

EXPOSIÇÃO *IN ÚTERO* AO DESREGULADOR ENDÓCRINO
BISFENOL A E AO AGENTE QUIMIOPREVENTIVO INDOL-3-
CARBINOL: EFEITOS SOBRE A MORFOGÊNESE E A
SUSCETIBILIDADE À CARCINOGÊNESE PROSTÁTICA

JOYCE ZALOTTI BRANDT

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPOSIÇÃO *IN ÚTERO* AO DESREGULADOR ENDÓCRINO
BISFENOL A E AO AGENTE QUIMIOPREVENTIVO INDOL-3-
CARBINOL: EFEITOS SOBRE A MORFOGÊNESE E A
SUSCETIBILIDADE À CARCINOGÊNESE PROSTÁTICA

JOYCE ZALOTTI BRANDT

Orientador: Prof. Dr. WELLERSON RODRIGO SCARANO

Co-orientador: Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Brandt, Joyce Zalotti.

Exposição *in útero* ao desregulador endócrino bisfenol A e ao agente quimiopreventivo indol-3-carbinol: efeitos sobre a morfogênese e a suscetibilidade a carcinogênese prostática / Joyce Zalotti Brandt. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Coorientador: Luis Fernando Barbisan

Capes: 20600003

1. Mama – Câncer. 2. Próstata – Câncer. 3. Resinas de epóxi - Toxicologia.
4. Morfogênese.

Palavras-chave: Bisfenol A; Carcinogênese prostática; Indol-3-Carbinol; Quimioproteção; Toxicologia da reprodução.

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus pais. Sem eles essa nova fase da minha vida não seria possível. Muito obrigada pela compreensão, paciência, suporte psicológico e financeiro e acima de tudo amor...”

Agradecimentos

Agradeço à Deus por me conceder vida, me dar sabedoria e estar presente em todos os momentos da minha existência.

Aos meus pais, Sidnei e Neide, pelo amor, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e por terem me ensinado desde criança a ter comprometimento, responsabilidade e perseverança com os desafios.

À minha irmã, Isabela, pelo amor e companheirismo.

À toda minha família e amigos que fazem os meus dias mais felizes.

À Daniela Mota Segantini pela amizade e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, que acreditou no meu potencial e me deu a oportunidade de trilhar um novo caminho. Muito obrigada pela confiança, dedicação, paciência e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, que também acreditou no meu potencial e me deu a oportunidade de começar um novo ciclo. Muito obrigada pela confiança, dedicação e ensinamentos transmitidos.

Ao amigo Tony Grassi que me acolheu, transmitiu seus conhecimentos e acima de tudo fez dos meus dias, finais de semana e dos dezesseis meses de biotério mais divertidos. Sem a sua ajuda essa jornada não estaria sendo concluída.

À aluna de iniciação científica, Lívia Teresa Ribeiro da Silveira, por toda ajuda, amizade e paciência.

Aos amigos de laboratório, André (Dói), André (Qualy), Cristiane, Leonardo, Lucas, Mariana e Talita pela ajuda, paciência, compreensão e pelos momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório.

À José Eduardo Bozano pelas conversas, ensinamentos, ajuda e por tornar os meus dias de trabalho mais divertidos.

À Paulo César Georgete (PC) pelas conversas, ensinamentos, ajuda e companhia nos dias de trabalho aos finais de semana.

Aos docentes que contribuíram para minha formação, assim como a todos funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo auxílio-pesquisa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!!!

*“Tudo vale a pena quando
a alma não é pequena”*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
Capítulo 1	
Revisão de Literatura	
1.1 A Próstata	14
1.2 Lesões Prostáticas	17
1.3 Suscetibilidade à carcinogênese	17
1.4 Desreguladores endócrinos	19
1.5 Bisfenol A	22
1.6 Indol-3-Carbinol	25
Capítulo 2	
Artigo Científico	
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
Animais e ambiente de experimentação	32
Preparo da ração com indol-3-carbinol	33
Delineamento experimental	33
Dosagem hormonal sérica	34
Microscopia de luz	34
Análise estereológica	35
Análise histopatológica: estimativa da frequência de lesões	35
Análise imuno-histoquímica	35
Deteção de fragmentação de DNA associada a apoptose	36
Determinação do índice de proliferação e apoptose	36
Western Blot	36
Análise estatística	36
RESULTADOS	
Avaliação imediata (DPN21)	37
Avaliação tardia (DPN180)	38

DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
LEGENDAS DAS FIGURAS	50
CONCLUSÃO GERAL	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	62
APÊNDICES	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BPA: bisfenol A
I3C: indol-3-carbinol
DPN: dia pós-natal
SUG: seio urogenital
PV: próstata ventral
PDL: próstata dorsolateral
DHT: dihidrotestosterona
AR: receptor de andrógeno
ER α : receptor de estrógeno α
ER β : receptor de estrógeno β
HBP: hiperplasia benigna prostática
PIN: neoplasia intraepitelial prostática
CaP: câncer de próstata
DE: desregulador endócrino
PIA: atrofia inflamatória proliferativa
DES: dietilestilbestrol
DIM: 3,3'-diindolilmetano

RESUMO

Sabe-se que fatores ambientais e de estilo de vida, tais como a dieta, são capazes de induzir significativas mudanças na concentração e no metabolismo dos hormônios esteroides, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças prostáticas. O Bisfenol A (BPA) é um componente dos produtos a base de resinas epóxi e plásticos policarbonato e tem sido investigado por sua provável atividade carcinogênica para a mama e próstata. O objetivo geral desse trabalho foi investigar se a exposição gestacional ao BPA suplementado ou não com Indol-3-Carbinol (I3C), um composto natural com propriedades quimioprotetoras, interfere no padrão de desenvolvimento da próstata, bem como na suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 5 grupos experimentais: G1: Controle (ração basal); G2: BPA25 (25µg/Kg); G3: BPA25 (25µg/Kg) + I3C; G4: BPA250 (250µg/Kg); G5: BPA250 (250µg/Kg) + I3C. Machos selecionados de diferentes ninhadas (2/ninhada) foram eutanasiados no DPN21 para avaliação imediata sobre a morfogênese prostática e no DPN180 para avaliação dos efeitos tardios. No DPN21 e DPN180 os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado para análises hormonais e os hemilobos ventrais direitos separados para rotina histológica, análise estereológica e imuno-histoquímica, e os esquerdos congelados em nitrogênio líquido para o Western Blot. O lobo dorsolateral foi coletado no DPN180 para avaliação histopatológica. O peso do lobo ventral da próstata reduziu no grupo G5 em relação a G4, enquanto no DPN180 não houve diferença nesse parâmetro. Com relação à estereologia no DPN21 evidenciou-se aumento do compartimento epitelial e diminuição do compartimento luminal nos grupos G3 e G5. Quanto ao índice de proliferação celular no DPN21 observou-se aumento nos grupos G2 e G3 em relação ao G1. Já em relação ao índice de apoptose, nos grupos suplementados com I3C (G3 e G5) houve aumento significativo em relação aos grupos tratados com BPA (G2 e G4). Em concordância, foi observada uma tendência ao aumento na expressão da PAR4 nesses mesmos grupos. No DPN180 foi observado aumento na incidência de infiltrado inflamatório multifocal na próstata ventral dos grupos G2 e G4. Houve diminuição significativa na incidência de atipia inflamatória reativa no grupo G5 em relação ao grupo G4. Quanto a incidência de hiperplasia/displasia na próstata ventral observou-se redução no grupo G3 em comparação a G2. O índice de proliferação celular no DPN180 apontou redução de células epiteliais em proliferação no grupo G3 em relação a G1. Quanto a apoptose, o grupo G5 apresentou aumento significativo desse índice em relação a G4. A expressão de PAR4 revelou uma tendência ao aumento do índice apoptótico nos grupos G3 e G5 em relação aos demais. Em ambos os períodos houve uma tendência ao aumento na expressão de ER α nos

grupos G2 e G4 em relação aos demais grupos. Os resultados obtidos apontaram para um efeito “protetor” do I3C em animais adultos expostos ao BPA durante a gestação reduzindo os efeitos do *imprinting* estrogênico gestacional sobre a próstata.

Palavras-chave: Bisfenol A; Carcinogênese prostática; Indol-3-Carbinol; Quimioproteção; Toxicologia da reprodução.

ABSTRACT

Environmental factors and life style, such as diet, are able to induce significant changes in the concentration and metabolism of steroid hormones and can contribute with prostatic diseases development. Bisphenol A (BPA) is an organic compound used to make epoxy resins and polycarbonate plastics and has been investigated for its probable carcinogenic activity for breast and prostate. The aim of this study was to investigate if gestational exposure to BPA, supplemented or not with Indole-3-Carbinol (I3C), a natural compound with chemoprotective properties, can modify the prostate development pattern as well as the susceptibility to develop lesions in prostate. Sprague-Dawley pregnant females were divided into five experimental groups: G1: Control (basal chow); G2: BPA25 (25 μ g/Kg) G3: BPA25 (25 μ g/Kg) + I3C; G4: BPA250 (250 μ g/Kg); G5: BPA250 (250 μ g/Kg) + I3C. Selected males from different litters (2/litter) were euthanized in PND21, to study the early effects on prostate morphogenesis and in PND180 to evaluate the late effects. At PND21 and PND180 the animals were euthanized by decapitation, blood was collected to hormone assays and right ventral lobule was used for histopathological evaluation, stereological analysis, immunohistochemistry and TUNEL assay, and the left ventral lobule was frozen and stored in the -80°C freezer for Western Blot analysis. Dorsolateral lobe was collected for histopathologic evaluation at PND180 animals. Prostatic ventral lobe weight at PND21 decreased in the G5 group compared to G4, while at PND180 there was no significant difference in this parameter. At PND21 there was increase in epithelial compartment and decrease in the luminal compartment in G3 and G5 compared to G1. Epithelial cells proliferation index at PND21 was significant higher in G2 and G3 than G1, and apoptosis index in I3C groups (G3 e G5) was higher in relation to G1, G2 and G4. In agreement, increase in the PAR4 expression was verified in G3 and G5. AR immunoreactivity was apparently higher in G2 in DPN21. At PND180, the incidence of multifocal inflammatory infiltrate increased in G2 and G4. There was a significant decrease of reactive inflammatory atypia incidence in G5 in relation to G4 and in hyperplasia/dysplasia incidence in G3 than G2 at PND180. Epithelial cells proliferation index was statistically lower in G3 than in G1, while apoptotic index and PAR4 expression were higher in G3 and G5 than the other groups at PND180. In both the ages there was increase in the ER α expression in G2 and G4 compared to the other groups. The results pointed for a protective effect of I3C in the animals exposed to BPA during pregnancy, reducing the effects of gestational estrogen imprinting on the prostate of adult animals.

Capítulo 1

Revisão de Literatura

1.1 A Próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino constituída de um corpo firme, parcialmente glandular, parcialmente fibromuscular que circunda o começo da uretra. Esta estrutura está localizada em um nível inferior na pelve menor, posterior à margem inferior da sínfise púbica e do arco do púbis e anteriormente à ampola do reto (Williams *et al.*, 1995).

Quanto à função, após a puberdade, a próstata contribui com a produção de nutrientes para o fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e pH adequado nessa secreção (Untergasser *et al.*, 2005).

A próstata se desenvolve a partir da parte pélvica do seio urogenital (SUG) (Timme *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 2004; Prins & Putz, 2008) sendo esta estrutura (SUG) encontrada na base da vesícula urinária em desenvolvimento e seu surgimento em machos e fêmeas de camundongos e ratos ocorre 13 dias após a concepção e, em humanos, após a 7ª semana de gestação. O SUG é morfologicamente indistinguível até o 17º - 18º dia de gestação em ratos e camundongos e até a 10ª - 12ª semana de desenvolvimento em humanos (Marker *et al.*, 2003).

O evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos do epitélio em direção ao mesênquima circundante do SUG. Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento, entretanto, no período neonatal, conforme a invasão desses cordões no mesênquima urogenital ocorre a bifurcação em ramos laterais dando origem a três lobos prostáticos: o lobo ventral, o lobo dorsolateral e a glândula de coagulação ou lobo anterior (Marker *et al.*, 2003). Simultaneamente ao processo de morfogênese de ramificação dos ductos ocorre a canalização ductal (formação do lúmen) e a citodiferenciação epitelial e estromal (Wang *et al.*, 2001; Vilamaior *et al.*, 2006).

A morfogênese prostática é dependente de hormônios esteroides como os andrógenos e os estrógenos, os quais são necessários para o seu desenvolvimento durante os períodos fetal e neonatal (Isaacs *et al.*, 1994). No entanto, a ação androgênica não é exercida diretamente sobre as células epiteliais no início dessa morfogênese. Sob influência de andrógenos, as células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que ditam o crescimento e a diferenciação da glândula prostática (Hayward *et al.*, 1996).

Por outro lado, também existe uma sinalização parácrina do epitélio para o mesênquima. Esta sinalização regula a diferenciação do mesênquima que circunda os brotos em formação em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward *et al.*, 1996).

Além de sua importância durante o desenvolvimento, os andrógenos também são fundamentais para a manutenção da homeostase tecidual prostática no adulto (Ellem & Risbridger, 2009). Neste sentido, a produção androgênica testicular é essencial para o crescimento e manutenção da próstata e também para o desenvolvimento de tumores andrógeno-dependentes (Goyer *et al.*, 2004). Além dos andrógenos, atualmente acredita-se que a diferenciação prostática também seja potencialmente estrógeno-dependente (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009), o que torna a morfogênese e fisiologia desse órgão altamente hormônio-dependente.

Histologicamente, a próstata é constituída por glândulas túbulo-alveolares. O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se sobre uma lâmina basal que repousa sobre um estroma conjuntivo e fibras musculares lisas que circundam os alvéolos e ductos, além de vasos sanguíneos. No estroma podem ser encontradas terminações nervosas entre as células musculares lisas (Ichihara *et al.*, 1978) e associadas ao epitélio (Price, 1963).

No homem, as unidades glandulares dispõem-se em três camadas concêntricas ao redor da parte prostática da uretra onde se abrem os ductos individuais. Periféricamente, uma fina cápsula fibromuscular rica em células musculares lisas envolve a próstata enviando septos que penetram na glândula (Junqueira & Carneiro, 2008). O epitélio das unidades secretoras e seus ductos são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas - as células epiteliais luminiais secretoras - e entre a base destas podem estar distribuídas células menores, achatadas ou arredondadas - as células epiteliais basais, além das células neuroendócrinas, as quais só podem ser distinguidas através de marcações específicas (Ichihara *et al.*, 1978).

Conforme apontado na figura abaixo (Figura 1), a próstata ventral (PV) do rato é constituída de dois hemilobos ventrolaterais que se localizam na base da bexiga urinária e estão conectados com a uretra por uma série de ductos (Shirai *et al.*, 2000), enquanto o lobo dorsolateral (PDL) está localizado ao longo da uretra prostática e forma uma massa macroscópica distinta (Shirai *et al.*, 2000). Estes lobos diferem entre si quanto à topografia, tamanho, composição celular, organização estrutural, secreções, processos secretórios (Jesik *et al.*, 1982; Aumüller & Sitz, 1990; Colombel & Buttyan, 1995) e morfologia (Ito & Shirai, 1990).

