



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

Luiz Henrique Alves Guerra

Efeito do óleo mineral e do óleo de milho sobre a próstata de
gerbilos

São José do Rio Preto

2017

Luiz Henrique Alves Guerra

Efeito do óleo mineral e do óleo de milho sobre a próstata de
gerbilos

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior.

São José do Rio Preto

2017

Guerra, Luiz Henrique Alves.

Efeito do óleo mineral e do óleo de milho sobre a próstata de gerbilos / Luiz Henrique Alves Guerra. -- São José do Rio Preto, 2017

51 f. : il., grafs.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.

Co-Orientador: Patricia Simone Leite Vilamaior.

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

1. Biologia animal. 2. Gerbilos. 3. Próstata. 4. Óleos minerais. 5. Óleos vegetais. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 591

Luiz Henrique Alves Guerra

Efeito do óleo mineral e do óleo de milho sobre a próstata de gerbilos

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

Financiadora: Capes

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi
UFG – Goiânia

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
UNESP – Botucatu

São José do Rio Preto
03 de março de 2017

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela oportunidade, estímulo e conhecimento a mim transmitido, além de sua amizade.

À minha co-orientadora, professora Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior, pela dedicação, paciência, disponibilidade, conhecimento a mim transmitido, sempre com um sorriso acolhedor que me tranquilizou nas horas mais difíceis.

À Professora Dra. Lilian Castiglione por toda assistência e ensinamentos, também por me receber sempre com muito carinho e se tornar uma amiga.

Aos técnicos Msc. Luiz Roberto Faleiros Junior e Sarah Bertazzi Agosto, pela ajuda e principalmente por se tornarem grandes amigos.

A todos do laboratório de Microscopia e Microanálise, pela amizade e companheirismo. Em especial à Mari Marcielo e à Carol Negrin, que sempre me ajudaram com muito bom humor tornando situações difíceis em grandes momentos.

À minha amiga Julia Antoniassi (Juliana) por toda ajuda, ensinamento, paciência e por ser sempre a mão a me socorrer.

Ao meu amigo Guilherme Tamarindo, por todo crescimento que me proporcionou, sempre mostrando novos caminhos quando me senti perdido. Ainda, por todo café e apoio mesmo à distância.

Aos meus Pais, Luiz e Sueli por todo amor e por dedicarem suas vidas em prol do meu sucesso e aos meus tios, Alair e Maria Inêz, que também foram meus pais, por todo o carinho e toda ajuda fundamental para que concluísse esse trabalho.

À todos os meus amigos que sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado a mim concedida.

Por fim, à todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

Embora haja indícios de que o óleo mineral apresente atividade estrogênica *in vitro*, a influência do óleo mineral purificado em estudos de desregulação endócrina é desconhecida. Um modelo interessante para esse tipo de estudo é a próstata, uma glândula dependente de hormônios esteróides para sua manutenção, sendo sensível a substâncias que interferem nas vias endócrinas. Uma alternativa de veículo utilizado em pesquisas científicas é o óleo de milho, entretanto esse óleo possui fitoesteróis em sua composição, o que pode comprometer seu uso em pesquisas principalmente na área de endocrinologia. Como atualmente não há informações da comparação dos efeitos de diferentes veículos sobre a próstata de animais de laboratório, este estudo comparou, pela primeira vez, a ação do óleo mineral e do óleo de milho sobre a morfofisiologia da próstata de gerbilos. Para isso, gerbilos machos adultos (90 dias de idade, n = 6) foram separados em 3 grupos experimentais: controle intacto (CI), gavagem com óleo mineral (MO) e gavagem com óleo de milho (CO). Os óleos, mineral e de milho, foram administrados aos animais de 90 a 115 dias de idade, via gavagem, que logo após, aos 116 dias de idade, foram eutanasiados. As próstatas foram removidas e processadas para análise histológica. Foram realizadas análises morfométricas, biométricas, estereológicas e de imunohistoquímicas para a detecção de receptores de andrógenos (AR) e estrógenos (ERS1, ERS2). Os níveis séricos de testosterona e estradiol foram determinados por ensaios ELISA. O tratamento com óleo mineral aumentou a expressão de AR e de ERS1, além da concentração sérica de estradiol. Já o tratamento com óleo de milho diminuiu a expressão de AR, e aumentou a expressão de ERS1 e ERS2. Ainda, o tratamento com óleo mineral aumentou a espessura da camada muscular envolvendo os ácinos. Estes dados mostram que tanto o óleo mineral quanto o de milho causaram

alterações morfológicas na próstata dos gerbilos. No entanto, as alterações morfológicas decorrentes da exposição ao óleo mineral foram mais expressivas indicando seu potencial papel como desregulador endócrino.

Palavras-chave: Próstata. Gerbilo. Óleo Mineral. Óleo Vegetal.

ABSTRACT

Even though there are indications that mineral oil has in vitro estrogenic activity, the influence of purified mineral oil in endocrine deregulation studies is unknown. An interesting model for this kind of study is the prostate, a gland dependent on steroid hormones for its maintenance, and sensible to substances that interfere with the endocrine pathways. An alternative vehicle used in scientific researches is the corn oil; nevertheless, this oil has phytosterols in its composition, and this can compromise its use in researches, mainly in the endocrinology area. As it is not an information comparing the effects of different vehicles on a prostate of laboratory animals, this study compared, for the first time, the action of mineral and corn oil on the prostate morphophysiology of gerbils. For this, adult male gerbils (90 days old, n=6) were divided in three experimental groups: intact control (IC), mineral oil (MO) and corn oil (CO). Mineral and corn oil were administered to animals from 90 to 115 days old, by gavage, and the animals were euthanized at 116 days old. Morphometric, biometric, stereological and immunohistochemistry analyses for androgen (AR) and estrogen receptors (ERS1, ERS2) detection were performed. Serum levels of testosterone and estradiol were determined by ELISA assay. Treatment with mineral oil increased the AR and ERS1 expression, besides the serum level of estradiol. On the other hand, the treatment with corn oil decreased the AR expression, and enhanced the ERS1 and ERS2 expression. Furthermore, both treatments raised the muscle layer thickness around the prostatic acini. These data show that both mineral and corn oil caused morphological alterations on the gerbils prostate. Nevertheless, the morphological alterations due to

mineral oil exposure were more significant, indicating its potential role as endocrine disrupting.

Keywords: Prostate. Gerbil. Oil.

Sumário

Introdução.....	1
<i>Considerações Gerais</i>	1
<i>Regulação hormonal</i>	4
<i>Modelo Experimental</i>	5
<i>Óleo Mineral</i>	6
<i>Óleo de Milho</i>	9
Objetivos.....	12
Metodologia.....	13
<i>Delimitação Experimental</i>	13
<i>Análises Morfológicas</i>	14
<i>Análises por Imunohistoquímica</i>	15
<i>Dosagem Hormonal</i>	16
<i>Análise Biométrica</i>	17
<i>Análise Estatística</i>	17
Resultados.....	18
Discussão.....	20
Conclusão.....	24
Imagens.....	25
Referências Bibliográficas.....	35

Introdução

Considerações Gerais

A próstata é um órgão do sistema genital masculino do tipo glandular, cuja secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo (MARKER et al., 2003) uma vez que fornece aos espermatozóides condições ideais de sobrevivência e de viabilidade durante e após a ejaculação (TABOGA et al., 2009). Entretanto essa glândula não é exclusiva do organismo masculino, sendo encontrada em fêmeas de diversos mamíferos, incluindo humanos (ZAVIAČIČ, 1999; CUSTÓDIO et al., 2004; SANTOS et al., 2006).

No homem e na maioria dos animais, este órgão, localizado em íntima associação ao colo da bexiga e à uretra, possui tanto um componente glandular quanto um muscular que lhe permite realizar sua função (ALUKAL & LEPOR, 2016) de produzir a maior fração do fluido seminal (UNTERGASSER et al., 2005). A morfologia dessa glândula varia entre as classes de mamíferos, por exemplo, em roedores a próstata é formada por quatro lobos distintos bilateralmente simétricos que circundam a uretra na base da bexiga, designados como lobo ventral, lobo lateral, lobo dorsal e, associados à glândula seminal, o lobo anterior ou glândula coaguladora (PRICE, 1963). O lobo ventral é o componente do complexo mais utilizado como modelo experimental para compreender a biologia da próstata (JESIK et al., 1982). Essa preferência deve-se ao seu tamanho maior, à sua sensibilidade aos andrógenos, e por haver maior incidência de hiperplasia e neoplasia nesta região da próstata (BANERJEE et al., 1998; SHAPPELL et al., 2004).

A atividade secretora está sob responsabilidade principalmente da sua porção alveolar, entretanto os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (RESSE et al., 1986). A secreção é efetuada por um epitélio, organizado em ácinos, composto de quatro tipos de células: basal, secretora, intermediária e neuroendócrina que são dependentes de hormônios esteroides e reagem diferentemente a cada um deles (DE MARZO et al., 2007; RUMPOLD et al., 2002). Na maioria dos mamíferos, as células basais se localizam entre o epitélio secretor e a membrana basal, já as células neuroendócrinas são pouco frequentes e podem

ser diferenciadas por técnicas específicas de coloração (MARKER et al., 2003). As células secretoras, as basais e as neuroendócrinas, que compõem a maior parte do epitélio prostático, além de diferirem quanto à regulação hormonal, são responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular que também compõem o fluido prostático (BONKHOF et al., 1998). A figura 1 mostra os principais componentes histológicos da próstata, com o conteúdo acinar e estromal.

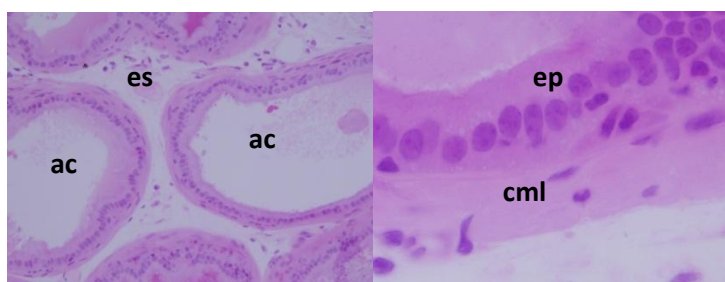


Figura. 1: Cortes histológicos de próstata ventral de gerbilo mostrando componentes acinares (ac) e estromais (es); (ep) na região epitelial; (cml) na região do estroma muscular contendo células musculares lisas.

Entremeando as porções glandulares existe um estroma conjuntivo ricamente vascularizado (CARVALHO et al., 1997). O estroma prostático é um arranjo complexo de células musculares lisas (CML) que têm papel contrátil durante a ejaculação (ROSS et al., 1993) e fibroblastos imersos em uma matriz extracelular (MEC) ao redor dos ácinos e ductos (TUXHORN et al., 2001). Neste compartimento encontram-se ainda macrófagos e células endoteliais vasculares. Foi também identificado neste compartimento um tipo celular recentemente descrito como telócito, o qual já havia sido encontrado em outros órgãos e sistemas. Esse tipo celular está envolvido com a intercomunicação das células estromais por apresentar múltiplos prolongamentos capazes de estabelecer contatos com outros tipos celulares (CORRADI et al., 2013).

Os componentes epiteliais e estromais possuem características comuns em diferentes animais independentemente do aspecto macroscópico da glândula, possibilitando assim, fazer homologias e analogias morfo-funcionais entre animais de laboratório e o homem (PRICE, 1963; KARR et al., 1995), e ainda criar situações experimentais que correlacionem com a fisiologia humana.

O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e o estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia dessa glândula. Sendo assim, muitos estudos são realizados em animais a fim de se compreender a biologia desta glândula, devido tanto ao seu complexo processo de desenvolvimento, quanto à alta incidência de doenças prostáticas, como o adenocarcinoma e a hiperplasia prostática benigna (HPB) (UNTERGASSER et al., 2005).

Entre os homens americanos, o câncer de próstata é o tipo mais comum de neoplasma não cutâneo e a segunda maior causa de mortalidade por carcinoma e, embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e de cura. A patologia molecular dessa doença é complexa, pois além de ser uma doença relacionada à idade e a fatores hereditários, é também influenciada por esteroides sexuais endógenos, fatores ambientais, dietas, repostas imunes e inflamatórias (CARRUBA, 2006; DE MARZO et al., 2007).

Neste contexto, é importante ressaltar a alta responsividade da próstata frente a desreguladores endócrinos, tanto naturais quanto sintéticos, que promovem desde o surgimento de alterações prostáticas simples até a ocorrência de neoplasias (SWEENEY et al., 2015; RIETJENS et al., 2016).

Desreguladores endócrinos atuam através de receptores de hormônios esteroides (como o receptor de andrógeno- AR) e não esteroides (como receptores de serotonina e de dopamina), de receptores órfãos (como o receptor de aril-hidrocarboneto - AhR), de vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo de esteroides, e de numerosos outros mecanismos que convergem sobre sistemas endócrino e reprodutivo.

