



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITOS DE UMA MISTURA AMBIENTALMENTE
RELEVANTE DE FTALATOS SOBRE CÉLULAS PROSTÁTICAS
HUMANAS**

Alexandre Matheus Baesso Cavalca

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como Exame Geral de Defesa de Mestrado.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

**Botucatu – SP
2021**

**EFEITOS DE UMA MISTURA AMBIENTALMENTE
RELEVANTE DE FTALATOS SOBRE CÉLULAS PROSTÁTICAS
HUMANAS**

Alexandre Matheus Baesso Cavalca

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como Exame Geral de Defesa de Mestrado.

**Botucatu – SP
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cavalca, Alexandre Matheus Baesso.

Efeitos de uma mistura ambientalmente relevante de ftalatos sobre células prostáticas humanas / Alexandre Matheus Baesso Cavalca. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20601000

1. Técnicas de cultura de Células. 2. Compostos químicos. 3. Movimento celular. 4. Próstata. 5. MicroRNAs.

Palavras-chave: Cultura celular; Ftalatos; Migração; Próstata; miRNAs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças e tantas oportunidades na vida para me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço a todos os amigos e familiares que estiveram comigo durante este ciclo, sem eles, a jornada não seria tão leve e proveitosa.

Agradeço ao meu orientador pela oportunidade, confiança e respeito, sem ele nada seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 8887.482348/2020-00

Por fim, gostaria de agradecer à CAPES, uma agência de fomento em que o conhecimento e a empatia são pilares de sustentação de um trabalho digno e respeitoso. Apesar das adversidades, mantiveram o mesmo conceito ideológico, auxiliar bons profissionais e pessoas de caráter para a evolução da ciência e humanidade.

RESUMO:

Os ftalatos representam um grupo de substâncias utilizadas na indústria que possuem atividade antiandrogênica e são encontrados em diferentes concentrações na urina e no plasma humano. Mais de 8 milhões de toneladas de ftalatos são usadas a cada ano, predominantemente como plastificantes em produtos de cloreto de polivinila (PVC), sendo amplamente utilizados em produtos de consumo diário e descartados, de forma inadequada, no meio ambiente. Ainda, estudos *in vivo* realizados em nosso laboratório, demonstraram que uma mistura de ftalatos, equivalente a usada neste estudo, desregulou a expressão de genes e miRNAs associados ao desenvolvimento e à vias carcinogênicas prostáticas. Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal mimetizar as condições da exposição *in vivo*, com o intuito de estabelecer um modelo *in vitro* para avaliação das vias relacionadas à sobrevivência, proliferação e morte celular e biossíntese de miRNAs, utilizando células epiteliais prostáticas normais e tumorais expostas a uma mistura de monoésteres de ftalato, ambientalmente relevante, em proporções semelhantes às encontradas em humanos. As linhagens de células epiteliais prostáticas tumorais (LNCaP) e normais (PNT-2) foram expostas por 24h e 72h à mistura de ftalatos. A proporção dos monoésteres na mistura foi calculada com base na concentração média de ftalatos encontradas na urina e sangue humanos. A dose de exposição (1000 μ mol/L) foi escolhida com base nos ensaios de viabilidade (IC₅₀) e do MTT, balizada pelas doses usadas da literatura. A quantificação da expressão dos genes foi realizada por qRT-PCR. Os miRNAs estudados foram escolhidos com base nos resultados dos estudos *in vivo*. Para análise do potencial migratório celular foi realizado o ensaio de migração celular através de insertos *transwell*. Nossos resultados mostraram que a mistura de ftalatos pode causar aumento em células LNCaP, do turnover celular, do estresse oxidativo, da biossíntese e expressão de miRNAs, podendo assim aumentar o potencial expansivo e migratório celular e modular o comportamento tumoral, tornando-as mais agressivas. No entanto, em células normais estes efeitos são menos acentuados, demonstrando que, a curto prazo, as mesmas são capazes de elaborar mecanismos e respostas mais efetivos contra o insulto, ou ainda, que as células PNT-2 são mais resistentes à exposição na dose empregada.

Palavras-Chave: Próstata, ftalatos, miRNAs, migração, cultura celular.

ABSTRACT:

Phthalates represent a group of substances used in industry that have antiandrogenic activity and are found in different concentrations in human urine and plasma. More than 8 million tons of phthalates are used each year, predominantly as plasticizers in polyvinyl chloride (PVC) products, being widely used in everyday consumer products and inappropriately disposed of in the environment. Furthermore, in vivo studies performed in our laboratory demonstrated that a mixture of phthalates, equivalent to the one used in this study, deregulated the expression of genes and miRNAs associated with developmental and prostatic carcinogenic pathways. Thus, the main objective of this study was to mimic the conditions of exposure in vivo, in order to establish an in vitro model for the evaluation of pathways related to cell survival, proliferation and death and miRNA biosynthesis, using normal and tumoral prostatic epithelial cells. exposed to an environmentally relevant mixture of phthalate monoesters in proportions similar to those found in humans. Prostatic tumor (LNCaP) and normal (PNT-2) epithelial cell lines were exposed for 24h and 72h to the phthalate mixture. The proportion of monoesters in the mixture was calculated based on the average concentration of phthalates found in human urine and blood. The exposure dose (1000 μ mol/L) was chosen based on feasibility tests (IC₅₀) and MTT, based on the doses used in the literature. Quantification of gene expression was performed by qRT-PCR. The miRNAs studied were chosen based on the results of the in vivo studies. To analyze the cell migration potential, the cell migration assay was performed using transwell inserts. Our results showed that the mixture of phthalates can cause an increase in LNCaP cells, cell turnover, oxidative stress, biosynthesis and expression of miRNAs, thus increasing the cellular expansive and migratory potential and modulating tumor behavior, making them more aggressive. However, in normal cells these effects are less accentuated, demonstrating that, in the short term, they are capable of elaborating more effective mechanisms and responses against the insult, or even that PNT-2 cells are more resistant to exposure at the dose used.

Keywords: Prostate, phthalates, miRNAs, migration, cell culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. A Próstata	5
1.2. Desreguladores Endócrinos: os ftalatos e o sistema genital masculino.....	8
1.3. Fatores Ambientais e Epigenética.....	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS GERAL	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Linhagens Celulares	14
4.2. Tratamentos	15
4.3. Análise da Viabilidade Celular	16
4.4. Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR	16
4.5. Ensaio de Transwell	18
4.6. Análise Estatística	18
5. RESULTADOS	18
5.1. Teste de MTT	18
5.2. Expressão gênica por RT-qPCR.....	20
5.2.1. Proliferação e Morte Celular	20
5.2.2. Enzimas Antioxidantes	21
5.2.3. Marcadores de biossíntese de miRNAs e Metilação	22
5.2.4. Marcadores do Ciclo Celular	23
5.2.5. Receptores Hormonais	24
5.2.6. miRNAs	24
5.2. Ensaio de migração celular através de insertos <i>transwell</i>	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Próstata

A próstata está localizada na pelve, anteriormente ao reto e posteriormente ao púbis. (Williams *et al.*, 1995), trata-se da maior glândula acessória do sistema genital masculino e circunda ou é atravessada pela parte prostática da uretra (Kierszenbaum *et al.*, 2016). Formada por uma estrutura consistente, moderadamente glandular e fibromuscular (Williams *et al.*, 1995), é envolta por uma cápsula constituída por tecido conjuntivo, com presença de fibras musculares lisas, e por epitélio colunar simples a pseudoestratificado (Kierszenbaum *et al.*, 2016).

Presente apenas em mamíferos (Marker *et al.*, 2003), a próstata tem como função primária secretar uma fração do fluido seminal que se soma junto ao fluido ejaculatório produzido pela glândula seminal (Sánchez *et al.*, 2013). Sua secreção alcalina neutraliza o ambiente vaginal ácido, proporciona nutrientes, liquefaz o sêmen e possibilita o transporte dos espermatozoides (Kierszenbaum *et al.*, 2016), promove a manutenção do gradiente iônico e pH ideais, condições que são fundamentais para a sobrevivência dos espermatozoides durante o trajeto pelo sistema genital feminino (Untergasser *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2013). Por meio de longos ductos excretores, suas glândulas túbulo-alveolares secretam na parte prostática da uretra, a secreção de natureza proteica que é rica em zinco e contém fosfatase ácida específica da próstata, o antígeno prostático específico (PSA, um importante marcador na detecção precoce de câncer de próstata), amilase, fibrinoliseína (Kierszenbaum *et al.*, 2016), íons e hormônios (Sánchez *et al.*, 2013).

A morfogênese prostática inicia-se no período fetal, a partir da região pélvica do seio urogenital (SUG) (Timms *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 2004; Prins & Putz, 2008), um tubo endodérmico derivado do intestino primitivo posterior, formado pela parte anterior da cloaca após a septação dos seios urogenital e retal (Timms *et al.*, 1994). O SUG é constituído por uma camada epitelial originada da endoderme que é circundada por uma camada mesenquimal originada da mesoderme esplâncnica (Marker *et al.*, 2003). A parte pélvica do SUG é vista na base da bexiga urinária em desenvolvimento e é morfologicamente indistinguível até o 17^o-18^o dia de gestação em ratos e camundongos e até a 10^a-12^a semana em humanos (Marker *et al.*, 2003).

A diferenciação prostática começa com o início da secreção de testosterona pelos testículos fetais e necessita da conversão de testosterona em 5 α -DHT (Taylor *et*

al., 2011). A 5α -DHT se liga aos receptores de andrógeno (AR) nas células mesenquimais do SUG e promove a produção de fatores de crescimento e moléculas de sinalização (Taylor *et al.*, 2011). As células epiteliais respondem a esses estímulos com a produção de outras moléculas de sinalização e esse cruzamento de sinalizações promovem o crescimento de brotos celulares epiteliais em direção ao mesênquima urogenital (MUG), iniciando assim, o processo de formação dos ductos (Taylor *et al.*, 2011). A modulação das ações estrogênicas na formação dos ductos ocorre via receptores de estrógeno (ER) em células do mesênquima do SUG (Taylor *et al.*, 2011).

Perturbações hormonais androgênicas e/ou estrogênicas nesse período podem resultar em patologias prostáticas tardias como inflamação, lesões pré-malignas e hiperplasia glandular (Prins *et al.*, 2001, 2007; Woodham *et al.*, 2003; Scarano *et al.*, 2009), o que é habitualmente chamado de “*imprinting hormonal*”.

O crescimento e desenvolvimento da próstata continuam até que a maturidade sexual seja atingida e a manutenção de sua homeostase no indivíduo adulto é garantida por hormônios esteroides como a testosterona (Cunha *et al.*, 1986; Marker *et al.*, 2003).

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

São exemplos de patologias prostáticas comumente encontradas, o adenocarcinoma prostático, a hiperplasia benigna prostática e as prostatites (Ho *et al.*, 1997), porém a etiologia dessas afecções não está completamente esclarecida. O adenocarcinoma prostático é a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens no mundo todo, contabilizando 1.414.259 novos casos e causando 466.003 mortes (3,8% de todas as mortes causadas por câncer em homens) em 2020. (GLOBOCAN, 2021).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm clarificando conhecimentos para explicar como os vários fatores responsáveis pelas doenças prostáticas somam-se e contribuem para o desenvolvimento de doenças mais severas nessa glândula, como o câncer (Hsing & Devesa, 2001).