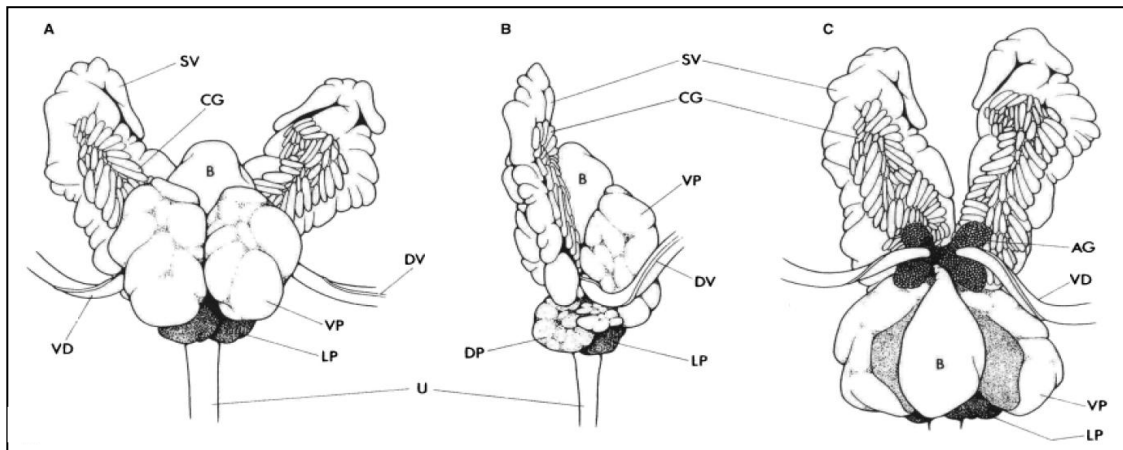


Figura 1 – Órgãos sexuais acessórios do rato macho adulto. A: visão anterior; B: visão lateral; C: visão anterior com a bexiga urinária defletida caudalmente. Glândula ampular do ducto deferente (AG); bexiga urinária (B); glândula de coagulação (CG); próstata dorsal (DP); próstata lateral (LP); vesícula seminal (SV); próstata ventral (VP); ducto deferente (VD); veia diferencial (DV). Extraído de Timms (2008).

Dentre os andrógenos, a testosterona e dihidrotestosterona (DHT) participam ativamente dos processos de crescimento e desenvolvimento da próstata e, de acordo com Culig e colaboradores (2000), a testosterona é convertida na próstata em DHT pela enzima 5α -redutase tipo II, apresentando maior afinidade na interação e ativação do receptor de andrógeno (AR).

Os receptores de estrógeno α e β (ER α e ER β) também apresentam grande importância nos processos de diferenciação e manutenção da próstata (Yang *et al.*, 2007), sendo o ER α encontrado predominantemente nas células estromais, enquanto o ER β predomina no epitélio (Prins & Korach, 2008). No entanto, a ativação estrogênica do ER α é necessária para uma resposta epitelial, e por isso, o estroma deve ser considerado como um componente essencial dos mecanismos de controle regulatório (Ellem & Risbridger, 2009). O aumento da expressão do ER α está relacionado a processos proliferativos, inflamatórios e ao desenvolvimento de lesões pré-malignas, enquanto o aumento da expressão do ER β associa-se a efeitos antiproliferativos (Ellem & Risbridger, 2009).

Desta forma, assim como os andrógenos, os estrógenos exercem funções importantes na homeostasia da próstata. Por isso, o equilíbrio entre esses dois hormônios é essencial para as atividades de crescimento, proliferação e secreção prostática (Scarano *et al.*, 2008), retardando o surgimento de lesões nesse órgão.

1.2 Lesões prostáticas

Possivelmente, a próstata é o órgão mais propenso a doenças do envelhecimento humano masculino (Ho, 2004A) com as desordens prostáticas benignas e malignas estando entre as doenças mais comuns que afetam os homens, principalmente em países industrializados (Ellem & Risbridger, 2010).

O adenocarcinoma prostático, a hiperplasia benigna prostática (HBP) e as prostatites são doenças comuns encontradas com o envelhecimento humano (Blumenfeld *et al.*, 1992; Petrovich *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1997), assim como a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (Epstein, 1995; Bostwick *et al.*, 1995). A HBP é a alteração prostática mais incidente, pois acomete aproximadamente 50% dos homens acima dos 60 anos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009), porém a etiologia dessas patologias prostáticas ou condições patológicas não está completamente esclarecida.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm identificado fatores de risco endógenos e exógenos para cada uma dessas condições (Thornton, 2001; Anway & Skinner, 2006; Bay *et al.*, 2006), no entanto, o envelhecimento parece ser um fator determinante assim como as mudanças hormonais endógenas (Ho, 2004A).

Acredita-se ainda que os eventos do desenvolvimento da próstata sob regulação dos esteroides possam estar ligados a predisposição dessa glândula a altos índices de doenças no homem adulto (Henderson *et al.*, 1988; 1991), uma vez que a próstata é particularmente sensível a exposição hormonal durante a sua morfogênese (Prins *et al.*, 2007).

1.3 Suscetibilidade à carcinogênese

A carcinogênese é um processo biológico complexo e duradouro, de múltiplas etapas, resultante de diversas alterações genéticas e epigenéticas acumulativas que acometem células-alvo, principalmente as de origem epitelial. Esse processo é dividido em iniciação, promoção e progressão, as quais são três fases individualizadas que cronologicamente e sequencialmente contribuem para o desenvolvimento do câncer através da interação de fatores endógenos e exógenos (Loeb *et al.*, 2003; Belpomme *et al.*, 2007; Pitot, 2007; Stricker & Kumar, 2010) (Figura 2).

A iniciação tumoral é resultado de mutações em um ou mais genes celulares envolvidos com vias regulatórias da célula, como diferenciação e apoptose, através da exposição a um carcinógeno químico, físico ou biológico. Essa exposição resulta em alterações celulares discretas ou não detectáveis morfologicamente ou em modificações permanentes e irreversíveis na morfologia tecidual ocasionando aumento na suscetibilidade ao

desenvolvimento tumoral (Pitot, 2007; Vincent & Gatenby, 2008; Stricker & Kumar, 2010). Sabe-se, porém, que a iniciação isolada não é suficiente para formação de neoplasia havendo necessidade, portanto, de um agente promotor para o desenvolvimento tumoral (Stricker & Kumar, 2010) (Figura 2).

A promoção é uma fase reversível, porém pode ocasionar aumento da replicação celular e inibição da apoptose das células iniciadas (Pitot, 2007). As células iniciadas se multiplicam de forma clonal e, sob estímulos promotores, formam lesões pré-neoplásicas. Os carcinógenos promotores atuam sobre essas células ocasionando expansão clonal das mesmas gerando acúmulo de mutações epigenéticas e resultando em instabilidade genética (Pitot, 2007; Vincenti & Gatenby, 2008).

Uma característica essencial da célula mutada/iniciada é sua capacidade de replicação infinita caracterizada por elevados índices de proliferação celular e baixos índices de apoptose (Pitot, 2007; Vincenti & Gatenby, 2008). Nesse momento, as células mutadas são autossuficientes (Figura 2).

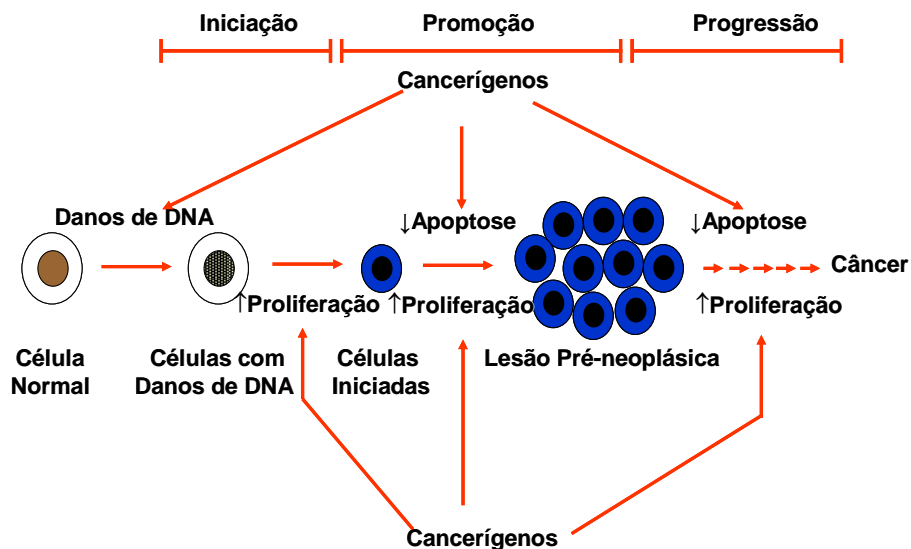


Figura 2 – Etapas da carcinogênese. Cedido por Marcos Correa Dias, arquivo pessoal.

Os modelos de carcinogênese mais aceitos no momento propõem que a célula modificada mantém algumas das características das células progenitoras abortando os processos normais de diferenciação celular (Stricker & Kumar, 2010). Atualmente, muitas evidências indicam que as diferentes etapas da carcinogênese são moduladas pela interação entre as células geneticamente alteradas e elementos do microambiente tecidual destas células

e, é nessa fase, que os tumores apresentam maior agressividade e potencial maligno e suas células estão sujeitas a seleção imune e não imune (Stricker & Kumar, 2010).

No caso das neoplasias masculinas, o câncer de próstata (CaP) é o tipo de neoplasia mais incidente entre os homens quando se desconsidera o câncer de pele não melanoma (INCA, 2012A).

A neoplasia prostática, tanto em humanos quanto em roedores, também apresenta uma base hormonal para sua iniciação e progressão e estes acontecimentos estão relacionados principalmente a alterações envolvendo estrógenos e andrógenos (Noble, 1977; Leav *et al.*, 1988; Shirai *et al.*, 2000; Taplin & Ho, 2001; Ho, 2004A; Landau-Ossondo *et al.*, 2009; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Ellem & Risbridger, 2009) bem como ao tempo de exposição aos estrogênios endógenos (Modugno *et al.*, 2001).

O principal androgênio encontrado na próstata é a testosterona. Sabe-se que o desenvolvimento do CaP comumente ocorre na fase de envelhecimento no qual tanto a síntese de testosterona testicular quanto o nível de testosterona sérico estão diminuídos (Ellem & Risbridger, 2009; 2010). Entretanto, os níveis hormonais intraprostáticos nem sempre refletem os níveis sistêmicos e, por isso, preconiza-se que são os níveis hormonais locais que são importantes para a manutenção adequada da próstata, bem como para o desenvolvimento e progressão de doenças nessa glândula (Ellem & Risbridger, 2010).

Contrariamente, o nível de estradiol permanece inalterado ou até mesmo aumenta com a idade (Ellem & Risbridger, 2009; 2010) devido ao aumento da aromatização dos androgênios adrenais no tecido adiposo periférico, uma vez que esse tecido também tende a aumentar com o envelhecimento (Ellem & Risbridger, 2009). Portanto, nota-se que há uma diminuição natural significativa da proporção testosterona/estradiol com o envelhecimento, fato que se acredita estar associado ao início de doenças prostáticas, inclusive o CaP (Ellem & Risbridger, 2009; 2010).

Entre os diversos tipos de estrógenos exógenos que podem ocasionar alterações prostáticas pode-se citar o grupo dos desreguladores endócrinos, uma vez que esses compostos estão presentes em diversos produtos de uso rotineiro e os humanos estão amplamente expostos a essas substâncias de forma ocupacional ou acidental, sendo esta última a mais frequente.

1.4 Desreguladores endócrinos

O termo desregulador endócrino (DE) foi definido pela *American Environmental Protection Agency* (EPA) como “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção,

transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios que estão presentes no organismo humano e animal e são responsáveis pela homeostase, reprodução e pelo processo de desenvolvimento” (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

De acordo com dados do *American Center for Disease Control (Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, 2005)* os humanos estão expostos a, no mínimo, centenas de químicos ambientais dos quais dezenas deles são conhecidamente DEs e essa exposição pode ocorrer através do ar, alimentação, água ou contato com uma grande variedade de produtos de consumo.

O grupo de moléculas identificado como DEs é altamente heterogêneo e inclui químicos sintéticos utilizados como solventes/lubrificantes industriais e seus subprodutos (bifenis policlorados – PCBs, bifenis polibromados - PBBs, dioxinas), plásticos (bisfenol A – BPA), plastificantes (ftalatos), pesticidas (metoxiclor, clorpirifós, diclorodifeniltricloroetano – DDT), fungicidas (vinclozolin) e compostos farmacêuticos (dietilestilbestrol - DES) (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Alguns DEs foram desenvolvidos para ter meia vida longa e pelo fato dessas substâncias não se deteriorarem facilmente, elas podem ou não ser metabolizadas e gerar produtos mais tóxicos do que o composto original (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Atualmente sabe-se que os DEs agem via receptores nucleares esteroides, receptores hormonais esteroides não nucleares, receptores não esteroides (receptores de serotonina, dopamina, norepinefrina), vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo esteroide e através de vários outros mecanismos que estão associados aos sistemas endócrino e genital (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

O sistema endócrino é sensível aos DEs devido as propriedades semelhantes desses compostos com hormônios endógenos ou de sua afinidade de ligação a receptores específicos (Thornton, 2001) e/ou sua capacidade de alterar enzimas envolvidas na síntese, liberação e degradação hormonal (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Todos os sistemas fisiológicos sensíveis a hormônios tais como o sistema neuroendócrino, cardiovascular, glândula mamária, tecido adiposo, pâncreas, útero e ovário em mulheres e próstata e testículos em homens (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009) são responsivos aos DEs. Porém, diferenças individuais no metabolismo e composição corporal irão criar variabilidades consideráveis na meia-vida e persistência dessas substâncias no organismo, bem como sua degradação nos fluidos corporais e tecidos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Quanto à exposição aos DEs, sabe-se que há um intervalo de tempo entre o período de exposição e a manifestação fisiopatológica, ou seja, as consequências da exposição durante as

fases iniciais de desenvolvimento, por exemplo, podem não ser imediatamente aparentes, mas podem se manifestar na idade adulta e/ou durante o envelhecimento (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Quanto aos indivíduos do sexo masculino, esses compostos podem afetar sua função reprodutiva através de múltiplas vias e diferentes mecanismos (Wong & Cheng, 2011) devido a alterações no sistema endócrino, na esteroidogênese e na expressão gênica por interferência direta ou por exercer alterações epigenéticas (Gray *et al.*, 2001; Benoff *et al.*, 2009; Luparello *et al.*, 2011). Além disso, esses compostos geralmente aumentam o estresse oxidativo através da diminuição da produção de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Liu *et al.*, 2009; Dhanabalan & Mathur, 2009; Chen *et al.*, 2011).

Acredita-se que a vida fetal seja mais vulnerável aos DEs por ocorrerem eventos funcionais e estruturais rápidos e dependentes de hormônios esteroides (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009) como a diferenciação sexual e o desenvolvimento cerebral, respectivamente (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). É importante lembrar que a organização do controle neuroendócrino da reprodução não está completa ao nascimento e permanece sensível a interações dos esteroides e DEs neonatais (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Em relação à próstata, sabe-se que ela é particularmente sensível a exposição ao estrogênio durante o período crítico de desenvolvimento (Prins *et al.*, 2007) e tem-se conhecimento de que os eventos prostáticos ocorridos nesse período, os quais são regulados por esteroides, podem estar ligados à predisposição dessa glândula a altos índices de doenças em homens adultos e senis (Henderson *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 1991), como o CaP.

Há estudos epidemiológicos e em modelos animais que indicam a associação entre DEs, CaP, carcinogênese e/ou suscetibilidade (Prins, 2008) e acredita-se que os DEs, em geral, atuem como estrogênios e/ou antagonizem androgênios, assim como podem atuar ativando ou antagonizando receptores hormonais (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

De acordo com Sheehan e colaboradores (1999) a exposição a qualquer nível de DEs pode causar anormalidades reprodutivas ou endócrinas, particularmente se a exposição ocorre durante o período crítico de desenvolvimento. Contrariamente ao esperado, a exposição a baixas doses pode exercer efeitos mais significativos que altas doses, sendo que os DEs podem apresentar uma curva dose-resposta não tradicional, como é o caso da curva U invertida (Welshons *et al.*, 2003; vom Saal & Hughes, 2005; vom Saal *et al.*, 2007).

