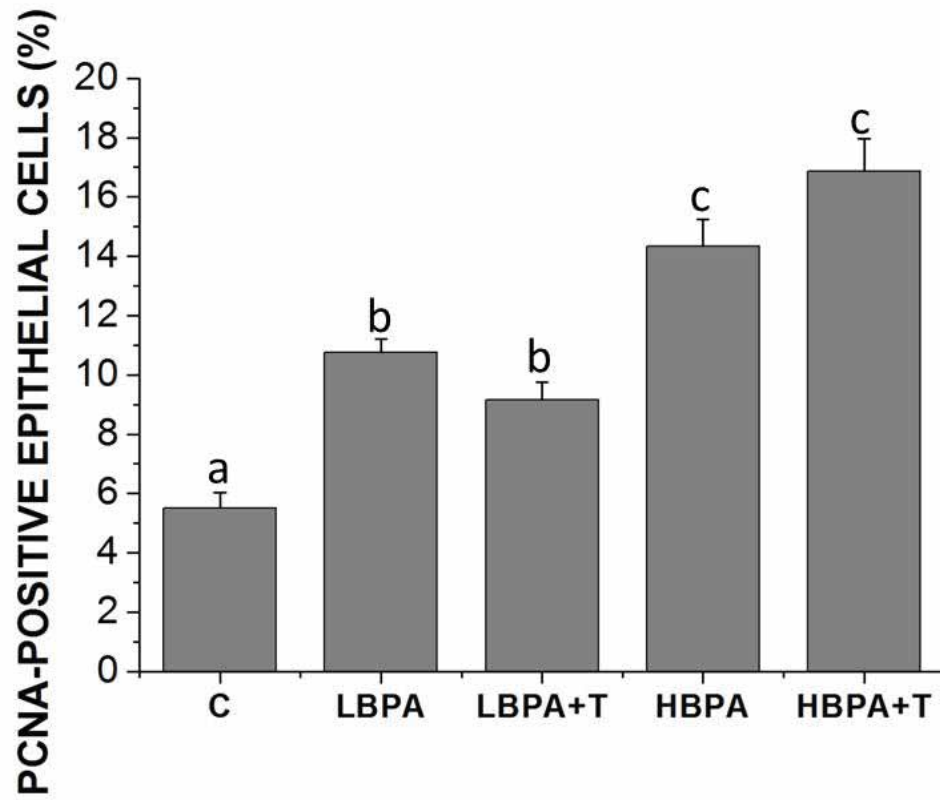


Figura 6



## CONCLUSÕES GERAIS

1. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que a exposição ao BPA nas fases iniciais da vida, tanto em dosagem ambiental quanto em dosagens aumentadas, causou importantes alterações morfofisiológicas na próstata de gerbilos machos e fêmeas adultos.

2. A exposição precoce ao BPA causou alterações similares na próstata de machos e fêmeas de gerbilo, sendo que o mecanismo de ação desse disruptor parece envolver diretamente as vias de ativação de receptores androgênicos e estrogênicos.

3. Nas fêmeas as alterações principais corresponderam a maior imunomarcação do receptor estrogênico alfa ( $ER\alpha$ ), aumento da proliferação celular e desenvolvimento de hiperplasia associado com focos inflamatórios.

4. Em machos observou-se maior imunomarcação do receptor androgênico (AR), aumento da proliferação celular e desenvolvimento de focos hiperplásicos e inflamatórios.

5. Visto que a administração de BPA em estágios precoces da vida causou uma série de alterações morfofisiológicas na próstata de gerbilos adultos, esses estudos são muito importantes pois servem de alerta para a população mundial que está exposta diariamente a crescentes níveis de BPA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brambell FWR, Davis DHS. The normal occurrence structure and homology of prostate glands in adult female *Mastomys erythroleucus* temm. *J Anat* 1940; 75:64-75.

Castro B, Sanchez P, Torres JM. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 $\alpha$  reductase isozymes in rat prostate. *PLOS ONE* 2013; 8: 55905.

Cunha GR, Ricke WA, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostate development. *J. Steroid Biochem. Mol.Biol* 2004; 92(4): 221-236.

Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol Int* 2004; 28:335-344.

Cooke OS, Simon L, Cimafranca MA. Environmental Endocrine Disruptors and Male Reproductive Toxicology. *Male Reproductive Toxicology: Mechanisms and Manifestations* 2010; 11: 231- 244.

Coster SD, Larebeke NV. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *Journal of Environmental and Public Health* 2012; 713696: 1-52.

Cunha, GR, Donjacour, AA, Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem. Cell Biol* 1986; 64: 608–614.

Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155:174–186.



Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat* 2002; 184:341-345.

Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, Safe S, Mc Donnell DP, Gaido KW. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor  $\alpha$  in a distinct manner from estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 142:203–14.

Hayward SW, Baskin LS, Haughney, PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anatomica* 1996; 155: 81–93.

Lasnitzki I, Mizuno T. Antagonistic effects of cyproterone acetate and oestradiol on the development of the fetal rat prostate gland induced by androgens in organ culture. *Prostate* 1980; 1: 147–156.

Lee CH, Olugbade AO, Kischenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2011; 40: 565–575.

Kirby RS, Christmas TJ, Brawer M. Prostate Cancer. *London, England: Mosby* 1996: 170.

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

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 2005; 72:1344–51.

McPherson SJ, Ellem JS, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 2008; 76: 660-670.

Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 2008; 76: 641-659.

Rochel SS, Bruni CA, Taboga SR, Vilamaior PSL, Góes R.M. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat. Rec* 2007; 290: 1233–1247.

Rogers AJ, Metz I, Yong VW. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology* 2013; 53: 421-430.

Rubin BS. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127: 27–34.

Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 2003; 35: 447-457.

Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod* 2006; 3(1): 3-18.

Seta DD, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessì-Filgheri F, Farabollini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006; 50(2): 301-307.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 1986; 34: 961–971.

Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, Saal FS. Estrogenic Environmental Chemicals and Drugs: Mechanisms for Effects on the Developing Male Urogenital System. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127(1-2): 83–95.

Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal developmental in the human. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16:105-121.

Timms BG. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 2008; 76: 565–577.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, Vom Saal FS. Oestrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS* 2005; 102: 7014–7019.

Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 2002; 129:1905-1912.

Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005; 40: 121-128.

Vilamaior PSL, Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Biancardi MF, Fochi RA, Taboga SR. Comparative histology of gerbil and rat female prostate: morphological evidences of different functional state during distinct phases of post-natal development. *Braz J Morphol Sci Suppl* 2005; 3:28.

Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998; 14: 239-260.

Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 2001; 68: 270-279.

Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness towards an integrated view of male sexual development. *Nat Genet* 2006; 7: 620-631.

Zaviacic M. The female prostate: From vestigial Skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate. *Bratislava, Slovakia: Slovack Academic Press* 1999; 171pp.