Assim, do ponto de vista fisiológico, uma substância de desregulação endócrina é um composto, natural ou sintético, o qual, através de exposições ambientais, altera os sistemas hormonais e homeostáticos que permitem ao organismo comunicar-se e responder ao seu ambiente (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Como exemplo de substâncias sintéticas temos dioxinas, alquilfenóis e seus subprodutos, ftalatos, bisfenol e estrogênios sintéticos, já como substâncias naturais temos os fitoestrogênios, estrogênios

naturais e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essas substâncias são encontradas no ambiente em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal. Em algumas espécies, esses efeitos podem conduzir ao declínio da população e em seres humanos esses efeitos incluem a redução da quantidade de espermatozoides, o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo, de próstata e a endometriose (BILA & DEZOTTI, 2007; BHANDARI et al., 2015).

Regulação Hormonal

A próstata é dependente de andrógenos para o desenvolvimento e a diferenciação durante a embriogênese, assim como para sua manutenção durante a vida adulta, sendo a ação desses hormônios mediada via receptores hormonais específicos (HSING et al., 2002), como receptores de andrógeno (AR) e receptores de estrógeno (ERS1 e ERS2). Sendo assim, a ação hormonal na próstata não é determinada somente pelos níveis de esteroides sexuais, mas também pela expressão diferencial de receptores de andrógeno e estrógeno, além de seus cofatores e fatores de crescimento (TABOGA et al., 2009). Os efeitos androgênicos em células alvo da próstata resultam da interação do hormônio com o seu receptor (AR), sendo a produção de andrógenos regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (CUNHA et al., 2001). A dihidrotestosterona (DHT) é o andrógeno predominante na próstata e resulta da conversão da testosterona pela enzima 5- α -redutase (ASADA et al., 2001). A DHT e a testosterona ligam-se a receptores androgênicos e ativam a maquinaria de transcrição de genes relacionados a atividades como crescimento celular, produção de PSA entre outros (TABOGA et al., 2009).

Embora o desenvolvimento e a manutenção da próstata sejam dirigidos por andrógenos, os estrógenos também influenciam a homeostase da próstata, uma vez que esse órgão expressa receptores de estrógenos do tipo alfa (ERS1) e do tipo beta (ERS2) (MCPHERSON et al., 2007). Além disso, ocorre na próstata a produção local de estrógeno devido à atividade da aromatase (CYP19) a partir da conversão de testosterona em estradiol (GRINDSTAD et al., 2016), assim, a próstata é suscetível aos efeitos da ação dos estrógenos durante

o desenvolvimento e ainda no estabelecimento de diferentes lesões, sendo que os efeitos desse hormônio variam de acordo com o tipo de receptor, ERS1 ou ERS2, que mediar a resposta. (RISBRIDGER et al., 2007; ELLEM & RISBRIDGER, 2007). Considerando o exposto, é importante enfatizar que a influência que a regulação estrogênica exerce na próstata tem sido considerada como um dos fatores hormonais de risco associados ao desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CP) (HENDERSON & FEIGELSON, 2000), relacionados com a variação na expressão dos receptores ERS1 e ERS2 (CHOI et al., 2016).

Modelo Experimental

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) (Figura 2), é utilizado cada vez mais na pesquisa científica com aplicações na área de imunologia, fisiologia, culturas de células e de morfologia (NAWA et al., 1994; NOLAN et al., 1990; MORITOMO et al., 1991; SANTOS e TABOGA, 2006). Esse roedor murídeo da subfamília Gerbillinae ainda é apontado como um modelo apropriado para estudos de toxicidade (PORT et al., 1974) e para o estudo da próstata devido à suas características morfológicas peculiares (ROCHEL et al., 2007).



Figura 2: Gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) (<http://www.bat-rodents.eu/en/mongolian-jird-or-mongolian-gerbil-meriones-unguiculatus-sid-43-detail>)

A próstata do gerbilo da Mongólia possui uma morfologia semelhante à próstata humana no que diz respeito à distribuição dos componentes teciduais, porém pode diferir da próstata de outros roedores no que diz respeito à compactação dos lobos, sendo formada por quatro pares de lobos associados à uretra: lobo anterior ou glândula coaguladora (GC), lobo dorsal (LD), lobo dorsolateral (LDL) e lobo ventral (LV) (Figura 3) (ROCHEL et al., 2007). Além disso, o gerbilo da Mongólia possui comportamento dócil, de fácil manipulação e manutenção em biotério devido a mecanismos fisiológicos de conservação da água corporal, apresentando relativa ausência de doenças naturais (PINHEIRO

et al., 2003). Uma característica importante dessa espécie como modelo experimental para o estudo da próstata é o desenvolvimento espontâneo de lesões, que podem também ser influenciadas por hormônios esteroides (CAMPOS et al., 2008).

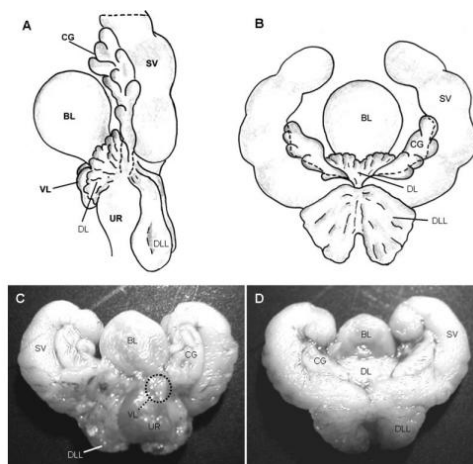


Figura 3: Complexo prostático de gerbilo de Mongólia. glândula coaguladora (GC), lobo dorsal (LD), lobo dorsolateral (LDL), lobo ventral (LV) e bexiga (BL). (ROCHEL et al., 2007).

Óleo Mineral

Muitos estudos em diversas áreas, utilizando animais como modelos experimentais, utilizam o Óleo Mineral como diluente e veículo para a administração de substâncias lipofílicas (ZANATELLI et al., 2013; SILVA et al., 2013; FOCHIE et al., 2013) devido à sua maior pureza e à ausência de fitoesteróis, que ocorrem nos óleos vegetais (WEIRAUCH & GARDNER, 1978).

O Óleo Mineral é uma mistura de hidrocarbonetos líquidos derivados do petróleo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) e é conhecido por muitos nomes diferentes, cujos sinônimos incluem Óleo Mineral Pesado, Óleo Mineral Leve, Parafina Líquida, Petrolato Líquido, Óleo de Parafina, Óleo Mineral Branco e Óleo Branco (RAWLINGS & LOMBARD, 2012). Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2012) os hidrocarbonetos de óleo mineral consistem em três classes principais de compostos de hidrocarbonetos: Alcanos, ramificados ou lineares (parafinas); Cicloalcanos, principalmente ciclopentanos e ciclohexanos; Sistemas alquilados e não alquilados; Naftalenos; Aromáticos, incluindo alquilos substituídos.

Dependendo das características estruturais em que estes hidrocarbonetos se encontram, o Óleo Mineral é comumente classificado em duas frações, isto é, Óleo Mineral de Hidrocarbonetos Saturados (MOSHs) e Óleo Mineral de Hidrocarbonetos aromáticos (MOAHs) (TARNOW et al., 2016).

Ainda, de acordo com EFSA 2012, existem algumas discrepâncias entre os estudos com óleo mineral que investigam um número de componentes individuais, dado a complexidade da composição desse óleo e principalmente devido às diferentes doses administradas, aos veículos usados, às espécies ou linhagens de animais. Dados toxicocinéticos sobre MOSH em roedores indicam que n-alcenos e cicloalcenos são bem absorvidos quando ingeridos em níveis baixos. Em ratos, a absorção desses hidrocarbonetos pode ser estimada variando de 25% (para C₂₆- C₂₉) a 90% para número de carbonos entre C₁₄ e C₁₈. As informações disponíveis sobre alcenos ramificados sugerem que a absorção dessa categoria de componentes ocorre em menor grau quando comparado com n-alcenos ou ciclo-alcenos de cadeia linear de peso molecular similar. Embora existam estudos limitados sobre a toxicocinética de MOAH, dados disponíveis sugerem que esse componente é bem absorvido, extensivamente biotransformado e não é bioacumulado em mamíferos. O destino dos MOAH é desconhecido.

Alcenos são oxidados em álcool graxo através do citocromo P450s e são então transformados geralmente em ácidos graxos que são integrados na fração lipídica em fosfolipídios, lipídios neutros como os triglicerídeos para serem incorporados em lipoproteínas. Essa reação é mais rápida para n-alcenos que para alcenos ramificados e ciclo-alcenos (ALBRO & THOMAS, 1974; TULLIEZ & BORIES, 1978, 1979).

MOSH com números de carbono entre C₁₆ e C₃₅ podem acumular em diferentes tecidos incluindo tecido adiposo, nódulos linfáticos, baço e fígado, ainda um extrato de compostos aromático de destilado de parafina quando administrado oralmente provoca atrofia na próstata, na vesícula seminal, no timo, necrose de hepatócitos entre outros sintomas (EFSA, 2012). Essa mistura de hidrocarbonetos de cadeias longas, composta principalmente de isoalcenos e cicloalcenos, possui potencial tóxico, inclusive carcinogênico, sendo, portanto,

necessário uma série de processos para atingir um nível de pureza que seja adequado e seguro para o seu uso em cosméticos, alimentos e drogas (NASH et al., 1996) sendo amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética.

O uso direto de óleo mineral branco em preparações do gênero alimentício inclui aplicações como fermentação de pães, controles de poeira no processamento de grãos e antiespumantes para sucos de frutas e vegetais frescos (FOOD CHEMICALS CODEX, 1981). Devido às suas propriedades emolientes e hidratantes, são muito utilizados na formulação de óleos para bebês, cremes e loções para a pele, batons, produtos para cabelo e base para maquiagens, em concentrações variando de menos de 1 a 99% (HARRY'S COSMETICOLOGY, 1982). Além disso, no Brasil, com registro e liberação da ANVISA, óleos minerais puros como Nujol®, Ideal®, entre outros estão disponíveis para a população, sem a necessidade de prescrição médica, indicados como laxante e terapia em uso tópico para a pele, ambos para uso adulto e pediátrico. Os óleos medicinais, cosméticos e de qualidade alimentar são óleos minerais brancos altamente refinados com um número de carbonos de 15 a 25 para os óleos leves e 25 a 50 para os óleos pesados (NASH et al., 1996).

Contudo, sabe-se também que algumas substâncias aromáticas do Óleo Mineral possuem ações estrogênicas quando analisados *in vitro* (TARNOW et al., 2016) e vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos têm a capacidade de substituir estrogênios naturais e ocupar sítios de ligação em ERs, pelo menos até certo ponto, implicando em um potencial mecanismo de ação nos tecidos responsivos ao sistema endócrino mediados por ER (SANTODONATO, 1997).

Apesar de certos tipos de óleos compostos de hidrocarbonetos minerais apresentarem efeitos prejudiciais em testes com animais de laboratório, o efeito tóxico e acumulativo de outros que compartilham muitas características físico-químicas com esses óleos não mostram nenhum efeito indesejável, e sendo esses óleos uma mistura de hidrocarbonetos, não estão claros quais compostos causam seus respectivos efeitos, o que torna difícil o estudo dessas substâncias (SCOTTER et al., 2003). Além disso, a forma de exposição a hidrocarbonetos é

importante, considerando que sua absorção pode variar (KOSS & TESSERAUX, 1999). Desse modo, a administração enteral é o modo mais simples e comum de administrar os fármacos, entretanto, oferece complicações nas vias de absorção devido à agressividade do ambiente gastrointestinal. A maioria dos fármacos absorvidos no trato gastrointestinal entra na circulação portal e encontra o fígado antes de serem distribuídos, podendo sofrer biotransformação (FINKEL et al., 2010), o que pode modificar as estruturas das substâncias. Sendo assim, considerando que o Óleo Mineral é uma mistura de hidrocarbonetos, é possível que estes possam ser modificados ao passar pelo fígado e formem diferentes compostos com potencial ação em diferentes tecidos do organismo. Nesse cenário e considerando a sensibilidade da próstata a diversos compostos, é possível que o Óleo mineral e/ou seus metabólitos, resultantes do efeito de primeira passagem, interfiram na homeostase prostática.

Óleo de Milho

Outro óleo utilizado em pesquisas é o Óleo de Milho que, por décadas tem sido amplamente aceito e utilizado como veículo para administração por via oral para substâncias voláteis e insolúveis em água (YUAN et al., 1991), inclusive em trabalhos avaliando o efeito de diversas substâncias sobre a próstata (SANTOS et al., 2006; PEREZ et al., 2012), entretanto, a presença de fitoesteróis, que ocorrem nos óleos vegetais (WEIRAUCH & GARDNER, 1978) deve ser considerada, principalmente em estudos experimentais envolvendo substâncias com potencial capacidade de desregulação endócrina.