Em modelos animais observou-se que a exposição gestacional a baixas doses de xenoestrógenos (vom Saal *et al.*, 1997; Welshons *et al.*, 2003; Welshons *et al.*, 2006) ou exposição pós-natal do tecido prostático normal a altas doses desses compostos (Prins *et al.*,

2007) – processo chamado em ambos os casos de „*imprinting* estrogênico” – podem aumentar a suscetibilidade a carcinogênese (Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2008) causando alterações permanentes no desenvolvimento prostático (Prins *et al.*, 2001) como o surgimento de lesões do tipo PIN, atipias epiteliais e até mesmo CaP em adultos (McLachlan, 2001; Prins *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2008).

Putz e colaboradores (2001) observaram aumento do peso prostático em ratos machos que receberam baixas doses de benzoato de estradiol, enquanto os que foram expostos a altas doses apresentaram diminuição no peso da glândula. Waisberg e colaboradores (2003) concluem portanto, que estudos que avaliam doses ambientalmente relevantes devem incluir também baixas doses para avaliar o impacto carcinogênico de um DE.

1.5 Bisfenol A

O bisfenol A (BPA) (Figura 3) é um composto industrial utilizado como componente de plásticos policarbonatos, resinas epóxi e selantes dentários (Kang *et al.*, 2006; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Rubin, 2011).

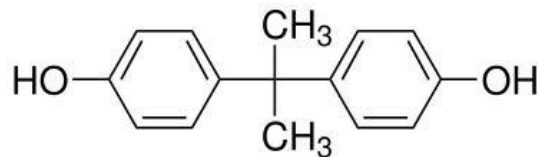


Figura 3 – Estrutura química do bisfenol A (extraído de: www.infoescola.com)

As resinas epóxi são utilizadas como revestimento de latas de alimentos e tampas de metal, acabamentos, adesivos e revestimento de tubulações de PVC, enquanto os policarbonatos plásticos são utilizados na fabricação de discos compactos, eletrodomésticos, embalagens de alimentos e garrafas plásticas com elevada resistência a impacto, dureza e tenacidade (Howdeshell *et al.*, 2003; Hess-Wilson, 2009; Vogel, 2009; Rubin, 2011).

Devido ao aumento de produtos revestidos com BPA, a fabricação e exposição a essa substância tem aumentado mundialmente desde a década passada (Tsai, 2006) e grande parte dessa exposição em humanos ocorre através de alimentos (vom Saal & Hughes, 2005; Kang *et al.*, 2006) como vegetais enlatados, peixes, carnes, laticínios e fórmulas infantis (Munguia-Lopez & Soto-Valdez, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Munguia-Lopez *et al.*, 2005).

As ligações carbonato entre os polímeros são inicialmente estáveis, porém podem hidrolisar quando expostas a altas temperaturas ou a substâncias ácidas/básicas (Kang *et al.*,

2006; Rubin, 2011) causando migração do BPA dos plásticos após a lavagem, esterilização, desgaste e uso geral (Tsai, 2006).

Em virtude de seu uso generalizado e da alta exposição a que os humanos estão sujeitos, esse composto se tornou o químico com atividade estrogênica mais estudado (Rubin, 2011). Estudos epidemiológicos com seres humanos têm correlacionado os níveis de BPA e patologias (Rubin, 2011). Baseado na pesquisa NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) do *American Center for Disease Control* (CDC) de 2003-2004, o BPA foi detectado em níveis relevantes em cerca de 90% dos americanos (Howdeshell *et al.*, 2003; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009), sendo essa exposição maior em crianças em comparação a adolescentes e com os adolescentes apresentando níveis mais elevados do que adultos (Howdeshell *et al.*, 2003). Esta é uma observação importante, pois demonstra a grande exposição ao BPA durante o período de desenvolvimento pré púbere (Rubin, 2011).

Outros estudos experimentais, epidemiológicos e *in vitro* fornecem evidências de que os níveis de BPA detectados em humanos em pesquisas de biomonitoramento, os quais estão no intervalo de 0,3-4ng/mL, podem desregular ou interferir nos processos de desenvolvimento e função celular com desfechos adversos em humanos (Braun *et al.*, 2009; Vandenberg *et al.*, 2010; Meeker *et al.*, 2010).

De acordo com o *National Toxicology Program* da *American Environmental Protection Agency* (EPA), a dose diária segura de ingestão de BPA para humanos é de 50µg/Kg/dia (EPA, 2012) e, segundo Kang e colaboradores (2006) acredita-se que a dose diária de ingestão de BPA seja menor que 1µg/Kg/dia. Porém, Howe e colaboradores (1998) estimaram o consumo humano de BPA em cerca de 6,6µg por pessoa por dia somente a partir de latas de alimentos revestidas com compostos epóxi.

Em relação à exposição ao BPA durante o período de desenvolvimento sabe-se que diversas doenças nos adultos, incluindo o câncer, podem ter sua origem durante a vida fetal e neonatal períodos nos quais a arquitetura e homeostase tecidual são estabelecidas (Barker, 2004; Fowden & Forhead, 2004; Ismail-Beigi *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2007). Isso é particularmente evidente para os desreguladores endócrinos que podem levar à disfunção de vários órgãos alvo dos esteroides sexuais (vom Saal *et al.*, 1997; Xita & Tsatsoulis, 2006), entre eles a glândula prostática (Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2008).

Keri e colaboradores (2007) acreditam que há possibilidade da exposição a baixas doses de BPA atuar como iniciador tumoral, embora a evolução dessa doença necessite de eventos promotores subsequentes para induzir a carcinogênese. Porém, os dados da literatura ainda são controversos a esse respeito.

Diversos estudos com roedores que utilizaram doses de BPA abaixo da atual dose de referência preconizada pelo EPA ($50\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) durante o período de desenvolvimento observaram uma gama de efeitos adversos no sistema genital de machos e fêmeas (vom Saal *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2009). Richter e colaboradores (2007) em estudo com humanos e Rubin (2011) em trabalho com roedores observaram que o BPA em doses abaixo do padrão de segurança apresenta associação com o aumento da incidência de câncer de mama e próstata, anormalidades cromossômicas, cerebrais e comportamentais e desordens metabólicas.

Estudos experimentais mostraram que a exposição de camundongos fêmeas *CD-1* ao BPA via oral ($10\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) dos dias 14-18 de gestação resultou em aumento do tamanho e índice de proliferação das células epiteliais basais da próstata dorsolateral, aumento do volume prostático e malformação da uretra dos filhotes machos (Timms *et al.*, 2005). Contrariamente, trabalhos que avaliaram o impacto da exposição ao BPA na próstata não encontraram mudanças significativas em ratos *Sprague-Dawley* (Tyl *et al.*, 2002), *Fischer* (Yoshino *et al.*, 2002) ou camundongos *CF-1* (Ashby *et al.*, 1999), levando a controvérsia nesse ponto (Ashby, 2001; vom Sasal & Hughes, 2005). Segundo Keri e colaboradores (2007), apesar da mudança do tamanho prostático em alguns estudos, não está claro se essa alteração está relacionada à maior suscetibilidade ao câncer.

Keri e colaboradores (2007) mostraram que ratos machos senis *Sprague-Dawley* que não receberam suplementação crônica de esteroides sexuais (estradiol e testosterona) durante 16 semanas desde o dia pós-natal 90 e que foram expostos ao BPA ($10\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$) nos dias pós-natal 1, 3 e 5 não apresentaram PIN ou outras lesões prostáticas. Entretanto, os ratos expostos ao BPA e que foram estimulados com estradiol apresentaram aumento significativo na incidência de PIN e outras lesões prostáticas. Essas lesões apresentaram atipias nucleares severas, hiperplasia e adenocarcinomas, com aumento dos índices de proliferação e apoptose. Esses dados sustentam a hipótese de que a exposição precoce a compostos estrogênicos, principalmente ao estradiol, pode aumentar a suscetibilidade à atividade carcinogênica dos esteroides sexuais.

Sabe-se que o BPA se liga a ambos os subtipos (α e β) de receptor de estrógeno bem como ao receptor de andrógeno (AR). De acordo com Kuiper e colaboradores (1998), Lemmen e colaboradores (2004) e Rubin (2011) a afinidade de ligação relativa do BPA com os receptores estrogênicos $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$ é aproximadamente 1.000 a 10.000 vezes menor do que com estradiol ou dietilestilbestrol (DES). Esses dados sugerem, portanto, que o BPA apresenta somente uma modesta atividade estrogênica (Keri *et al.*, 2007; Rubin, 2011), porém

outros estudos relatam que embora o BPA possa ter um potencial menos significativo que os estrogênios endógenos, *in vitro* ele é um forte agonista, tanto do ER α quanto do ER β (Song *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009) podendo estimular algumas respostas celulares mesmo em baixas concentrações (Rubin, 2011).

Esses dados mostram que a exposição perinatal a estrogênios endógenos ou exógenos estimula o crescimento prostático fetal/neonatal com consequências permanentes para a função prostática e doença tardia (Taylor *et al.*, 2011), além de poder modificar essa glândula através de alterações epigenéticas resultando na predisposição a carcinogênese (Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2008).

Contrariamente ao BPA, sabe-se que os alimentos possuem diversos compostos que podem apresentar efeitos benéficos à saúde humana, como é o caso dos fitoquímicos, pois esses compostos estão relacionados a efeitos proapoptóticos, anti-inflamatórios e antiproliferativos (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

1.6 Indol-3-Carbinol

Os mecanismos pelos quais os fatores dietéticos conferem proteção contra o câncer são ainda desconhecidos e complexos. Alguns autores têm sugerido que a indução de apoptose está predominantemente envolvida na redução ou inibição da iniciação e progressão de neoplasias (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Su e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição *in útero* a dietas contendo isoflavonas de soja e genisteína pode conferir proteção contra o desenvolvimento de tumores mamários na vida adulta.

Além dos componentes da soja, outra molécula que vem sendo amplamente investigada pelas suas propriedades anticarcinogênicas para fígado, pulmão, cólon, endométrio, próstata e mama é o Indol-3-Carbinol (I3C), um componente natural encontrado em altas concentrações nos vegetais da família das *Brassicas* que incluem brócolis, couve-flor, couve-flor de Bruxelas e couve (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Kim & Milner, 2005). Como suplemento, o I3C tem recebido atenção nos últimos anos como um agente de prevenção e tratamento promissor para câncer de mama e outros tipos de câncer e pode ter efeito benéfico no tratamento do Herpes simplex vírus (HSV) e vírus do papiloma humano (HPV) (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Kim & Milner, 2005; Weng *et al.*, 2008). Em células hormônio-dependente como células neoplásicas prostáticas e mamárias, o I3C suprime a capacidade de resposta ao estrogênio, diminui a regulação da expressão do ER α (Sundar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) e tem sinergia com os efeitos antiproliferativos do tamoxifeno,

um antiestrogênico amplamente utilizado em terapias contra o câncer de mama (Cover *et al.*, 1999).

Evidências experimentais indicam que o I3C estimula a supressão do crescimento e indução de apoptose, interferindo numa ampla gama de vias sinalizadoras ligadas a regulação e sobrevivência celular, incluindo as vias mediadas pela Akt, fator nuclear- κ B (NF- κ B), Bcl-2, MAPK e algumas CDKs, sendo proposto como um composto potencialmente antitumoral na próstata e em outros órgãos (Weng *et al.*, 2008).

Capítulo 2

Artigo Científico

**O Indol-3-Carbinol atenua os efeitos da exposição gestacional ao
Bisfenol A na próstata de ratos *Sprague-Dawley***

Brandt JZ¹, Grassi TF², Silveira LTR¹, Barbisan LF¹, Scarano WR^{1*}

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina

UNESP, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil.

*** Autor para correspondência:**

Wellerson Rodrigo Scarano

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Botucatu-SP

CEP 18618-970

Fone: 14 3880-0475

E-mail: scarano@ibb.unesp.br

RESUMO

Sabe-se que fatores ambientais e de estilo de vida, tais como a dieta, são capazes de induzir significativas mudanças na concentração e no metabolismo dos hormônios esteroides, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças prostáticas. O Bisfenol A (BPA) é um componente dos produtos a base de resinas epóxi e plásticos policarbonato e tem sido investigado por sua provável atividade carcinogênica para a mama e próstata. O objetivo geral desse trabalho foi investigar se a exposição gestacional ao BPA suplementado ou não com Indol-3-Carbinol (I3C), um composto natural com propriedades quimioprotetoras, interfere no padrão de desenvolvimento da próstata, bem como na suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 5 grupos experimentais: G1: Controle (ração basal); G2: BPA25 (25µg/Kg); G3: BPA25 (25µg/Kg) + I3C; G4: BPA250 (250µg/Kg); G5: BPA250 (250µg/Kg) + I3C. Machos selecionados de diferentes ninhadas (2/ninhada) foram eutanasiados no DPN21 para avaliação imediata sobre a morfogênese prostática e no DPN180 para avaliação dos efeitos tardios. No DPN21 e DPN180 os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado para análises hormonais e os hemilobos ventrais direitos separados para rotina histológica, análise estereológica e imuno-histoquímica, e os esquerdos congelados em nitrogênio líquido para o Western Blot. O lobo dorsolateral foi coletado no DPN180 para avaliação histopatológica. O peso do lobo ventral da próstata reduziu no grupo G5 em relação a G4, enquanto no DPN180 não houve diferença nesse parâmetro. Com relação à estereologia no DPN21 evidenciou-se aumento do compartimento epitelial e diminuição do compartimento luminal nos grupos G3 e G5. Quanto ao índice de proliferação celular no DPN21 observou-se aumento nos grupos G2 e G3 em relação ao G1. Já em relação ao índice de apoptose, nos grupos suplementados com I3C (G3 e G5) houve aumento significativo em relação aos grupos tratados com BPA (G2 e G4). Em concordância, foi observada uma tendência ao aumento na expressão da PAR4 nesses mesmos grupos. No DPN180 foi observado aumento na incidência de infiltrado inflamatório multifocal na próstata ventral dos grupos G2 e G4. Houve diminuição significativa na incidência de atipia inflamatória reativa no grupo G5 em relação ao grupo G4. Quanto a incidência de hiperplasia/displasia na próstata ventral observou-se redução no grupo G3 em comparação a G2. O índice de proliferação celular no DPN180 apontou redução de células epiteliais em proliferação no grupo G3 em relação a G1. Quanto a apoptose, o grupo G5 apresentou aumento significativo desse índice em relação a G4. A expressão de PAR4 revelou uma tendência ao aumento do índice apoptótico nos grupos G3 e G5 em relação aos demais. Em ambos os períodos houve uma tendência ao aumento na expressão de ER α nos

grupos G2 e G4 em relação aos demais grupos. Os resultados obtidos apontaram para um efeito “protetor” do I3C em animais adultos expostos ao BPA durante a gestação, reduzindo os efeitos do *imprinting* estrogênico gestacional sobre a próstata.

Palavras-chave: Bisfenol A; Carcinogênese prostática; Indol-3-Carbinol; Quimioproteção; Toxicologia da reprodução.