O câncer de próstata pode ser de origem epitelial ou de origem estromal (não-epitelial). Devido à posição anatômica da glândula, o desenvolvimento do tumor se dá em zonas externas, justificando a metodologia do toque retal como diagnóstico preditivo. Em se tratando de tumores de origem epitelial tem-se o adenocarcinoma

acinar e o não acinar, estando em um subgrupo dos não acinares o adenocarcinoma ductal, que dispõe do pior prognóstico. (Sarris *et al.*, 2018)

A carcinogênese prostática é um processo biológico longo e complexo, de múltiplas etapas, resultante de diversas alterações genéticas e epigenéticas que, quando somatizaas, acometem células-alvo, principalmente as de origem epitelial. Tal processo é dividido em iniciação, promoção e progressão, que contribuem sequencialmente para o início e desenvolvimento do câncer através da interação de fatores endógenos e exógenos (Loeb *et al.*, 2003; Belpomme *et al.*, 2007; Pitot, 2007; Stricker & Kumar, 2010). Esses acontecimentos, frequentemente, são resultantes da ativação de proto-oncogenes específicos e inativação de genes supressores de tumor (Safe *et al.*, 2008). A maioria desses genes está envolvida com o reparo e manutenção da integridade do DNA, com a regulação da proliferação e com as vias de manutenção da sobrevivência e morte celular (Safe *et al.*, 2008).

O processo gradual de carcinogênese prostática é também influenciado por fatores como a dieta, alcoolismo, tabagismo, obesidade, genética (Lane *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019) e a exposição a compostos químicos dispersos no ambiente, dentre eles os ftalatos, o bisfenol A (Scarano *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2016; Seachrist *et al.*, 2016), que aumentam o risco de desenvolvimento do câncer.

O diagnóstico do câncer de próstata é convencionalmente realizado através do toque retal, biópsia tecidual e quantificação de antígeno específico prostático (PSA) no soro. Apesar da mensuração de PSA ser considerado o método diagnóstico padrão ouro para câncer de próstata, esta metodologia não é capaz de distinguir o câncer em sua fase proliferativa, de crescimento lento ou invasiva. A faixa etária de maior detecção da patologia está entre 60 e 70 anos, porém apenas 1,5% dos diagnósticos são considerados precoces. Dessa forma, os métodos atuais são considerados inadequados para realizar o diagnóstico precoce desta patologia, fazendo-se necessária a detecção de novos biomarcadores confiáveis. (Dejous *et al.*, 2020)

O tratamento do câncer de próstata é direcionado de acordo com o estadiamento do câncer e inclui vigilância ativa, quimioterapia, cirurgia, terapia hormonal, radioterapia ou uma combinação dessas intervenções. Mas todas essas estratégias são insuficientes quando o câncer está em sua fase invasiva, tornando o diagnóstico precoce um fator crítico no prognóstico da doença. (Miller *et al.*, 2016)

1.2. Desreguladores Endócrinos: os ftalatos e o sistema genital masculino

Segundo Yoon e colaboradores (2014), “os desreguladores endócrinos (DE) são compostos naturais ou sintéticos, capazes de interferir com a biossíntese, armazenamento, liberação, transporte e/ou ligação ao receptor de hormônios endógenos, interferindo em última análise com as funções próprias desses hormônios”. Aproximadamente 800 produtos químicos comerciais são suspeitos de serem DEs, mas apenas uma pequena parte destes foi estudado para potenciais efeitos prejudiciais (Bergman *et al.*, 2013).

Muitos fatores ambientais são capazes de perturbar o percurso de desenvolvimento adequado e os DEs têm ganhado atenção considerável devido a sua ubiquidade no ambiente e ao aumento da incidência de distúrbios endócrinos nos seres humanos, incluindo complicações da gravidez, malformações genitais (como a criptorquidia e hipospádia em crianças do sexo masculino) e câncer (mama, ovário, próstata, testicular) (Bergman *et al.*, 2013).

Os ftalatos são compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs) os quais formam uma família de diésteres de ácido ftálico tipicamente utilizados como plastificantes para amaciar e aumentar a flexibilidade dos produtos de plástico de cloreto de polivinilo. Estão presentes no meio ambiente de forma ubíqua incluindo dispositivos médicos, embalagens de alimentos, cosméticos, brinquedos, mordedores, tintas, pisos, sabonetes, xampus e detergentes. Xu e colaboradores (2020), relataram que ftalatos, principalmente Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), Di-n-butyl phthalate (DnBP) e Diisobutyl phthalate (DiBP), estão presentes em sacolas de plástico frequentemente utilizadas, sugerindo que essas sacolas podem ser a principal fonte atual de exposição da população aos ftalatos. A produção global anual de ftalato foi de 5,35 milhões de toneladas em 2014 e aproximadamente 6,76 milhões de toneladas em 2019. A migração dos diésteres para o meio ambiente advém da evaporação, lixiviação e abrasão, estando presente em uma variedade de matrizes ambientais abrangendo lodo, solo, ar, poeira e água (Wang *et al.*, 2021).

Os ftalatos são agrupados em uma categoria de menor peso molecular (com uma cadeia lateral contendo de um a quatro carbonos; Dimethyl phthalate (DMP), Diethyl phthalate (DEP) e Dibutyl phthalate (DBP)) e de maior peso molecular (com uma cadeia lateral contendo cinco ou mais carbonos; DEHP, Diisononyl phthalate (DiNP), Diisodecyl phthalate (DiDP) e Benzylbutyl phthalate (BzBP)) (North *et al.*, 2014). Os ftalatos de alto peso molecular são utilizados principalmente em polímeros de PVC,

aplicações de plásticos, materiais de embalagens e de processamento de alimentos e produtos de construção. Arroz, vegetais e farinha são as principais fontes de DEHP na China (Xu *et al.*, 2020). Os ftalatos de baixo peso molecular são frequentemente utilizados em aplicações que não são de PVC, como produtos de cuidados pessoais, tintas, adesivos e comprimidos com revestimento entérico (Wittassek *et al.*, 2011). BzBP, DEHP, DiNP, DBP e DiBP são utilizados em brinquedos, bolsas, luvas e tubos plásticos. DMP e DEP são amplamente utilizados em cosméticos, como perfumes, loções pós-barba, xampus, maquiagem e produtos para unhas (Wormuth *et al.*, 2006). Cosméticos e produtos de cuidados pessoais são as principais fontes de exposição humana a ftalatos de baixo peso molecular. Laticínios, óleos e carnes, classificados como alimentos de alto índice lipídico, demonstraram ter maior probabilidade de absorver ftalatos de embalagens. (Jia *et al.*, 2019)

Devido estes compostos não serem ligados covalentemente aos produtos em que são utilizados, podem lixiviar e contaminar alimentos processados ou armazenados em produtos de plástico (Bosnir *et al.*, 2003). Como desreguladores endócrinos, os ftalatos têm sido especialmente estudados por sua atividade antiandrogênica e cancerígena (Fisher, 2004).

A farmacocinética dos ésteres de ftalato consiste na hidrólise de diésteres em monoésteres no trato gastrointestinal. Por exemplo, DEHP, DBzP, DiBP, DEP e DBP sofrem degradação / hidrólise e formam seus monoésteres correspondentes, isto é, MEHP, MBzP, MiBP, MEP e MBP, respectivamente. (Wang *et al.*, 2019).

A degradação microbiana de DEHP para MEHP em solos através das enzimas lipase e esterase é realizada através de processos de degradação e transformação lenta. Como os ftalatos têm meia-vida curta no corpo humano e são excretados rapidamente na urina como monoésteres metabólitos, estes são biomarcadores adequados para a exposição humana a compostos ambientais. O tempo de meia-vida dos ftalatos no corpo humano (na urina e no plasma) é inferior a 24 horas. Após a metabolização, monoésteres de ftalatos são conjugados com glucuronídeo ou sulfato e excretados na urina. A avaliação da exposição humana aos ftalatos baseia-se principalmente na medição de seus níveis urinários.

Semelhante ao Bisphenol A (BPA), as investigações que avaliam o papel da exposição ao ftalato concentraram-se principalmente nos resultados reprodutivos, metabólicos e neurológicos. A exposição humana aos ftalatos provém principalmente da inalação, absorção pela derme e ingestão. Tal exposição está associada ao estresse

oxidativo em humanos. (Yu Wang *et al.*, 2019; Xiang-Zhou Meng *et al.*, 2014 & Bosnir *et al.*, 2003).

As consequências da exposição ao ftalato na saúde humana também foram extensivamente descritos e revistos pelo Programa Nacional de Toxicologia - Centro para a Avaliação de Riscos a Reprodução Humana dos Estados Unidos (Shelby, 2006). Existem evidências suficientes em roedores que a exposição ao ftalato provoca toxicidades de desenvolvimento e de reprodução. Em seres humanos, os distúrbios dismórficos do trato urogenital, vistos em lactentes do sexo masculino, foram significativamente relacionados à exposição pré-natal a ftalatos (Swan *et al.*, 2005).

Os metabólitos MBP e MiBP foram os principais metabólitos encontrado em amostras de urina em um estudo realizado na China, e suas respectivas concentrações medianas foram de 61,2 e 51,7 $\mu\text{g} / \text{L}$. Amostras de urina coletadas no Kuwait entre 2006 e 2007 continham as maiores concentrações médias de metabólitos MEP (411 $\mu\text{g} / \text{L}$), MBP (113 $\mu\text{g} / \text{L}$) e DEHP (180 $\mu\text{g} / \text{L}$), com uma soma das concentrações medianas do metabólito do ftalato de 1.050 $\mu\text{g} / \text{L}$ (Wang *et al.*, 2019).

Sete metabolitos de ftalato em amostras de urina foram medidos a partir de 2540 indivíduos que participaram da National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000 (Silva *et al.*, 2004). O mono-etil-ftalato esteve presente em todas as amostras, o mono-butil-ftalato em 99% das amostras e o ftalato de monoetilhexilo (MEHP) em 78% das amostras. A mediana de exposição ao ftalato em adultos foi estimada em 8,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ e em crianças de 25,8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ (NTP-CERHR, 2006). Verificou-se que as mulheres tinham níveis de exposição ao ftalato duas a quatro vezes mais elevados do que os homens (Silva *et al.*, 2004). Crianças mais jovens têm uma exposição significativamente maior do que crianças mais velhas (Koch & Calafat, 2009). Crianças em torno de 1 ano de idade foram consideradas um grupo de alto risco de exposição por causa de seus padrões comportamentais de alimentação e mastigação e por rastejarem em tapetes inalando poeira de ftalato (NTP-CERHR, 2006).

Um estudo realizado por Huaijun Xie e colaboradores (2021) analisou a composição de máscaras descartáveis produzidas por 44 países, as quais passaram a ser essenciais para o combate à pandemia desde 2019. A partir das análises realizadas buscando a presença de 12 ftalatos, constatou-se que 11 deles estavam presentes nas produções, e que, o DEHP esteve presente em todas as máscaras examinadas. O uso da máscara acarreta exposição pelas três vias conhecidas e o suor produzido aumenta o risco de contaminação pelos ftalatos. Em um aspecto geral, 89,3% das máscaras

produzidas apresentaram potenciais efeitos cancerígenos para humanos, sendo de 4 a 5 vezes mais incidente em crianças.

Estudos em modelos *in vivo* comprovaram a relação direta de aumento na taxa de incidência de patologias prostáticas em animais expostos a ftalatos (Scarano et al., 2009; Peixoto et al., 2016). Estudos *in vitro* em células de Sertoli humanas demonstraram que o MBP (Mono-butil-ftalato) é capaz de aumentar o stress oxidativo e interferir no ciclo celular, aumentando a apoptose nessas células reprodutivas (de Freitas et al., 2019). Embora haja estudos *in vitro* com exposição de células de adenocarcinoma prostático à doses específicas de diésteres de ácido ftálico e seus metabólitos, ainda não há registros de avaliações de misturas que mimetizem os valores fidedignos de exposição ambiental capazes de descrever as passagens pelas vias metabólicas. Desta forma, a exposição de linhagens celulares prostáticas, tanto tumorais (LNCaP) quanto normais (PNT-2), à doses específicas de uma mistura de monoésteres constitui um modelo biológico importante para elucidação de possíveis vias de modulação gênica relacionadas à sobrevivência celular, stress e ativação de mecanismos epigenéticos que possam alterar a fisiologia prostática, aumentar a susceptibilidade à oncogênese e a agressividade de tumores prostáticos.