Por ser uma rica fonte de ácidos graxos poliinsaturados, o óleo de milho é atribuído como agente regulador dos níveis de colesterol no sangue e pressão arterial (RODRIGUES et al., 2003), uma vez que dietas ricas em gorduras saturadas aumentam a concentração total sérica de colesterol e que a substituição de gorduras saturadas por poliinsaturadas (particularmente ácido linoleico) leva à redução de colesterol total sérico (JACKSON et al., 1978).

Ainda, sabe-se que há uma relação entre o colesterol corporal e lipídios totais do corpo em ratos adultos, sendo a proporção mais baixa em ratos alimentados com uma dieta de baixo teor de gordura do que aqueles que receberam suplementação com óleo de milho (GERSON et al.,1961).

O Óleo de Milho apresenta um alto valor nutricional e propriedades sensoriais desejáveis, sendo composto principalmente pelo ácido graxo linoleico (ω -6) (39-63%), oleico (20-42%) e palmítico (9-17%) (MOREAU, 2005), sendo que o ω -6 possui tanto características vantajosas quanto desvantajosas devido à facilidade em sofrer processos oxidativos (SNYDER et al., 1985). Entretanto, de modo geral, o óleo apresenta boa estabilidade oxidativa, devido aos altos níveis de compostos insaponificáveis que incluem os fitoesteróis e os tocoferóis (GUNSTONE, 2005). Segundo Dupont et al., 1990 o ácido linoleico é o precursor, por dessaturação e alongamento, de di-homo-gama-linoleico e ácido araquidônico. Esses ácidos graxos são esterificados em fosfolipídios e são liberados após estimulação para serem usados como precursores de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Esses componentes são ativos como fatores parácrinos e autócrinos em quantidades muito pequenas (pico e nanogramas) e são coletivamente conhecidos como eicosanoides. Os eicosanoides são necessários para uma ampla gama de funções fisiológicas no sistema cardiovascular, renal, gastrointestinal, imune e reprodutivo. O óleo de milho é, também, uma boa fonte de ácido linoleico e também de vitamina E.

O ácido araquidônico, sintetizado a partir do ácido linoleico e da vitamina E, ligado à membrana, lipofilicamente, tem um efeito antioxidante, tanto no aspecto físico-químico quanto em propriedades funcionais das membranas celulares. A orientação da vitamina E na membrana está em íntima associação com o ácido araquidônico, sendo que os mecanismos que afetam a função celular são por interação lipídio-proteína. Esses efeitos podem incluir efeitos na estrutura da membrana (fluidez, organização, atividade antioxidante) e efeitos na função de regulação (receptores, permeabilidade, fatores de crescimento). Entretanto, o efeito da adição dietética na composição lipídica do tecido tem limites, pois a quantidade total de PUFA (do inglês *polyunsaturated fatty acid*) e a quantidade de insaturação tende a permanecer constante numa membrana conforme o tecido e o tipo de membrana em que estão (DUPONT et al., 1990).

Considerando o fato da ingestão e ação de ácidos graxos como o ω -6, que são considerados como fatores que influenciam na fisiologia da próstata e que foram associados à maior agressividade do câncer de próstata (ZHAO et al., 2016; TAMMA et al., 2015), e a presença desses componentes no Óleo de Milho, é considerável a proposição de que a ingestão diária de Óleo de Milho possa interferir na homeostase prostática.

Objetivo

Considerando que o Óleo mineral e Óleo de Milho são utilizados como veículo para a administração de hormônios esteroides e de drogas lipofílicas, com finalidade experimental ou terapêutica, e que as informações sobre os efeitos desses compostos na próstata são escassas, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar a ação desses óleos sobre a morfofisiologia da próstata ventral de gerbilos adultos machos.

Metodologia

Delineamento Experimental

Os animais utilizados nesse experimento foram provenientes e mantidos no Biotério do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP), em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade (12horas de luz e 12h de escuro) e temperatura média de 24°C, sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBILCE – UNESP, protocolo 124/2015.

Foram utilizados 18 machos adultos (90 dias de idade) de gerbilo, divididos igualmente (n=6) e aleatoriamente em 3 grupos como descrito a seguir:

- Controle Intacto (**IC**): Os animais não foram submetidos a qualquer tratamento.
- Gavagem com óleo de milho (**CO**): Os animais receberam 0,1ml/dia* de óleo de milho via oral por gavagem durante 25 dias.
- Gavagem com óleo mineral (**MO**): Os animais que receberam 0,1ml/dia* de óleo mineral (Nujol®) via oral por gavagem durante 25 dias.

(*) Maior dose possível para ser administrada com segurança em animais com peso médio de 70 gramas, baseada em um teste prévio.

Com 116 dias de idade, todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, pesados e em seguida decapitados para a coleta do sangue total que foi armazenado em tubos de 4 ml com gel de separação a 2°C para posterior centrifugação. Em seguida foi realizada a dissecação para a retirada do complexo prostático (composto pelos lobos prostáticos e uma pequena parte da uretra circundada por estes), fígado e glândulas adrenais. O Complexo prostático, a próstata ventral isolada e todos os órgãos foram pesados

e fixados por imersão em paraformaldeído 4% por 24 horas. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos e o soro armazenado a -80°C. Após a fixação, todo o material foi desidratado em bateria de etanol, clarificado em xilol, infiltrados e incluídos em Paraplast. O complexo prostático sem o lobo ventral, o fígado e as glândulas adrenais foram destinados a outros experimentos. As próstatas ventrais foram então seccionadas a 4µm de espessura para análises histológicas e imuno-histoquímicas.

Análises morfológicas

Para as análises morfológicas gerais, estereológicas e morfométricas os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Para isso as lâminas contendo os cortes foram submersas em hematoxilina de Harris, lavadas em água, mergulhadas em solução de diferenciador (HCl 1% em álcool 70%), novamente lavadas em água e submersas em solução de eosina-floxina.

Para analisar o sistema de fibras reticulares, foi realizada a técnica de Reticulina de Gömöri, para isso, os cortes foram submetidos aos seguintes procedimentos, intercalados por banhos em água destilada: permanganato de potássio 1%, ácido oxálico 3%, alúmen férrico 1%, solução de prata amoniacal, formol 10%, cloreto de ouro 0,2%, hipossulfito de sódio 2% e, por fim, solução saturada de ácido pícrico.

Após as duas colorações, foi realizada uma desidratação em bateria de etanol e após, as lâminas foram mergulhadas em xilol e finalmente foi realizada a montagem das lâminas com bálsamo do Canadá e lamínula.

A fim de obter o volume relativo dos diferentes compartimentos prostáticos dos grupos em estudo, foi realizada uma análise estereológica. Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo e as medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1978) e aplicado à próstata por Huttunen et al. (1981). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência relativa dos compartimentos: epitélio, lúmen, estroma muscular (ou camada muscular lisa), estroma não muscular e vasos sanguíneos.

Também foi realizada a morfometria, para a qual os cortes histológicos foram submetidos à medida da altura (μm) das células epiteliais secretoras e espessura (μm) da camada muscular lisa abaixo do epitélio, desconsiderando as regiões com hiperplasia ou neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIP). Para cada uma dessas análises foram coletadas 200 medidas de cada grupo experimental.

Análises por Imuno-histoquímica

Foram realizadas reações de Imuno-histoquímica para detecção de receptor de Andrógeno (Anti-AR) e receptor de Estrógeno dos tipos ERS1 e ERS2 (Anti-ER α e Anti-ER β). Os protocolos desenvolvidos para estas reações já foram estabelecidos para uso na espécie animal em questão em nosso laboratório e foram precedidos de desparafinização com banhos de xilol e hidratação em bateria de etanol com um último banho em água destilada.

Basicamente, os protocolos seguiram uma ordem de procedimentos semelhante para todos os testes a serem desenvolvidos com algumas variações específicas para cada anticorpo. Primeiramente realizou-se a recuperação antigênica utilizando tampão citrato (trisódio citrato dihidrato e ácido cítrico monohidrato) pH 6 a 6,5 em forno de micro-ondas, por 3 vezes de 7 minutos em potência média-baixa ou em banho-Maria a 96°C por 45 minutos. Em seguida fez-se o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio 3% em metanol protegido da luz e o bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó 5% ou BSA 1% em tampão TBSnp40. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário, específico para cada receptor, e armazenados em câmara úmida *overnight*. Os cortes foram incubados ainda com um anticorpo secundário em estufa a 37°C. Logo após, os cortes foram tratados com complexo avidina e biotina ou Polímero NovoLink-Leica, que impede reações com a biotina endógena. A revelação dos sítios de ligação foi então realizada com DAB e a contracoloração com hematoxilina de Mayer. Ao final, todas as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula.

As variações realizadas no protocolo descrito anteriormente são descritas a seguir:

A reação de Imuno-histoquímica para detecção de receptor de Andrógeno (Anti-AR - sc-816/Santa Cruz Biotechnology) teve a recuperação antigênica realizada em banho-Maria por 45 minutos, o bloqueio de proteínas inespecíficas realizado com leite em pó 5% e foi usado polímero NovoLink-Leica.

Na reação de Imuno-histoquímica para detecção de receptor de Estrógeno do tipo ERS1 (Anti-Er α - sc-542/ Santa Cruz Biotechnology), foi utilizada a recuperação em banho-maria por 15 minutos com mais 20 minutos de descanso após sair da panela; o bloqueio de proteínas inespecíficas realizado em BSA 1% em tampão TBS e foi usado complexo avidina-biotina.

Já a reação de Imuno-histoquímica para detecção de receptor de Estrógeno do tipo ERS2 (Anti-ER β - sc-8974/Santa Cruz Biotechnology) teve a recuperação antigênica realizada em banho-maria por 45 minutos com mais 20 minutos de descanso após sair da panela, o bloqueio de proteínas inespecíficas realizado com leite BSA 1% e foi usado complexo avidina-biotina.

As avaliações foram efetuadas em microscopia de luz e as imagens histológicas foram digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens - Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics.

As quantificações das reações de imuno-histoquímica para AR, ERS1 e ERS2 foram realizadas por meio de contagem de células positivas e negativas, com total de, no mínimo, duas mil células epiteliais e duas mil células estromais por grupo, utilizando dez campos aleatórios por animal de cada grupo. A frequência de células positivas foi calculada pela razão entre o número de células positivas pelo número total de células de cada campo.

Dosagem hormonal

Foi feita a dosagem hormonal sérica dos níveis de testosterona e de estradiol por ensaio de ELISA Captura/Sanduiche (anticorpo-antígeno-anticorpo) utilizando kits comerciais específicos de alta sensibilidade (Cayman Chemical Company, MI, EUA - itens nº 582701 e nº 582251, respectivamente). As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer System- BioTek Instruments, VT, EUA).

Análise Biométrica

Para a análise biométrica, foi realizada a comparação, entre os grupos experimentais, do peso dos animais e dos órgãos: complexo prostático e da próstata ventral. Para evitar a interferência da variação causada pela proporção anatômica dos animais, o peso do complexo prostático e da próstata ventral foi dividido pelo peso do animal, resultando em um peso relativo.

Análise estatística

Todos os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análises estatísticas realizadas em software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. 1992-2007) e utilizando-se testes estatísticos paramétricos (ANOVA seguido do teste de Tukey) e não paramétricos (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). Os resultados são apresentados em termos da média \pm desvio padrão e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

A análise morfológica geral da próstata ventral realizada nos cortes corados com HE permitiu observar ácinos compostos por um epitélio variando entre cúbico e prismático simples, com algumas regiões apresentando pseudoestratificações. No citoplasma basófilo é possível observar uma região clara sobre o núcleo correspondente a área citoplasmática ocupada por um complexo de Golgi bem desenvolvido e polarizado, além de grânulos de secreção no ápice dessas células característicos de secreção apócrina. A presença de células claras, com nucléolo evidente, também foi observada com certa frequência em todos os grupos, assim como um estroma muscular, circundante aos ácinos, composto por células musculares lisas e capilares sanguíneos mostrou algumas regiões irregulares que avançam na direção do estroma não muscular (Figura 4). Já a técnica de Reticulina de Gömori, mostrou uma maior concentração de fibras colágenas na transição epitélio-estroma muscular e circulando vasos, muitas fibras reticulares contínuas entre as células musculares e um maior espessamento dessas fibras na região próxima ao epitélio. Além disso, foi possível observar um aumento discreto das fibras colágenas no grupo MO e algumas regiões com uma perda de continuidade entre as fibras reticulares nesse grupo (Figura 5).

Comparando a morfologia geral entre os grupos, embora alguns animais apresentassem algumas características incomuns às já descritas para a próstata de gerbilos, estes animais não estavam restritos a um grupo específico, portanto, não foram encontradas diferenças morfológicas acentuadas entre os grupos. Nesse cenário, é importante ressaltar que tanto no grupo controle quanto nos tratados, foram encontradas regiões com epitélios irregulares, apresentando muitas dobras e estratificação epitelial, além de regiões hiperplásicas. Uma ocorrência que chamou a atenção foi a ocorrência, em todos os grupos, de neoplasias intraepiteliais (NIP) localizadas sempre entre o epitélio e o estroma muscular, formando arranjos similares a microácinos, e não foi encontrada nenhuma NIP na direção luminal (Figura 4).