INTRODUÇÃO

O Bisfenol A (BPA) é alvo de grande atenção nos últimos anos em virtude de seu amplo uso industrial, da alta exposição a que os humanos estão sujeitos e por apresentar atividade estrogênica (Durando *et al.*, 2007; Rubin, 2011). Baseado na pesquisa NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) do *American Center for Disease Control* (CDC) de 2003-2004, o BPA foi detectado em níveis relevantes em cerca de 90% dos americanos (Howdeshell *et al.*, 2003; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Considerado um desregulador endócrino, o BPA é utilizado no processo de fabricação de plásticos policarbonato e resinas epóxi (Kang *et al.*, 2006; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Rubin, 2011). As resinas epóxi são utilizadas como revestimento de latas de alimentos e tampas de metal, acabamentos e revestimento de tubulações de PVC, enquanto o policarbonato é utilizado na fabricação de eletrodomésticos, embalagens de alimentos e garrafas plásticas, mamadeiras e muitos outros produtos (Krishnan *et al.*, 1993; Markey *et al.*, 2001; Howdeshell *et al.*, 2003; Welshons *et al.*, 2006; Hess-Wilson, 2009; Vogel, 2009; Rubin, 2011).

Dados da literatura sobre a segurança deste produto são controversos. Investigações sobre a segurança do BPA têm mostrado que os produtos de consumo com resíduos de BPA são seguros para utilização e sem riscos conhecidos para a saúde humana (Haighton *et al.*, 2002). Contrariamente, estudos *in vivo* têm demonstrado efeitos adversos em doses abaixo da dose diária segura de ingestão para humanos que é de 50µg/Kg/dia (EPA, 2012) (Welshons *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006). Nos EUA, Europa e Japão, os níveis de BPA em soro humano de adultos, de fetos e no leite materno estão na faixa de 0,2 a 10ng/mL (~ 0,5-40nM) (Sun *et al.*, 2004; Welshons *et al.*, 2006; Kuruto-Niwa *et al.*, 2007;) indicando que a exposição a essa substância também ocorre durante o período de amamentação, pois o BPA é lipofílico e pode acumular-se em tecido adiposo e ser detectado em amostras de tecido adiposo mamário (Fernandez *et al.*, 2007).

Vários estudos também detectaram a presença de BPA no soro de mulheres grávidas, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico e plasma fetal sugerindo que os embriões e fetos são expostos ao BPA durante a gestação (Ikezuki *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2006). Devido sua presença comum no meio ambiente e sua atividade estrogênica, os efeitos adversos potenciais da exposição ao BPA para a saúde humana são uma preocupação constante (Colerangle & Roy, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Markey *et al.*, 2001).

Contrariamente ao BPA, sabe-se que os alimentos possuem diversos compostos que podem apresentar efeitos benéficos à saúde humana, como é o caso dos fitoquímicos, uma vez que esses compostos têm sido relacionados a efeitos proapoptóticos, anti-inflamatórios e antiproliferativos (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais esses compostos naturais conferem proteção contra o câncer são ainda desconhecidos e complexos. Alguns autores têm sugerido que a indução de apoptose está predominantemente envolvida na redução ou inibição da iniciação e progressão de neoplasias (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Su e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição *in útero* a dietas contendo isoflavonas de soja e genisteína pode conferir proteção contra o desenvolvimento de tumores mamários na vida adulta.

Além dos componentes da soja, outra molécula que vem sendo amplamente investigada pelas suas propriedades quimioprotetoras para fígado, pulmão, cólon, endométrio, próstata e mama é o Indol-3-Carbinol (I3C), o principal composto bioativo encontrado em altas concentrações nos vegetais da família das *Brassicaceae* que incluem brócolis, couve-flor, couve-flor de Bruxelas e couve (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Kim & Milner, 2005; Wu *et al.*, 2011).

O I3C tem recebido atenção nos últimos anos como um agente de prevenção e tratamento promissor para o câncer de mama, cólon e outros tipos de neoplasia (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Kim & Milner, 2005; Weng *et al.*, 2008). Em células hormônio-dependente como as células neoplásicas prostáticas e mamárias, o I3C suprime a capacidade de resposta ao estrogênio e diminui a regulação da expressão do receptor de estrógeno alfa (Sundar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Tendo em vista que o BPA pode causar alterações histopatológicas relevantes a longo prazo quando administrado no período de morfogênese prostática, o objetivo geral desse trabalho foi investigar se a exposição gestacional ao I3C reverte os efeitos deletérios do BPA sobre o padrão de desenvolvimento da próstata, bem como na suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas na vida adulta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos e fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley* em idade reprodutiva foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP (Campinas/SP) e mantidos no biotério do Departamento de

Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os animais foram distribuídos em duas fêmeas e um macho adulto para acasalamento e, posteriormente, a prole em três machos por gaiola de polipropileno de 41x34x16cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas duas vezes por semana.

Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração comercial (Nuvilab CR1 – Nuvital, PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico com capacidade para 500mL. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Foi realizado consumo de água e ração semanalmente. Durante o experimento os animais passaram por avaliação semanal. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (Protocolo n° 281-CEEA).

Preparo da ração com indol-3-carbinol

Indol-3-Carbinol (CAS n° 700-06-1 Sigma-Aldrich[®], EUA) foi adicionado e misturado a ração em pó Nuvilab CR1 – Nuvital, PR na concentração final de 2.000mg/kg de ração. Após completa homogeneização e umidificação, realizada em misturador industrial (CAF-modelo M60), a ração foi peletizada em máquina peletizadora de ração (Chavantes – PR), seca por ventilação e acondicionada em sacos plásticos previamente identificados e mantida sob refrigeração (-8°C) até o momento do uso.

Delineamento experimental

Após o período de aclimatação três fêmeas sexualmente virgens foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). A presença de esperma no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da fase de estro foram considerados como indicadores do dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas.

Grupos de fêmeas prenhes foram expostas ao Bisfenol A - BPA (CAS n° 80-05-7 Sigma-Aldrich Co[®], EUA) por via oral (gavagem) nas concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo ou volume equivalente de dimetilsulfóxido (DMSO - veículo de diluição do BPA) do dia DG10 até o DG21 (Marker *et al.*, 2003; Vilamaior *et al.*, 2006; Prins *et al.*,

2007). Durante esse período as fêmeas receberam ração basal ou ração acrescida de Indol-3-Carbinol e água *ad libitum*. Sendo assim, constituíram-se cinco grupos experimentais: G1: Controle (DMSO + ração basal); G2: BPA25 + ração basal; G3: BPA25 + ração acrescida de I3C; G4: BPA250 + ração basal; G5: BPA250 + ração acrescida de I3C.

Após o nascimento o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, sendo quatro fêmeas e quatro machos. Após o desmame (DPN21) e na idade adulta (DPN180), dois animais machos por ninhada foram eutanasiados por decapitação para a avaliação dos efeitos imediatos (DPN21) e tardios (DPN180) sobre a próstata. No DPN21 e DPN180 os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado para análises hormonais e os hemilobos ventrais direitos separados para rotina histológica, análise estereológica, imunohistoquímica e TUNEL, e os esquerdos congelados em nitrogênio líquido para análise por Western Blot. O lobo dorsolateral foi coletado no DPN180 para avaliação histopatológica.

Dosagem hormonal sérica (DPN 21 e 180)

Após a decapitação foi coletado sangue em tubos de ensaio de 15mL. O material foi centrifugado a 3.000r.p.m., 4°C, por 20 minutos e o soro separado e congelado para análise. A análise sérica foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas Veterinária VETPAT, Campinas/SP por quimioluminescência para dosagem de estradiol nos animais no DPN 21 e 180. As dosagens foram realizadas em equipamento automatizado Elecsys (Roche®), kit Estradiol II E2, sensibilidade do teste: 5pg/mL, linearidade: 4.300pg/mL. As dosagens de testosterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/SP - USP, por radioimunoensaio de duplo-anticorpo utilizando o kit Coat-A-Count® (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, EUA) somente para os animais do DPN180. As variações intra e interensaio foram de 1,75% e 20%, respectivamente.

Microscopia de luz

Os fragmentos de próstata ventral removidos foram fixados por imersão em metacarn (Putchler *et al.*, 1970) por três horas e incluídos em Paraplast® (Sigma-Aldrich®). Cortes de 5µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Após a microtomia, os cortes do material incluído em Paraplast® foram submetidos às seguintes colorações:

- 1- **Hematoxilina-Eosina (HE)** para estudo morfológico e morfométrico de ordem geral, análises dos tipos e incidência de lesões.

- 2- **Impregnação pela prata** para evidenciar fibras reticulares.
- 3- **Picrossírius-hematoxilina** para evidenciar fibras colágenas.

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando um sistema analisador de imagens (Axio Vision 4.8) acoplado a fotomicroscópio AxioLab.A1, Zeiss®.

Análise estereológica

Foi realizada a análise morfométrico-estereológica segundo Weibel (1963) na qual se utiliza um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 168 pontos. Assim, obteve-se a proporção de cada grupo para os seguintes componentes prostáticos: lúmen, epitélio e estroma nos dois períodos analisados.

Análise histopatológica: estimativa da frequência de lesões

Os cortes histológicos das próstatas ventral e dorsolateral no DPN180 coradas pela hematoxilina & eosina foram submetidas à análise de incidência das seguintes lesões: inflamação focal e multifocal, atipia inflamatória reativa, PIA (*Proliferative Inflammatory Atrophy*), PIN (*Prostatic Intraepithelial Neoplasia*), hiperplasia/displasia e adenocarcinoma microinvasivo. As lâminas foram pré-identificadas para análise do tipo “cega”. Considerou-se positiva para a identificação de determinada lesão a presença desta no corte histológico. Foram analisadas 8 lâminas por grupo experimental (1 lâmina/animal).

Análise imuno-histoquímica

Fragmentos da próstata ventral foram incluídos em Paraplast® conforme descrito anteriormente. Os cortes provenientes do material fixado em metacarn foram submetidos a recuperação antigênica em ambiente úmido a 100°C em tampão Tris/EDTA, pH=9,0 por 30 minutos. Após a lavagem em água destilada os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3% em metanol) por 15 minutos. Em seguida os cortes foram cobertos com BSA 3% acrescido de soro não imunogênico de cabra (1%) para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após esses procedimentos foram realizadas as reações imuno-histoquímicas para a identificação do marcador de proliferação celular: Ki-67 – clone ab16667 (Abcam®, Inc., Cambridge, EUA), receptor de andrógeno: AR – clone sc-816 (Santa Cruz Biotechnology®, Inc., Dalas, Texas, EUA). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo secundário HRP (IgG goat-anti rabbit,

ab-97051, Abcam[®] Inc.) e, posteriormente, a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes foram contra-corados com hematoxilina.

Deteção de fragmentação de DNA associada a apoptose

Cortes em Paraplast[®] dos animais no DPN21 e DPN180 foram submetidos à digestão por Proteinase K. Os cortes foram processados segundo as instruções do Kit apoptose (TdT-FragEl – Oncogene), o qual é baseado na reação de TUNEL. A marcação foi revelada com DAB e os cortes foram contra-corados com *methylgreen*. O índice de apoptose foi determinado contando-se todos os núcleos de, pelo menos, 10 campos microscópicos em objetiva de 20X das próstatas de cada grupo experimental. A proporção de células apoptóticas foi expressa em relação ao número total de células contadas.

Determinação do índice de proliferação e apoptose

Os índices de proliferação celular (células Ki-67 positivas) e morte celular (TUNEL positivas) no tecido prostático foram determinados contando-se todos os núcleos de, pelo menos, 50 campos microscópicos em objetiva de 20X das próstatas de cada grupo experimental. A proporção de células em proliferação e em apoptose foi determinada dividindo-se o número de células marcadas pelo número de células analisadas (~2.000 células por próstata) e, finalmente, o valor multiplicado por 100 para cada animal nos diferentes tratamentos.

Western Blot

As amostras da próstata ventral foram mantidas a -80°C após a eutanásia até o início das análises. O tecido foi homogeneizado a 4°C em tampão RIPA acrescido de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich[®], EUA) em homogeneizador do tipo Tureaux (Ultra Stirrer – Ultra80) em 3 ciclos de 10 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000r.p.m., por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford em placas de ELISA com 96 poços e leitura em leitor de ELISA (595nm).

As alíquotas (70µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (Laemli Sample Buffer – BIO-RAD[®]) e β-mercaptoetanol a 100°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese transferidas para a membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da

incubação das membranas em BSA 3% em tampão TBST por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários: ER α – clone ab80922 (Abcam[®], Inc., Cambridge, EUA); PAR4 - clone sc-1666 (Santa Cruz Biotechnology[®], Inc., Dalas, Texas, EUA); β -actina - clone sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology[®], Inc., Dalas, Texas, EUA) em BSA 1% diluído em TBST overnight em geladeira. Após 4 ciclos de lavagem em TBST, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico HRP (IgG goat-anti rabbit, ab97051, Abcam[®] Inc. ou IgG goat-anti mouse, ab97023, Abcam[®] Inc.) diluído em BSA 1% e em TBST por 2 horas em temperatura ambiente. Após 4 ciclos de lavagem em TBST, os componentes imunorreativos foram revelados por quimioluminescência (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific).

Análise estatística

Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos experimentais através do software GraphPad Prism[®] pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (comparação aos pares entre G2/G3 e G4/G5), exceto para a incidência de lesões histopatológicas no DPN180 em que foi utilizada tabela de contingência seguida do teste de Fisher, no qual todos os grupos foram comparados dois a dois para próstata ventral e dorsolateral. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p \leq 0,05$. Dados expressos em porcentagem foram mostrados pela mediana seguido pelo intervalo interquartil [Q1-Q3]. Os dados absolutos foram expressos pela média \pm DP. Os dados de incidência foram expressos em porcentagem.

RESULTADOS

Avaliação imediata (DPN21)

Com relação ao peso corporal no DPN21 observou-se que houve diminuição no peso dos animais dos grupos G2 e G5 em relação ao grupo G1. Notou-se ainda que os animais dos grupos G5 tiveram redução do peso corporal quando comparados a G4 (Tabela 1).

Quanto ao peso da próstata, o peso do lobo ventral dos grupos G3 e G4 foi maior quando comparado ao do grupo G1. No entanto, os animais do grupo G5 tiveram o peso da próstata reduzido em relação ao grupo G4 (Tabela 1).

A dosagem hormonal sérica de estradiol não diferiu estatisticamente entre os grupos experimentais (Tabela 1). A análise estereológica mostrou que a proporção relativa do epitélio aumentou significativamente nos grupos suplementados com I3C: G3 e G5 (Tabela 1). Em relação ao compartimento estromal, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, enquanto o compartimento luminal apresentou diminuição significativa nos grupos que receberam I3C (Tabela 1).

Os grupos tratados com BPA apresentaram numerosos ácinos de pequeno tamanho (diâmetro luminal menor) (Figuras 1: d, g, j e m) quando comparados ao grupo G1. A suplementação com I3C mostrou que os ácinos mesmo menores tiveram um padrão de ramificação e desenvolvimento intermediário entre o grupo G1 e os não suplementados com I3C (Figuras 1: g e m). Nos grupos G2-G5 houve aumento na densidade das fibras colágenas e reticulares ao redor dos ácinos em relação a G1 (Figuras 1: b-c, e-f, h-i, k-l, n-o). Nos grupos G3 e G5 o estroma pareceu menos denso em células e fibras (Figuras 1: h-i, n-o) quando comparados aos grupos G2 e G4 (Figuras 1: e-f, k-l).

O índice de proliferação celular das células prostáticas apresentou aumento nos grupos G2 e G3 em relação a G1 (Figura 2A). Já em relação ao índice de apoptose, nos grupos suplementados com I3C (G3 e G5) houve aumento significativo desse índice em relação ao grupo G1 e em comparação aos grupos G2 e G4 (Figura 2B). Em concordância, foi observada uma tendência ao aumento na expressão da Par4 nesses mesmos grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

A imunorreatividade para o AR apresentou-se predomínio nuclear e aparentemente, foi mais intensa no grupo G2 em relação aos demais grupos (Figura 7).