1.3.Fatores Ambientais e Epigenética

Modificações epigenéticas são estabelecidas como alterações hereditárias na função gênica que acontecem sem uma mudança na sequência de nucleotídeos (Bird, 2007; Goldberg *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2009; Zhang & Ho, 2011). Conforme Singh & Li (2012), no contexto da DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), a epigenética pode ser observada como um importante "termômetro" que propicia a um organismo ou a um tecido ligar ou desligar programas de transcrição gênica previamente em resposta a alterações ambientais, promovendo alterações fenotípicas adaptativas para aumentar a sobrevivência. Os programas de transcrição e tradução são modificados em um contexto funcional e temporal como respostas adaptativas imediatas e de longo prazo em resposta aos insultos ambientais.

Mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações das histonas (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ribosilação de ADP) e expressão de RNAs não codificantes (incluindo microRNAs). Em mamíferos, padrões de metilação do DNA são estabelecidos durante a embriogênese através da cooperação de DNA metiltransferases (DNMTs) e proteínas associadas. O período de

desenvolvimento precoce é o mais suscetível a insultos epigenéticos, porque a taxa de síntese de DNA é alta, e a padronização da metilação do DNA elaborado e organização da cromatina necessária para o desenvolvimento normal do tecido é estabelecida neste momento (Dolinoy & Jirtle, 2008).

A maioria dos estudos que avaliaram modificações epigenéticas após exposições a ftalatos focou a metilação do DNA. Estudos epidemiológicos humanos correlacionaram níveis urinários mais altos de metabólitos de ftalato com genes controlados por imprinting como o IGF2/H19 alterados e metilação de LINE-1 no tecido placentário (Zhao et al., 2014; LaRocca et al., 2014). Estudos de roedores relataram alteração da metilação do DNA global e locus-específico após a exposição ao DEHP (Kostka et al., 2010; Martinez-Arguelles et al., 2015).

Estudos *in vitro* recentes proporcionaram informação adicional sobre mecanismos potenciais de alterações epigenéticas induzidas por ftalato. O tratamento de células de câncer da mama humana MCF-7 com Benzil-Butil-Ftalato (BBP) ou ftalato de dibutilo (DBP) resultou na demetilação de DNA no promotor do receptor de estrógeno (ER) (Kang & Lee, 2005), proporcionando uma ligação entre fatores de transcrição ativados por ligantes, ocasionando aumento do potencial tumoral das células.

Alguns dos processos celulares regulados pelos miRNAs são a apoptose, o crescimento celular, o armazenamento de gordura, a secreção de insulina e a iniciação e progressão do câncer (Grimm *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 2006; Gaur *et al.*, 2007). Os miRNAs podem desempenhar papel importante na resposta a xenobióticos químicos e suas consequências à saúde, causando doenças. Huang *et al.* (2017) demonstraram que a regulação negativa de miR141-3p apresentou forte correlação com metástase óssea em câncer de próstata, além de uma modificação na morfologia celular em células da linhagem PC-3. Scarano *et al.* (2019) demonstraram que a exposição a uma mistura de ftalatos no período perinatal de ratos alterou parâmetros de desenvolvimento reprodutivo e na próstata, desregulou a expressão de vários genes e *upregulou* os miR184 e miR141-3p. Neste estudo, de forma interessante, o miR184 foi *upregulado* na próstata independente da dose da mistura. Yang *et al.* (2017) sugerem o potencial significado prognóstico do miR-483-5p mediando a regulação negativa da expressão de RBM5 que promove a proliferação e invasão de células cancerígenas no câncer de próstata, sendo este um estudo realizado nas linhagens celulares VCaP, LNCaP, DU-145 e PC-3.

Os mecanismos reguladores epigenéticos não funcionam isoladamente, mas trabalham juntos em uma rede reguladora complexa. As perturbações em qualquer dos mecanismos reguladores epigenéticos acima mencionados estão associadas com o aumento do risco de doença (Portela & Esteller, 2010) e a desregulação epigenética que ocorre em células germinativas fornece um mecanismo para a herança epigenética transgeracional de fenótipos anormais.

2. JUSTIFICATIVA

Mais de 8 milhões de toneladas de ftalatos são utilizados na indústria anualmente (Hannon & Flaws, 2015), sendo que a maior parte é utilizada para a produção da base do PVC para as embalagens plásticas. Sendo assim, a dispersão desses produtos, tornou-se um problema de saúde pública mundial.

O efeito do DEHP e de outros ftalatos em seres humanos é pouco estudado, mas há evidências que ligam os níveis de DEHP e seus metabólitos aos distúrbios reprodutivos naqueles diretamente expostos e seus descendentes (Hauser *et al.*, 2007; Swan *et al.*, 2015). Nesta perspectiva, são necessários estudos moleculares mais aprofundados com DEHP e outros ftalatos para lançar nova luz sobre os riscos potenciais destes compostos sobre a reprodução e a oncogênese.

Os cinco ftalatos mais conhecidos (DEHP / MEHP e DBP / BBP / MBP) foram descritos no *Toxicogenomics Database* (Davis *et al.*, 2009) por terem 1232 e 265 interações únicas com genes/proteínas, respectivamente (Singh & Li, 2011; 2012). Cinco das dez principais redes comuns afetadas pelos ftalatos estão envolvidas com inflamação e stress oxidativo (Dietert *et al.*, 2010); e seis delas são preditas pelo *GeneGo* por estarem envolvidas em neoplasias urogenitais, incluindo a neoplasia prostática, a de genitais masculino e feminino, as endometriais e de mama (Singh & Li, 2012).

As limitações dos métodos diagnósticos de câncer de próstata impedem a diferenciação dos estágios da patologia, resultando em baixas detecções de diagnósticos precoces. Dessa forma, o estudo foi direcionado à elucidação do comportamento de células LNCaP, representando patologias tardias, e PNT-2, representado um grupo normal, diante da exposição à mistura de ftalatos.

A maioria dos estudos toxicológicos envolvendo os ftalatos tem sido proposta para a avaliação de ftalatos isolados, no entanto, já foi bem documentado que os seres

humanos são expostos a diferentes ftalatos ao mesmo tempo (Ferguson *et al.*, 2014; Meeker & Ferguson, 2014; Watkins *et al.*, 2014).

A linhagem PNT-2 ainda está em fase inicial de uso em pesquisas voltadas para exposição de células prostáticas à ftalatos, sendo este trabalho um dos primeiros a utilizá-la. A determinação do IC₅₀ e a quantificação de genes alterados após exposição à mistura de monoésteres de ftalato caracteriza um grande avanço no conhecimento do comportamento celular.

Nesse ínterim, esse estudo buscou trazer perspectivas básicas, porém essenciais, para o entendimento dos efeitos e das possíveis rotas mecânicas em células prostáticas humanas expostas à mistura de ftalatos em proporção semelhante à encontrada no meio ambiente através de experimentos *in vitro*, complementando os estudos que o nosso grupo têm desenvolvido em modelos animais envolvendo envelhecimento e perspectivas transgeracionais.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição de células prostáticas humanas, tumorais ou não, à mistura de monoésteres de ftalatos em proporção semelhante à encontrada na população humana, é capaz de alterar a proliferação e morte celular, bem como o potencial migratório das células, o status do sistema antioxidante e marcadores moleculares relacionados à metilação gênica e biossíntese de miRNAs em células prostáticas, tumorais ou não.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares epiteliais prostáticas LNCaP, tumoral dependente de andrógeno, e PNT-2, uma linhagem de células epiteliais normais imortalizadas. A linhagem celular LNCaP foi adquirida da empresa American Type Cell Culture (ATCC) (Manassas, Virginia, USA) e a linhagem celular PNT-2 foi adquirida da empresa Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™, EUA) a 10%, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml anfotericina B (Gibco/Invitrogen™, EUA). Durante a expansão das células, os meios foram trocados a cada 2 dias e foi realizado o acompanhamento celular diário ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Alemanha).

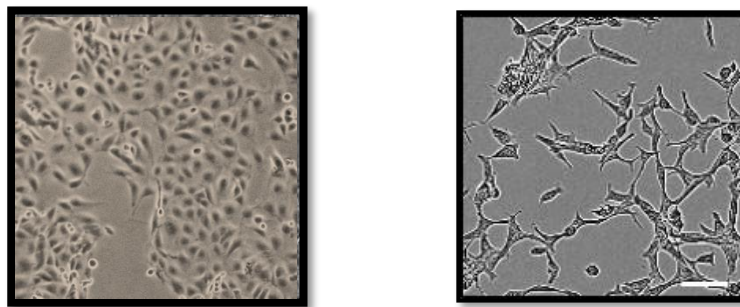


Figura 1. Imagens de células da linhagem PNT-2 (esquerda) e células da linhagem LNCaP (direita) obtidas em microscópio de contraste de fases em aumento 10x.

Todas as células foram expandidas em placas de cultura celular de poliestireno de 25cm² e 75cm² e mantidas em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. Quando atingiram 80% de confluência, as células foram submetidas à tripsina (Gibco/Invitrogen™, EUA) 0,25% e transferidas para placas de cultura de 6 poços especiais (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) para a execução dos experimentos subsequentes.

4.2. Tratamentos

A mistura usada neste estudo continha 36,7% de ftalato de monoetil (MEP), 15,3% de ftalato de monobutil (MBP), 10,2% de ftalato de monoisobutil (MiBP), 8,2% de ftalato de monobenzila (MBzP), 19,4% de (MEHP) e 10,2% de monoisononil (MiNP), sendo estes diluídos em DMSO em meio de cultura a 0,05%. As proporções foram baseadas em somas de metabólitos em uma base molar encontrada na urina de mulheres (Zhou & Flaws, 2017). Diferentes concentrações da mistura foram testadas para a escolha da dose, baseado no IC₅₀.

Os ftalatos usados para a mistura MEHP(796832), MBzP(89505), MiBP(sc-397544), MEP(M542580), MiNP(B185500) e MBP(30751) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, USA) e foram diluídos em DMSO estéril para os tratamentos. A concentração da mistura utilizada para o experimento foi obtida pelo teste de viabilidade celular e determinação da IC₅₀.

As células das duas linhagens foram expostas por 24 e 72 horas aos seguintes tratamentos: CONTROLE (CT): meio de cultura + DMSO (na mesma concentração utilizada na mistura de ftalato) e TRATAMENTO (T): meio de cultura + mistura de ftalatos. Assim como para a expansão, o meio de cultivo, adicionado ou não com os agentes químicos, foi trocado a cada 2 dias durante os tratamentos.

4.3. Análise da Viabilidade Celular

Para determinar o índice IC₅₀, foi realizado o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), as células foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 10.000 células por poço em 200uL de meio completo). Estas foram expostas a 7 concentrações crescentes dos agentes tóxicos, em µmol/L, iniciando na dose de 100 µmol/L até a dose de 4000 µmol/L, por 24 e 72 horas a 37 °C. Após os tratamentos, o meio foi aspirado e as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL de meio de cultura) por 4 horas a 37°C. Ao final deste período a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada , sendo acrescentados em cada poço 200µL de DMSO. Após 10 minutos a análise foi realizada em leitor de Elisa a 550 nm.

Após a determinação da dose, e seguindo a descrição dos tratamentos, a exposição foi realizada em triplicatas de 24 e 72 horas.

4.4. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Foi avaliada a expressão de genes nas células prostáticas por RT-qPCR relacionados com sobrevivência, proliferação e morte celular, defesa antioxidante, metilação do DNA e biossíntese de miRNAs (141-3p, 184 e 30d). A extração do RNA foi realizada com o kit TriZol (Ambion, EUA) segundo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, EUA). A análise da qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluídos, utilizando o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) (Fleige & Pfaffl, 2006; Becker et al., 2010). A Reação de Transcrição Reversa dos mRNAs foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação foram utilizados 4 µL de Master Mix para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 1 µg de RNA e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min., 42 °C por 30 min. seguido da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min. Para cada reação de RT-qPCR para mRNAs foram empregados 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, baseado na

química SYBR Green (Promega, EUA), 5 μ L da reação de RT e 1 μ L de primers “sense” e “anti-sense” a 10 μ M e o volume foi completado para 20 μ L com água livre de nucleases. Os iniciadores para os genes foram desenhados utilizando-se o programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A termociclagem foi executada no equipamento QuantStudio (Life Technologies, EUA), obedecendo as seguintes condições: GoTag Hot Start Polymerase ativação 2 min. a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg. a 95°C e 1 min. a 60°C, por fim, curva de dissociação no intervalo de 60-95°C. Para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação mostrando aumento do reporter dye fluorescente (ΔR_n) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (cycle threshold - CT). A quantificação relativa de cada gene foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de acordo com Livak e Schmittgen, (2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre os genes alvo e o gene endógeno (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de Primers designados para RTq-PCR

Gene	Código de Referência
Marcadores de biossíntese de miRNAs e Metilação	
<i>DROSHA</i>	<i>NM_001100412.2</i>
<i>DICER1</i>	<i>NM_001195573.1</i>
<i>DNMT1</i>	<i>NM_001130823.3</i>
Enzimas antioxidantes	
<i>SOD1</i>	<i>NM_000454.4</i>
<i>CAT</i>	<i>NM_001752.4</i>
<i>GPX3</i>	<i>NM_001329790.2</i>
<i>GSR</i>	<i>NM_000637.5</i>
Proliferação e Morte Celular	
<i>BCL2</i>	<i>NM_000633.2</i>
<i>BAX</i>	<i>NM_001291428.2</i>
<i>CASP3</i>	<i>NM_001354777.1</i>
<i>CASP8</i>	<i>NM_001080124.2</i>
<i>KI67</i>	<i>NM_001145966.2</i>
Marcadores do Ciclo Celular	
<i>CCNB1</i>	<i>NM_001354844.1</i>
<i>CCND2</i>	<i>NM_001759.4</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>NM_000077.4</i>
Receptores Hormonais	
<i>ERα</i>	<i>NM_000125.3</i>
Endógenos	
<i>ACTB</i>	<i>NM_001101.5</i>
miRNAs	
<i>141-3p</i>	<i>NC_000012.12</i>
<i>184</i>	<i>NC_000015.10</i>
<i>30d</i>	<i>NC_000008.11</i>

4.5. Ensaio de Migração Celular através de insertos transwell

Para elaboração deste ensaio foram utilizados insertos ThinCert com membranas de poros de 8 μm em placas de 24 poços. Na parte superior do inserto foram plaqueadas 2×10^4 células (LNCaP e PNT-2) por poço, em 300 μl de meio RPMI contendo o tratamento de seu respectivo grupo sem adição de SFB (CT e T). Abaixo do inserto foram colocados 800 μl de meio RPMI suplementado com 10% SFB como um quimioatratador. A placa com os insertos foi incubada por 24 horas em estufa de CO_2 . Após a incubação, as células não invasivas na parte superior do inserto foram lavadas com cotonetes. As células que atravessam os poros e ficaram aderidas à região inferior da membrana foram fixadas com metanol e coradas com hematoxilina a 0,1% para visualização. As células foram contadas em quatro campos, com uma ampliação de 400x utilizando um microscópio de luz invertido.

4.6. Análise Estatística

A comparação entre os grupos experimentais foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.4.3 através do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, seguido pelo teste T “*student*” não pareado ou de Mann-Whitney, de acordo com a característica das variáveis. Serão consideradas diferenças onde o $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Teste de MTT

As doses utilizadas para o teste foram: 100 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$, 800 $\mu\text{mol/L}$, 900 $\mu\text{mol/L}$, 1000 $\mu\text{mol/L}$, 2000 $\mu\text{mol/L}$, 4000 $\mu\text{mol/L}$ (Figuras 2 e 3). No tempo de 24h, as doses não apresentaram diferenças significativas para as duas linhagens. No tempo de 72h, para a linhagem PNT-2, a dose mais próxima ao IC_{50} foi 2000 $\mu\text{mol/L}$. A dose 1000 $\mu\text{mol/L}$, que apresentou redução significativa apenas na linhagem LNCaP, foi a mais próxima ao IC_{50} (Figura 4).

MTT 24/72 horas - LNCaP

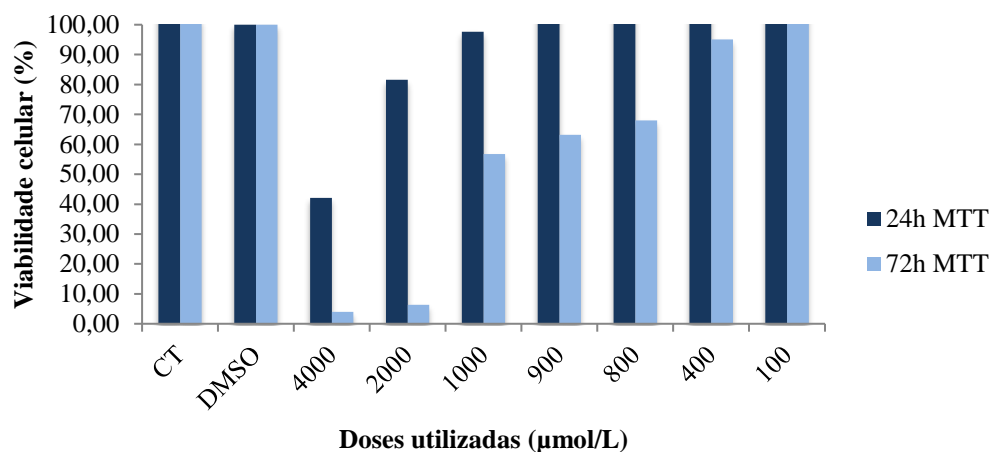


Figura 2. Padrões de viabilidade das células LNCaP expostas à doses cumulativas crescentes da mistura de ftalatos nos tempos de 24h e 72h. As diferentes concentrações da mistura e períodos de exposição são indicados em cada gráfico. A viabilidade celular é expressa em percentagem. CT = controle realizado tratamento apenas com o meio de cultivo RPMI. DMSO = Dimetil Sulfóxido adicionado ao meio com a concentração de 0,05% na dose mais alta de exposição (4000µmol/L).

MTT 24/72 horas - PNT-2

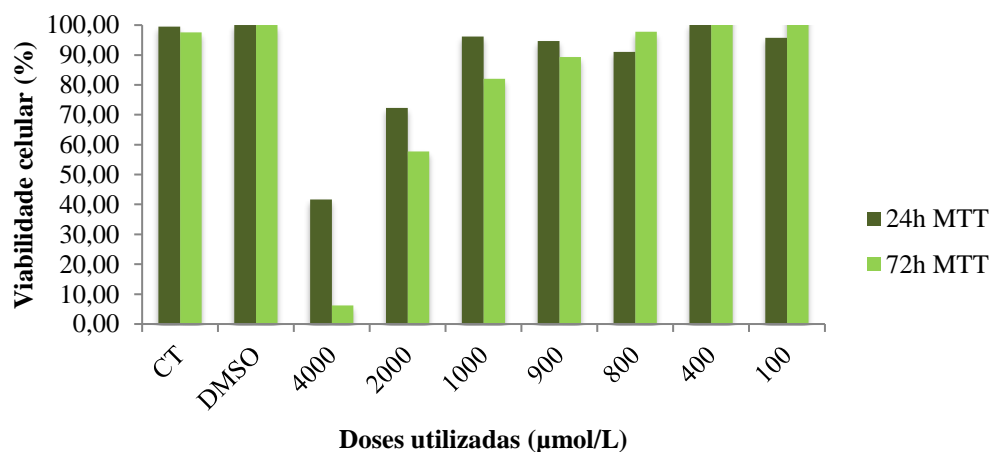


Figura 3. Padrões de viabilidade das células PNT-2 expostas à doses cumulativas crescentes da mistura de ftalatos nos tempos de 24h e 72h. As diferentes concentrações da mistura e períodos de exposição são indicados em cada gráfico. A viabilidade celular é expressa em percentagem. CT = controle realizado tratamento apenas com o meio de cultivo RPMI. DMSO = Dimetil Sulfóxido adicionado ao meio com a concentração de 0,05% na dose mais alta de exposição (4000µmol/L).

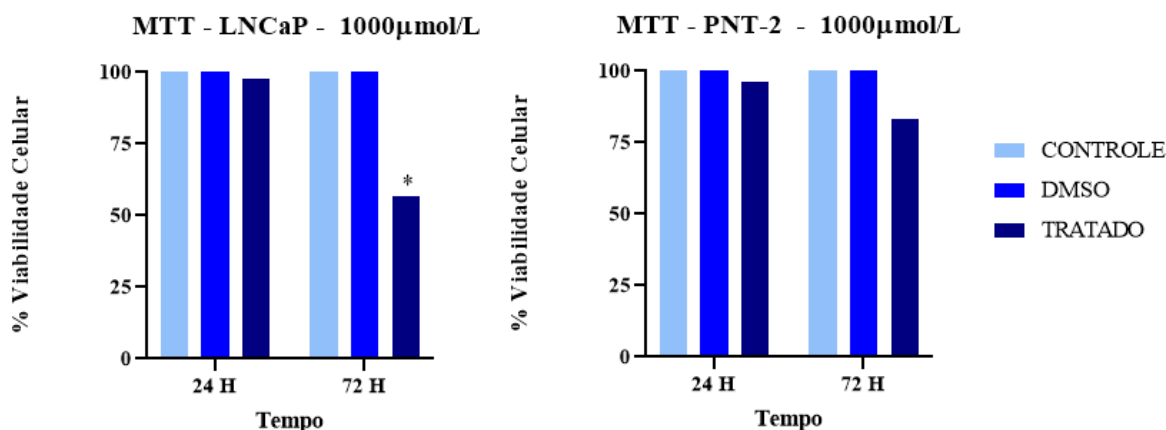


Figura 4. Padrões de viabilidade das células LNCaP e PNT-2 expostas à dose de 1000µmol/L da mistura de ftalatos nos tempos de 24h e 72h. A concentração da mistura e períodos de exposição são indicados em cada gráfico. A viabilidade celular é expressa em porcentagem. CT = controle realizado tratamento apenas com o meio de cultivo RPMI. DMSO = dimetilsulfóxido adicionado ao meio com a concentração de 0,05% na dose de exposição (1000µmol/L).

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para T com relação ao DMSO no tempo de 72h para LNCaP.