O resultado da análise morfométrica mostrou que os tratamentos com o Óleo Mineral e com o Óleo de milho não provocam alteração na altura epitelial

(Figura 6), entretanto a espessura da camada muscular do grupo que recebeu óleo mineral ficou maior em relação ao grupo controle (Figura 7).

Na obtenção do volume relativo dos diferentes compartimentos prostáticos por meio da estereologia, a frequência relativa de epitélio, lúmen, estroma muscular, estroma não muscular e vasos sanguíneos mostrou manter um padrão entre os grupos, com a maior frequência de lúmen, seguida de epitélio, estroma não muscular, estroma muscular e por fim, com menor frequência, vasos sanguíneos. Esse padrão se manteve em todos os grupos (Figura 8). Além disso, foi realizada a comparação das frequências dos compartimentos entre os grupos experimentais, e os resultados mostram que tanto o tratamento com Óleo Mineral quanto o tratamento com Óleo de Milho não alteram a proporção dos compartimentos prostáticos (Figura 9).

A análise biométrica resultante da comparação do peso dos animais e do peso relativo do complexo prostático e próstata ventral mostrou que houve uma perda de peso nos animais tratados tanto com Óleo Mineral quanto nos tratados com Óleo de Milho. (Figura 10).

Quando realizadas as reações de Imuno-histoquímica, foi possível avaliar o padrão de imunomarcção por meio da quantificação de células positivas para receptor de Andrógeno e receptor de Estrógeno dos tipos ERS1 e ERS2. Assim, o resultado da comparação entre os grupos experimentais foi que o tratamento com Óleo mineral provoca um aumento no padrão de imunomarcção de AR tanto no epitélio quanto no estroma (Figura 11), além de aumentar o de ER α no epitélio (Figura 12). Já o tratamento com Óleo de Milho resultou em uma diminuição de AR tanto no epitélio quanto no estroma (Figura 11), um aumento da de ER α (Figura 12) no epitélio e um aumento de ER β no epitélio (Figura 13).

Após a dosagem hormonal sérica de testosterona e estradiol, foi verificado que os tratamentos com Óleo Mineral e com Óleo de milho não alteram a concentração sérica de testosterona, entretanto, o tratamento com Óleo Mineral aumentou a concentração sérica de estradiol nos animais (Figura 14).

Discussão

Diversas pesquisas, com intuito de avaliar atividades benéficas, tóxicas ou de desregulação endócrina de determinados compostos, utilizam-se de substâncias lipofílicas para diluição e administração desses compostos (THAYER, et al., 2001; PEREZ, et al., 2012; ZANATELLI et al., 2013; SILVA, et al., 2013). Dois desses veículos comumente utilizados são o Óleo Mineral e o Óleo de Milho, que possuem em sua composição moléculas capazes de interagir com diversos tecidos em variados organismos. Embora o uso desses dois veículos em estudos seja comum, é a primeira vez que a análise do efeito desses óleos na próstata é realizada.

Nesse contexto, a próstata é um importante modelo na avaliação da ação desses veículos, uma vez que se mostra sensível a inúmeras variações que possam ocorrer no organismo, respondendo a elas por alterações verificadas morfológicamente. Sendo assim, a intenção desse trabalho foi avaliar a ação do Óleo Mineral e do Óleo de Milho sobre a morfologia da próstata ventral de gerbilos, um eficaz modelo para estudos envolvendo a próstata.

Os tratamentos com Óleo Mineral e com Óleo de Milho provocaram uma redução no peso dos animais, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, não houve alteração no peso do complexo prostático, nem da próstata ventral, sendo assim, é possível que a diminuição no peso dos animais esteja relacionada ao estresse da manipulação desses animais durante o tratamento. Sabe-se que altas doses de óleo mineral interferem na absorção de diversos nutrientes no trato intestinal (TROVATO et al., 1991), sendo assim, é possível também os tratamentos interfiram na absorção gastrointestinal.

Além do padrão morfológico já descrito anteriormente por Rochel et al., 2007, foi notável em todos os grupos a presença de células claras, já descritas em gerbilos por Zanatelli et al., 2016. Além da presença de células claras, outro fato que chamou a atenção na análise morfológica geral, foi a presença de regiões anormais nos epitélios, com regiões estratificadas, muitas dobras, regiões hiperplásicas, e ainda a formação de NIP, nas quais células com núcleos atípicos se arranjam em microácinos entre o epitélio e o estroma muscular. Essas características hiperplásicas e neoplásicas geralmente estão associadas

ao aumento da idade, visto que gerbilos mais velhos tendem a apresentar lesões espontâneas (CAMPOS et al., 2008) e são causadas geralmente por variações nos níveis hormonais, principalmente andrógenos, provocando mudanças também em gerbilos adultos (SCARANO et al., 2006). Sendo assim, é possível que os animais tenham sofrido variações hormonais resultando nessas alterações, porém, como esses encontrados não foram quantificados e foram observados em todos os grupos, não se pode determinar se as hiperplasias e NIPs foram causadas pelos tratamentos com Óleo Mineral ou Óleo de Milho.

Embora a avaliação morfológica geral e a estereológica não tenham, de fato, mostrado diferenças marcantes entre os grupos experimentais, a morfometria revelou que o tratamento com Óleo Mineral resultou em um espessamento da camada muscular circundante aos ácinos. A aparente reorganização das fibras estromais, colágenas e reticulares pode estar associada ao espessamento observado na camada de células musculares lisas, uma vez que o estroma muscular é sensível a alterações androgênicas e pode responder variando a secreção de colágeno e outros componentes (VILAMAIOR et al., 2005). Esse espessamento da camada muscular pode ser resultante de alterações na expressão de receptores hormonais, uma vez que a ativação ou não do AR regula o crescimento da próstata (TAN et al., 2015).

A diminuição no padrão de imunomarcação de AR tanto no epitélio quanto no estroma resultante da exposição ao óleo de milho pode provocar alterações na morfologia da próstata, uma vez que esse receptor pertence a uma família de receptores nucleares ligados a fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento prostático, essenciais para o crescimento normal e sobrevivência do epitélio da próstata que, interage diretamente com o estroma numa relação conhecida como interação epitélio/estroma (ROCHEL-MAIA et al., 2011). Além disso, o tratamento com óleo de milho aumentou a frequência de células positivas para os receptores de estrógeno ERS1 epitelial e ERS2 epitelial e estromal. Essas alterações podem estar relacionadas com o potencial de ação estrogênica do óleo de milho de acordo com Schettler (2003).

O ERS1 ou ER α epitelial é conhecido por sua relação com a proliferação celular anormal e inflamação (ELLEM & RISBRIDGER, 2009), sendo assim, o

aumento da expressão desse receptor no grupo CO proporciona uma situação favorável a alterações na morfologia da próstata. Esse aumento se somado a presença do $\omega 6$ no óleo de milho, pode potencializar o efeito inflamatório do ERS1, uma vez que esse ácido graxo é conhecido por desempenhar um papel pró-inflamatório de acordo com Calder (2008). Conflitante a isso, houve também um aumento de ERS2 ou ER β epitelial, sendo que esse receptor é caracterizado como tendo um papel anti-proliferativo e anti-inflamatório (ELLEM & RISBRIDGER, 2009), sendo assim é possível que haja um balanceamento dos efeitos causados pelo aumento da expressão de ERS1. Ainda nesse contexto, novamente é preciso levar em consideração a ação do $\omega 6$, visto que, embora esse ácido graxo tem um papel pró-inflamatório, ele leva a formação de um eicosanoide chamado PGE2 que possui propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2008), entretanto, como não foi realizada nenhuma dosagem desses eicosanoides essa questão é meramente especulativa.

Diferente do efeito provocado pelo Óleo de Milho, o tratamento com Óleo Mineral resultou em um aumento na expressão de AR no epitélio e no estroma. Esse receptor, juntamente com os andrógenos, é responsável por regular a razão entre proliferação e morte celular (TAN et al., 2015) assim, a próstata depende da sua sinalização para manter a homeostase na glândula já desenvolvida (DENG & TANG, 2015). Esse aumento da expressão de AR no grupo MO proporciona um ambiente favorável para modificações morfofisiológicas como hiperplasias e neoplasias, uma vez que o aumento da expressão de AR relacionado à idade está ligado a hiperplasias espontâneas na próstata, assim, o aumento da expressão de AR nuclear pode ser um precursor para o desenvolvimento de câncer de próstata (DIALLO et al., 2008).

Essa situação propensa ao surgimento de alterações prostáticas se agrava no grupo MO, uma vez que é acompanhada de um aumento da expressão de ERS1 ou ER α epitelial, que quando ativado conduz à proliferação, à inflamação e pré-malignidade na próstata (PISOLATO et al., 2016). Essas modificações envolvendo esses receptores são semelhantes aos efeitos provocados pelo etinil-estradiol em gerbilos de acordo com Perez et al. (2011) e Falleiros-Jr et al. (2016). Nesse cenário, um fator agravante é o aumento do nível sérico de estradiol no grupo MO.

Embora a ação estrogênica do Óleo Mineral tenha sido relatada por Tarnow et al. (2016) devido à presença de compostos aromáticos nesse óleo, não é possível afirmar que o óleo utilizado no tratamento do grupo MO contenha esses compostos aromáticos, uma vez que não foi realizada nenhuma análise de caracterização química dos óleos utilizados no presente trabalho. O que se sabe é que, apesar de certos tipos de óleos compostos de hidrocarbonetos minerais apresentarem efeitos prejudiciais em testes com animais de laboratório, o efeito tóxico e acumulativo de outros que compartilham muitas características físico-químicas com esses óleos não mostram nenhum efeito indesejável, e sendo esses óleos uma mistura de hidrocarbonetos, não está claro quais compostos causam seus respectivos efeitos, o que torna difícil o estudo dessas substâncias (SCOTTER et al., 2003). Ainda assim, o aumento na expressão de ERS1 aliado ao aumento da concentração sérica de estradiol no grupo MO sugere fortemente a possibilidade da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no Óleo Mineral que interferem na homeostase prostática como um desregulador endócrino.

Considerando que tanto o Óleo de Milho quanto o Óleo Mineral provocam alterações na morfologia da próstata de gerbilos adultos, quando administrados por via oral, o uso desses óleos como veículos para outras substâncias em experimentos deve ser cauteloso e seus efeitos devem ser levados em consideração. Embora ambos os óleos apresentem potencial de desregulação endócrina, os efeitos provocados pelo Óleo de Milho como o aumento de ambos os receptores de estrógeno ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e a diminuição do receptor de andrógeno indicam uma maior condição de controle na taxa de proliferação e morte celular e, conseqüentemente, um efeito menos danoso na próstata que o provocado pelo Óleo Mineral na próstata de gerbilos.

Conclusão

A administração de óleo mineral provoca um aumento no nível sérico de estradiol aliado a um aumento da frequência de receptores de andrógenos e de estrógenos do tipo alfa, que sabidamente estão associados a um desequilíbrio na taxa de proliferação e morte. Embora a administração de óleo mineral e do óleo de milho promovam alterações morfológicas na próstata, o óleo mineral causa uma desordem mais expressiva, evidenciando um papel como potencial desregulador endócrino.

Imagens

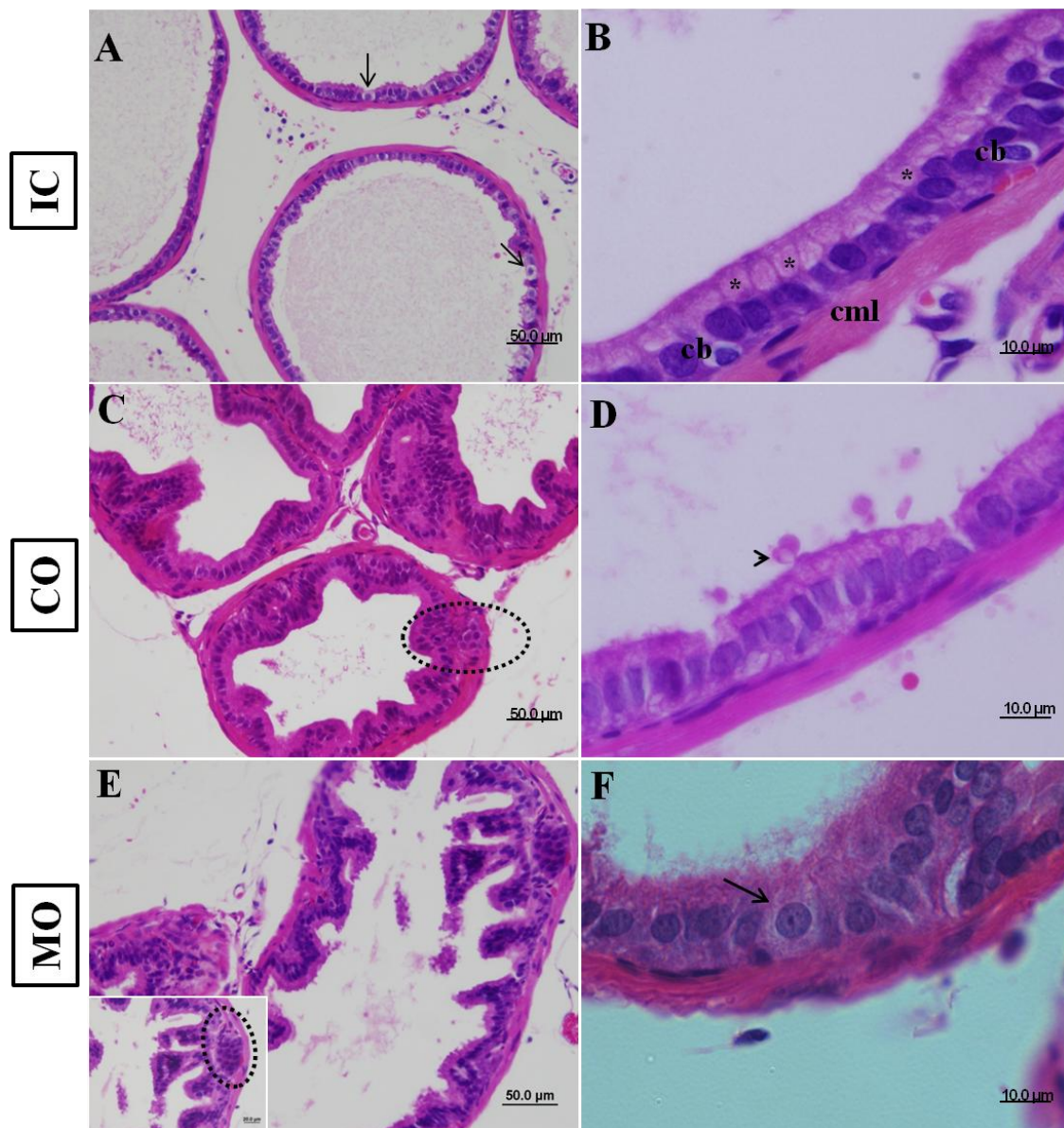


Figura 4: Cortes histológicas da próstata ventral de gerbilos corados com HE. Seta: células claras; cabeça de seta: secreção do tipo apócrina, asterisco: regiões do Complexo de Golgi; cb: em célula basal; cml: célula muscular lisa. Região circundada por pontos: NIP (Neoplasia Intraepitelial Prostática).

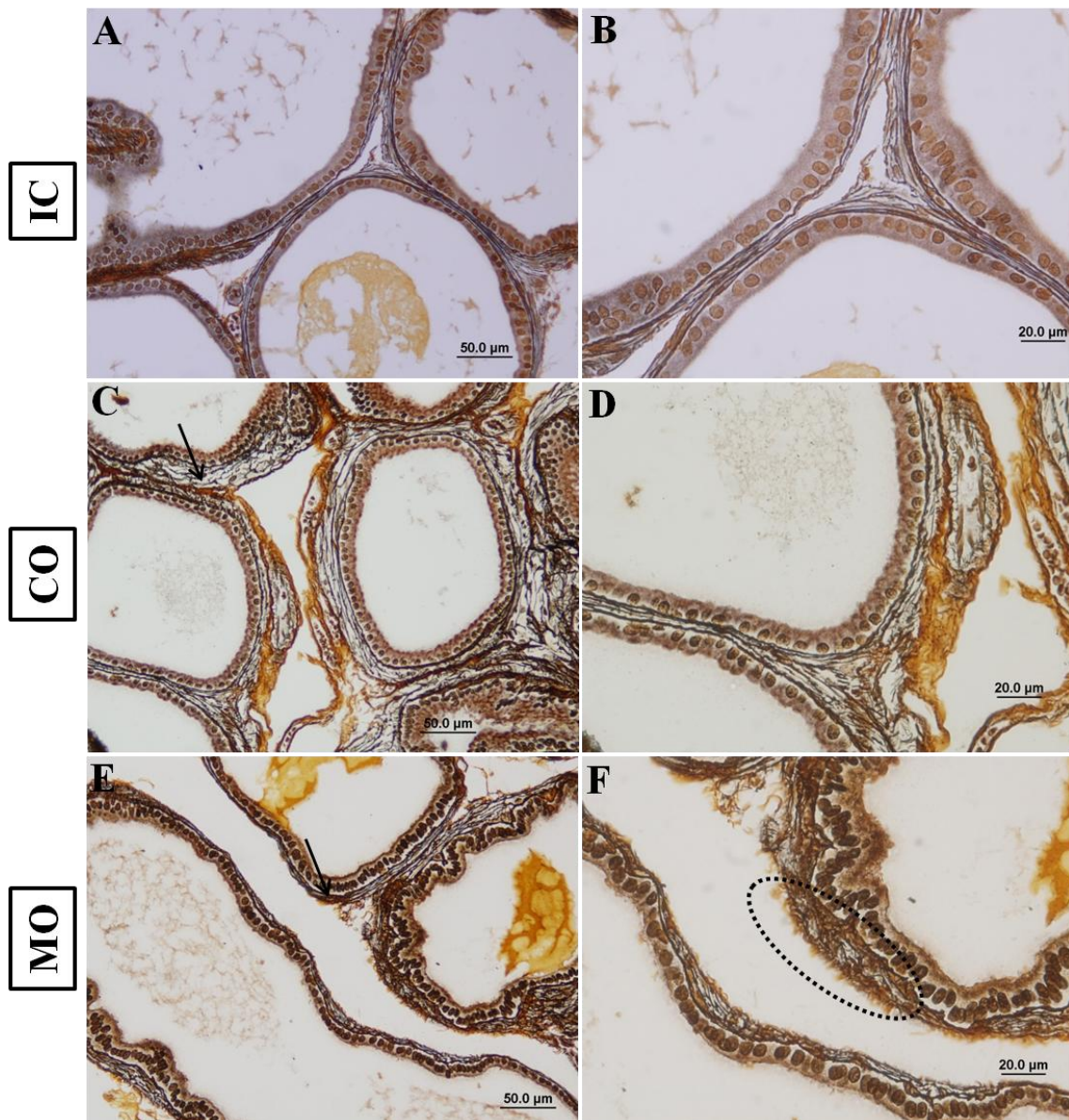


Figura 5: Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos corados pela Reticulina de Gömori. Seta: fibras colágenas. A região circundada pela linha pontilhada apresenta um desarranjo das fibras reticulares.

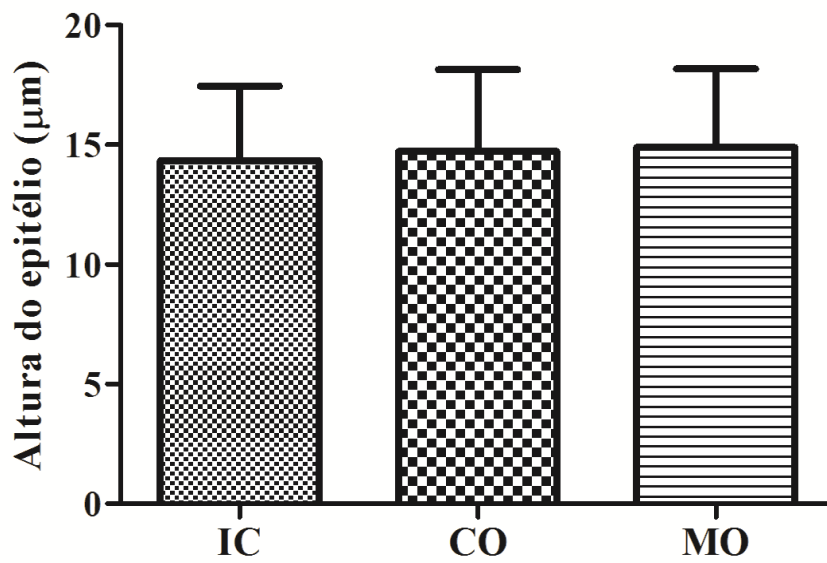


Figura 6: Altura média do epitélio (em μm) da próstata dos animais IC, CO e MO.

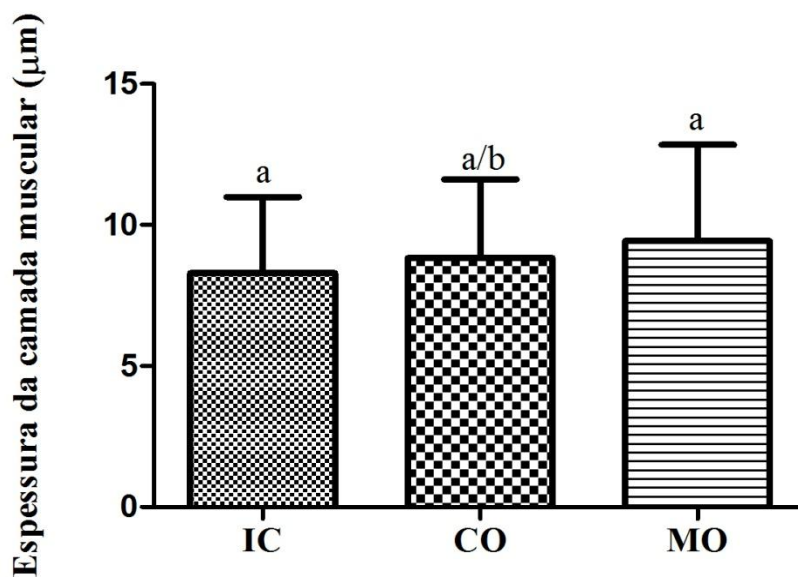


Figura 7: Espessura média da camada muscular circundante aos ácinos (em μm) da próstata ventral dos animais IC, CO e MO. (a) representa diferença estatística de IC, com $p \leq 0,05$.

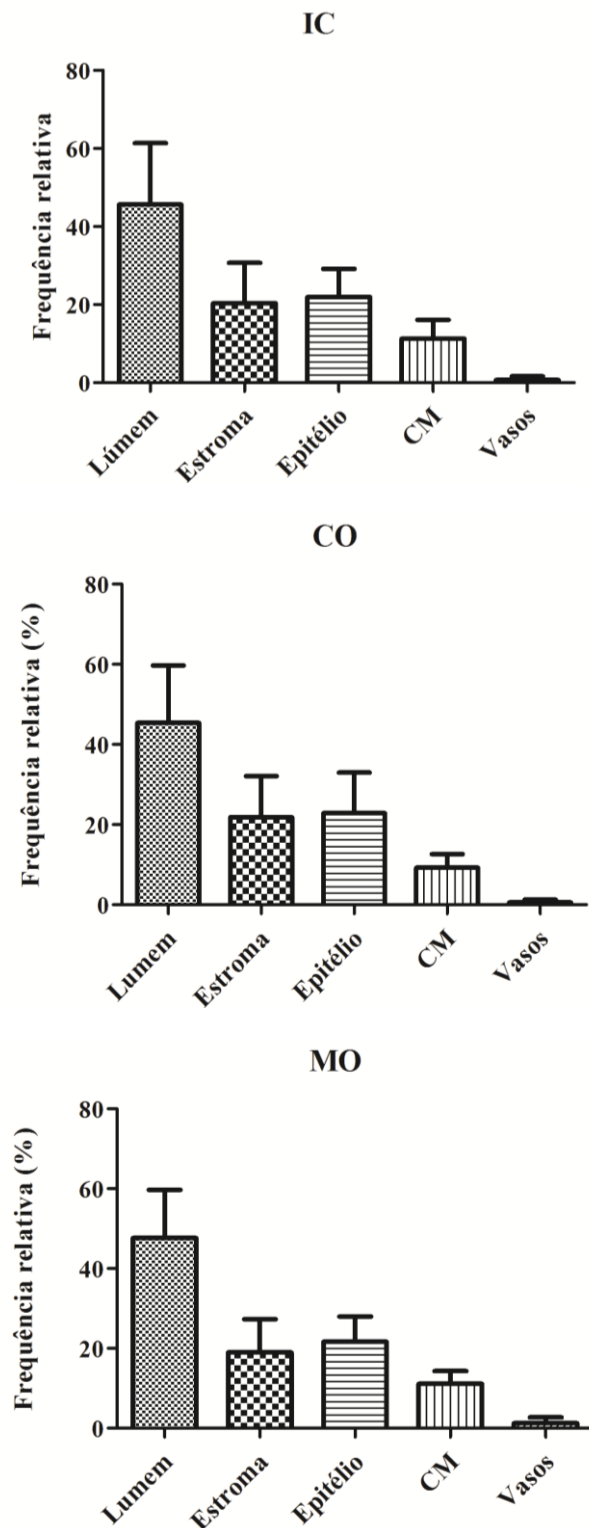


Figura 8: Frequência relativa (%) dos diferentes compartimentos teciduais prostáticos nos animais dos diferentes grupos experimentais. Controle Intacto (IC); Gavagem com Óleo de Milho (CO); Gavagem com Óleo Mineral (MO).

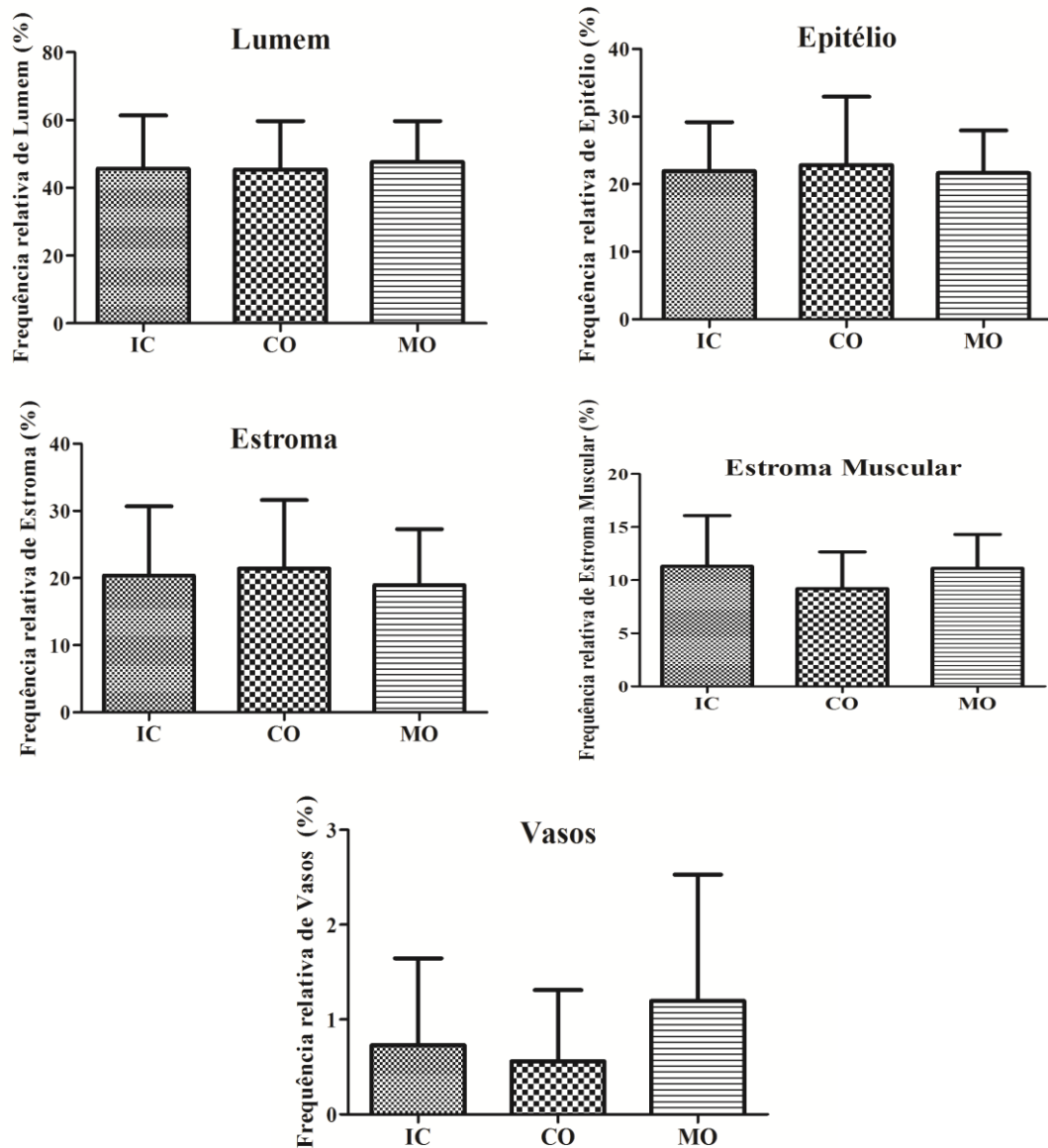


Figura 9: Comparação da média e desvio padrão dos compartimentos teciduais prostáticos dos grupos experimentais.

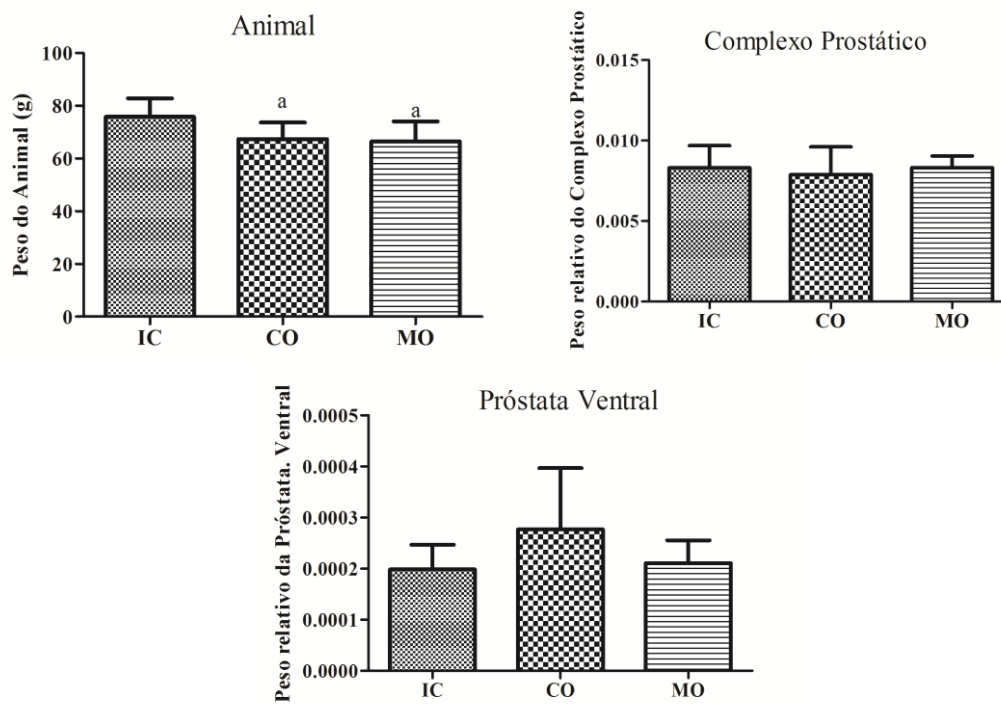


Figura 10: Peso corpóreo dos animais e peso relativo dos órgãos analisados (média e desvio padrão) nas diferentes condições experimentais. (a) representa diferença estatística de IC, considerando $p \leq 0,05$;

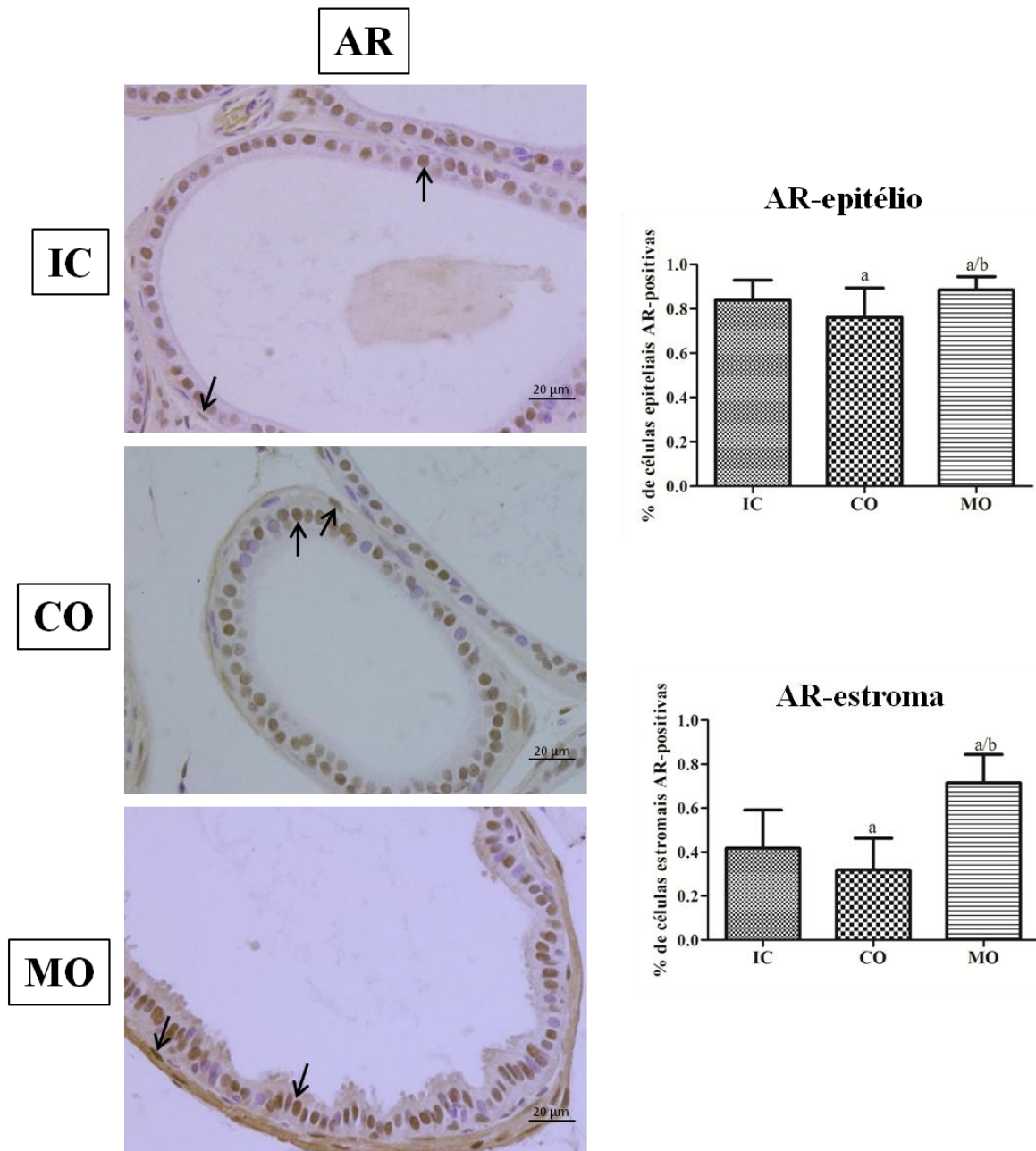


Figura 11: Cortes histológicos marcados para a detecção de AR (Setas: células AR-positivas) e frequência de células epiteliais e estromais AR-positivas; (a) representa diferença estatística de IC; (b) representa diferença estatística de CO. Com $p \leq 0,05$.

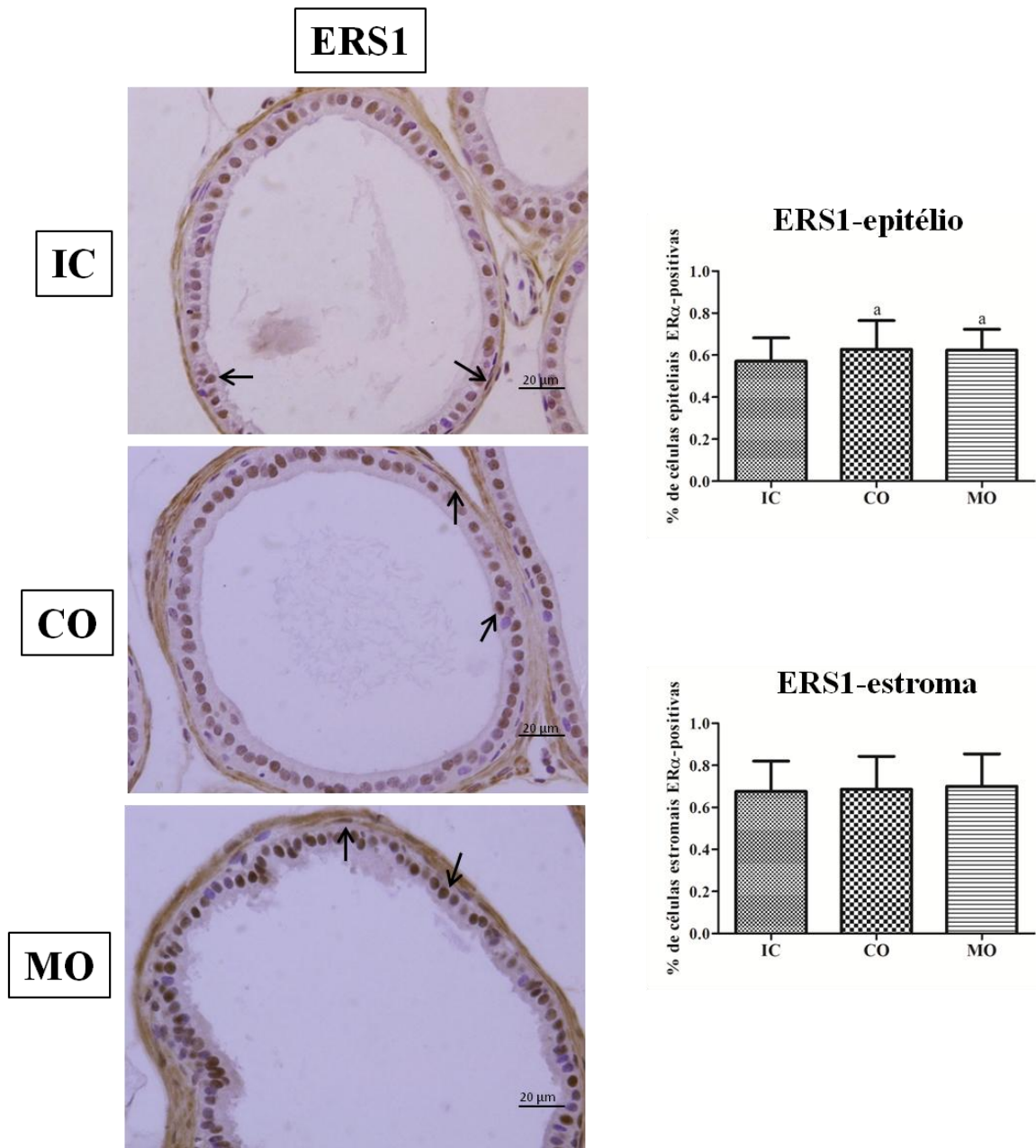


Figura 12: Cortes histológicos marcados para a detecção de ERS1 (Setas: células ERS1-positivas) e frequência de células epiteliais e estromais ERS1-positivas; (a) representando diferença estatística de IC, considerando $p \leq 0,05$.

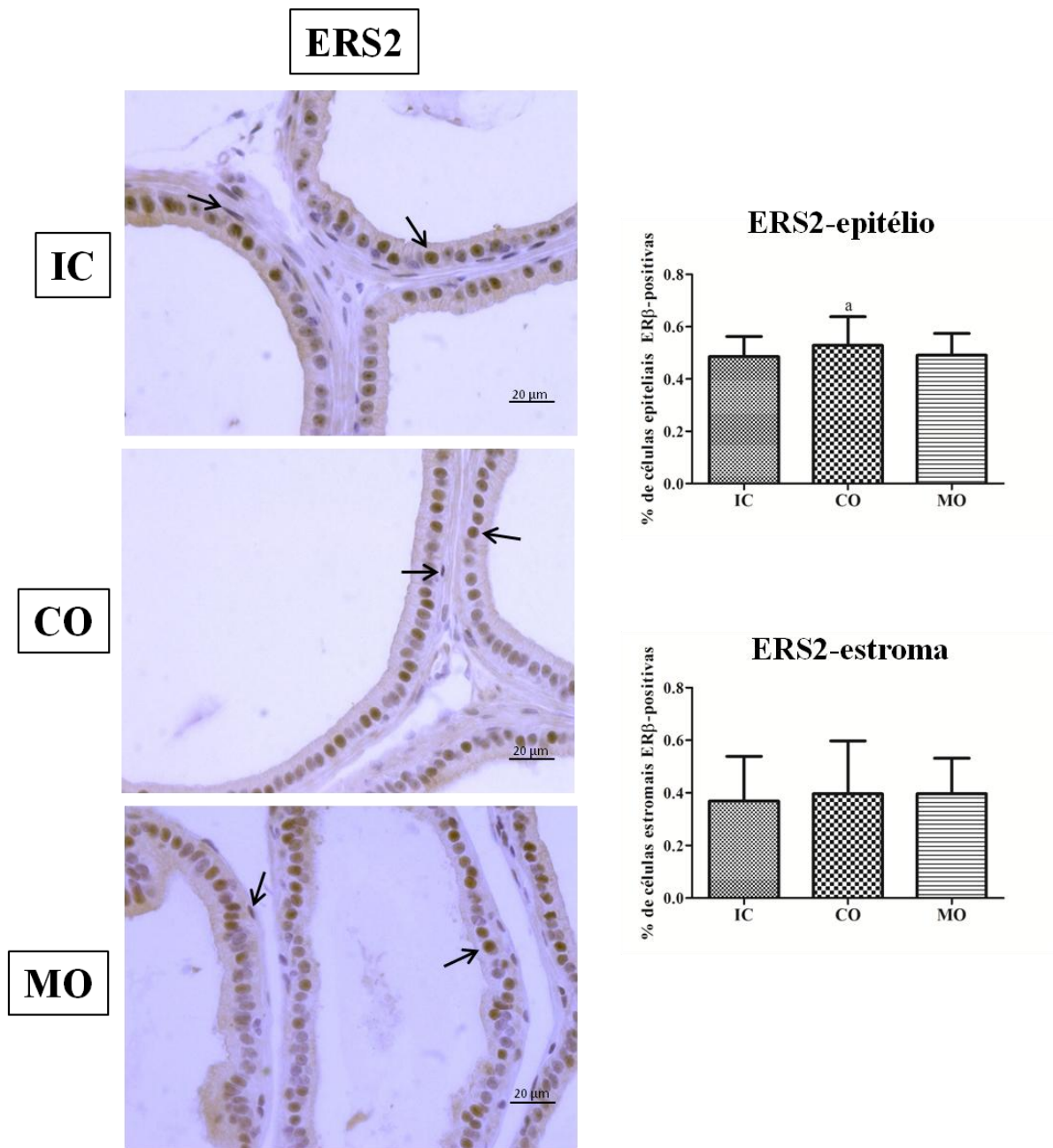


Figura 13: Cortes histológicos marcados para a detecção de ERS2 (Setas: células ERS2-positivas) e frequência de células epiteliais e estromais ERS2-positivas; (a) representando diferença estatística de IC e MO, considerando $p \leq 0,05$.

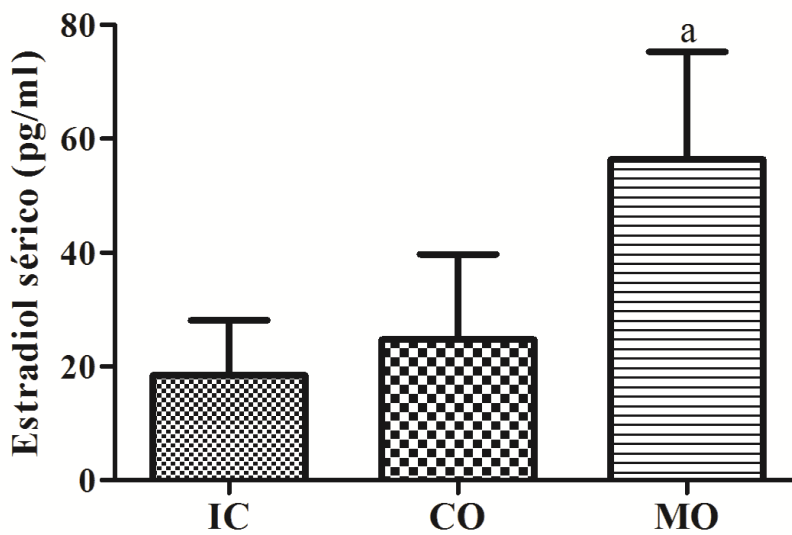
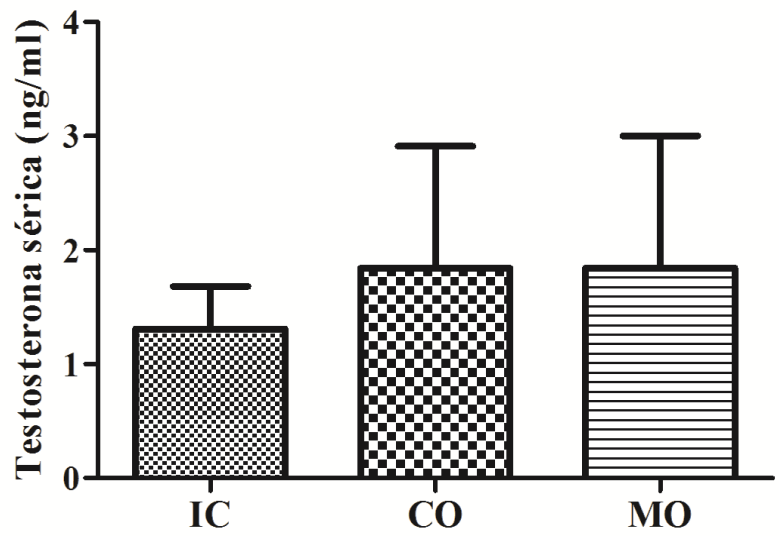


Figura 14: Média e desvio padrão da concentração hormonal sérica de testosterona (ng/ml) e estradiol (pg/ml); (a) representando diferença estatística de IC e de CO, considerando $p \leq 0,05$.

Referências Bibliográficas

ALBRO, P.W.; THOMAS, R. Intestinal absorption of hexachlorobenzene and hexachlorocyclohex and isomers in rats. **Bull Environ Contam Toxicol**, v 12, p 289-294, 1974.

ALUKAL, J.P.; LEPOR, H. Testosterone Deficiency and the Prostate. **Urol Clin North Am**, v 43, n 2, p 203-208, 2016.

ASADA, Y.; SONDA, T.; OJIRO, M.; KURATA, S.; SATO, T.; EZAKI, T.; TAKAYASU, S. 5 alpha-reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v 86, p 2875–2880, 2001.

BANERJEE, P.P.; BANERJEE, S.; LAI, J.M.; STRANDBERG, J.D.; ZIRKIN, B.R.; BROWN, T.R. Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. **Biol Reprod**, v 59, p 1163–1170, 1998.

BHANDARI, R.K.; DEEM, S.L.; HOLLIDAY, D.K.; JANDEGIAN, C.M.; KASSOTIS, C.D.; NAGEL, S.C.; TILLITT, D.E.; VOM SAAL, S.S.; RONSENFELD, C.S. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. **Gen Comp Endocrinol**, v 214, p195-219, 2015.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Quim. Nova**, v 30, p 651-666, 2007.

BONKHOFF, H.; REMBERGER, K. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. **Virch Arch**, v 433, p 195–202, 1998.
CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 8, p.885-897, 2008.

CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **Int J Exp Path**, v 89, p 13–24, 2008.

CARRUBA G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci**, v 1089, p 201-217, 2006.

CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Collagem type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. **Tissue Cell**, v 29, p 163-170, 1997.

CHOI, H.M.; JUNG, Y.; PARK, J.; KIM, H.L.; YOUN, D.H.; KANG, J.W.; JEONG, M.Y.; LEE, J.H.; YANG, W.M.; LEE, S.G.; AHN, K.S.; UM, J.Y. Cinnamomi cortex

(*Cinnamomum verum*) suppresses testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by regulating 5 α reductase. **Sci Rep**, v 6, p 31906-31918, 2016.

CORRADI, L.S.; JESUS, M.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; JUSTULIN-JR, L.A.; GÓES, R.M.; FELISBINO, S. L.; TABOGA, S.R. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **J Cell Mol Med**, v 17, n 3, p 398-406, 2013.

CUNHA, G.R.; WANG, Y.Z.; HAYWARD, S.W.; RISBRIDGER, G.P. Estrogenic effects on prostatic differentiation adenocarcinogenesis. **Reprod Fertil Dev**, v 13, p 285-296, 2001.

CUSTÓDIO, A.M.G.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. **Cell Biol Int**, v 28, p 335-344, 2004.

DE MARZO, A.M.; PLATZ, E.A.; STUCLIFFE, S., XU, J., GRONBERG, H.; DRAKE, C.G.; NAKAI, Y.; ISAAC, W.; NELSON, W. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev**, v 7, n 4, p 256-269, 2007.

DENG, Q.; TANG, D.G. Androgen receptor and prostate cancer stem cells: biological mechanisms and clinical implications. **Endocr Relat Cancer**, v 22, n 6, p T209-T220, 2015.

DIALLO, J.S.; ALDJMAH, A.; MOUHIM, A.F.; FAHMY, M.A.; KOUMAKPAYI, I.H.; SIRCAR, K.; BEGIN, L.R.; MÊS-MASSON, A.M.; SAAD, F. Co-assessment of cytoplasmic and nuclear androgen receptor location in prostate specimens: potential implications for prostate cancer development and prognosis. **BJU Int**, v 101, n 10, p 1302-1309, 2008.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.P.; GIUDICE, L.C.; HAUSER, R.; PRINS, G.S.; SOTO, A.M.; ZOELLER, R.T., GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. **Endocr Rev**, v 30, p 293–342, 2009.

DUPONT, J.; WHITE, P.J.; CARPENTER, M.P.; SCHAEFER, E.J.; MEYDANI, S.N.; ELSON, C.E.; WOODS, M.; GORBACH, S.L. Food uses and health effects of corn oil. **J Am Coll Nutr**, v 9, n 5, p 438-470, 1990.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. **EFSA Journal**, v 10, n 6, 185pp, 2012.

ELLEM, S.J.; RISBRIDGER, G. P. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. **Ann N Y Acad Sci**, v 01155, n 1, p174-186, 2009.

ELLEM, S.J.; RISBRIDGER, G.P. Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. **Nat Rev**, v 7, p 621-627, 2007.

FALLEIROS-JR, L.R.; PEREZ, A.P.S.; TABOGA, S.R.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L., Neonatal exposure to ethinylestradiol increases ventral

prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils. **Int J Exp Path**, v 97, p 380-388, 2016.

Farmacopéia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz**, v 2. 5ed. Brasília, p 1197-1198, 2010.

FINKEL, R.; CUBEDDU, L. X.; CLARK, M.A. Farmacologia Ilustrada. 4.ed. . Artmed, Porto Alegre. 2010.

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

Food Chemicals Codex. Mineral Oil White. National Academy Press, Washington, DC; p 199-200. 1981.

GERSON, T.; SHORLAND, F.B.; ADAMS, Y. The Effects of Corn Oil on the Amounts of Cholesterol and the Excretion of Sterol in the Rat. **Biochem J**, v 81, p 584-591, 1961.

GRINDSTAD, T.; SKJEFSTAD, K.; ANDERSEN, S.; NESS, N.; NORDBY, Y.; ALSAAD, S.; FISMEN, S.; DONNEM, T.; KHANEHKENARI, M.R.; BUSUND, L.T.; BREMNES, R.M.; RICHARDSEN, E. Estrogens receptors α and β and aromatase as a independent predictors for prostate cancer outcome. **Sci Rep**, v 6, p 33114-33124, 2016.

GUNSTONE, Frank D.. Vegetable Oils. In: SHAHIDI, Fereidoon. **Bailey's Industrial Oil & Fat Products: Edible Oil & Fat Products Chemistry, Properties & Health Effects**. 6. ed. New Jersey: Wiley Interscience v 1 cap 6, p 213-268, 2005.

HARRY'S COSMETICOLOGY. J. B. Wilkinson and R. J. Moore, ed 7 , Chemical Publishing, New York. 1982.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v 21, p 427–433, 2000.

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

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

JACKSON, R.L.; TAUNTON, O.D.; MORRISETT, J.D.; GOTTO, A.M.J. The Role of Dietary Polyunsaturated Fat in Lowering Blood Cholesterol in Man. **Circ Res**, v 42, n 4, p 447-453, 1978.

JESIK, C.J.; HOLLAND, J.M.; LEE, C. An anatomic and histology study of the rat prostate. **Prostate**, v 3, p 81-97, 1982.

KARR, JF, KANTOR, JA, HAND, PH, EGGENSBERGER, DL, SCHOLM, J. The presence of prostate specific antigen in a transfected murine cell line. **Cancer Res**, v 55, p 2455-2462, 1995.

KOSS, G.; TESSERAUX, I. Hydrocarbons. In. MARQUARDT, H.; SCHÄFER, S.G.; MCCLELLAN, R.O.; WELSCH F. **Toxicology**, 1 Ed. Academic Press, Waltham, 1999

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol.**, v 253, p 165-174, 2003.

MCPHERSON, S.J.; ELLEM, S.J.; SIMPSOM, E.R.; PATCHEV, V.; FRITZEMEIER, K.H.; RISBRIDGER, G.P. Essential role forestrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostaic hyperplasia. **Endocrinol**, v 148, n 2, p 566-574, 2007

MOREAU, R.A. Corn Oil. In, Shahid, F. Bailey's Industrial Oil e Fat Products: Edible Oil e Fat Products Chemistry, Properties e Health Effects. 6. ed. New Jersey: Wiley Interscience. v2. cap 4, p 149-172, 2005.

MORITOMO, T.; SAITO, H.; WATANABE, T.; MOCHIZUKI, K. Tissue culture on Mongolian gerbil's (Meriones unguiculatus) malignant melanoma. **Jikken Dobtsu**, v 40, n 3, p 385-388, 1991.

NASH, J.F.; GETTINGS, S.D.; DIEMBECK, W.; CHUDOWSKI, M.; KRAUS, A.L.A. toxicological review of topical exposure to white mineral oils. **Fd Chem Toxic**, v 34, n 2, p 213-225, 1996.

NAWA, Y.; OKADA, M.; ARIZONO, N. Histochemical and cytochemical characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils. **Int Arch Allergy Immunol**, v 104, p 249-254, 1994.

NOLAN, C.C.; BROWN, A.W.; CAVANAGH, J.B. Regional variations in nerve cell response to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbil. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v 81, n 2, p 204-212, 1990.

PEREZ, A.P.; BIANCARDI, M.F.; GÓES, R.M.; SANTOS, F.A.; TABOGA, S.R. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. **Int J Exp Path**, v 92, p 121-130, 2011.

PEREZ, A.P.; BIANCARDI, M.F.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone

cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. **Microsc Res Tech**, v 75, n 8, p 1084-1092, 2012.

PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.B.; MARTINEZ, F.E. Structure of the pelvic and penile urethra – Relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Anat**, v 202, p 431-44, 2003.

PISOLATO, R.; LOMBARDI, A.P.G.; VICENTE, C.M.; LUCAS, T.F.G.; LAZARI, M.F.M.; PORTO, C.S. Expression and regulation of the estrogen receptors in PC-3 human prostate cancer cells. **Steroids**, v107, p 74-86, 2016.

PORT, C.D.; BAXTER, D.W.; RICHTER, W.R. The Mongolian Gerbil as a Model for Lead Toxicity **Am J Pathol**, v 76, p 79-94, 1974.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr**, v 12, p 1-27, 1963.

RAWLINGS, A.V.; LOMBARD, K. J. A review on the extensive skin benefits of mineral oil. **Int J Cosmet Sci**, v 34, p 511–518, 2012.

REESE, J.H.; MCNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SAMLOFF, I.M.; STAMEY, T.A. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of human prostate and seminal vesicle. **J Urol**, v 136, p 1148-1152, 1986.

RIETJENS, I.M.C.M.; LOUISE, J.; BEEKMAN, K. The Potential Health Effects of Dietary Phytoestrogens. **Br J Pharmacol**. doi: 10.1111/bph.13622. 2016.

RISBRIDGER, G.P.; ELLEM, S.J.; MCPHERSON. S.J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. **J Mol Endocrinol**, v 39, p 183-188, 2007.

ROCHEL, S.S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR. P.S.L.; GÓES, R.M. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Anat Rec**, v 290, n 10, p 1233-1247, 2007.

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

RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A.; ANTON, C. Propriedades Físicas de Lipídios Estruturados Obtidos de Misturas de Gordura de Leite e Óleo de Milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v 23, n 2, p 226-233, 2003.

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. Histologia – Texto e Atlas. Panamericana, 2 ed. Rio de Janeiro., 779p. 1993.

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

SANTODONATO J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity. **Chemosphere**, v 34, p 835-848, 1997.

SANTOS, F.C.A.; LEITE, R.P.; CUSTÓDIO, A.M.G.; CARVALHO, K.P.; MONTEIRO-LEAL, A.B.S.; GÓES, R.M.; CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. Testosterone Stimulates Growth and Secretory Activity of the Female Prostate in the Adult Gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Biol Reprod**, v 75, p 370-379, 2006.

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

SCARANO, W.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Tissue Evidence of the Testosterone Role on the Abnormal Growth and Aging Effects Reversion in the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Prostate. **Anat Rec**, v 288(a), p 1190-1200, 2006.

SCHETTLER, T. Corn and Corn-Derived Products: Sources of . **Endocrine Disruptors. Environmental Health Perspectives**, v 111, n13, p A691, 2003.

SCOTTER, M.J.; CASTLE, L.; MASSEY, R.C.; BRANTOM, P.G.; CUNNINGHAME, M. E. A study of the toxicity of five mineral hydrocarbon waxes and oils in the F344 rat, with histological examination and tissue-specific chemical characterisation of accumulated hydrocarbon material. **Food Chem Toxicol**, v 41, p 489–521, 2003.

SHAPPELL, S.B.; THOMAS, G.V.; ROBERTS, R.L.; HEBERT, R.; ITTMANN, M.M.; RUBIN, M.A.; HUMPHREY, P.A.; SUNDBERG, J.P.; ROZENGURT, N.; BARRIOS, R.; WARD, J.M.; CARDIFF, R.D. 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**, v 64, n 6, p 2270-2305, 2004.

SILVA, D.A.L.; ZANATELLI, M.; SHINOHARA, F.Z.; GÓES, R.M.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Effects of exposure to estradiol and estradiol plus testosterone on the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Microsc Res Tech**, v 76, p 486–495, 2013.

SNYDER, J. M.; FRANKEL, E. N.; SELKE, E. Capillary Gas Chromatographic Analyses of Headspace Volatiles from Vegetable Oils. **Journal Of The American Oil Chemists' Society, Peoria**, v 62, n 12, p1675-1679, 1985.

SWEENEY, M.F.; HASAN, N.; SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. Environmental Endocrine Disruptors: Effects on the human male reproductive system. **Rev Endocr Metab Disord**. v 16, n 4, p 341-357, 2015.

TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v 53, n 8, p 946-955, 2009.

TAMMA, S.M.; SHORTER, B.; TOH, K.L.; MOLDWIN, R.; GORDON, B. Influence of polyunsaturated fatty acids on urologic inflammation. **Int Urol Nephrol**, v47, p 1753-1761, 2015.

TAN, M.H.E.; LI, J.; XU, H.E.; MELCHER, K.; YONG, E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacol Sin**, v 36, p 3-23, 2015.

TARNOW, P.; HUTZLER, C.; GRABIGER, S.; SCHÖN, K.; TRALAU, T.; LUCH, A. Estrogenic Activity of Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons Used in Printing Inks. **PLoS One**, v 11, n, p e0147239, 2016.

THAYER, K.A.; RUHLEN, R.L.; HOWDESHELL, K.L.; BUCHANAN, D.L.; COOKE, P.S.; PREZIOSI, D.; WELSHONS, W.V.; HASEMAN, J.; VOM SAAL, F.S. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. **Hum Reprod**, v 16, n 5, p 988-996, 2001.

TROVATO, A., NUHLICEK, D.N., MIDTLING, J.E. Drug-nutrient interactions. **Americ Fam Phys**, v.44, n.5, p.1651-1658, 1991.

TULLIEZ, J.E.; BORIES, G.F. Metabolism of a n-paraffin, heptadecane, in rats. **Lipids**, v 13, p 110-115, 1978

TULLIEZ, J.E.; BORIES, G.F. Metabolism of naphthenic hydrocarbons. Utilization of a monocyclic paraffin, dodecylcyclohexane, by rat. **Lipids**, v 14, p 292-297, 1979.

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

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHERB, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Exp Gerontol**, v 40, n 3, p 121-128. 2005.

VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H. F. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic

transition in the rat ventral prostate after castration. **Cell Biol Int**, v 29, p 809-816, 2005.

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

WEIRAUCH, J.L.; GARDNER, J.M. Sterol content of foods of plant origin. **J Am Diet Assoc**, v 73, p 39–47, 1978.

YUAN, J.; JAMESON, C.W.; GOEHL, T.J.; COLLINS, B.J.; PURDIE, W.; JUDD, L. Encapsulation for Toxicology Studies: Toxicokinetics of p-Chloro- α , α , α -trifluorotoluene in α -Cyclodextrin or Corn Oil Vehicles in Male F344 Rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v 111, p 107-115, 1991.

ZANATELLI, M.; CUSTÓDIO, A.M.G.; BIANCARDI, M.F.; SANTOS, F.C.A.; GÓES, R.M.; FALEIROS-JR, L.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Ovariectomy increases the phenotypic plasticity of the female prostate epithelium in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Reprod Fertil Dev** 2016.

ZANATELLI, M.; SILVA, D.A.L.; SHINOHARA, F.Z.; GÓES, R.M.; SANTOS, F.C.A. VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Actions of oestradiol and progesterone on the prostate in female gerbils: reversal of the histological effects of castration. **Reprod Fertil Dev**. v 26, p 540-550, 2013.

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

ZHAO, Z.; REINSTATLER, L.; KLAASSEN, Z.; XU, Y.; YANG, X.; MADI, R.; TERRIS, M.K.; QIAN, S.Y.; KELAVKAR, U.; MOSES, K.A. The Association of Fatty Acid Levels and Gleason Grade among Men Undergoing Radical Prostatectomy. **PLoS ONE**, v 11, n 11, p e0166594, 2016.