Quanto à expressão do ER α houve uma tendência ao aumento em sua expressão nos grupos G2 e G4 em comparação aos demais grupos, porém somente o grupo G2 apresentou diferença significativa em relação a G1 (Figura 3).

Avaliação tardia (DPN180)

Com relação ao peso corporal e do lobo ventral da próstata no DPN180 não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 2), assim como para a dosagem hormonal sérica de testosterona e estradiol (Tabela 2).

A análise estereológica mostrou que não houve diferença entre a proporção relativa do epitélio nos grupos experimentais em relação ao grupo G1, assim como entre os grupos G2 e G3 e entre G4 e G5 (Tabela 2). Quanto ao estroma houve diminuição da sua proporção no grupo G5 em comparação ao grupo G1 (Tabela 2) e diminuição no grupo G5 em relação ao G4 (Tabela 2). Por fim, em relação ao compartimento luminal observou-se que somente o grupo G5 diferiu significativamente de todos os grupos, apresentando um aumento desse compartimento (Tabela 2).

A análise histopatológica da parte distal da próstata ventral mostrou que os animais do grupo G1 apresentaram regularidade na arquitetura glandular, com ácinos constituídos predominantemente por epitélio simples e colunar baixo, apoiado por um estroma fibromuscular delicado (Figuras 4: a-d). No grupo G2 foi observada incidência de infiltrado inflamatório multifocal em 75% das PVs dos animais (Figuras 4: e-h; Tabela 3). Esse infiltrado caracterizou-se pelo predomínio de células mononucleadas (inflamação crônica). Além disso, atipias epiteliais inflamatórias reativas foram observadas principalmente associadas às áreas inflamadas, algumas semelhantes a neoplasias intraepiteliais (PIN) papilares (Figura 4f). Esse grupo também apresentou pregueamento no epitélio acinar diminuindo, aparentemente, o lúmen dos ácinos (Figura 4d).

Já nos animais do grupo G3 apenas 25% das PVs apresentaram inflamação multifocal (Figura 4j; Tabela 3). Além disso, nesse grupo, os ácinos prostáticos mostraram-se mais amplos e pouco pregueados (Figura 4i) e a ocorrência de atipia epitelial foi semelhante ao grupo G2 (Tabela 3).

O grupo G4 apresentou ácinos prostáticos mais amplos em relação ao grupo G2 porém, mais pregueados em relação ao grupo G1 (Figura 4m). Todos os animais desse grupo apresentaram infiltrado inflamatório focal ou multifocal, considerando-se a PV e PDL (Figuras 4: m e o). Ainda nesse grupo, em algumas regiões foi observada a formação de microácinos (Figura 4n).

O grupo G5 apresentou ácinos mais regulares e amplos, semelhantes ao grupo G1 (Figura 4q). Além disso, não foi verificada a presença de processos inflamatórios no estroma desses animais e o epitélio secretor mostrou-se predominantemente mais baixo em relação aos demais grupos (Figuras 4: r-s; Tabela 3).

A citoquímica para fibras reticulares mostrou marcação predominante no estroma delimitando a membrana basal das células epiteliais, das células musculares lisas e dos vasos sanguíneos (Figuras 4: c, g, k, o, s). Nos grupos G2 e G4, devido à presença de infiltrado inflamatório adjacente ao epitélio, as fibras reticulares apresentaram-se mais delgadas em meio às células inflamatórias (Figura 4g). Nesses grupos, as fibras colágenas foram observadas em meio às células inflamatórias, configurando um rearranjo do estroma periacinar, onde apareceram mais delgadas e descontínuas (Figuras 4: h, p). Nos grupos G1, G3 e G5 a distribuição e arranjo das fibras colágenas foram semelhantes (Figuras 4: d, l, t).

De acordo com a incidência de lesões histopatológicas observou-se aumento significativo na incidência de inflamação multifocal para PV nos grupos G2 e G4 em relação a G1 e diminuição nesse parâmetro no grupo G5 em relação a G4 (Tabela 3). Quando avaliada a incidência de atipia reativa inflamatória na PV verificou-se aumento significativo no grupo G4 em comparação a G1 e diminuição neste tipo de lesão no grupo G5 em relação a G4 (Tabela 3). Além disso, foi observado aumento na incidência de hiperplasia/displasia na próstata ventral no grupo G2 em relação ao grupo G1 e diminuição nessa incidência no grupo G3 em comparação a G2 (Tabela 3). Não foi evidenciada na PV diferença entre os grupos para os seguintes parâmetros: inflamação focal, PIA, PIN e adenocarcinoma microinvasivo (Tabela 3). Quando avaliada a PDL desses mesmos grupos experimentais não foi observada diferença estatisticamente significativa para os mesmos parâmetros analisados para PV (Tabela 3).

O índice de proliferação celular epitelial mostrou diminuição do grupo G3 em relação a G1 (Figura 5A). Quanto aos demais grupos, não houve diferença estatística quando comparados entre si (Figura 5A). Quanto a apoptose, os grupos G4 e G5 apresentaram aumento significativo do índice apoptótico quando comparados a G1 e aumento em G5 em relação a G4 (Figura 6B). Quanto à expressão de Par4, observou-se uma tendência ao aumento de sua expressão nos grupos suplementados com I3C (G3 e G5) (Figura 6).

O AR apresentou marcação predominantemente nuclear e imunorreatividade semelhante entre os grupos experimentais no DPN180 (Figura 7).

Em relação às análises moleculares houve uma tendência ao aumento na expressão de ER α nos grupos G2 e G4 em relação aos demais grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 6).

DISCUSSÃO

O bisfenol A (BPA) é um polímero sintético usado na produção de plásticos policarbonatos e resinas epóxi e é considerado um desregulador endócrino (Howdeshell *et al.*, 2003; Calafat *et al.*, 2008). O termo desregulador endócrino foi definido pela *Environmental Protection Agency* (EPA) americana como “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação de hormônios que estão presentes no organismo humano e animal e são responsáveis pela homeostase, reprodução e pelo processo de desenvolvimento” (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Além dos fatores carcinogênicos, outro aspecto importante está envolvido com a exposição gestacional ao BPA. A exposição intrauterina e neonatal, períodos nos quais a arquitetura e homeostase tecidual são estabelecidas, pode levar a alterações epigenéticas importantes e resultar em efeitos adversos que podem levar anos para serem reconhecidos (Barker, 2004; Fowden & Forhead, 2004; Ismail-Beigi *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2007). Essa exposição precoce pode ocasionar alterações que modulam o desenvolvimento da próstata e promovem, nos indivíduos expostos, lesões como metaplasias, hiperplasias e inflamação na idade adulta (Prins *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que a exposição gestacional ao BPA alterou o peso corporal no DPN21 nos grupos G2 e G5, reduzindo-os em comparação ao grupo G1, assim como houve diminuição significativa no peso do grupo G5 em relação a G4. Essa diferença de peso pode estar relacionada à diferença de peso ao nascer nos diferentes grupos e/ou alterações no ganho de peso durante a lactação. Contrariamente, nos animais DPN180 essa exposição não alterou o peso corporal dos animais.

Com relação ao peso da próstata, nos animais DPN21 observamos aumento de peso no grupo G3 em relação ao grupo G1. Quando comparamos os grupos tratados com BPA na dose de 250µg/kg vimos que o grupo G5 apresentou redução no peso da glândula em relação a G4. Essas alterações no peso prostático podem estar relacionadas ao desbalanço hormonal causado pelo BPA e modulado pelo I3C durante o período inicial da morfogênese prostática que se inicia durante a gestação e direciona os processos de brotamento da próstata (Marker *et al.*, 2003).

O grupo G3 apresentou aumento significativo no índice de proliferação celular epitelial, além de aumento no compartimento epitelial e diminuição do luminal, caracterizando um aumento no número de ácinos com menor diâmetro luminal, o que poderia contribuir para o aumento no peso da próstata nesse grupo.

Já em relação ao grupo G5, este apresentou índice de proliferação celular menor e maior índice apoptótico que o grupo G4, o que poderia justificar a redução no peso da próstata neste grupo.

Nos animais DPN180 não verificamos diferença estatística entre os grupos experimentais para o peso prostático. Hyoung e colaboradores (2007), utilizando altas doses de BPA, na forma de BADGE (*Bisphenol A diglycidyl ether*), verificou que o peso relativo da próstata não se alterou no DPN21 e DPN42 em machos expostos durante a amamentação e lactação.

Estudos utilizando baixas doses de BPA em camundongos (20µg/kg) mostraram aumento no peso da próstata em animais com 8 meses de idade após a exposição gestacional a esse composto (Taylor *et al.*, 2011). Além disso, estes autores relataram que doses elevadas de DES (dietilestilbestrol, 20 e 200µg/kg durante os dias de gestação GD11-GD17) não alteraram e até diminuíram o peso da próstata em camundongos mostrando que doses mais elevadas tendem a diminuir ou não alterar o peso da glândula.

Apesar de nossos resultados não concordarem plenamente com os resultados obtidos por outros autores, esse fato pode estar relacionado com a linhagem animal utilizada, a via de administração, período de tratamento ou até mesmo com a forma de quantificar o peso da glândula, já que não fica claro em alguns trabalhos se o peso relatado é do complexo prostático inteiro ou somente do lobo ventral, como o que mensuramos.

Quanto às dosagens hormonais, os níveis de testosterona nos animais DPN180 e estradiol nos animais DPN21 e 180 não foram alterados. No entanto, houve uma tendência em ocorrer aumento na concentração de estradiol no DPN21 nos animais dos grupos G2 a G5 em relação a G1, possivelmente pela proximidade ao período de exposição gestacional.

Contrariamente aos nossos resultados, Richter e colaboradores (2007) verificaram diminuição nos níveis de testosterona circulante tanto em ratos *Sprague-Dawley* jovens (DPN37) quanto em adultos tratados com 40µg/Kg/dia de BPA. Alguns trabalhos utilizando desreguladores endócrinos durante a gestação têm mostrado que os níveis hormonais tendem a se normalizar na idade adulta, apesar dos efeitos tecido-específicos perdurarem (Gray *et al.*, 2000; Scarano *et al.*, 2009). Os resultados apresentados por Richter e colaboradores (2007) não deixam claros o período de avaliação hormonal da idade adulta, e por isso, dificultam os aspectos comparativos nesse parâmetro.

Em relação à análise histopatológica observamos alteração nos processos de brotamento e ramificação prostáticos nos animais DPN21 tratados com BPA com predomínio de ácinos menores. No entanto, o IBC parece modificar esse padrão de desenvolvimento e

restaurar parcialmente o aspecto morfológico encontrado nos animais do grupo G1 o que inclusive foi demonstrado nas análises estereológicas.

Outro aspecto a ser considerado é a distribuição dos elementos colagênicos após os tratamentos e os efeitos sob a organogênese prostática. Os animais DPN21 tratados somente com BPA (G2 e G4) apresentaram o estroma mais denso e as fibras colágenas apareceram formando feixes mais compactos. Nos animais suplementados com I3C as fibras aparecem mais dispersas, apesar de ocorrerem em maior proporção do que nos animais do grupo G1. Embora não tenha sido observada alteração na proporção relativa do estroma entre os grupos, é nítido que a alteração no padrão de brotamento provocado pelo BPA resultou em alterações na distribuição e agregação dos elementos da matriz extracelular. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a exposição ao estradiol pode aumentar a síntese das células estromais, além de propiciar agregação do colágeno em feixes mais espessos (Scarano *et al.*, 2005; 2008).

Todos os animais dos grupos experimentais no DPN180 mostraram semelhança no arranjo e distribuição das fibras colágenas interacinares. No entanto, nos animais que apresentaram maior ocorrência de focos inflamatórios (G2 e G4) houve alteração no padrão de distribuição e compactação das fibras colágenas, além de em algumas regiões, onde os focos de inflamação se infiltraram sob o epitélio, haver uma descontinuidade das fibras reticulares na membrana basal. Resultados anteriores mostraram que a exposição a desreguladores endócrinos durante a gestação pode aumentar a degradação e rearranjo das fibras da matriz extracelular nas regiões de inflamação (Scarano *et al.*, 2009).

Em relação aos dados estereológicos dos animais DPN180 foi observada semelhança do compartimento epitelial dos grupos experimentais em relação ao grupo G1 e entre os animais que receberam as mesmas doses BPA. Além disso, observamos redução da altura epitelial nos grupos tratados com 250µg/kg (G4 e G5), o que concorda com o aumento luminal observado nos animais G5.

Estudos utilizando baixas doses de BPA durante a vida fetal relatam aumento no número de brotos prostáticos, na proliferação celular e no tamanho da próstata em camundongos adultos (vom Saal *et al.*, 1997; Timms *et al.*, 2005). No entanto, anormalidades histopatológicas não são observadas nesses animais na idade adulta, enquanto que em altas doses, o BPA pode causar *imprinting* estrogênico, o qual está associado a alterações histopatológicas na idade adulta (Prins *et al.*, 2007).

Nas doses de 25µg/kg e 250µg/kg de BPA foram observadas alterações histopatológicas importantes no DPN180 como inflamação focal e multifocal,

hiperplasia/displasia, atipia inflamatória reativa e PIA. No entanto, a incidência de alterações epiteliais foi vista com maior frequência nos animais tratados com a menor dose de BPA. Ademais, existem evidências consistentes de que a exposição a estrogênios em baixas doses durante estágios iniciais de diferenciação prostática pode estimular o crescimento da próstata fetal/neonatal e levar a doenças prostáticas na idade adulta (Taylor *et al.*, 2011; Timms *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006).

Um aspecto muito importante a ser considerado é que nas duas doses de BPA utilizadas observamos a ocorrência de inflamação e atipias proliferativas de caráter displásico aqui denominadas como atipias inflamatórias reativas (Shappell *et al.*, 2004), sendo que essas alterações foram mais evidentes nos animais do grupo G4.

Nos animais suplementados com I3C houve redução significativa nos processos histopatológicos de caráter inflamatório em ambos os grupos (G3 e G5), assim como nos trabalhos de Wu e colaboradores (2011) e Cho e colaboradores (2011) em que foram observadas reduções na progressão histológica de tumores prostáticos nos camundongos TRAMP que receberam I3C ou sua fórmula dimérica (DIM - 3,3"-diindolilmetano) corroborando com o possível efeito quimioprotetor do I3C. Wu e colaboradores (2011) demonstraram ainda que o I3C é capaz de aumentar a atividade antioxidante da proteína Nrf2 em células prostáticas tumorais o que confere maior proteção contra o stress oxidativo, sendo que a diminuição desse estresse pode reduzir os danos teciduais e dessa forma minimizar o efeito inflamatório causado pelo BPA.

Outro aspecto relevante para o aumento da incidência das lesões histopatológicas observadas nos grupos G2 e G4 é o aumento na expressão de ER α nestes grupos. Sabe-se que os estrogênios são essenciais para a manutenção da homeostase prostática e que quando encontram-se escassos ou em excesso ocasionam perturbação no crescimento da glândula como proliferação aberrante, inflamação e desenvolvimento de lesões pré-malignas (Ellem & Risbridger, 2009) estimulando predominantemente os receptores α , favorecendo o surgimento de doenças (Ellem & Risbridger, 2009).

Em células hormônio-dependentes, como as células neoplásicas mamárias, o I3C suprime a capacidade de resposta ao estrogênio, diminuindo a regulação da expressão do receptor de estrógeno alfa (Sundar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006) o que poderia explicar a diminuição da expressão nos grupos G3 e G5.