5.2 Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

5.2.1 Proliferação e Morte Celular

A sobrevivência e morte celular são controladas por proteínas que atuam na ativação ou inibição do processo de apoptose. Neste estudo a mistura de ftalatos foi capaz de influenciar a expressão de genes efetores desta via apoptótica. Para a linhagem LNCaP, houve aumento na expressão de BAX, BCL2 e Ki67 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 24h de exposição, já após 72h, houve aumento na expressão de CASP3 e CASP8 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Para a linhagem PNT-2 houve aumento na expressão de Ki67 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 24h de exposição, já após 72h, houve diminuição na expressão de CASP3 e Ki67 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 5)

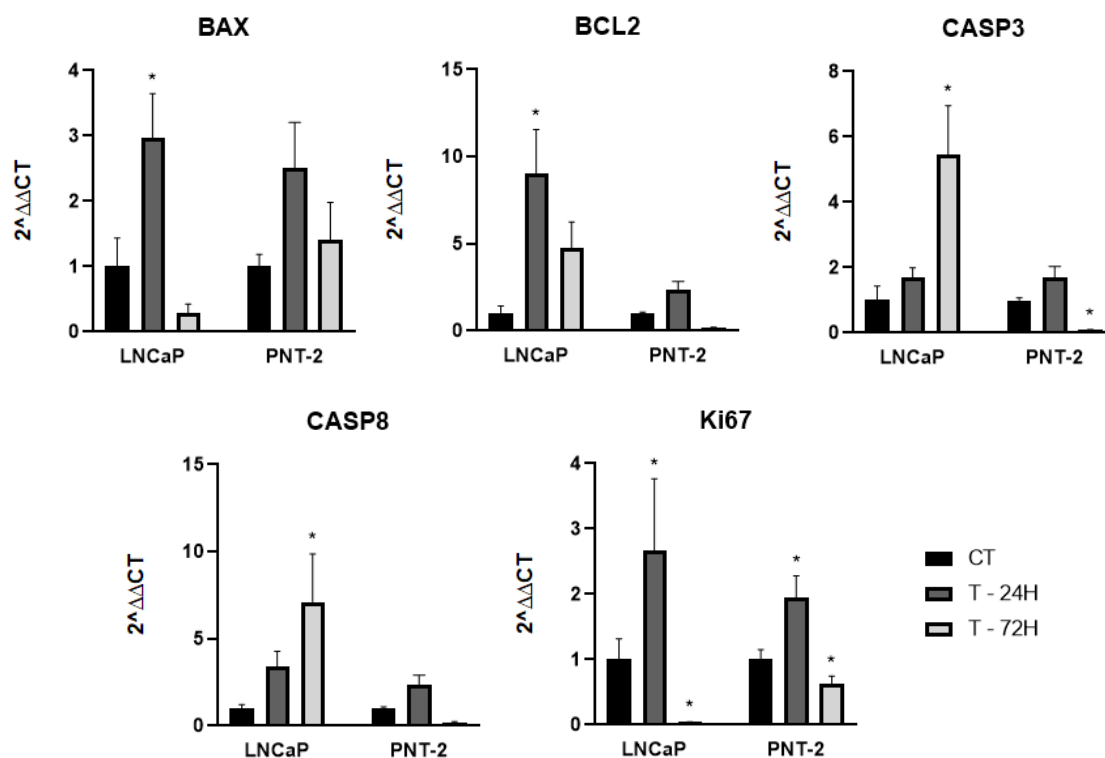


Figura 5. Gráficos representativos da expressão dos genes BAX, BCL2, Ki67, CASP3 e CASP8 a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.2.2 Enzimas Antioxidantes

Enzimas antioxidantes são importantes para neutralizar o estresse oxidativo celular. Neste estudo, a expressão dos genes de enzimas antioxidantes foi influenciada pela exposição de células prostáticas à mistura de ftalatos. Para a linhagem LNCaP, houve aumento na expressão de CAT, GSR e SOD1 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 24h de exposição (Figura 7). Para a linhagem PNT-2, houve aumento na expressão de CAT no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 24h de exposição (Figura 6). Após 72h não foram observadas alterações significativas em nenhum tipo celular.

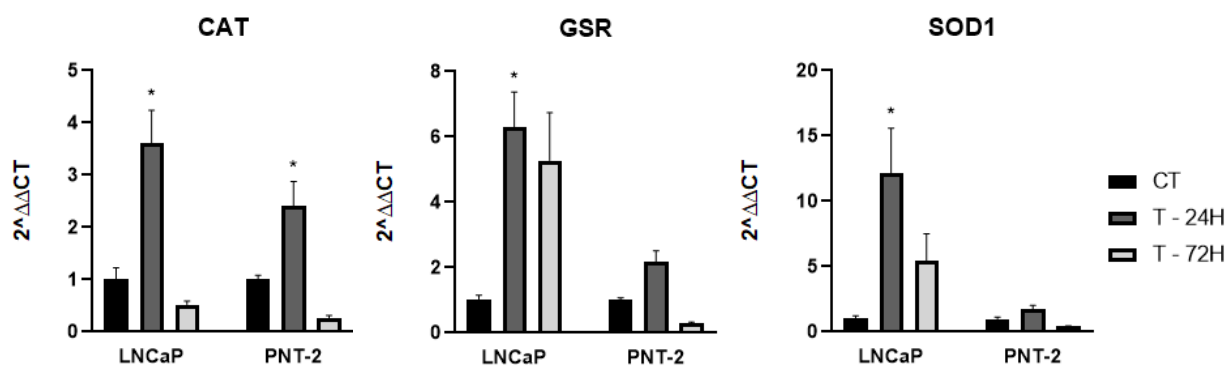


Figura 6. Gráficos representativos da expressão dos genes CAT (catalase), GSR (glutathiona redutase) e SOD1 (superóxido dismutase) a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.2.3 Marcadores de biossíntese de miRNAs e Metilação

As proteínas DROSHA e DICER1 são enzimas essenciais no processo de biossíntese de miRNAs, a nível nuclear e citoplasmático, respectivamente. Os miRNAs atuam no controle da expressão gênica em conjunto com o processo de metilação de genes específicos, realizados por enzimas como DNMT1. As regiões do gene em que ocorre o processo de metilação tem sua expressão diminuída. Houve aumento na expressão de DNMT1 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 72 horas de exposição na linhagem LNCaP, já para a linhagem PNT-2 houve diminuição na expressão de DNMT1 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 72 horas de exposição (Figura 7).

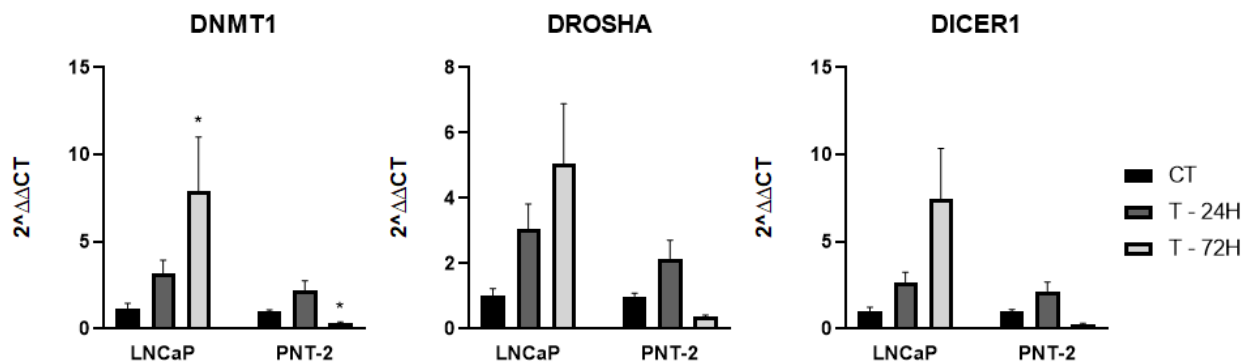


Figura 7. Gráficos representativos da expressão dos genes DNMT1, DICER1 e GSR a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.2.4 Marcadores do Ciclo Celular

O ciclo celular é regulado por enzimas que atuam controlando o progresso no processo de proliferação celular através de *checkpoints*, impedindo a replicação celular em caso de erros. Para a linhagem PNT-2, houve diminuição na expressão de CDKN2A no grupo tratado em relação ao controle após 72h de exposição (Figura 8).

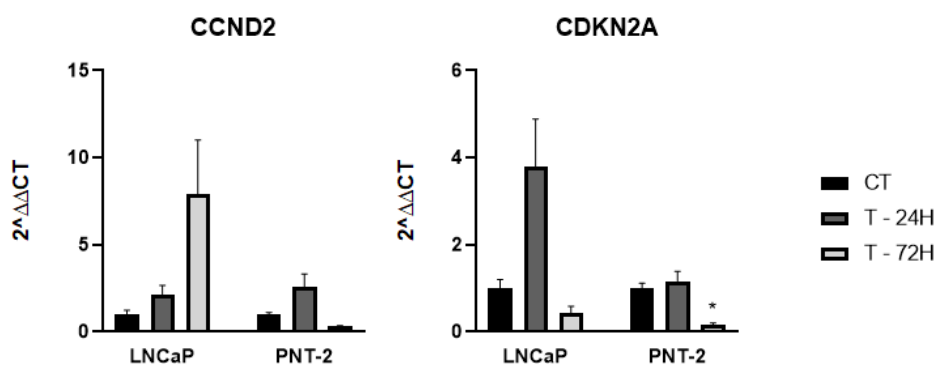


Figura 8. Gráficos representativos da expressão dos genes CCND2 (ciclina D2) a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.2.5 Receptores Hormonais

Houve aumento na expressão de ER α no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) após 24h de exposição em células LNCaP e PNT-2. Após 72h, uma diminuição na expressão de ER α no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) foi observada em células LNCaP e PNT-2 (Figura 9).

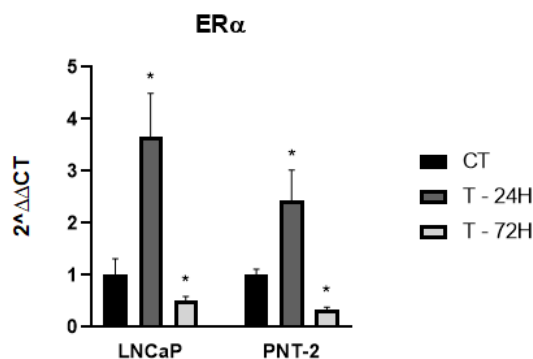


Figura 9. Gráficos representativos da expressão do gene ER α a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.2.6 miRNAs

A expressão gênica é finamente regulada por miRNAs, capazes de controlar o processo de tradução através do silenciamento por inibição, através de clivagem de regiões específicas de mRNAs, ou ligação ao mRNA, impedindo ação de enzimas promotoras da tradução. Após 24h de exposição, houve aumento na expressão de miR141-3P e miR 184 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) na linhagem LNCaP. Após 72h, houve aumento na expressão de miR141-3P e diminuição na expressão de miR 184 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) para a linha LNCaP, enquanto que para a linhagem PNT-2 no tempo de 72 horas houve aumento na expressão de miR 184 no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 10).

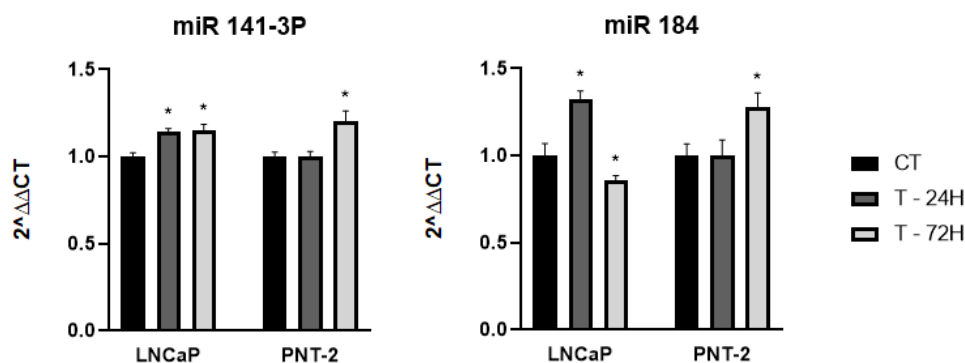


Figura 10. Gráficos representativos da expressão dos genes miR 141-3p e miR 184 a partir da análise por RT-qPCR em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam a exposição, no tempo de 24h e 72h, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados são apresentados pela Média \pm SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

5.3 Ensaio de Migração Celular através de insertos *transwell*

A migração celular é um processo fundamental que envolve a passagem das células de um local para outro por meio de adoção de diferentes modos de motilidade. O processo de migração procede da presença de estímulos como quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas, culminando na reorganização do citoesqueleto de actina e de complexos de adesão para realização da migração celular.

Neste estudo, a mistura de ftalatos mostrou-se capaz de alterar o potencial migratório celular, com aumento do número de células migratórias no grupo tratado em relação ao controle ($p \leq 0,05$) em ambas as linhagens. O grupo tratado da linhagem LNCaP quando comparado ao grupo tratado da linhagem PNT-2 apresentou aumento significativo, demonstrando que a mistura de ftalatos foi capaz de influenciar mais acentuadamente o comportamento migratório de células da linhagem LNCaP.

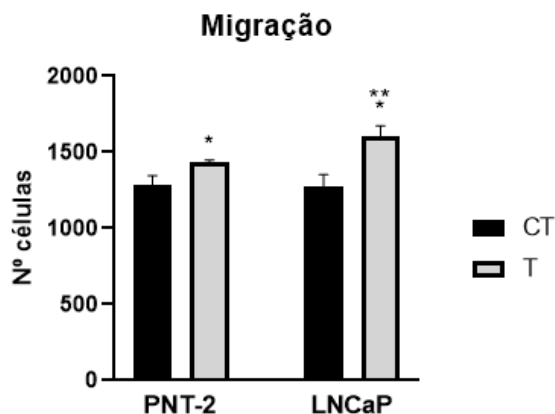


Figura 11. Gráficos representativo do número de células que migraram através do inserto a partir da contagem de campos em células LNCaP e PNT-2. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. As bandas representam o número total de células que migraram, do grupo CONTROLE exposto ao DMSO na mesma concentração da mistura e do grupo TRATADO exposto à mistura. Os dados são apresentados pela Média±SEM.

* **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO com relação ao CONTROLE.

** **Teste t** ajustado $p \leq 0,05$ para TRATADO em PNT-2 com relação ao TRATADO em LNCaP.

6. DISCUSSÃO

Os ftalatos estimulam um mercado crescente na produção de plastificantes, movimentando mais de 10 bilhões de dólares (Wang *et al.*, 2021). As restrições de aplicação de ftalatos na produção de plásticos e demais materiais têm se intensificado, porém sua produção ainda se apresenta crescente (Bornehag *et al.*, 2014). A China, maior produtora de plástico do mundo, apresenta altos índices de contaminação por ftalatos em sua população e uma relação direta da exposição destes desreguladores com distúrbios metabólicos, danos ao sistema reprodutivo e cânceres sensíveis a hormônios masculinos e femininos (Giovanoulis *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2017). A via mais frequente de contaminação é a ingestão, e a taxa de contaminação varia de acordo com o comportamento, hábitos da população, gênero e a faixa etária.

Neste estudo, avaliamos os efeitos de uma mistura ambientalmente relevante de ftalatos em células prostáticas humanas PNT-2 e LNCaP. Nossos resultados mostraram que a mistura pode influenciar a expressão de genes relacionados ao turnover celular, ao estresse oxidativo, à biossíntese e expressão de miRNAs e à apoptose. Além disso, a mistura causou mudanças nos níveis de expressão de receptores hormonais e de

microRNAs específicos. As evidências e tendências averiguadas neste estudo corroboram estudos anteriores realizados com diésteres de ftalato precursores dos monoésteres (Scarano *et al.*, 2019; Flaws *et al.*, 2020). No geral, os monoésteres mostraram-se mais tóxicos que seus precursores, devido sua maior bioatividade (Hannon *et al.*, 2015). A mistura de monoésteres usada neste estudo foi baseada em resultados anteriores de um estudo sobre presença de metabólitos de ftalatos na urina de mulheres grávidas (Zhou *et al.*, 2017) e de estudos *in vitro* com folículos ovarianos de camundongos (Meling *et al.*, 2020) utilizando as mesmas concentrações de monoésteres para expor folículos antrais.

O teste de MTT é um ensaio colorimétrico usado para avaliar a atividade metabólica celular, permitindo avaliar diferentes doses e observar seus efeitos sobre a viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade. O MTT de 24 horas mostrou maior queda de viabilidade celular em ambas as linhagens LNCaP e PNT-2 a partir da dose 2000 $\mu\text{mol/L}$. Já o MTT de 72 horas mostrou maior queda de viabilidade celular na linhagem LNCaP a partir da dose 800 $\mu\text{mol/L}$, já na linhagem PNT-2, a queda foi maior a partir da dose 2000 $\mu\text{mol/L}$. Observando o efeito tóxico da dose 2000 $\mu\text{mol/L}$ sobre a linhagem LNCaP e com base nas alterações nos tempos de 24 e 72 horas, a dose adotada para o tratamento das células foi de 1000 $\mu\text{mol/L}$, uma dose próxima ao valor de IC_{50} para células LNCaP e PNT-2 após 72 horas de exposição. A linhagem PNT-2 se mostrou mais resistente aos efeitos da mistura, possivelmente por sua maior capacidade de reparo e defesa celular, resultando em menos alterações.

A dose de 1000 $\mu\text{mol/L}$ sustenta estudos presentes na literatura em que a exposição aos ftalatos assume uma relação de dose-dependência com a concentração da mistura (Scarano *et al.*, 2019). A exposição de folículos antrais com as mesmas concentrações da mistura de monoésteres deste estudo foi realizada nos tempos de 24 e 96 horas com aplicação de doses 0.065, 0.65, 6.5, 65, e 325 $\mu\text{g/mL}$, proporcionais à dose adotada neste trabalho (Flaws *et al.*, 2020). Outros estudos adotaram doses mais baixas devido realização de exposição aos ftalatos de forma isolada e não em conjunto e por terem tempos de exposição elevados, de forma que altas doses apresentaram-se tóxicas para o tempo necessário do experimento (Lee *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016; Hrubá *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018). O tempo de 24 de exposição a qualquer ftalato pesquisado presente na literatura não foi o suficiente para comprometer a viabilidade celular para doses até 1000 $\mu\text{mol/L}$ em linhagens LNCaP e PNT-2.

A via mitocondrial está sob controle da família de proteínas pró-apoptóticas (*BAX*) ou anti-apoptóticas (*BCL2*) (Reed *et al.*, 1994, Adams e Cory, 1998, Chao e Korsmeyer, 1998). A regulação da apoptose envolve um equilíbrio dinâmico entre essas duas categorias de proteínas. A expressão de *BAX* e *BCL2* apresentou-se aumentada no tempo de 24 horas para a linhagem LNCaP e PNT-2. A razão *bcl2/bax* mostrou-se positiva para LNCaP, indicando um saldo de maior efeito de um processo antiapoptótico celular, porém a mesma relação mostrou-se negativa para PNT-2, indicando maior tendência de processo apoptótico. No tempo de 72 horas a relação *bcl2/bax* manteve-se positiva para LNCaP e negativa para PNT-2. Dessa forma, os efeitos para a sobrevivência de células LNCaP diante da exposição à mistura de ftalatos foi mais pronunciada que em PNT-2. Maire (2005) confirmou os efeitos antiapoptóticos do DEHP em células SHE através de mecanismos que envolveram aumento da razão *bcl2/bax* por meio de uma regulação positiva da expressão de *BCL2* a 50 μ M de DEHP.

As caspases, pertencentes à família das cisteíno-proteases, estão diretamente associadas à apoptose e apresentam diferentes funções na coordenação da morte celular programada. A caspase 8 (*CASP8*) é uma das primeiras a ser ativada, denominada iniciadora. Já a caspase 3 (*CASP3*) é responsável pela maioria dos efeitos deletérios celulares da apoptose. Neste estudo, após 72 horas de exposição à mistura de ftalatos, a linhagem LNCaP apresentou aumento nos genes *CASP3* e *CASP8*, indicando possível ativação da via apoptótica. Os resultados corroboram um estudo realizado por Gomes (2008) onde foi realizada a quantificação de caspase 3 por imunohistoquímica em amostras de adenocarcinoma colorretal, constatando que todas as amostras apresentaram aumento da expressão deste gene.

A avaliação da atividade proliferativa celular é amplamente compreendida através do estudo de quantificação de *Ki67*, um gene codificado no cromossomo 10, cuja expressão está fortemente associada à entrada de células no ciclo celular, sendo, entretanto, expresso em todos os estágios do ciclo celular (Prayson, 1998; Lai, 1998). Neste estudo, após 24 horas de exposição à mistura de ftalatos, as linhagens apresentaram aumento no gene *Ki67*, indicando possível ativação da via proliferativa celular. No tempo de 72 horas ambas apresentaram diminuição da expressão de *Ki67*, possível consequência da ocupação dos poços em que as células estavam inseridas, havendo cada vez menos nutrientes, resultando em um *feedback* negativo para a proliferação celular. O aumento na expressão de *Ki67* também foi constatado por Pérez (2020) após exposição de células de cultura primária de pituitária por 72 horas a doses

de 1, 10 ou 100 nM de DEHP. A expressão de *Ki67* no carcinoma de próstata é considerada um fator prognóstico independente de sobrevida, recorrência clínica do tumor e recidiva detectada pelo PSA. (Gyftopoulos *et al.*, 2001).

A expressão aumentada dos genes CAT (catalase), GSR (glutathiona redutase) e SOD1 (superóxido dismutase), importantes antioxidantes celulares, em células LNCaP no tempo de 24 horas após a exposição à mistura de ftalatos, indica provável aumento no estresse oxidativo celular, corroborando dados presentes na literatura sobre a exposição aos ftalatos e seus efeitos sobre o sistema antioxidante. A desregulação do sistema antioxidante também foi constatada por Ferguson (2013) através de análises que quantificaram a presença de metabólitos de ftalatos em urinas de 10.026 indivíduos. A bilirrubina, um importante antioxidante que elimina espécies reativas de oxigênio (ROS), apresentou-se diminuída na média geral dos grupos, destacando o efeito nocivo da exposição aos ftalatos sobre o sistema antioxidante. Além da quantificação de bilirrubina, Ferguson (2020) constatou, através da análise de urina de 758 mulheres grávidas, a influência de MEHP, MBzP e MBP na regulação do gene 8-iso-PGF2 α , um marcador de estresse oxidativo. Foi demonstrado que ftalatos específicos induzem estresse oxidativo pela ativação das células de Kupffer, aumentando a produção de radicais livres *in vivo* (Rusyn *et al.*, 2001).

Wu e Chen (2017) investigaram o efeito de metilação de DNA em células LNCaP quando expostas a MEHP nas doses 1, 5, 10 e 25 $\mu\text{mol/L}$. As células foram expostas por 3 dias e foi realizada a quantificação de 5-metilcitosina (5-mC) e 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), intermediários de metilação genômicos. MEHP mostrou reduzir a metilação de 5-mC, afetando a progressão do câncer de próstata influenciando o estado de metilação do DNA genômico. Tal redução do nível de metilação do DNA genômico pode resultar uma instabilidade genética e ser causa do início e da progressão tumoral. Além disso, a diminuição de 5-mC e 5-hmC pode induzir heterogeneidade e reincidência tumoral. A DNA metiltransferase 1 (DNMT1) é a enzima responsável pela manutenção dos padrões de metilação durante a replicação do DNA. Acredita-se que a metilação do DNA é o principal mecanismo regulador epigenético da expressão gênica e está envolvido com a progressão de adenocarcinomas prostáticos (Yegnasubramanian, 2008). Neste estudo, após 72 horas de exposição à mistura de ftalatos, a linhagem LNCaP apresentou aumento no gene *DNMT1*, indicando possível aumento no processo de metilação do DNA. Como citado anteriormente, Wu (2017) também encontrou níveis

elevados de *DNMT1* quantificados em células LNCaP após exposição ao MEHP nas doses 1, 5, 10 e 25 $\mu\text{mol/L}$.

A enzima *DICER1* representa um modulador crucial da expressão de RNAm por meio da síntese de miRNA, importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Dessa forma, *DICER1* é uma endoribonuclease protagonista no processo de biogênese de miRNAs maduros no citoplasma (Wang *et al.*, 2009). Enquanto a enzima *DICER1* atua no citoplasma, a nuclease *DROSHA* desempenha um papel na iniciação da maturação de miRNAs no núcleo. Após iniciados, os miRNAs são transportados para o citoplasma e influenciam a regulação de alvos moleculares (Cho *et al.*, 2020). Neste estudo, após 24 e 72 horas de exposição à mistura de ftalatos, a linhagem LNCaP apresentou aumento nos genes *DICER1* e *DROSHA*, indicando possível ativação da via de biossíntese de miRNAs. Estes resultados corroboram um estudo realizado por Flaws (2020) em que a expressão de genes envolvidos na biossíntese de miRNAs apresentou-se aumentada após exposição as mesmas concentrações de ftalatos em folículos antriais.

Um estudo realizado por Mingming Zhu e colaboradores (2019) expôs as linhagens celulares prostáticas LNCaP e PC3 à doses baixas de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de Butil Benzil Ftalato (BBP) por 6 dias consecutivos. A exposição à BBP nas doses de 1 $\mu\text{mol/L}$ e 10 $\mu\text{mol/L}$ promoveu proliferação de células cancerosas, alteração nos genes do ciclo celular das células prostáticas e redução de miR-34a, um supressor tumoral. A regulação da proliferação se pronunciou através do eixo miR-34a e c-myc, diminuindo os níveis de miR-34a e aumentando os níveis de c-myc, um oncogene que desempenha um papel crítico na regulação de genes do ciclo celular como cyclinD1, PCNA e p21, essenciais no processo de proliferação celular. Ambas as linhagens apresentaram influência direta do BBP na proliferação celular através da exposição à baixas doses, e através da transfecção induzida de miR-34a, foi pronunciada uma redução da proliferação celular e diminuição dos níveis c-myc, comprovando a relação do eixo miR-34a / c-myc com o comportamento tumoral celular. A *ciclina dependente de cinase N2A (CDKN2A)* tem envolvimento nos processos do ciclo celular e via de sinalização de *p53*, atuando como supressor tumoral impedindo a progressão da fase G1 para fase S. A *ciclina d2 (CCND2)* também atua em processos relacionados ao ciclo celular e é tida como oncogene, agindo na regulação da senescência celular, sendo observada em tumores ovarianos e testiculares (Dworkin *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2010). Neste estudo, após 24 horas de exposição à mistura de ftalatos, a linhagem LNCaP apresentou aumento nos genes *CDKN2A* e *CCND2*, indicando possível

alteração da regulação do ciclo celular. No tempo de 72 horas, a linhagem LNCaP apresentou diminuição no gene *CDKN2A*, pontuando a alteração do ciclo celular com diminuição da atuação do processo de supressão tumoral. Tais alterações também foram encontradas em um estudo realizado por Cho (2014), onde 50 μ M de DEHP foi capaz de alterar a expressão de genes envolvidos com o ciclo celular.

Os ftalatos são conhecidos pelo seu efeito antiandrogênico, atuando nas vias hormonais através de receptores $ER\alpha$, $Er\beta$ e AR (Engel *et al.*, 2017). Lee e colaboradores (2014) determinaram se a exposição de células LNCaP à DBP poderia induzir a progressão do câncer de próstata, afetando o crosstalk molecular entre as vias de sinalização de ER e TGF- β . As células foram expostas por 5 dias nos tempos de 6 e 24h em concentrações 1 μ M e 0,10 μ M. Um experimento *in vivo* também foi realizado fazendo a transfecção de um xenoenxerto de células LNCaP tratadas com o ftalato em camundongos. A progressão do tumor nos camundongos se mostrou acentuada nos animais expostos ao ftalato quando comparados aos animais que receberam apenas estradiol como controle. Quando administrado ICI 182,780, um antagonista de ER, obteve-se uma regulação da progressão tumoral, revertendo os efeitos desencadeados pela exposição à DBP. Dessa forma, o ftalato empregado foi capaz de aumentar a proliferação do câncer de próstata através da via de sinalização ER e TGF- β induzindo o crescimento celular. Estudos *in vitro* mostraram que ftalatos como di- n-butilftalato (DBP) e butilbenzilftalato (BBP) são capazes de se ligar ao receptor de estrogênio α ($ER\alpha$), induzindo a expressão gênica mediada por $ER\alpha$, aumentando a proliferação de células de câncer de mama humano MCF-7, as quais expressaram $ER\alpha$ abundante. Acredita-se que a ativação ou inibição de $ER\alpha$ pode resultar em vários efeitos no nível do organismo devido à expressão específica do tecido e às diferentes funções regulatórias desse receptor. O $ER\alpha$ é conhecido por induzir a proliferação celular e, portanto, é problemático, por exemplo, em relação à progressão do câncer de mama, sendo conhecida a estimulação de $ER\alpha$ por estrogênio para estimulação de proliferação do tecido mamário (Takeuchi *et al.*, 2005). Neste estudo, houve aumento na expressão de $ER\alpha$ no grupo tratado em relação ao controle após 24 horas de exposição em células LNCaP e PNT-2. Após 72 horas, uma diminuição na expressão de $ER\alpha$ no grupo tratado em relação ao controle foi observado em células LNCaP e PNT-2. A variação da expressão de $ER\alpha$ observada nas duas linhagens celulares e nos dois tempos de tratamento corroboram estudos presentes na literatura, onde a exposição a um grupo de ftalatos em conjunto pode influenciar o comportamento celular devido ações

antagonistas entre os próprios desreguladores endócrinos, de modo que alguns ftalatos tem capacidade de influenciar e ligar-se a $E\alpha$ e outros não, assim como foi constatado por Engel (2017) e Liu (2021).

O aumento de miR 141-3p e miR 184 na linhagem LNCaP, após 24 horas de exposição à mistura de ftalatos, sustenta as proposições da literatura pelo papel de oncogenes na regulação do comportamento tumoral, também obtido no estudo anterior realizados em modelos *in vivo* expostos a uma mistura com concentrações semelhantes de diésteres de ftalatos (Scarano *et al.*, 2019). Houve também um aumento de miR 141-3p e miR 184 no tempo de 72 horas de exposição de PNT-2 à mistura. O miR 141-3p aumenta proliferação, migração e invasão, e diminui autofagia, já vistas em cânceres de pulmão e nasofaríngeo (Wu *et al.*, 2020; Mu *et al.*, 2020). O miR 184 participa dos processos de diferenciação e desenvolvimento celular, assumindo um papel de oncogene ou supressor de tumor, dependendo do contexto, regulando negativamente genes responsáveis pela supressão tumoral, como constatado por Huang (2020), onde miR 184 influenciou a proliferação, migração, apoptose e autofagia de células de carcinoma hepatocelular (HCC).

O papel do BBP na migração celular foi investigado por Tsai (2014) expondo células de carcinoma hepatocelular (Huh7) à 1 μ M de BBP por 24 horas. Os resultados revelaram que o ftalato promove aumento da migração de células cancerosas, contribuindo para a progressão tumoral. Neste estudo, a mistura de ftalatos foi capaz de promover um aumento no potencial migratório de células prostáticas, corroborando estudos presentes na literatura que revelaram a influência de ftalatos na motilidade celular e progressão do câncer (Yao *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a mistura de ftalatos em dose de 1000 μ mol/L pode causar aumento, em células LNCaP, do *turnover* celular, do estresse oxidativo, da biossíntese e expressão de miRNAs, podendo assim aumentar o potencial expansivo e migratório celular e modular o comportamento tumoral, tornando-as mais agressivas. No entanto, em células normais estes efeitos são menos acentuados, demonstrando que, a curto prazo, as mesmas são capazes de elaborar mecanismos e respostas mais efetivos contra o insulto, ou ainda, que as células PNT-2 são mais resistentes à exposição na dose empregada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*. 4, (2015).
- Ambros, V. et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)*. 9(3), (2003), 277–9.
- Anders, S. et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols*. 8(9), (2013), 1765–1786.
- Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. 11(10), (2010).
- Anika Engel, Thorsten Buhrke, Francine Imber, Sönke Jessel, Albrecht Seidel, Wolfgang Völkel, Alfonso Lampen, Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ER α , ER β , and AR, *Toxicology Letters*, 277, (2017), 54-63.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility, *Science*. 308 (5727), (2005), 1466–1469.
- Blunt E. Diethylstilbestrol exposure: it's still an issue, *Holist. Nurs. Pract.*. 18(4), (2004), 187–191.
- Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 30(15), (2014), 2114–20.
- Bosnir J, Puntarić D, Skes I, Klarić M, Simić S, Zorić I. Migration of phthalates from plastic products to model solutions. *Coll Antropol*. 27(1), (2003), 23-30.
- Brandt JZ, Silveira LT, Grassi TF, Anselmo-Franci JA, Fávvaro WJ, Felisbino SL, Barbisan LF, Scarano WR. Indole-3- carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod Toxicol.* 43, (2014), 56-66.
- Cho SJ, Lee M, Stout-Delgado HW, Moon JS. DROSHA-Dependent miRNA e AIM2 Inflammasome Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrose. *Int J Mol Sci*. 28 de fevereiro de; 21 (5), (2020), 1668.
- Ciavarella C, Motta I, Vasuri F, et al. Envolvimento de miR-30a-5p e miR-30d na transição endotelial para mesenquimal e comprometimento osteogênico precoce sob estresse inflamatório em HUVEC. *Biomoléculas* . 11 (2), (2021), 226.
- Clark BJ, Cochrum RK, The steroidogenic acute regulatory protein as atarget of endocrine disruption in male reproduction, *Drug Metab. Rev.*. 39(2–3), (2007), 353–370.
- 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 BiochemMol Biol.* 92, (2004), 221-236.

Davis, A.P.; Murphy, C.G.; Saraceni-Richards, C.A.; Rosenstein, M.C.; Wiegers, T.C.; Mattingly, C.J. Comparative toxicogenomics database: A knowledgebase and discovery tool for chemical-gene-disease networks. *Nucleic Acids Res.* 37, (2009), 786–792.

de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet.* 36, (1999), 439–52.

De Freitas, A. T. A. G., Figueiredo Pinho, C., de Aquino, A. M., Fernandes, A. A. H., Fantin Domeniconi, R., Justulin, L. A., & Scarano, W. R.. Panax ginseng methabolit (GIM-1) prevents oxidative stress and apoptosis in human Sertoli cells exposed to Monobutyl-phthalate (MBP). *Reproductive Toxicology.* 86, (2019), 68-75.

Dejous, C., Krishnan, U. M.. Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics,* 112790, (2020).

Ferguson KK, Loch-Carusio R, Meeker JD. Exploração do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios em relação aos metabólitos do ftalato urinário: NHANES 1999-2006. *Environ Sci Technol.* 46 (1), (2012), 477-485.

Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A.-M.. Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition & Food Research.* 51(7), (2007), 899–911.

Gomes, M. J. et al., Evaluation of caspase-3 markers expression in colorectal adenocarcinoma by a computadorized image analysis system, *Arq. Bras. Cir.* 21 (1), (2008).

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

Hrubá E, Pernicová Z, Pálková L, Souček K, Vondráček J, Machala M. Phthalates deregulate cell proliferation, but not neuroendocrine transdifferentiation, in human LNCaP prostate cancer cell model. *Folia Biol (Praha).* 60 (1), (2014), 56-61.

Huang, S., Wa, Q., Pan, J., Peng, X., Ren, D., Huang, Y., Tang, Y.. Downregulation of miR-141-3p promotes bone metastasis via activating NF-κB signaling in prostate cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 36(1), (2017).

J.A. Lane, S.E. Oliver, P.N. Appleby, M.A.H. Lentjes, P. Emmett, D. Kuh, A. Stephen, E.J. Brunner, M.J. Shipley, F.C. Hamdy, D.E. Neal, J.L. Donovan, K.T. Khaw, et al. Prostate cancer risk related to foods, food groups, macronutrients and micronutrients derived from the UK dietary cohort consortium food diaries. *Eur. J. Clin. Nutr.* 71, (2017), 274-283.

Jia, S.; Sankaran, G.; Wang, B.; Shang, H.; Tan, S.T.; Yap, H.M.; Shen, J.; Gutiérrez, R.A.; Fang, W.; Liu, M.; et al. Exposure and risk assessment of volatile organic compounds and airborne phthalates in Singapore's Child Care Centers. *Chemosphere.* 224, (2019), 85–92.

K. Gyftopoulos, P. Perimenis, P. Ravazoula, G.A. Barbalias, Cyclin E and Ki67 (MIB1) as markers of proliferative activity in human prostate cancers: an immunohistochemical study, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.*, 6(6), (2001), 249-253.

Lee H, Hwang K and Choi K: The estrogen receptor signaling pathway activated by phthalates is linked with transforming growth factor- β in the progression of LNCaP prostate cancer models. *Int J Oncol*, 45, (2014), 595-602.

Lin ZY, Chen G, Zhang YQ, et al. MicroRNA-30d promotes angiogenesis and tumor growth via the MYPT1/c-JUN/VEGFA pathway and predicts aggressive outcome in prostate cancer. *Mol Cancer* . 16 (1), (2017), 48.

Liu G, Cai W, Liu H, Jiang H, Bi Y, Wang H. The Association of Bisphenol A and Phthalates with Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*.;18(5), (2021), 2375.

Maire M.A., C. Rast, P. Vasseur, Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) increases Bcl-2/Bax ratio and modifies c-myc expression in Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Toxicology Letters*, , 3(158), (2005) ,237-245.

Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., Cunha, G. R.. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253(2), (2003), 'x165–174.

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

Meling DD, Warner GR, Szumski JR, Gao L, Gonsioroski AV, Rattan S, Flaws JA. The effects of a phthalate metabolite mixture on antral follicle growth and sex steroid synthesis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1(388), (2020), 114875.

Miller, KD., Siegel, R.L., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Kramer, J.L., Rowland, J.H., Stein, K.D., Alteri, R., Jemal, A.. *A Cancer Journal for Clinicians* 66(4), (2016), 271-289.

Mingming Zhu, Cong Huang, Xiao Ma, Rui Wu, Weiwei Zhu, Xiaoting Li, Zhaofeng Liang, Feifei Deng, Jieshu Wu, Shanshan Geng, Chunfeng Xie, Caiyun Zhong, Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 63, (2018), 29-33.

Mingming Zhu, Jieshu Wu, Xiao Ma, Cong Huang, Rui Wu, Weiwei Zhu, Xiaoting Li, Zhaofeng Liang, Feifei Deng, Jianyun Zhu, Wei Xie, Xue Yang, Ye Jiang, Shijia Wang, Shanshan Geng, Chunfeng Xie, Caiyun Zhong, Butyl benzyl phthalate promotes prostate cancer cell proliferation through miR-34a downregulation, *Toxicology in Vitro*. 54, (2019), 82-88.

Mu JW, Zhou XY, Wang QJ, Han LH, Jiao JB. MicroRNA-141-3p promoted the progression of nasopharyngeal carcinoma through targeting DLC1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 24(21), (2020), 11105-11113.

Pablo A. Pérez, Jonathan Toledo, Liliana del Valle Sosa, Nahuel Peinetti, Alicia I. Torres, Ana L. De Paul, Silvina Gutiérrez, The phthalate DEHP modulates the estrogen receptors α and β increasing lactotroph cell population in female pituitary glands, *Chemosphere.*, 258, (2020), 127304.

- Peixoto, A. R., Santos, T. M., Brandt, J. Z., Delella, F. K., Gonçalves, B. F., Campos, S. G. P., Scarano, W. R. . Gestational and lactational exposition to Di-N-butyl-phthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol. *Environmental Toxicology.*, 31(10), (2015), 1185–1195.
- R. Lai, L.J. Medeiros, C.S. Wilson, et al. Expression of the cell-cycle-related proteins E2F-1, p53, mdm-2, p21waf-1 and Ki67 in multiple myeloma: correlation with cyclin D1 immunoreactivity *Mod Pathol*, 11, (1998), 642-647.
- R.A. Prayson, Cyclin D1 and MIB1 immunohistochemistry in ependymomas, *Am J Clin Pathol*, 110, (1998), 629-634.
- Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A, Kono H, Yin M, Tsuchiya K, Mason RP, Peters JM, Gonzalez FJ, Segal BH, Holland SM, Thurman RG Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol.* 59(4), (2001), 744-50.
- Santos, P. M. G., Barsky, A. R., Hwang, W., Deville, C., Wang, X., Both, S., ... Vapiwala, N.. Comparative toxicity outcomes of proton-beam therapy versus intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer in the postoperative setting. *Cancer.* 125(23), (2019), 4278-4293.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Campos SGP, Justulin Jr. LA, 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. *Toxicol.* 262, (2009), 215-223.
- Scarano WR, Bedrat A, Alonso-Costa LG, Aquino AM, Fantinatti B, Justulin LA, Barbisan LF, Freire PP, Flaws JA, Bernardo L. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats. *Toxicol Sci.* 14, (2019),171(1):84–97.
- Seachrist, D. D., Bonk, K. W., Ho, S.-M., Prins, G. S., Soto, A. M., & Keri, R. A. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive Toxicology.* 59, (2016), 167–182.
- Shi XY, Wang Z, Liu L, Feng LM, Li N, Liu S, Gao Low concentrations of bisphenol A promote human ovarian cancer cell proliferation and glycolysis-based metabolism through the estrogen receptor- α pathway. *H Chemosphere.*; 185, (2017), 361-367.
- Shinji Takeuchi, Mitsuru Iida, Satoshi Kobayashi, Kazuo Jin, Tadashi Matsuda, Hiroyuki Kojima, Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors α and β , and androgen receptor, *Toxicology*, 210, 2–3, (2005), 223-233.
- Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vomSaal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid BiochemMol Biol.* 127, (2011), 83-95.
- TimmsTL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinol.* 134, (1994), 1039-1045.

Tsai, CF., Hsieh, TH., Lee, JN. et al. O benzil butil ftalato induz a migração, invasão e angiogênese de células de carcinoma hepatocelular Huh7 por meio de sinalização de proteína G / AhR não genômica. *BMC Cancer* 14, (2014), 556.

van T Erve TJ, Rosen EM, Barrett ES, et al. Phthalates and Phthalate Alternatives Have Diverse Associations with Oxidative Stress and Inflammation in Pregnant Women. *Environ Sci Technol*. 53(6), (2019), 3258-3267.

Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JÁ, Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC – loading complex. *Nat Struct Mol Biol.*; 16(11), 2009, 1148-53.

Wang TT, Milner MJ, Milner JA, Kim YS. Estrogen receptor alpha as a target for indole-3-carbinol. *J NutrBiochem.* 17, (2006), 659–664.

Wang Yong, Chen Jiao, Wu Jianhui, Zhao Yan, Pan Qi, Wang Xiu, Sun Zuyue, Zhang Yunhui, Mono-2-ethylhexyl phthalate advancing the progression of prostate cancer through activating the hedgehog pathway in LNCaP cells, *Toxicology in Vitro*, Volume 32, (2016), 86-91.

Wang, X., Wang, Y., Song, Q., Wu, J., Zhao, Y., Yao, S., Zhang, Y.. In utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate increased the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring. *Reproductive Toxicology*, 69, (2017), 60–67.

Wang, Y., Zhu, H., & Kannan, K.. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*. 7(2), (2019), 21.

Wang, Y.; Qian, H., Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare*, 9, (2021), 603.

Williams, Warwick, Dyson, Bannister. *Esplanologia*. In: Williams, Warwick, Dyson, Bannister. *Gray anatomia*. 37^a ed.

WU Jian Hui, CHEN Jiao, WANG Yong, XIA Bin, WANG Rong, ZHAO Yan, WANG Qin Xia, CANÇÃO Qi, YAO Shun Heng, ZHANG Yun Hui, SUN Zu Yue. Efeito de Mono-2-ethylhexyl Phthalate em DNA Methylation in Human Prostate Cancer Cells LNCaP . *Biomedical and Environmental Sciences*. 30 (9), (2017), 641-648.

Wu J, Shen Z. Exosomal miRNAs as biomarcadores para diagnóstico e prognóstico em câncer de pulmão. *Cancer Med* . 9 (19), (2020), 6909-6922.

Xie, H.; Han, W.; Xie, Q.; Xu, T.; Zhu, M.; Chen, J.; Face mask - A potential source of phthalate exposure for human. *J. Hazard. Mater.* 422, (2022), 126848

Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol.* 43, (2015), 66-75.

Xu, Z.; Xiong, X.; Zhao, Y.; Xiang, W.; Wu, C. Pollutants delivered every day: Phthalates in plastic express packaging bags and their leaching potential. *J. Hazard. Mater.* 384, (2020), 121282.

Yang, Z.-G., Ma, X.-D., He, Z.-H., & Guo, Y.. miR-483-5p promotes prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting RBM5. *International Braz j Urol.* 43(6), (2017), 1060–1067.

Yao, PL., Lin, Y, Richburg, JH. Mono- (2-etilhexil) ftalato (MEHP) promove a invasão e migração de células de carcinoma embrionário testicular humano. *Biol Reprod.* 86 (5), (2012), 1601-1670.

Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res.*; 68, (2008), 8954-67.

Yoon K, Kwack SJ, Kim HS, Lee B-M. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *J.Toxicol Environ Health B: Crit Rev.* 17, (2014), 127–74.

Yurdakok Dikmen B, Alpay M, Kismali G, Filazi A, Kuzukiran O, Sireli UT. In Vitro Effects of Phthalate Mixtures on Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*;34(2), (2015), 115-23

Zhang X, Ho SM. Epigenetics meets endocrinology, *J. Mol. Endocrinol.* 46(1), (2011), 11–32.

Zhao Y, Shi H-J, Xie C-M, Chen J, Laue H. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol. Mutagen.* 56(2), (2014), 286-92.

Zhou, C., Flaws, J. A. . Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicological Sciences*, 156(1), (2016), 217-229.