Também observamos redução no índice de proliferação celular nos animais do grupo G3 no DPN180, no qual a análise histopatológica evidenciou recuperação da arquitetura prostática quando o comparamos com o grupo G2. Similarmente a esses resultados, outros

estudos também têm mostrado que o I3C e o DIM podem diminuir a proliferação em células de tumorais prostáticas (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Souli *et al.*, 2008).

Além disso, foi observado que o índice apoptótico tanto no DPN21 quanto no DPN180 foi maior nos grupos suplementados com I3C (G3 e G5) em comparação aos que receberam exclusivamente BPA (G2 e G4). Em concordância foi observada uma tendência ao aumento na expressão da Par4 nesses mesmos grupos, concordando com os achados obtidos através da obtenção do índice de morte celular pela técnica do TUNEL.

A proteína pró-apoptótica Par4 (*prostate apoptosis response 4*) apresenta uma potente atividade em uma variedade de sistemas celulares respondendo a diversos estímulos como radiação UV, citocinas, ablação hormonal e agentes citotóxicos (Gacia-Cao *et al.*, 2005) e, por isso pode ser utilizada como um marcador molecular para apoptose.

Nossos resultados estão de acordo com (Kim & Milner, 2005; Higdon *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2008) que relacionam o I3C à indução de vias apoptóticas, ativação da caspase e expressão gênica de BRCA. Além disso, diversos estudos (Sarkar & Li, 2004; Kim & Milner, 2005; Weng *et al.*, 2008) mostraram que o I3C pode suprimir o desenvolvimento tumoral devido a inibição da proliferação celular, indução de apoptose, regulação do ciclo celular e supressão da inflamação tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A imunorreatividade do AR foi aparentemente maior no grupo G2 no DPN21 comparado aos demais grupos. Esse resultado corrobora com Nagel e colaboradores (1997) e Gupta (2000) que relatam que a exposição pré-natal ou neonatal de camundongos machos a baixas doses de estradiol e outros estrogênios químicos como o BPA e o DES promovem um aumento na sensibilidade aos andrógenos em adultos jovens associados com um aumento na expressão de AR na próstata. Além disso, em estudo anterior observamos que a suplementação estrogênica mesmo em ambiente hipoandrogênico (após castração) é capaz de aumentar a expressão do AR através de mecanismos parácrinos de sinalização via ER α (Scarano *et al.*, 2008).

Em concordância com estudos anteriores concluímos que as ações do BPA são múltiplas e complexas e que a exposição a esse composto exerce efeitos específicos na próstata, que são influenciados pelo período de exposição e pela dose utilizada. No entanto, nosso estudo mostrou que o I3C foi capaz de atenuar os efeitos do *imprinting* estrogênico ocasionados pela exposição gestacional ao BPA indicando um potencial efeito quimioprotetor para a próstata.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado com subsídios da FAPESP (2010/17262-0/bolsa de mestrado de Joyce Zalotti Brandt e 2011/01954-2/bolsa de IC de Livia T. R. Silveira) e CNPq (471646/2011-3 – Auxílio-pesquisa).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal BB, Ichikawa, H. Molecular targets and anti-cancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*. 2005 4:1201–15.
- Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004 23:88-5.
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham, LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental health perspectives*. 2008 116:39-4.
- Cho HJ, Park SY, Kim EJ, Kim JK, Park JH. 3,3'-Diindolylmethane inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Mol Carcinog*. 2011 50:100-12.
- Colerangle JB, Roy D. Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997 60:153-60.
- Dave B, Eason RR, Till SR, Geng Y, Velarde MC, Badger TM, Simmen RC. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis*. 2005 26:1793-03.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009 30:293-342.
- Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Munoz-de-Toro M. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environmental health perspectives*. 2007 115:80-6.
- Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 1155:174-86.
- Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol*. 2006 21:110-2.
- Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 2007 24:259-4.
- Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction*. 2004 127:15–26.
- García-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martín-Caballero J, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. *EMBO Rep*. 2005 6:577-3.
- Gray LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L. 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP BBP and DINP but not DEP DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci*. 58:350–365.
- Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 224:61–8.
- Haighton LA, Hlywka JJ, Doull J, Kroes R, Lynch BS, Munro IC. An evaluation of the possible carcinogenicity of bisphenol A to humans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002 35:238-54.
- Hess-Wilson JK. Bisphenol A may reduce the efficacy of androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Cancer Causes Control*. 2009 20:1029-7.
- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. Cruciferous vegetables and human cancer risk: Epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res*. 2007 55: 224–36.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins G. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res*. 2006 66:5624–2.

Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL, VomSaal FS, Welshons WV. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect*. 2003 111:1180–7.

Hyoungh UJ, Yang YJ, Kwon SK, Yoo JH, Myoung SC, Kim SC, Hong YP. Developmental toxicity by exposure to bisphenol A diglycidyl ether during gestation and lactation period in Sprague-Dawley male rats. *J Prev Med Public Health*. 2007 40:155-1.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002 17:2839-1.

Ismail-Beigi F, Catalano PM, Hanson RW. Metabolic programming: fetal origins of obesity and metabolic syndrome in the adult. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 291:439-40.

Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006 226:79-89.

Keri RA, Ho SM, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2007 24:240-52.

Kim YS, Milner JA. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 2005 16:65–3.

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 1993 132:2279-6.

Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*. 2007 66:1160-4.

Li Y, Li X, Sarkar FH. Gene expression profiles of I3C- and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis. *J Nutr*. 2003 133:1011–9.

Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res*. 2005 65:6934-2.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biol*. 2003 253:165-4.

Markey CM, Michaelson CL, Sonnenschein C, Soto AM. Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. In: Metzler M, editor. The handbook of *environmental chemistry*, vol. 3. Part L, endocrine disruptors - part I. *Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag*. 2001 129-53.

Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect*. 1997 105:70–6.

National Toxicology Program from Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>. Acesso em setembro de 2012.

Park SS, Kim YN, Jeon YK, Kim YA, Kim JE, Kim H, Kim CW. Genistein induced apoptosis via Akt signaling pathway in anaplastic large-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 56:271-8.

Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 2007 23:374–2.

Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (Methanol-Carnoy) Fixation: Practical and Theoretical Considerations. *Histochem Cell Biol*. 1970 21:97-116.

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*. 2007 24:199-4.

Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 127:27-4.

Sarkar FH, Li Y. Indole-3-carbinol and prostate cancer. *J Nutr*. 2004 134:3493S-8S.

Scarano WR, Cordeiro RS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR. Tissue remodeling in Guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. *Cell Biol Int*. 2005 29:778-4.

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

Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Campos SGP, Júnior LAJ, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas WG. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: Proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology*. 2009 262:215-3.

Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor Meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. *Cancer Res*. 2004 64:2270-2305.

Souli E, Machluf M, Morgenstern A, Sabo E, Yannai S. Indole-3-carbinol (I3C) exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008 46:863-70.

Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* 1997 138:1780-6.

Su Y, Eason RR, Geng Y, Till SR, Badger TM, Simmen RC. In utero exposure to maternal diets containing soy protein isolate, but not genistein alone, protects young adult rat offspring from NMU-induced mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2007 28:1046-1.

Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 2004 18:501-7.

Sundar SN *et al*. Indole-3-carbinol selectively uncouples expression and activity of estrogen receptor subtypes in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2006 20:3070-82.

Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vomSaal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 127:83-95.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vomSaal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 102:7014-9.

Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anatomical Record A*. 2006 288A:885-92.

Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*. 2009 559-66.

vomSaal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 94:2056-1.

Wang TT, Milner MJ, Milner JA, Kim YS. Estrogen receptor alpha as a target for indole-3-carbinol. *J Nutr Biochem*. 2006 17:659-4.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*. 1963 12:131-55.

Welshons WV, Nagel SC, vomSaal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006 147:56-69.

Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen C.S. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett*. 2008 262:153-63.

Wu TY, Saw CL, Khor TO, Pung D, Boyanapalli SSS, Kong AT. In vivo pharmacodynamics of Indole-3-carbinol in the inhibition of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: involvement of Nrf2 and cell cycle/apoptosis signaling pathways. *Mol. Carcinog*. 2011.

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol*. 2002 16:735-9.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 - Cortes histológicos da próstata ventral no DPN21 dos diferentes grupos experimentais: G1: a-c; G2: d-f; G3: g-i; G4: j-l; G5: m-o; corados pela Hematoxilina & Eosina (Figs a, d, g, j, m), reticulina de Gömöri (Figs b, e, h, k, n) e picrossírius-hematoxilina (Figs c, f, i, l, o). Abreviações: ep: epitélio; st: estroma; lu: lúmen; col: colágeno. As setas brancas apontam as fibras reticulares na base do epitélio prostático. Aumento: 400x.

Figura 2 - A: Mediana e intervalo interquartil do índice de proliferação celular das células epiteliais da próstata ventral dos animais experimentais no DPN21. **B:** Mediana e intervalo interquartil do índice de apoptose das células epiteliais da próstata ventral nos grupos experimentais DPN21. O asterisco representa diferença estatística entre o G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA ($p \leq 0,05$). **C:** Cortes histológicos **representativos** utilizados para a determinação dos índices de proliferação e apoptose, submetidos à reação imuno-histoquímica para Ki-67 (Figs 1-2) e à técnica de TUNEL (Figs 3-4).

Figura 3: Western Blot para as proteínas ER α , Par4 e β -actina dos grupos experimentais no DPN21 a partir de extratos proteicos provenientes da próstata ventral (cada banda representa um pool com amostras de três animais). Os gráficos representam a expressão relativa da densidade óptica integrada para as proteínas ER α e Par4, normalizadas pela β -actina, expressa pela média \pm DP. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos ($p \leq 0,05$).

Figura 4: Cortes histológicos da próstata ventral no DPN180 dos diferentes grupos experimentais: G1: a-d; G2: e-h; G3: i-l; G4: m-p; G5: q-t; corados pela Hematoxilina & Eosina (Figs a, b, e, f, i, j, m, n, q, r), reticulina de Gömöri (Figs c, g, k, o, s) e picrossírius-hematoxilina sob luz polarizada (Figs d, h, l, p, t). Abreviações: ep: epitélio; st: estroma; L: lúmen; inf: inflamação; *: atipia inflamatória reativa; mi: microácino; col: colágeno; setas: fibras reticulares, ; Figs a, e, i, m, q: aumento 200x; Figs b, c, d, f, g, h, j, k, l, n, o, p, r, s, t: aumento 400x.

Figura 5: Cortes histológicos da próstata ventral nos DPN 21 e DPN180 dos diferentes grupos experimentais submetidos à imunomarcagem para AR (Figs: a-j). As setas apontam para as marcações positivas que estão coradas em marrom.

Figura 6 - A: Mediana e intervalo interquartil do índice epitelial de proliferação celular da próstata ventral dos animais experimentais no DPN180. **B:** Mediana e intervalo interquartil do

índice de apoptose nas células epiteliais da próstata ventral nos grupos experimentais no DPN180. O asterisco representa diferença estatística entre G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA ($p \leq 0,05$).

Figura 7: Western Blot para as proteínas ER α , Par4 e β -actina dos grupos experimentais no DPN180 à partir de extratos proteicos provenientes da próstata ventral (cada banda representa um pool com amostras de três animais). Os gráficos representam a expressão relativa da densidade óptica integrada para as proteínas ER α e Par4, normalizadas pela β -actina, expressa pela média \pm DP. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos ($p \leq 0,05$).

Tabela 1 - Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no DPN21.

Parâmetros	Grupo/Tratamento ³				
	G1	G2	G3	G4	G5
	Controle	Controle + BPA25µg	I3C + BPA25µg	Controle + BPA250µg	I3C + BPA250µg
<i>Parâmetros Biométricos¹</i>	n=20	n=17	n=22	n=22	n=15
Peso corpóreo (g)	53,57±4,73	47,14±2,72*	51,35±3,90	51,05±5,31 ^a	44,29±4,04 ^{a,b}
Peso da prostate (mg)	27,91±10,82	31,47±6,05	41,22±6,32*	37,81±8,01 ^a	29,64±6,89 ^b
<i>Dosagem Hormonal¹</i>					
Estradiol Sérico (pg/mL)	8,67±5,11	13,56±6,07	10,79±3,90	13,74±7,32	11,27±5,75
<i>Parâmetros estereológicos²</i>					
Compartmento Epitelial (%)	33,03[26,19-37,80]	34,82[28,72-37,95]	46,13[38,84-50,15]*	37,20[34,08-42,11]	42,26[36,16-46,58]*
Compartmento Estromal (%)	30,36[21,13-36,90]	23,81[18,30-28,13]	25,30[23,21-27,53]	24,70[21,73-28,57]	29,46[24,85-33,48]
Compartmento Luminal (%)	33,33[28,57-41,96]	45,53[36,16-51,79]	27,38[23,21-32,59]*	39,88[31,10-42,26]	29,76[21,43-33,03]*

¹Valores em média ± desvio-padrão; ²Valores expressos pela mediana seguido do intervalo interquartil [Q1-Q3]; ³Grupos: G1 – dieta basal; G2 – dieta basal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G3 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G4 – dieta basal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; G5 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA (p≤0,05).

Tabela 2 - Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no DPN180.

Parâmetros	Grupo/Tratamento ³				
	G1	G2	G3	G4	G5
	Controle	Controle + BPA25µg	I3C + BPA25µg	Controle + BPA250µg	I3C + BPA250µg
	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
<u>Parâmetros Biométricos¹</u>					
Peso corpóreo (g)	514,84±25,04	522,55±26,47	521,37±23,15	509,26±58,83	527,97±57,42
Peso da prostate (g)	0,66±0,11	0,69±0,10	0,67±0,15	0,66±0,17	0,66±0,09
<u>Dosagem Hormonal¹</u>					
Dosagem de estradiol (pg/mL)	5,15±0,21	5,08±0,19	5,05±0,11	5,10±0,19	5,38±0,76
Dosagem de testosterona (ng/mL)	0,96±0,92	1,33±1,51	1,79±1,38	1,10±0,95	1,38±1,90
<u>Parâmetros estereológicos²</u>					
Compartimento Epitelial (%)	17,86[12,80-22,17]	21,13[16,52-23,21] ^a	17,86[14,88-19,05] ^{a,b,c}	13,99[10,57-17,86] ^{b,c}	15,48[12,50-17,86] ^c
Compartimento Estromal (%)	24,11[21,13-25,74]	20,53[17,86-25,59] ^a	21,73[17,26-33,93] ^a	27,98[23,66-23,07] ^a	13,99[9,37-23,07] ^{*.b}
Compartimento Luminal (%)	56,55[51,04-63,24]	56,55[49,40-61,46] ^a	59,52[53,42-65,63] ^a	55,65[50,59-75,59] ^a	70,83[62,65-75,59] ^{*.b}

¹Valores em média ± desvio-padrão; ²Valores expressos pela mediana seguido do intervalo interquartil [Q1-Q3]; ³Grupos: G1 – dieta basal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G3 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G4 – dieta basal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; G5 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA (p≤0,05).

Tabela 3 - Incidência das lesões histopatológicas nos lobos ventral e dorsolateral dos grupos experimentais no DPN180.

	<i>Inflamação Focal</i>	<i>Inflamação Multifocal</i>	<i>Atipia Reativa Inflamatória</i>	<i>PIA</i>	<i>PIN</i>	<i>Hiperplasia/ Displasia</i>	<i>Carcinoma Microinvasivo</i>
G1							
<i>PV</i>	25%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>PDL</i>	0%	37,5%	0%	0%	0%	25%	0%
G2							
<i>PV</i>	0%	75% ^{*,a,b}	37,5% ^{a,b}	25%	0%	62,5% ^{*,a}	0%
<i>PDL</i>	0%	0%	0%	0%	0%	37,5%	0%
G3							
<i>PV</i>	37,5%	25% ^{a,b}	37,5% ^{a,b}	0%	0%	0% ^b	0%
<i>PDL</i>	0%	0%	0%	0%	0%	25%	0%
G4							
<i>PV</i>	25%	62,5% ^{*,a}	62,5% ^{*,a}	0%	0%	0% ^b	0%
<i>PDL</i>	25%	25%	0%	25%	0%	25%	0%
G5							
<i>PV</i>	0%	0% ^b	0% ^b	0%	0%	0% ^b	0%
<i>PDL</i>	0%	0%	0%	0%	0%	37,5%	0%

Valores em porcentagem; Grupos: G1 – dieta basal; G2 – dieta basal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G3 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G4 – dieta basal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; G5 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; PV: próstata ventral; PDL: próstata dorsolateral. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA (p≤0,05).

Figura 1

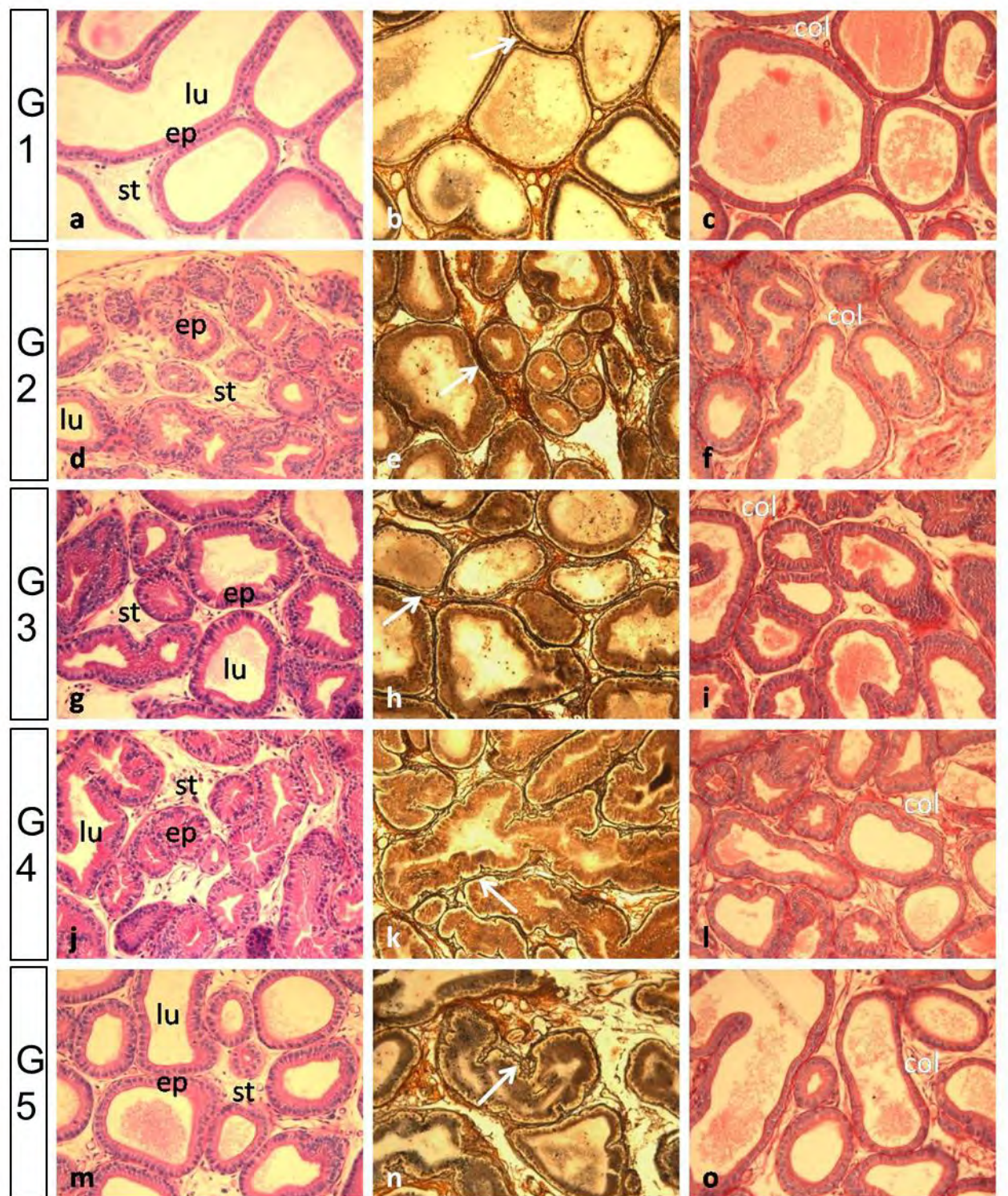


Figura 2

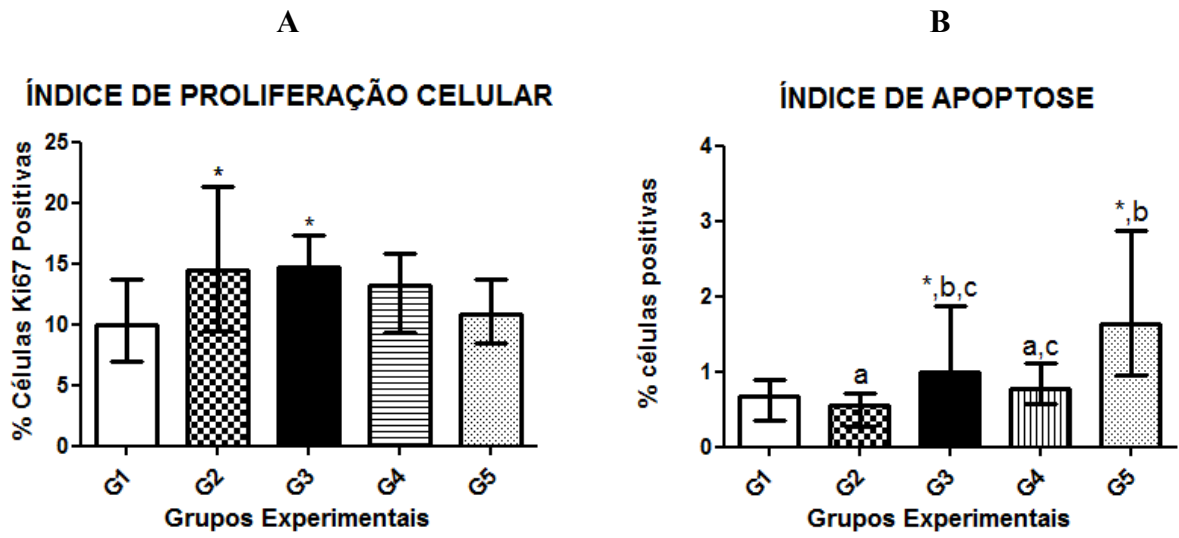


Figura 3

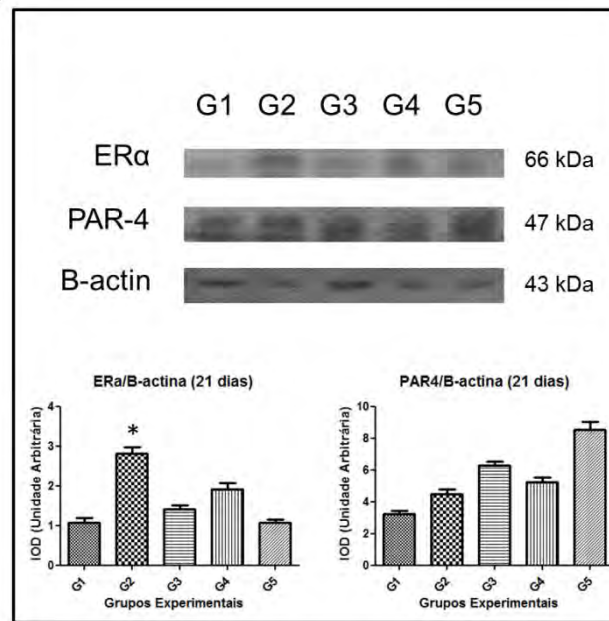


FIGURA 4

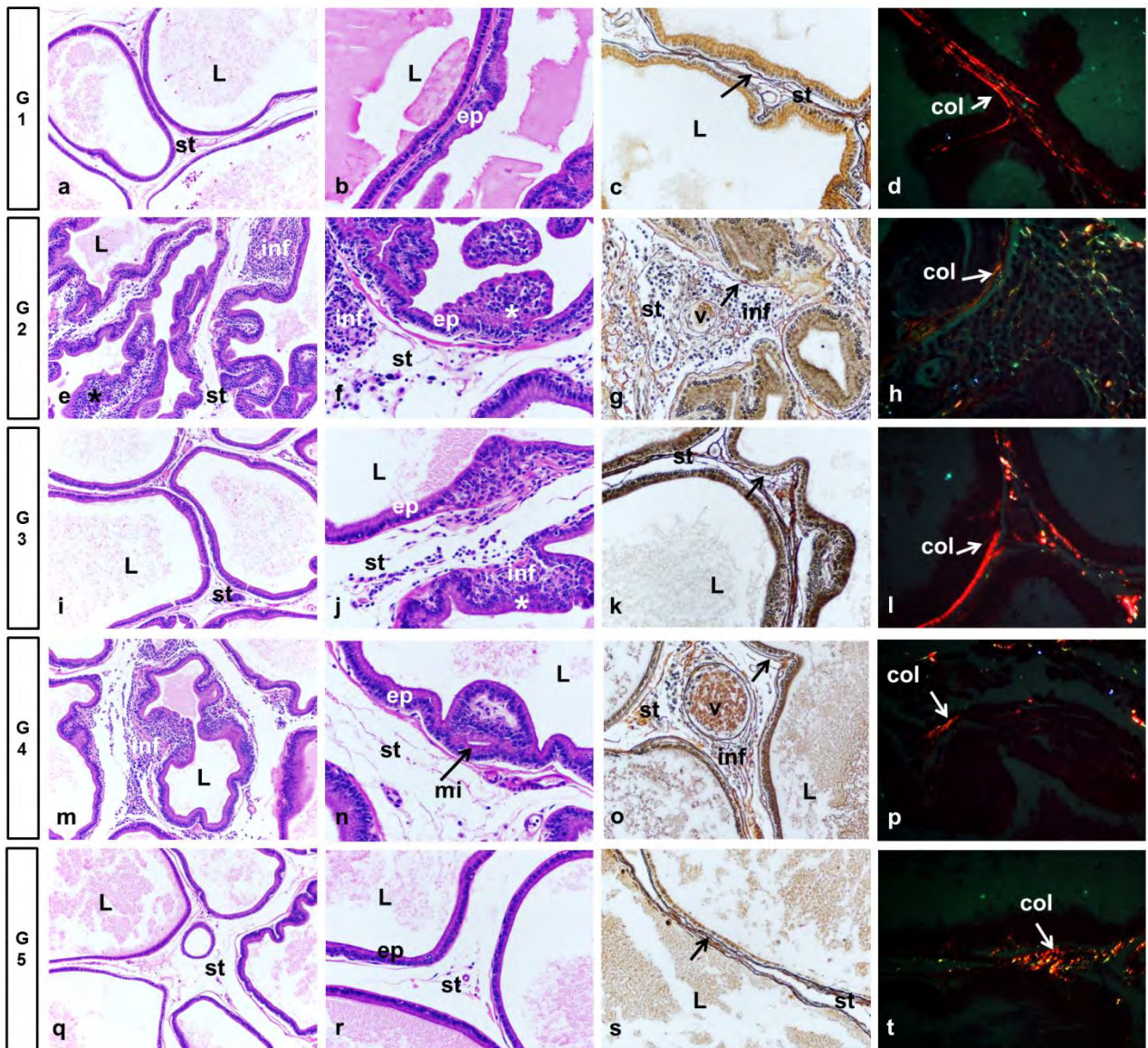


Figura 5

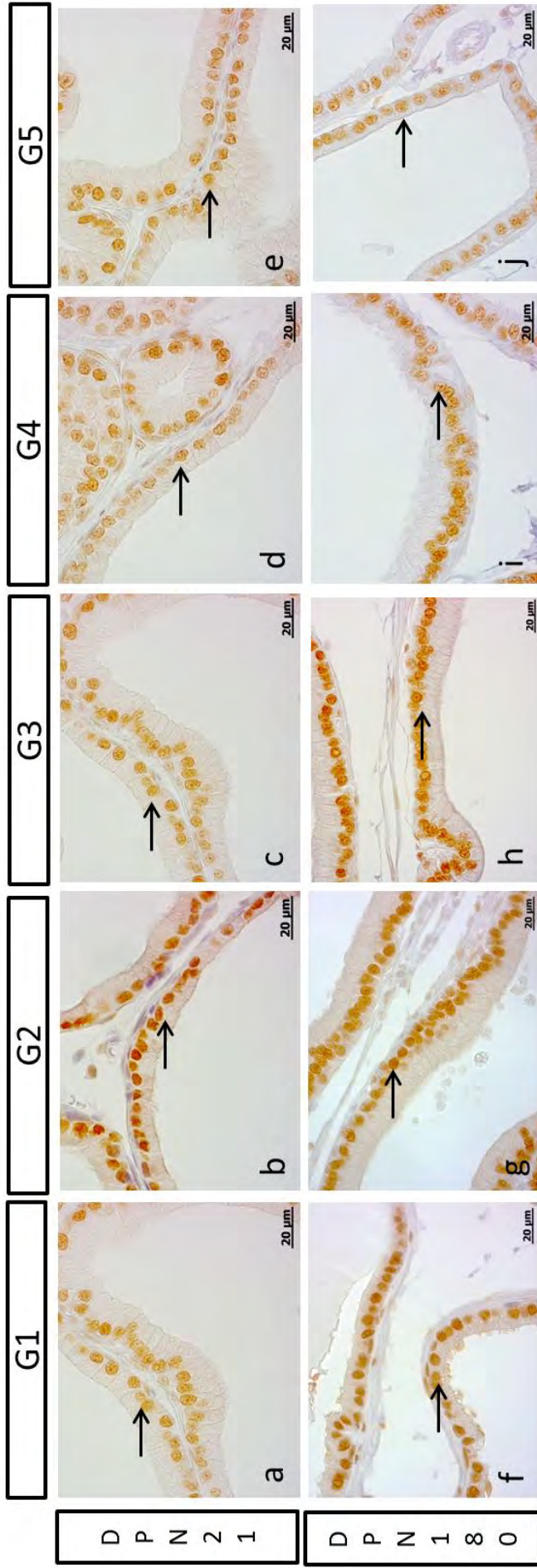


Figura 6

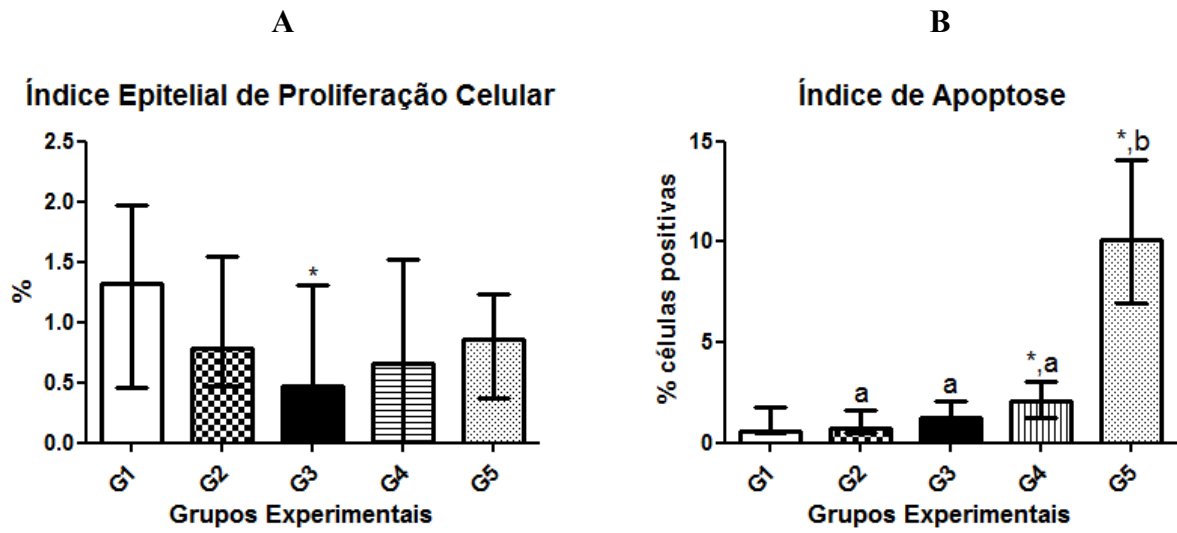
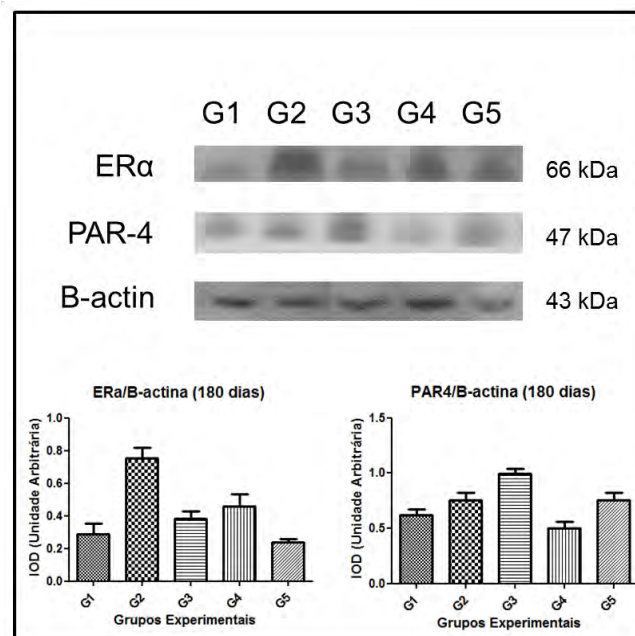


Figura 7



CONCLUSÃO GERAL

Em concordância com estudos anteriores, concluímos que as ações do BPA são múltiplas e complexas e que a exposição a esse composto exerce efeitos específicos na próstata, que são influenciados pelo período de exposição e pela dose utilizada. No entanto, nosso estudo mostrou que o I3C foi capaz de atenuar os efeitos do *imprinting* estrogênico ocasionados pela exposição gestacional ao BPA indicando um potencial efeito “protetor” para a próstata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- Aggarwal BB, Ichikawa, H. Molecular targets and anti-cancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*. 2005 4:1201–15.
- Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*. 2006 147:43–9.
- Ashby J, Tinwell H, Haseman J. Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1999 30:156–66.
- Ashby J. Toward resolution of the divergent effects of estrogens on the prostate gland of CF-1 mice. *Environ Health Perspect*. 2001 109:109.
- Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol*. 1990 121:127-231.
- Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004 23:88-5.
- Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson AM. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006 20:77–90.
- Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Calpp R, Montagnier L, Epstein S. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*. 2007 105:414-29.
- Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med*. 2009 15:248–62.
- Blumenfeld W, Tucci S, Narayan P. Incidental lymphocytic prostatitis. Selective involvement with nonmalignant glands, *Am J Surg Pathol*. 1992 16:975.
- Bostwick DG, Qian J, Frankel K. The incidence of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsies. *J Urol*. 1995 154:1791.
- Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung RYX, Calafat AM, Lanphear BP. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*. 2009.
- Chen X, An H, Ao L, Sun L, Liu W, Zhou Z, Wang Y, Cao J. The combined toxicity of dibutyl phthalate and benzo(a)pyrene on the reproductive system of male Sprague-Dawley rats in vivo. *J Hazard Mater*. 2011.
- Colombel MC, Buttyan R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. In: Schwartz LM, Osborne, BA, editors. *Methods in Cell Biology - Cell Death*. New York: Academic Press; 1995 369-385.
- Cover CM *et al*. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1999 59:1244–1.
- Culig Z, Hobish A, Bartsch G, Klocker H. Androgen receptor – an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urol Res*. 2000 28:211-9.
- 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 prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 92:221-36.
- Dave B, Eason RR, Till SR, Geng Y, Velarde MC, Badger TM, Simmen RC. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis*. 2005 26:1793-03.
- Dhanabalan S, Mathur PP. Low dose of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces testicular oxidative stress in adult rats under the influence of corticosterone. *Exp Toxicol Pathol*. 2009 61:415–3.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009 30:293-342.

Epstein JI. Adenosis (atypical adenomatous hyperplasia): histopathology and relationship to carcinoma. *Pathol Res Pract.* 1995 191:888.

Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 1155:174-86.

Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 118:246-1.

Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction.* 2004 127:15-26.

Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals.* 2004 17:555-8.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update.* 2001 7:248-64.

Hayward SW, Cunha GR, Dahiya R. Normal development and carcinogenesis of the prostate: a unifying hypothesis. *Ann NY Acad Sci.* 1996 784:50-62.

Henderson BE, Bernstein L, Ross RK, Depue RH, Judd HL. The early in utero oestrogen and testosterone environment of blacks and whites: potential effects on male offspring. *Br J Cancer.* 1988 57:216-8.

Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science.* 1991 254:1131-8.

Hess-Wilson JK. Bisphenol A may reduce the efficacy of androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Cancer Causes Control.* 2009 20:1029-7.

Ho SM, Lee KF, Lane K. Neoplastic transformation of the prostate. In: Rajesh K. Naz editor. Prostate: Basic and Clinical Aspects. Boca Raton: CRC Press; 1997 73.

Ho SM. Estrogens and anti-estrogens: Key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem.* 2004.

Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins G. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase Type 4 Variant 4. *Cancer Res.* 2006 66:5624-2.

Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL, Vom Saal FS, Welshons WV. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect.* 2003 111:1180-7.

Howe S, Borodinsky L, Lyon R. Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of epoxy coated cans. *J Coat Tech.* 1998 70:69-4.

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 81:807-3.

Ichihara I, Kallio M, Pelliniemi LJ. Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tiss Res.* 1978 192:381-90.

Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Semin Cancer Biol.* 1994 5:391-400.

Ismail-Beigi F, Catalano PM, Hanson RW. Metabolic programming: fetal origins of obesity and metabolic syndrome in the adult. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 291:439-40.

Ito N, Shirai T. Tumours of the accessory male sex organs. In: Turusov V, Mohr U editors. Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Lyon: IARC; 1990 421-44.

- Jesik CJ, Holland JM, Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*. 1982 3:81-97.
- Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 428-30.
- Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006 226:79-89.
- Keri RA, Ho SM, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2007 24:240-52.
- Kim YS, Milner JA. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 2005 16:65-3.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology*. 1998 139:4252-63.
- Landau-Ossondo M, Rabia N, Jos-Pelage J, Marquet LM, Isidore Y, Saint-Aimé C, Martin M, Irigaray P, Belpomme D; ARTAC international research group on pesticides. Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. *Biomed Pharmacother*. 2009 63:383-5.
- Leav I, Ho SM, Ofner P, Merk FB, Kwan PW, Damassa D. Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst*. 1988 80:1045-3.
- Lemmen JG, Arends RJ, van der Saag PT, van der Burg B. In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2004 112:1544-9.
- Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res*. 2005 65:6934-2.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 238:209-4.
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutation and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 100:776.
- Luparello C, Sirchia R, Longo A. Cadmium as a transcriptional modulator in human cells. *Crit Rev Toxicol*. 2011 41:75-2.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biol*. 2003 253:165-4.
- McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev*. 2001 22:319-41.
- Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol*. 2010 44:1458-3.
- Ministério da Saúde. INCA. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil (A). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acesso em julho, 2012.
- Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA. Allelic variants of aromatase and androgen and estrogen receptors: toward a multigenic model of prostate cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2001 7:3092-6.
- Moral R, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Pereira J, Russo J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol*. 2008 196:101-12.

Munguia-Lopez EM, Soto-Valdez H. Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings. *J Agric Food Chem*. 2001 49:3666–1.

Munguia-Lopez EM, Gerardo-Lugo S, Peralta E, Bolumen S, Soto-Valdez H. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit Contam*. 2005 22:892–8.

National Toxicology Program from Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>. Acesso em setembro de 2012.

Noble RL. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. *Cancer Res*. 1977 37:1929–3.

Park SS, Kim YN, Jeon YK, Kim YA, Kim JE, Kim H, Kim CW. Genistein induced apoptosis via Akt signaling pathway in anaplastic large-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 56:271-8.

Petrovich, Z, Ameye, Baert, Bichler, Boyd, Brady, Bruskevitz, Dixon, Perrin, Watson. New trends in the treatment of benign prostatic hyperplasia and carcinoma of the prostate. *Am J Clin Oncol*. 1993 16:187.

Pitot HC. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2007 2:1-29.

Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst*. 1963 12:1-27.

Prins GS, Birch L, Habermann H. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*. 2001 13:241-52.

Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 2007 23:374–2.

Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008 76:641-59.

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

Prins GS, Tang WY, 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 102:134-8.

Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. 2008 15:649-6.

Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat. I. effects on the prostate gland. *Biol Reprod*. 2001 65:1496–5.

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*. 2007 24:199–24.

Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 127:27-4.

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

Sheehan DM, Willingham EJ, Bergeron JM, Osborn CT, Crews D. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect*. 1999 107:155–9.

Shirai T, Takahashi S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, et al. Experimental prostate carcinogenesis - rodent models. *Mutation research*. 2000 462:219–6.

Song KH, Lee K, Choi HS. Endocrine disruptor bisphenol A induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology*. 2002 143:2208–5.

Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Robbins & Cotran. *Patologia Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 259-330.

Su Y, Eason RR, Geng Y, Till SR, Badger TM, Simmen RC. In utero exposure to maternal diets containing soy protein isolate, but not genistein alone, protects young adult rat offspring from NMU-induced mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2007 28:1046-1.

Sundar SN *et al.* Indole-3-carbinol selectively uncouples expression and activity of estrogen receptor subtypes in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2006 20: 3070–82.

Taplin ME, Ho SM. Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 86:3467.

Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 127:83-95.

Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention. 2005.

Thornton JW. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 98:5671–6.

Timme TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor-beta expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*. 1994 134:1039-5.

Timms BG, Howdeshell KL, 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 102:7014–9.

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

Tsai WT. Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2006 24:225–55.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague–Dawley rats. *Toxicol Sci*. 2002 68:121–46.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benignprostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol*. 2005 40:121–8.

Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:1055–70.

Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anatomical Record A*. 2006 288A:885-2.

Vincent TL, Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2008 32:729-37.

Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety". *Am J Public Health*. 2009 559-66.

vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 94:2056-1.

vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2005 113:926–3.

vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabolini F, Guillette Jr LJ, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, LeBlanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers

JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill. Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*. 2007 24:131–8.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 2003 192:95-117.

Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha GR. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*. 2001 68:270-9.

Wang TT, Milner MJ, Milner JA, Kim YS. Estrogen receptor alpha as a target for indole-3-carbinol. *J Nutr Biochem*. 2006 17:659–4.

Walsh DE, Dockery P, Doolan CM Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on $[Ca^{2+}]$ in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005 230:23–30.

Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*. 2003 111:994–06.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006 147:56-69.

Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Chen C.S. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett*. 2008 262:153–63.

Williams, Warwick, Dyson, Bannister. Esplanologia. In: Williams, Warwick, Dyson, Bannister. Gray anatomy. 37^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p. 1176-1387.

Wong EW, Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 32:290-9.

Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *JCEM*. 2006 91:1660–5.

Yang GS, Wang Y, Wang P, Chen ZD. Expression of oestrogen receptor-alfa and oestrogen receptor-beta in prostate cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2007 120:1611-5.

Yoshida T, Horie M, Hoshino Y, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam*. 2001.

Yoshino H, Ichihara T, Kawabe M, Imai H, Hagiwara A, Asamoto M. Lack of significant alteration in the prostate or testis of F344 rat offspring after transplacental and lactational exposure to bisphenol A. *J Toxicol Sci*. 2002 27:433–9.

APÊNDICES

TABELA 4 - Dados reprodutivos dos diferentes grupos experimentais¹

Parâmetros/Mães	Grupo/Tratamento ²				
	G1 Controle n=9	G2 Controle + BPA25µg n=10	G3 I3C + BPA25µg n=10	G4 Controle + BPA250µg n=11	G5 I3C + BPA250µg n=13
Mães ⁴					
Período de gestação (dias)	22,00±0,00	21,70±0,48	22,00±0,00	21,91±0,30	21,69±0,48
Animais por ninhada	11,44±2,88	12,30±1,70	10,90±3,25	11,91±2,39	11,15±1,86
Relação entre sexo (M:F)	1,28±0,59	1,56±0,80	1,80±1,74	1,41±0,49	2,11±2,46
Peso corporal (g) no DG20	376,67±34,80	367,20±19,17	372,25±16,83	387,82±24,58	400,38±20,79
Ganho de peso corporal (g) ³	127,00±23,71	115,20±18,10	121,33±10,36	134,64±11,56	123,77±14,98
Consumo de ração (g) ³	63,36±31,04	62,69±26,13	64,24±22,50	64,08±26,72 ^a	68,15±24,65 ^b
Prole machos					
Pesos corporais (g)					
DPN 03	7,94±0,67	8,09±0,73	8,01±0,74	8,09±0,76	8,09±0,82
DPN 10	20,61±1,33	20,42±1,23 ^a	22,00±1,26 ^{*,b}	21,27±1,13	21,10±2,88

¹Valores em média ± desvio-padrão; ²Grupos: G1 – dieta basal; G2 – dieta basal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G3 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G4 – dieta basal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; G5 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal. ³Do DG0 ao DG21. ⁴Número de animais. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA (p≤0,05).

TABELA 5- Consumo de água e ração dos diferentes grupos experimentais no DPN180¹

Parâmetros/Mães	Grupo/Tratamento ²				
	G1	G2	G3	G4	G5
	Controle	Controle + BPA25µg	I3C + BPA25µg	Controle + BPA250µg	I3C + BPA250µg
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Consumo de água (mL)	109,53±6,85	126,53±11,79 ^{*b}	126,47±11,38 ^{*b}	118,84±8,89 ^{a,b}	109,68±7,42 ^c
Consumo de ração (g)	80,58±4,60	80,42±5,73 ^a	86,79±5,82 ^{*b}	80,16±5,55 ^a	83,68±9,85 ^{a,b}

¹Valores em média ± desvio-padrão; ²Grupos: G1 – dieta basal; G2 – dieta basal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G3 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 25µg/kg/peso corporal; G4 – dieta basal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal; G5 – dieta basal com Indol-3-Carbinol 2.000mg/kg/peso corporal e Bisfenol A 250µg/kg/peso corporal. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo G1 e os demais grupos. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BPA (p≤0,05).




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **281-CEEA**, sobre "Exposição in útero ao desregulador endócrino Bisfenol A e ao agente quimiopreventivo Indol-3-Carbinol: efeitos sobre a morfogênese e a susceptibilidade a carcinogênese prostática", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan e Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, nesta data.

Botucatu, 19 de abril de 2011.


Prof^a Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEEA