



unesp

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



MORFOGÊNESE DA PRÓSTATA DE RATOS EXPOSTOS AO DI-N-BUTIL-FTALATO (DBP) NO PERÍODO GESTACIONAL E LACTACIONAL: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GLANDULAR

Talita de Mello Santos

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

Prof. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

BOTUCATU – SP

2015



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**MORFOGÊNESE DA PRÓSTATA DE RATOS EXPOSTOS
AO DI-N-BUTIL-FTALATO (DBP) NO PERÍODO GESTACIONAL E
LACTACIONAL: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS
SOBRE A DIFERENCIAÇÃO GLANDULAR**

Talita de Mello Santos

Prof. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

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

Prof. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

BOTUCATU – SP

2015

Pelo amor, por toda a saudade, pela inspiração de caráter e profissional, e especialmente pela confiança depositada em mim, dedico esse trabalho aos meus grandes amores, Sílvia de Mello e Wilson de Mello Jr.

AGRADECIMENTOS

Não é fácil lidar com o desconhecido sem ter fé que todo o esforço será recompensado e principalmente sem acreditar em Deus.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biosciências e a UNESP de Botucatu pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho, e a CAPES pelo suporte financeiro.

Á todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica e aos professores dos departamentos de Anatomia e Morfologia pelo auxílio durante esses dois anos de mestrado.

Principalmente, a minha orientadora, Professora Raquel Fantin Domeniconi por confiar no meu potencial, me dar à oportunidade de crescer profissionalmente, pelo suporte intelectual e pela sua alegria que contagia os que com ela convivem. Ao Professor Wellerson Rodrigo Scarano, pela paciência, ensinamentos, dedicação ao meu trabalho, pelo suporte em todos os momentos que precisei, e em especial na ausência da minha orientadora, sou muito grata. Como disse Isaac Newton, –Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Aos colegas do laboratório de Anatomia, do LabDeca e do LabMec, grata pelo apoio e auxílio no dia a dia. Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disposição e colaborações fundamentais para o trabalho.

Aos meus animais do experimento pelas vidas que engrandeceram a ciência.

Este momento jamais seria o mesmo sem o apoio e incentivo dos meus colegas e grandes amigos, que estão presentes, fisicamente ou virtualmente, nos momentos de dificuldades tornando-os mais leves e fazendo os meus dias mais alegres. Tenho a sorte de viver rodeada de amor, de carinho, de incentivo e confiança. Agradeço ao meu namorado, por acreditar em mim e ser meu companheiro de vida.

Um sorriso pode mudar um dia e por isso sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desde sonho. Muito obrigada!

“Graças te dou, visto que por modo assombrosamente maravilhoso me formaste; as Tuas obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito bem” Salmo 139:14

RESUMO

Os ftalatos são ésteres utilizados na fabricação de plásticos transparentes empregados na indústria e são amplamente encontrados como substâncias contaminantes no meio ambiente, sendo o tipo mais encontrado, o Di-n-Butil-Ftalato (DBP). Diversos estudos têm mostrado efeitos antiandrogênicos do DBP em ratos expostos durante a vida fetal, refletindo em alterações morfofuncionais sobre órgãos reprodutivos. A morfogênese da próstata é um processo dependente de andrógeno resultante das interações entre mesênquima e epitélio, modulada por fatores de crescimento e algumas moléculas de sinalização. Dentre elas, estão as BMPs que controlam o desenvolvimento de vários tecidos e sofrem influência hormonal. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição gestacional e lactacional ao DBP em duas doses (100 e 500mg/kg), sobre a morfogênese inicial e intermediária da próstata de ratos. Assim, fêmeas prenhes da linhagem Wistar foram divididas em 3 grupos experimentais (n=10): CN (controle negativo); DBP100 (DBP; 100 mg/kg) e DBP500 (DBP; 500 mg/kg). Os animais tratados foram expostos ao DBP do 15º dia de gestação (DG15) até o 21º dia pós-natal (DPN21) por gavagem, enquanto os animais CN receberam óleo de milho (veículo). Os animais da geração F1 foram eutanasiados por decapitação nos DPN1 e DPN21, e procedeu-se a coleta do sangue para a análise sérica de testosterona. A parte pélvica da uretra (DPN1) e a próstata ventral (DPN21) foram submetidas às análises histológica e imuno-histoquímica para a detecção de AR (receptor de andrógeno), antígeno P63 e α -actina; enquanto que os níveis das proteínas: AR, BMP-4 e PCNA foram avaliados por *Western Blot*. No DPN1, houve redução na distância anogenital e nos níveis de testosterona nos animais tratados com DPB, e a reconstrução 3D mostrou redução nos números e comprimentos dos brotos no grupo DBP500. A imunomarcagem para AR e α -actina foi reduzida no mesênquima em diferenciação, e a expressão das proteínas AR e BMP-4 foi menor, principalmente nos animais DBP500. No DPN21, houve alterações no padrão de distribuição de células AR positivas e a marcação para α -actina, nas regiões periacinares, evidenciou redução na espessura da camada muscular. A menor expressão do AR se manteve nos animais do DBP500 no DPN21, no entanto, para a BMP-4 não houve diferença entre os grupos. Estes resultados mostram que houve importante interferência do DBP, em ambas as doses, na morfogênese da próstata de ratos expostos nos períodos gestacional e lactacional, alterando a produção hormonal e a expressão de proteínas regulatórias na modulação do desenvolvimento prostático.

ABSTRACT

Phthalate esters such as Di-n-butyl phthalate (DBP) are used in the manufacture of transparent plastics and they are widely found as contaminants in the environment. Previous studies have shown anti-androgens effects of DBP in rats exposed during fetal life, which presented morphological changes on the reproductive organs. Morphogenesis of the prostate is an androgen-dependent process that depends on interactions between mesenchymal and epithelial cells and it is modulated by growth factors and signaling molecules. Among these molecules, BMPs are important morphogenetic proteins, which are influenced by hormonal levels. These proteins have been implicated in the regulation of prostatic branching morphogenesis. The aim of this study was to evaluate the effects of gestational and lactational exposure to DBP in two doses (100 and 500 mg/kg b.w.) on the initial and intermediate morphogenesis in prostate of rats. Thus, pregnant female rats were divided into 3 groups (n = 10): CN (negative control); DBP100 (BPD; 100 mg/kg) and DBP500 (BPD; 500 mg/kg). Treated animals were exposed from 15th gestation day (GD15) to 21st postnatal day (PND21) by gavage, while the CN animals received corn oil (vehicle). F1 male rats were sacrificed by decapitation in PND1 and PND21 to proceed the blood collect to analysis the testosterone serum levels. The prostatic urethra (DPN1) and the ventral prostate (DPN21) were subjected to histological and immunohistochemical detection for AR (androgen receptor), p63 antigen and α -actin; whereas protein levels: AR, BMP-4 and PCNA were assessed by Western Blot assay. In DPN1, anogenital distance and testosterone levels decreased in animals treated with DBP, and on three-dimensional reconstruction of the prostate, the number of prostatic buds was lower in DBP500 than CN. Immunostaining for AR and α -actin were reduced in the mesenchyme in differentiation, and protein expression of AR and BMP-4 were lower, especially in animals DBP500. In DBP500 group at DPN21, AR-positive epithelial cells decreased and the immune reactivity for α -actin in periacinar regions was more delicate, which indicates reduction in the muscle cells layer thickness. The lower expression of AR remained in DBP500 animals in PND21, however, for BMP-4 there was no difference between groups. These results show that there was a significant interference of DBP, at both doses, in the morphogenesis of the prostate in rats exposed during pregnancy and lactation, changing the hormone production and the expression of regulatory proteins in the modulation of prostatic development.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OS FTALATOS: DI-N-BUTIL-FTALATO (DBP) SOBRE SISTEMA GENITAL MASCULINO	9
1.2 PRÓSTATA: ESTRUTURA E FISIOLOGIA	11
1.3 MORFOGÊNESE PROSTÁTICA	13
1.4 PROTEÍNAS MORFOGÊNICAS (BMPS)	17
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVO	20
CONCLUSÃO GERAL	488
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS FTALATOS: DI-N-BUTIL-FTALATO (DBP) SOBRE SISTEMA GENITAL MASCULINO

Os ftalatos são ésteres utilizados como aditivos químicos que conferem maleabilidade na fabricação de plásticos transparentes empregados em indústrias, como por exemplo, o PVC, resinas epóxi ou poliésteres, que são utilizados em uma vasta gama de produtos (Programa Internacional em Segurança Química [IPCS], 1992; 1997), tais como: bolsas de sangue, de soro e de soluções intravenosas, cateteres, máscaras para inalação de oxigênio, luvas, tubos, dentre outros produtos médico-hospitalares; nas embalagens de alimentos, como biscoitos, gordura vegetal, salsichas, queijos e etc; e em recipientes de loções, como shampoos e cremes corporais, e cosméticos (MAFF, 1996; WITTASSEK et al., 2011.)

Por serem compostos que não são ligados à matriz polimérica, os ftalatos podem migrar de seus recipientes originais para o ambiente circundante (SCHETTLER, 2006), tornando-se amplamente encontrados como substâncias contaminantes no meio ambiente, fonte primária potencial de exposição humana, pois são absorvidos pelo solo, mananciais e plantas, (ZURMÜHL, 1990; LIANG et al., 2010; LIU et al., 2010; WANG et al., 2012). Porém, as principais rotas para exposição humana ao ftalato são: pela ingestão de água e alimentos contaminados, pela inalação de ar poluído, bem como pelo contato dérmico com produtos plásticos, e também diretamente pelo sistema circulatório com o uso de equipamentos médicos. Dentre as quatro maiores fontes, acredita-se que a maior (90%), seja pela ingestão de alimentos, pois podem absorver tais compostos de suas embalagens ou durante o processo de produção (MAFF, 1996; KOHN et al., 2000; CHANG et al., 2014).

Produtos químicos, como os ftalatos, estão presentes no ambiente devido ao estilo de vida moderno e estudos recentes mostraram que o Di-n-Butil-Ftalato (DBP) está presente nos metabólitos urinários humanos em altas concentrações (BLOUNT et al., 2000; JORNET-MARTÍNEZ et al., 2015), o que justifica o crescente interesse dos pesquisadores em seus efeitos em seres humanos e animais (SU et al., 2015). O DBP é o tipo de ftalato mais encontrado em alimentos embalados em plásticos e devido a ampla utilização deste composto, há um potencial diário de exposição a este químico na população em geral (LEHMANN et al. 2004), estimando-se 0,84 a 113 µg/Kg/dia de DBP por pessoa (BLOUNT et al., 2000; KOHN et al., 2000).

Poucos estudos são realizados com humanos, porém Pant *et al.* (2014) relataram os efeitos na fertilidade em homens com idade reprodutiva, expostos a níveis ambientais de DBP, mostrando que houve declínio acentuado da qualidade espermática, salientando o possível dano ao DNA dessas células germinativas. Assim como Hauser e Calafat (2005), estudando homens adultos expostos a diferentes tipos e doses de ftalato, mostraram possíveis alterações na capacidade reprodutiva, relacionada aos níveis mais baixos de testosterona.

Estudos sobre a exposição materna aos ftalatos mostraram efeitos em diversas fases do desenvolvimento de roedores, principalmente sobre o sistema genital masculino da prole, tais como: diminuição das células germinativas, declínio da qualidade espermática, redução da distância anogenital, criptorquidismo, hipospádia, queda na concentração de testosterona, atraso do início da puberdade e, na fase adulta, malformações de epidídimo, ducto deferente, glândula seminal e próstata (WINE *et al.*, 1997; MYILCHREEST *et al.*, 2000; 2002; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010; VENTRICE *et al.*, 2013; BUSTAMANTE-MONTES *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2015).

Esses efeitos associados, caracterizam o DBP como substância com atividade anti-androgênica (HOWDESHELL *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014) ligados à diminuição na produção intratesticular de testosterona pelas células Leydig. Este fator o diferencia de outros agentes químicos como a flutamida, a qual está envolvida diretamente no bloqueio de receptores androgênicos (BARLOW *et al.*, 2004; SPECHT *et al.*, 2014).

O mecanismo pelo qual o DBP causa redução nos níveis de testosterona parece estar envolvido com a diminuição na produção de andrógenos, desde o período perinatal, atuando nas células de Leydig dos testículos fetais. Evidências dos efeitos antiandrogênicos também foram observadas nas células de Sertoli, onde se encontrou alterações na capacidade funcional de adesão e de interações destas células com os gonócitos. Mostrando, então, que os testículos fetais são diretamente afetados durante a morfogênese e a diferenciação testicular (FISHER *et al.*, 2003; BEVERLY *et al.*, 2014). Esta diminuição tem efeito potencial no processo de diferenciação dos ductos mesonéfricos, e principalmente, altera o balanço hormonal, interferindo no desenvolvimento normal dos órgãos e glândulas sexuais dependentes de andrógeno (WINE *et al.*, 1997; MYILCHREEST *et al.*, 2000; 2002; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010; VENTRICE *et al.*, 2013; BUSTAMANTE-MONTES *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2015).

Em roedores, os ftalatos constituem um grupo de contaminantes que, a princípio, tem baixa toxicidade em pequenas dosagens. No entanto, segundo Mylchreest *et al.* (2000) a menor dose de DBP para se observar efeitos adversos de toxicidade (LOAEL) no sistema

genital masculino é de 100 mg/kg (KIM et al., 2004; SCARANO et al., 2010) e, de acordo com grande parte da literatura, altas doses - 500-850 mg/kg - são as que provocam os principais e mais evidentes efeitos (FOSTER, 2006; JIANG et al., 2007; 2011; KIM et al., 2010; BELLO et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015). Contudo, a investigação dose-dependente é importante para a interpretação dos diferentes efeitos do DBP sobre o sistema genital masculino (GE et al., 2007).

Diversos estudos avaliaram o desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos, principalmente o testículo fetal frente a altas doses de exposição ao DBP. Porém, não há estudos na literatura que avaliem o padrão de desenvolvimento da próstata frente ao DBP. Isso se faz necessário principalmente por ser conhecido que a exposição pré-natal aumenta a incidência de lesões prostáticas em ratos adultos, o que possivelmente relaciona-se a desbalanços morfofuncionais causados durante a morfogênese do órgão (PEIXOTO et al., 2015).

1.2 PRÓSTATA: ESTRUTURA E FISIOLOGIA

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino, encontrada somente em mamíferos, cuja função é produzir a maior fração do fluido seminal, juntamente com a glândula seminal, promovendo a manutenção do gradiente iônico e pH adequados nessa secreção (MARKER et al., 2003; UNTERGASSER et al., 2005). Em humanos, a próstata tem morfologia compacta e sem lobos distintos, pesa entre 30g e 50g e situa-se inferiormente à bexiga urinária, envolvendo a parte prostática da uretra. Apresenta-se geralmente diferenciada em três zonas: central, de transição e periférica (MCNEAL, 1983; ROY-BURMAN et al., 2004; DE MARZO et al., 2007).

Em ratos e camundongos a glândula é composta por quatro lobos distintos: anterior ou glândula coaguladora, dorsal, lateral e ventral (SHIRAI et al., 2000). Os lobos dispõem-se ao redor da bexiga urinária, contendo particularidades quanto à ramificação de ductos e produção de secreções proteicas (SUGIMURA et al., 1986). Devido às diferenças morfogênicas específicas de cada lobo, a morfologia final destes é distinta, por exemplo, histologicamente as próstatas dorsal e lateral possuem epitélio pregueado, enquanto a próstata ventral apresenta epitélio regular, contendo poucas pregas (MARKER et al., 2003). Entretanto, no mesmo lobo, os ductos prostáticos permanecem com a heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, síntese e secreção proteica, e resposta a andrógenos (BANERJEE et al., 1998). Estudos

comparativos do desenvolvimento da próstata em roedores e humanos demonstraram que a morfogênese ocorre de maneira análoga em ambos os modelos (TIMMS et al., 1994). Os componentes glandulares de natureza epitelial e os não glandulares, de natureza estromal, apresentam características comuns nos diferentes animais, independente do aspecto macroscópico da glândula. Os tipos de populações celulares são similares e, provavelmente, desempenham as mesmas funções, variando somente na distribuição relativa entre as espécies (IMAMOV et al., 2004). Portanto, este fator favorece estudos referentes à homologia morfofuncional entre as diferentes espécies (PRICE, 1963; KARR et al., 1995; IMAMOV et al., 2004).

De acordo com Peehl *et al.* (2005), o epitélio prostático é composto por cinco tipos celulares com suas respectivas funções (Figura 1). Células epiteliais secretoras, que revestem o lúmen dos ácinos prostáticos, expressam altos níveis de receptores de andrógenos (AR) e são responsáveis pela produção e secreção do líquido prostático; células epiteliais basais, as quais formam uma monocamada descontínua sobre a membrana basal envolvendo o epitélio prostático e constituem a principal população de células proliferativas do epitélio da próstata; células neuroendócrinas, que aparecem em menor quantidade e secretam uma variedade de fatores de crescimento que, possivelmente, afetam o desenvolvimento e a manutenção do tecido prostático; “stem cells”, que mesmo raras, parecem localizar-se na camada de células basais; e, por último, células transitórias amplificadoras, as quais expressam características entre as células basais e secretoras e podem ser células progenitoras ainda não diferenciadas.

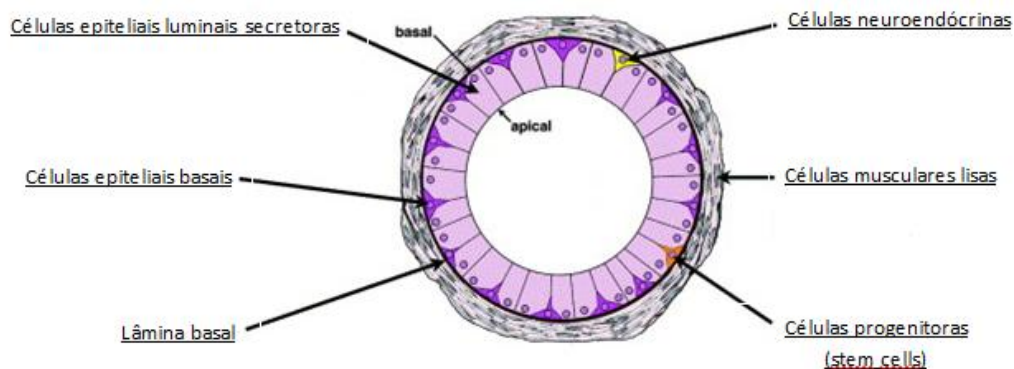


Figura 1: Esquema representando os cinco tipos celulares presentes no epitélio prostático. Adaptado de MARKER *et al.* 2003.

Entremeando as partes glandulares há estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com células musculares lisas dispostas concentricamente aos ácinos e entremeadas às

camadas de colágeno, bem como poucas fibras conjuntivas e elásticas (CARVALHO e LINE, 1996). As células musculares lisas exercem papel contrátil durante a ejaculação e, juntamente com os fibroblastos, são responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular.

Entre os elementos estruturais que integram a matriz, destacam-se as fibras colágenas, reticulares e elásticas, as quais conferem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, servindo como substrato para a ancoragem e migração celular (TUXHORN et al., 2001; VILAMAIOR et al., 2005). E as células estromais são responsáveis por direcionar os processos de desenvolvimento, manutenção e diferenciação do epitélio, fornecendo nutrientes e fatores de crescimento (BERRY et al., 2008).

Para que haja o desenvolvimento, crescimento e atividades normais dos elementos que constituem a próstata é necessário a presença de hormônios androgênicos. Os andrógenos são os responsáveis pela masculinização dos tecidos, sendo atuante desde o início do desenvolvimento dos órgãos genitais externos e internos, até o indivíduo chegar à puberdade, onde atua diretamente no desenvolvimento de características sexuais secundárias, como por exemplo, aumento da massa muscular esquelética, aprofundamento da voz, crescimento de pelos axilares e pubianos, e promove a manutenção dos órgãos andrógeno-dependentes por toda a vida adulta (BRINKMANN, 2011).

A produção dos andrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (DEBES e TINDALL, 2002), sendo o principal andrógeno circulante a testosterona. Do total de testosterona circulante no organismo, 95% é produzida pelas células de Leydig nos testículos e 5% pelas glândulas adrenais (dehidroepiandrosterona) (HSING et al., 2002; DART et al., 2013).

Na próstata, a testosterona livre é convertida em um andrógeno mais potente (cerca de 3 a 10 vezes), a diidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5 α -redutase do tipo II, mais específica para células epiteliais da próstata. Os andrógenos atuam via receptor, o Receptor de Andrógenos (AR), e tanto a testosterona, quanto a DHT podem se ligar ao AR e migrar para o núcleo das células epiteliais (TAPLIN e HO, 2001).

1.3 MORFOGÊNESE PROSTÁTICA

A próstata tem origem e desenvolvimento inicial durante a vida fetal, porém a maturação total do órgão ocorre quando o animal atinge a sua maturidade sexual. Origina-se à partir de uma estrutura chamada seio urogenital (SUG), a qual é composta por uma camada epitelial (SUE) derivada da endoderme, que é circundada por uma camada mesenquimal

(SUM) originada do mesoderme (Figura 3). Esta estrutura é encontrada na base da bexiga urinária em desenvolvimento e aparece nos machos e nas fêmeas após 13 dias de concepção nos camundongos e ratos, e após 7 semanas de gestação em humanos. O SUM é morfológicamente indistinguível em machos e fêmeas até o 17^o-18^o dia de gestação em ratos e camundongos, e até a 10^a-12^a semana em humanos. E a partir desse período, então, inicia-se a morfogênese prostática, um processo que é iniciado e dependente de andrógenos produzidos pelos testículos fetais (MARKER et al., 2003).

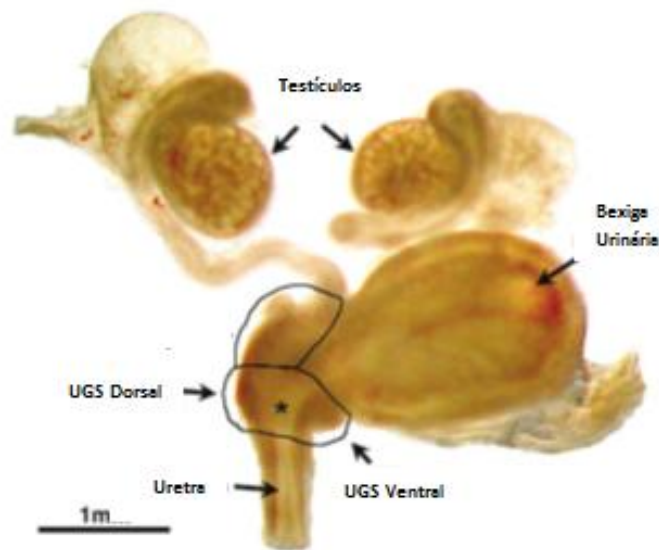


Figura 2: Parte do trato urogenital de um embrião macho de camundongo com 16,5 dias de gestação. O Seio Urogenital (SUG) está localizado na base da Bexiga Urinária em desenvolvimento e observa-se o epitélio do SUG como uma dilatação da uretra (área clara com *) circundada por um mesênquima condensado nas porções ventral e dorsal (área escura). Adaptado de MARKER *et al.*, 2003.

Está bem estabelecido na literatura que eventos que ocorrem no início da vida são influentes para o desenvolvimento de doenças em diversos órgãos, incluindo a próstata, que aparecem tardiamente (Figura 3). Durante o período fetal e neonatal, o desenvolvimento prostático é suscetível a um “imprinting” pelos andrógenos e estrógenos, bem como a outras substâncias que possam alterar o eixo e trazer sérias conseqüências na vida reprodutiva no adulto (RISBRIDGER et al., 2005).

Todo esse processo da morfogênese da próstata é dependente de andrógeno resultante das interações entre mesênquima e epitélio, e também é modulado por fatores de crescimento (CUNHA et al., 1995). Acredita-se que esses fatores de crescimento sejam os mediadores parácrinos dessa interação UGM-UGE e que anterior à diferenciação sexual do UGS, o UGM

expressa receptores de andrógeno adquirindo a capacidade de induzir a diferenciação e o brotamento dos lobos prostáticos (COOKE et al., 1991; TAKEDA et al., 2013).

A produção de andrógenos é realizada pelos testículos fetais que agem especificamente no desenvolvimento do SUG para a formação da próstata. E a resposta celular aos andrógenos é mediada pelo receptor nuclear de andrógeno, o qual é ativado pela testosterona ou pela diidrotestosterona (BROWN et al., 1995; CHAREST et al., 1991; GASPAR et al., 1991). A função dos andrógenos na indução e formação da próstata, e de órgãos derivados do ducto mesonéfrico, revela um período no qual os andrógenos iniciam um programa de expressão de genes masculinos específicos, que são necessários para a organogênese (TAKEDA et al., 1986; WELSH et al., 2007; 2008).

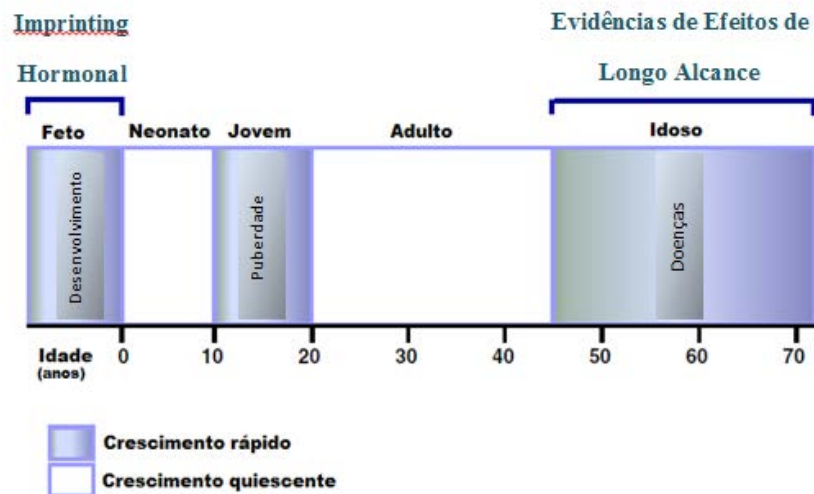


Figura 3: Esquema representando a origem fetal das doenças do adulto, evidenciando as fases de crescimento rápido e crescimento quiescente. Adaptado de RISBRIDGER *et al.* 2005.

Em resposta aos níveis de andrógenos circulantes e expressão de genes responsáveis pelo desenvolvimento prostático, inicia-se a formação de brotos epiteliais sólidos, originados do epitélio do seio urogenital, que se desenvolvem e penetram no mesênquima circundante do SUG, nas diferentes direções: ventral, dorsal e lateral (PRINS et al., 1993). Durante o período perinatal, os brotos e os ductos prostáticos são maciços e o processo de canalização destas estruturas começa somente após o nascimento do indivíduo. A canalização destes ductos tem início na parte proximal (uretra), progredindo distalmente em direção às extremidades dos ductos, e é durante este processo que ocorre a diferenciação das células epiteliais basais e secretoras (LOPES et al., 1996; MARKER et al., 2003).

Conforme esses brotos se desenvolvem, formam-se cordões de células epiteliais. Estes cordões começam a se ramificarem, dando forma ao que posteriormente originará os lobos

prostáticos. Cada lobo possui um padrão de brotamento ductal característico, o que originará, em roedores, as seguintes subdivisões: a próstata dorsolateral, ventral e anterior, (TIMMS et al., 1994; KINBARA et al., 1995; MARKER et al., 2003).

Além da determinação indutora dos andrógenos, da expressão de genes e de fatores de transcrição específicos, o brotamento, a elongação e a ramificação dos brotos prostáticos são impulsionados por uma complexa interação entre células epiteliais e mesenquimais, através da secreção de fatores parácrinos e autócrinos (PRINS e PUTZ, 2008).

Enquanto muitos sinais secretórios desta interação epitélio-mesênquima têm sido caracterizados, apenas algumas moléculas de sinalização, altamente conservadas, foram descritas como essenciais durante a embriogênese (HOGAN, 1999). Dentre estas moléculas, estão as SonicHedgehog (Shh), as Wnts, as Fgfs e as Bmps/Tgfb β /ativinas, as quais têm como função controlar sutil e detalhadamente o desenvolvimento dos tecidos.

Essas moléculas regulatórias, positivas e negativas, são temporalmente e espacialmente reguladas, e comunicam-se com as células via seus receptores específicos (PRINS e PUTZ, 2008). Em roedores, a morfogênese de todo o complexo prostático se completa entre os dias 15-30 pós-natal (DPN). No entanto, a completa diferenciação celular e a maturação da próstata ocorrem durante a puberdade, quando há um aumento dos níveis de andrógeno circulante no organismo, entre os dias 25-40 pós-natais (Figura 4) (PRINS e PUTZ, 2008).

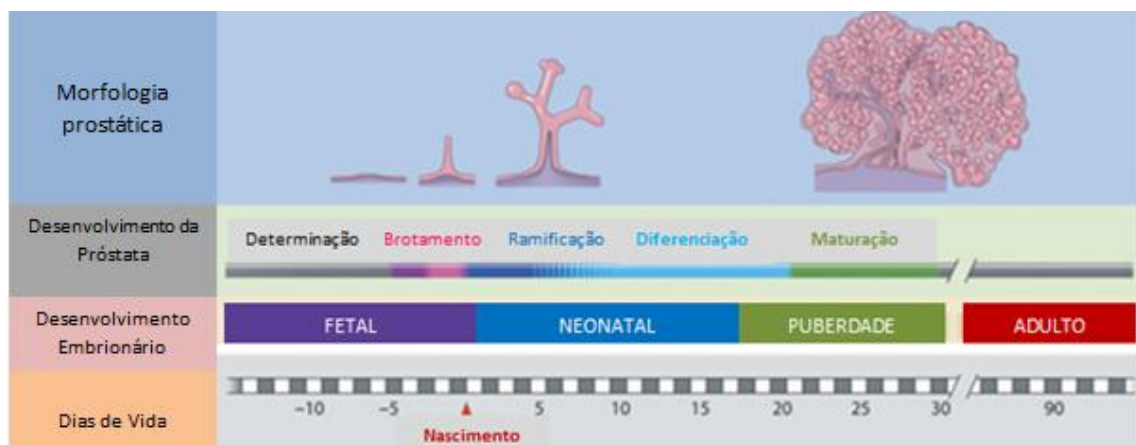


Figura 4: Estágios do desenvolvimento da próstata de rato. Adaptado PRINS e PUTZ, 2008.

Somado ao aumento na produção de testosterona ou diidrotestosterona, a qual é mediada pela expressão de AR, ocorre uma mudança nos padrões de diferenciação epitelial das células progenitoras em células diferenciadas basais e luminas na próstata de ratos (PRINS e BIRCH, 1995; HAYWARD et al., 1996). No entanto, a diferenciação das células

secretoras, em roedores, ocorre no período pós-natal, e as proteínas secretórias específicas da próstata são inicialmente detectadas entre os 12°-20° dias após o nascimento do animal (LOPEZ et al., 1996; MARKER et al., 2003).

A diferenciação do epitélio prostático é acompanhada pela diferenciação do mesênquima, em células musculares lisas e fibroblastos (HAYWARD et al., 1997), sendo que no final do desenvolvimento, os ductos prostáticos são compostos por uma parte epitelial e por outra estromal. Portanto, a interação entre esses dois compartimentos é a responsável pelo crescimento e atividade funcional da glândula (NEMETH et al., 1996).

1.4 PROTEÍNAS MORFOGÊNICAS (BMPS)

As proteínas morfogênicas do osso (BMPs) são membros da superfamília de genes de TGF- β e, de modo geral, atuam como inibidores da proliferação durante o desenvolvimento (WOZNEY et al., 1988). As BMPs secretadas iniciam a sinalização celular através da ligação com receptores transmembrana do tipo II, que formam um complexo com receptores do tipo I, ativando vias intracelulares (HOGAN, 1996).

Na próstata de ratos e camundongos, há um tipo de BMP que é amplamente expressa no UGM e no mesênquima circundante das extremidades dos futuros brotos, a BMP-4. Esta proteína permanece ativa antes e durante o início do brotamento e diminui os níveis de expressão local no período pós-natal (PRINS e PUTZ, 2008). A BMP-4 foi localizada no mesênquima periductal ao longo do comprimento dos ductos em alongamento e ramificação, e os receptores específicos estão expressos tanto nas células mesenquimais como nas epiteliais da próstata de ratos, indicando que as ações desta BMP podem ser mediadas nos dois tipos celulares durante o desenvolvimento (LAMM et al., 2001; PRINS et al., 2006). Portanto, a sinalização da BMP-4 é um fator chave tanto para a conformação dos ramos dos ductos prostáticos, quanto para a diferenciação das células epiteliais da glândula (OMORI et al., 2014). Tendo em vista que a expressão da BMP-4 é regulada por outros fatores de crescimento da próstata, incluindo “up-regulation” pelo Shh e “down-regulation” por FGF-10, a expressão da BMP-4 possui diferentes gradientes em locais distintos, o que contribui para o padrão da ramificação ductal (PU et al., 2004; HUANG et al., 2005).

Assim como ilustrado na figura 5, com maiores detalhes, as células epiteliais e mesenquimais fazem contato umas com as outras (Figura 5b). O Shh segregado (seta vermelha) ativa receptores presentes nas células mesenquimais locais, e desta forma, regula negativamente a expressão das proteínas FGF-10 e positivamente a expressão da BMP-4. A

“down-regulation” focal de FGF-10 resulta em subdomínios laterais de maior expressão de proteínas Shh, que, por sua vez, regula negativamente a BMP-4 nessa região, e ativa (seta verde) maior proliferação epitelial. O aumento da proliferação epitelial nos domínios laterais dos ductos resulta no surgimento de dois brotos de cada lado do foco Shh (setas azuis), assim dando origem a ramificação (PRINS e PUTZ, 2008).

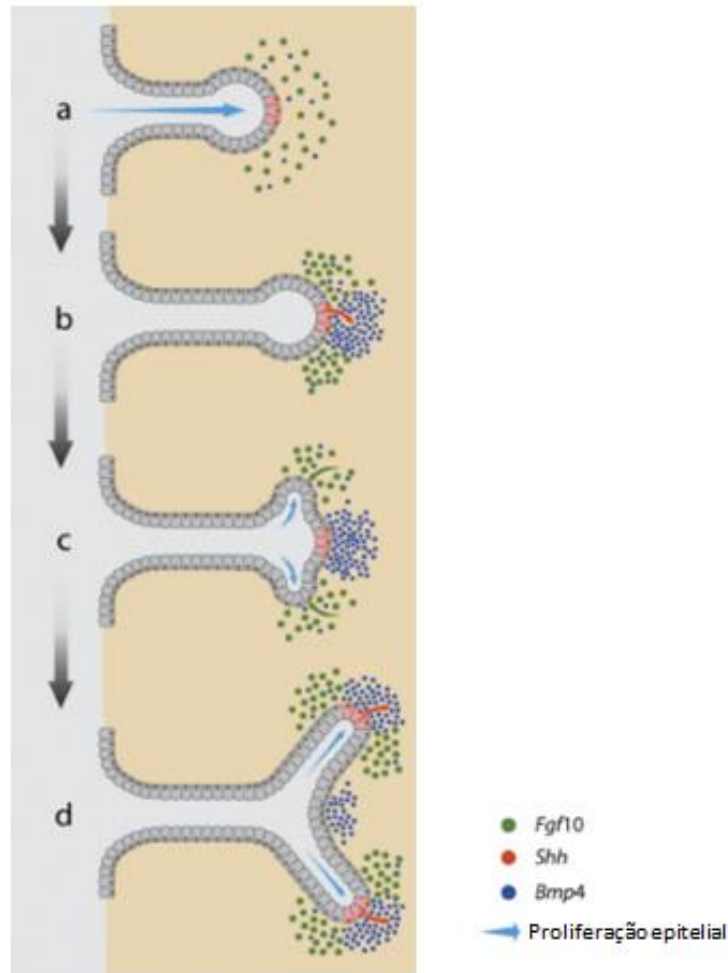


Figura 5: Modelo proposto para ramificação dicotômica dos ductos da próstata de ratos em desenvolvimento controlado pela expressão localizada e interação de fatores morforegulatórios secretados. A parte distal dos ductos expressa Shh em áreas focais (pontos vermelho), enquanto o mesênquima distal expressa FGF-10 (pontos verdes) e BMP-4 (pontos azuis). Adaptado de PRINS E PUTZ, 2008.

Contudo, Pu *et al.*, (2007) mostraram que há outro fator regulador importante que pode atuar na expressão da BMP-4, a regulação androgênica. E propõem que a presença dos andrógenos modula a expressão desta proteína através da repressão da expressão da BMP-4, contribuindo para a regulação dos fatores de crescimento no desenvolvimento da próstata. Ou seja, a presença de testosterona no microambiente prostático e a expressão dos seus receptores regulam a expressão da BMP-4 nas células mesenquimais (OMORI *et al.*, 2014).

Assim, a proteína morfogênica BMP-4 é fator chave para o correto padrão de ramificação ductal e posterior diferenciação celular da glândula prostática. Como observaram Risbridger *et al.* (2005), em camundongos nocaute para o receptor de BMP, aspectos importantes do desenvolvimento da próstata podem estar relacionados com o surgimento de doenças na próstata adulta. Demonstraram que houve aumento no volume e comprimento da próstata ventral no mutante BMP-4, na idade adulta, revelando a natureza permanente dos efeitos da BMP-4 no desenvolvimento da próstata, mostrando que alterações precoces (vida intra-uterina) podem estar relacionadas com doenças do envelhecimento.

2 JUSTIFICATIVA

A literatura traz vários resultados mostrando o efeito dos ftalatos sobre o sistema genital em roedores. Porém, dois aspectos se tornam deficientes nesse ínterim: um deles baseia-se na escassez de dados sobre os efeitos diretos do DBP sobre a biologia do desenvolvimento prostático, o outro é sobre a avaliação do possível “*imprinting*” do DBP sobre a gênese de doenças prostáticas (PEIXOTO et al., 2015). Assim como, os efeitos das diferentes doses de administração do agente: 100 mg/peso corpóreo (dose “*baixa*”) e 500 mg/peso corpóreo (dose “*alta*”) que simularam a dose mínima necessária para acarretar efeitos no sistema genital (LOAEL- MYLCHREEST et al., 2000) e a exposição ocupacional ao DBP, respectivamente (SCARANO et al., 2009).

Tornando-se importante a investigação das consequências sobre a prole de mães expostas ao DBP, durante a gestação e lactação, fases que coincidem com o período de desenvolvimento da próstata em roedores (PRINS e PUTZ, 2008).

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito da exposição gestacional e lactacional ao DBP sobre a morfogênese da próstata de ratos machos, em diferentes doses (100 e 500 mg/kg), com destaque para dois momentos morfogênicos importantes: DPN1 (brotamento epitelial da parte pélvica da uretra) e no DPN21 (diferenciação ductal e canalização glandular).

Os dados resultantes deste trabalho foram reunidos no artigo a seguir:

**GESTATIONAL AND LACTATIONAL EXPOSITION TO DI-N-BUTYL-
PHTHALATE (DBP) DELAYS PROSTATE MORPHOGENESIS BY ANDROGEN
DEPENDENT MECHANISMS**

Talita de Mello Santos¹, Wellerson Rodrigo Scarano² and Raquel Fantin Domeniconi³

¹Graduate Program in General and Applied Biology, ²Department of Morphology

³Department of Anatomy; Institute of Biosciences of Botucatu, Univ. Estadual Paulista,
UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Acknowledgements

This paper was supported by grants from CAPES for scholarship to TMS.

Running title: Perinatal exposition to DBP delays prostate morphogenesis.

*** Corresponding Author:**

Raquel Fantin Domeniconi, PhD.

Department of Anatomy

Institute of Biosciences – UNESP

Botucatu, SP, Brazil

Zip Code 18618-970

Email: rdomeniconi@ibb.unesp.br

Abstract

Phthalate esters such as Di-n-butyl phthalate (DBP) are used in the manufacture of transparent plastics and they are widely found as contaminants in the environment. Previous studies have shown anti-androgens effects of DBP in rats exposed during fetal life, which presented morphological changes on the reproductive organs. Morphogenesis of the prostate is an androgen-dependent process that depends on interactions between mesenchymal and epithelial cells and it is modulated by growth factors and signaling molecules. Among these molecules, BMPs are important morphogenetic proteins, which are influenced by hormonal levels. These proteins have been implicated in the regulation of prostatic branching morphogenesis. The aim of this study was to evaluate the effects of gestational and lactational exposure to DBP in two doses (100 and 500 mg/kg b.w.) on the initial and intermediate morphogenesis in prostate of rats. Thus, pregnant female rats were divided into 3 groups (n = 10): CN (negative control); DBP100 (BPD; 100 mg/kg) and DBP500 (BPD; 500 mg/kg). Treated animals were exposed from 15th gestation day (GD15) to 21st postnatal day (PND21) by gavage, while the CN animals received corn oil (vehicle). F1 male rats were sacrificed by decapitation in PND1 and PND21 to proceed the blood collect to analysis the testosterone serum levels. The prostatic urethra (DPN1) and the ventral prostate (DPN21) were subjected to histological and immunohistochemical detection for AR (androgen receptor), p63 antigen and α -actin; whereas protein levels: AR, BMP-4 and PCNA were assessed by Western Blot assay. In DPN1, anogenital distance and testosterone levels decreased in animals treated with DBP, and on three-dimensional reconstruction of the prostate, the number of prostatic buds was lower in DBP500 than CN. Immunostaining for AR and α -actin were reduced in the mesenchyme in differentiation, and protein expression of AR and BMP-4 were lower, especially in animals DBP500. In DBP500 group at DPN21, AR-positive epithelial cells decreased and the immune reactivity for α -actin in periacinar regions was more delicate, which indicates reduction in the muscle cells layer thickness. The lower expression of AR remained in DBP500 animals in PND21, however, for BMP-4 there was no difference between groups. These results show that there was a significant interference of DBP, at both doses, in the morphogenesis of the prostate in rats exposed during pregnancy and lactation, changing the hormone production and the expression of regulatory proteins in the modulation of prostatic development.

Introdução

Os ftalatos são ésteres utilizados na fabricação de plásticos transparentes empregados em indústrias (Programa Internacional em Segurança Química [IPCS], 1992; 1997) e são amplamente encontrados como substâncias contaminantes no meio ambiente (LIANG et al., 2010; LIU et al., 2010; WANG et al., 2012). A exposição humana ao ftalato pode ocorrer pela ingestão de água ou alimentos contaminados, inalação de ar poluído, uso de alguns medicamentos, bem como, pelo contato dérmico com loções ou cosméticos que contêm este aditivo (WITTASSEK et al., 2011)

Acredita-se que a maior fonte de exposição humana aos diferentes tipos de ftalatos são os alimentos (90%), pois podem absorver tais compostos de suas embalagens ou durante o processo de produção (MAFF, 1996; KOHN et al., 2000; CHANG et al., 2014). Produtos químicos, como os ftalatos, estão presentes no ambiente devido ao estilo de vida moderno. Estudos mostraram que o Di-n-Butil-Ftalato (DBP) está presente nos metabólitos urinários humanos em altas concentrações (BLOUNT et al., 2000; JORNET-MARTÍNEZ et al., 2015), o que justifica o crescente interesse dos pesquisadores em seus efeitos em seres humanos e animais (SU et al., 2015).

Estudos sobre a exposição materna aos ftalatos mostraram efeitos em diversas fases do desenvolvimento de roedores, principalmente sobre o sistema genital masculino da prole, tais como: diminuição das células germinativas, declínio da qualidade espermática, redução da distância anogenital, criptorquidismo, hipospadia, queda na concentração de testosterona, atraso do início da puberdade e, na fase adulta, malformações de epidídimo, ducto deferente, glândula seminal e próstata (MYILCHREEST et al., 2000; 2002; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010; BUSTAMANTE-MONTES et al., 2013; XIE et al., 2015). Esses efeitos associados, caracterizam o DBP como sendo uma substância com atividade anti-androgênica. (HOWDESHELL et al., 2008; LIU et al., 2014).

Segundo Mylchreest et al (2000) a menor dose de DBP para se observar efeitos adversos de toxicidade (LOAEL) no sistema genital masculino é a de 100mg/kg (KIM et al., 2004; SCARANO et al., 2010) e, de acordo com grande parte da literatura altas doses 500-850mg/kg são as que provocam os principais e mais evidentes efeitos (JIANG et al., 2007; 2011; BELLO et al., 2014; PEIXOTO et al., 2015).

Os andrógenos são essenciais para o desenvolvimento da próstata nos diferentes estágios da morfogênese, como: brotamento, ramificação e diferenciação celular (GEORGE e PETERSON, 1988; PRINS et al., 1993; 2008; PU et al., 2007) e regulam proteínas

morfogênicas, como por exemplo a proteína morfogênica BMP-4, responsáveis por modular as interações entre epitélio-mesênquima, estruturas derivadas do seio urogenital (TIMMS et al., 1994; PU et al., 2007; OMORI et al. 2014).

Alterações nos padrões de morfogênese prostática podem interferir de maneira irreversível na morfofisiologia da próstata adulta, atuando diretamente em doenças relacionadas ao envelhecimento (RISBRIDGER et al., 2005). Assim, a exposição a agentes anti-androgênicos, como o DBP, na fase de desenvolvimento, aumenta o risco de desenvolver câncer de próstata na vida adulta (BOBERG et al., 2015).

Com vistas ao exposto, torna-se importante investigar os efeitos do DBP sobre o desenvolvimento prostático, no que tange as proteínas regulatórias que medeiam este processo, bem como a diferenciação e a maturação da glândula.

Material e Métodos

Delineamento Experimental

Ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, em idade reprodutiva, foram adquiridos do Biotério Central da UNESP (Botucatu-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia –IBB – UNESP para aclimação. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. Durante toda a fase de experimentação as condições ambientais do biotério foram controladas: temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam *ad libitum* ração comercial (NUVILAB® CR1 – Nuvital-PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de bocharra e bico metálico (500 ml). Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (protocolo 546 – CEUA).

Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo e em sistema de harem, na proporção de duas fêmeas e um macho. Posteriormente, esfregaços vaginais de fêmeas em estro foram realizados e a presença de espermatozoide determinou a detecção da prenhez e determinou o dia zero gestacional (DG0). As ratas prenhes ou lactentes foram mantidas em gaiolas individuais, pesadas em dias alternados para calcular o volume de feto a ser administrado e investigar os sinais clínicos de toxicidade. As ratas foram divididas em 3 grupos experimentais ($n= 10/\text{grupo}$) assim denominados: CN (controle negativo), DBP100 (tratadas com DBP-100 mg/kg) e DBP500 (tratadas com 500 mg/kg). Os grupos DBP100 e DBP 500 receberam doses diárias de *Di-n-butylphthalate* – DBP (SUPELCO®, BELLENFONTE, PA, USA) em concentrações de 100 mg/kg e 500 mg/kg respectivamente, e o grupo CN recebeu óleo de milho. A administração se iniciou no 15º dia gestacional (DG15) ao 21º dia pós-natal (DPN21), período que corresponde ao início do desenvolvimento prostático (TIMMS, 2008).

Após o nascimento, os filhotes foram pesados e a distância anogenital (DAG) medida. Posteriormente, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, preferencialmente do sexo masculino, e ninhadas com número inferior a sete foram descartadas, procedendo-se a eutanásia de mães e filhotes. Os filhotes machos foram eutanasiados em dois momentos: 1º dia pós-natal (DPN1) para a avaliação da formação inicial dos brotos prostáticos e no 21º dia

pós-natal (DPN21) para a avaliação do processo de ramificação e diferenciação do epitélio e do estroma (Figura 1). Para tal, os animais foram anestesiados com CO₂ em câmara apropriada e eutanasiados através da decapitação, procedendo-se a coleta do sangue dos vasos cervicais rompidos em tubo seco para dosagens hormonais. A parte pélvica da uretra (DPN1) e a próstata ventral (DPN21) de 2 animais/ninhada foram coletadas e fixadas em Methacarn por três horas, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast. Cortes seriados de 4 µm foram produzidos em micrótomo rotativo automático e coletados em lâminas silanizadas para análises histológicas e imuno-histoquímicas. Da mesma forma se procedeu a coleta de 2 animais/ninhada para análises moleculares. As amostras foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer com temperatura -80°C.

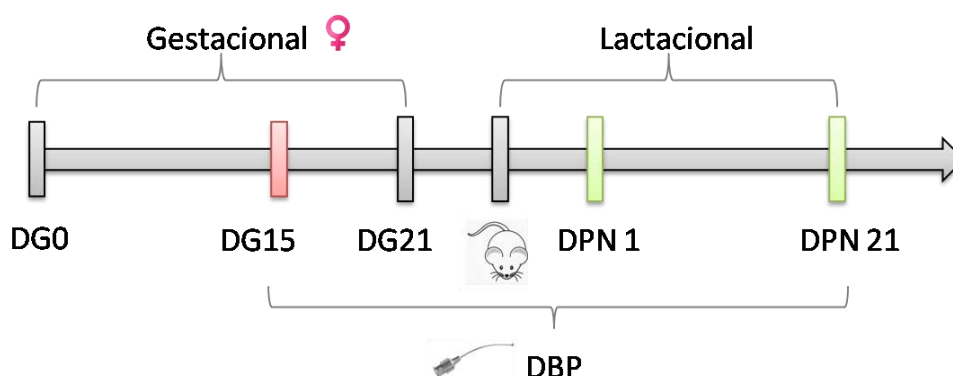


Figura 1: Delineamento experimental. O período de administração do Ftalato (DBP) decorreu do 15º dia gestacional até os 1º e 21º dias pós-natais, quando os animais dos grupos DPN1 e DPN21 foram sacrificados.

Análise Hormonal Sérica

Após a decapitação, foi coletado sangue em tubos de ensaio sem conservante. O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. (20°C por 20 minutos), o soro separado e congelado para posterior análise. Para o DPN1 foram feitas “pools” de amostra sérica (4 animais/pool) e para o DPN21 foram individuais. A análise sérica foi realizada por quimiluminescência (Elecsys, Roche®) com kit *Testosterone Assay* (sensibilidade 20ng/dL) para a dosagem de testosterona.

Imuno-histoquímica

Os cortes da parte pélvica da uretra e da próstata ventral foram submetidos à recuperação antigênica em banho Maria na panela elétrica a 100°C em tampão Tris/EDTA 0,1M pH= 9.0 por 30 minutos. Após lavagem em água destilada, os cortes foram submetidos

ao bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio em metanol 3%) por 15 minutos no escuro e ao bloqueio de proteínas inespecíficas com leite desnatado (MOLICO®) a 3% em tampão PBS por 1 hora. Após esses procedimentos, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-AR – receptor de Andrógenos (concentração 1:100; 06-608 Milipore®- USA); anti-P63 – células basais progenitoras (concentração 1:100; MAB4135 Milipore®-USA); anti- α -actina – células musculares lisas (concentração 1:100; ab6594 Abcam®). Após a incubação *overnight* na geladeira com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em tampão PBS e, em seguida incubados com os anticorpos secundários anti-coelho (concentração 1:200 ab97051-HRP Abcam®) por duas horas em temperatura ambiente. Após a reação, os cortes foram revelados com cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, SIGMA®, USA) e contrastados com Hematoxilina por 1 minuto.

Determinação dos índices de células basais progenitoras

As células basais progenitoras (p63 positivas) foram marcadas no DPN1 e DPN21, e posteriormente foi feito o índice de marcação no broto e no epitélio prostático, respectivamente, comparando os diferentes grupos experimentais. Para tal, 5 cortes de cada grupo foram utilizados, fotografando todos os brotos (DPN1) ou 5 campos histológicos (DPN21). Aproximadamente, foram contadas 1500 células no DPN1 e 700 células no DPN21. Uma média para cada grupo foi feita e então, comparadas entre si quando submetidas a análise estatística.

Reconstrução tridimensional

Após o processamento histológico, a parte pélvica da uretra de três animais de cada grupo (CN, DBP100 e DBP500) foi seccionada em cortes seriados de 5 μ m, e corados com hematoxilina-eosina. Foram capturadas e processadas as imagens utilizando o *Reconstruct* software gratuito para Windows® desenvolvido pelo National Institutes of Health and the Human Brain (Bethesda, MD, USA). Após o alinhamento da imagem, a uretra e os brotos prostáticos foram isolados em cada imagem e, em seguida, processados para obter a interface em cada seção, gerando, assim, um modelo tridimensional (3-D) semelhante ao descrito por Santos et al. (2006). É importante mencionar que este software não é capaz de captar fundos cegos como os ácinos prostáticos, portanto, as imagens mostram extremidades cegas nas pontas.

Western Blot

Para DPN1 foram feitos “pools” com amostras da parte pélvica da uretra de 5 animais de cada grupo e para DPN21, as amostras da próstata ventral, de 6 animais por grupo, foram analisadas individualmente. Para isto, os fragmentos foram homogeneizados a 4°C em tampão RIPA com inibidor de protease (BioRad®, USA) em homogeneizador do tipo Tureaux em 3 ciclos de 5 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi realizada em placas de ELISA com 96 poços e a leitura feita em leitor de ELISA pelo método de Bradford. As alíquotas (70 µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida em gel (Laemli Sample Buffer – BioRad®) e β-mercaptoetanol a 95 °C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese vertical (Mini-Protean, BioRad®) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose em sistema úmido de transferência. Os procedimentos de bloqueio, lavagem e incubação dos anticorpos primários e secundários foram realizados conforme recomendado pelo fabricante dos anticorpos. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada em leite desnatado (MOLICO®) a 3% em tampão TBST por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários: AR (concentração 1:500; 06-608 Milipore®, USA); BMP4 (concentração 1:500; ab39973 Abcam®, USA) e PCNA (concentração 1:1000; J0511 Santa Cruz®, USA), que foram diluídos em BSA 1%. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBST 3 vezes de 10 minutos. Após a lavagem, foram incubados os anticorpos secundários HRP, específicos para cada anticorpo primário, diluídos em BSA 1% por 2 horas e em seguida, foram lavadas com TBST 3 vezes de 10 minutos. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente (Amersham™ ECL Select Western Blotting Detection Reagent) da GE Healthcare® e a densidade óptica de cada banda foi avaliada pelo software ImageJ® para Windows®, normalizada pela densidade da β-actina (concentração 1:800; 47778, Santa Cruz®, USA), em seguida, os resultados foram comparados entre os grupos.

Análises estatísticas dos dados

Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos experimentais usando o software GraphPad Prism® e o teste utilizado foi ANOVA seguido de Kruskal-Wallis. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p < 0,05$.

Resultados

Dia Pós-Natal 1 (DPN1)

Quanto aos parâmetros biométricos, peso corpóreo e distância anogenital (DAG), não houve diferença no peso corpóreo dos animais, entre os grupos estudados (Tabela 1). No entanto, a DAG foi menor nos grupos tratados, DBP100 e DBP500, em relação ao grupo controle (Tabela 1 e Figura 2).

Houve redução nos níveis séricos de testosterona nos *pools* dos animais do grupo DBP500 e observou-se redução dose-dependente dos grupos tratados quando comparados ao controle (Figura 3).

Os brotos prostáticos ventrais, os primeiros a se formarem, iniciaram a sua ramificação próximo a uretra e seguiram em direção a parte distal da mesma. O padrão de brotamento epitelial foi semelhante entre os grupos experimentais, porém qualitativamente, a diminuição do número e no comprimento dos brotos no grupo DBP500 em relação aos demais é morfolologicamente nítida (Figura 4). Este resultado foi observado na reconstrução tridimensional, onde os brotos prostáticos aparecem ao redor da parte pélvica da uretra confirmando essa diferença no padrão de brotamento (Figura 5).

A localização do AR, nesta fase do desenvolvimento, foi predominante nas células mesenquimais que circundam os brotos prostáticos. Observou-se maior heterogeneidade na proporção de células AR-positivas em relação a células AR-negativas ou com marcação fraca nos grupos experimentais DBP100 e 500 em relação ao grupo controle (Figura 6- a, b, c). A imunomarcção para α -actina foi observada nas células que circundam os brotos prostáticos, região onde as células mesenquimais se diferenciam em células musculares lisas. Observou-se menor imunorreatividade nessa região nos grupos DBP, principalmente no grupo DBP500 quando comparados ao grupo CN (Figura 6- d, e, f).

Em todos os grupos estudados, a imunomarcção para a proteína p63 foi restrita às células basais do epitélio prostático dos brotos e, portanto, ausente no mesênquima circundante aos brotos prostáticos. Não houve diferença entre a quantidade de células P63 positivas entre os grupos experimentais (Figura 6 – g, h, i e figura 7).

No DPN1 as análises semi-quantitativas por *Western Blot* mostraram redução na expressão das proteínas AR e da BMP-4 entre os grupos DBP500 e CN, e ainda, no AR entre os grupos DBP100 e DBP500. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para o antígeno PCNA (Figura 8).

Dia Pós-Natal 21 (DPN21)

Os parâmetros biométricos peso corpóreo, peso da próstata ventral e peso do testículo direito foram avaliados. Não houve diferença em nenhum destes parâmetros entre os grupos experimentais (Tabela 2).

No DPN21 os níveis séricos de testosterona ficaram abaixo dos níveis de linearidade do ensaio, ou seja, abaixo de 20 ng/dL, impossibilitando a comparação entre os indivíduos nos grupos experimentais (dados não mostrados).

Não houve alterações histológicas qualitativas entre os grupos experimentais (Figura 9 a-c). O AR foi localizado, predominantemente, no núcleo das células epiteliais dos ácinos da próstata ventral, porém o padrão de marcação mostrou-se diferente entre os grupos. Os grupos DBP100 e 500 apresentaram maior heterogeneidade de imunorreatividade entre células positivas e com marcação fraca ou ausente em relação ao controle (Figura 9- a, b, c). A imunomarcação para α -actina, nas células musculares lisas que circundam os ácinos, mostrou diferença no grupo DBP500, com aparente redução na espessura da camada muscular, em relação aos demais grupos (Figura 9- d, e, f).

A imunomarcação para a proteína p63 foi restrita ao compartimento basal do epitélio prostático do lobo ventral nos animais com 21 dias. As células basais, com formas variando de triangulares a alongadas, localizaram-se dispersas entre as células luminiais nos três grupos analisados. Não houve diferença na quantidade de células basais marcadas entre os grupos experimentais (Figuras 9- g, h, i e figura 10).

No DPN21 as análises semi-quantitativas por *Western Blot* mostraram diminuição na expressão tecidual do AR entre nos grupos DBP100 e DBP500 em relação ao CN. E para a BMP-4 e o PCNA não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 11).

Discussão

Muitos contaminantes químicos industriais, como os ftalatos, passam para o feto através da placenta e pelo aleitamento materno (ROGAN, 1996; ADIBI et al., 2009). A exposição de gestantes a estes agentes químicos pode alterar a morfogênese de diversos sistemas e órgãos, incluindo malformações do trato urogenital (JIANG et al., 2011; BISCHOFF et al., 2013). A maioria dos estudos em roedores verte para a utilização de doses altas de ftalatos como 500 mg/kg (MYLCHREEST et al. 1998; FOSTER, 2006; JIANG et al., 2007, 2011), para a qual, os efeitos parecem ser mais pronunciados no desenvolvimento

do sistema genital masculino (JARFELT et al., 2005; PEIXOTO et al. 2015). No entanto, outros estudos mostram efeitos com doses mais baixas para roedores, como 100 mg/kg (KIM et al., 2004; SCARANO et al., 2010; AYDOGAN, 2013). Neste estudo utilizamos duas doses, 100 e 500 mg/kg, para exposição contínua nos períodos gestacional e lactacional, visando observar os efeitos do DBP sobre o desenvolvimento prostático de ratos e verificar se a exposição lactacional potencializa os efeitos da administração perinatal, bem como sobre o possível “imprinting” do DBP sobre o desenvolvimento inicial da glândula (AYDOGAN, 2013).

A distância anogenital, a regressão de aréolas/mamilos, a descida testicular e a separação prepucial em ratos machos são fatores dependentes de andrógeno, sensíveis aos efeitos hormonais de desreguladores endócrinos, como a exposição *in utero* do DBP (KORENBROT et al., 1977; CARRUTHERS e FOSTER, 2005; BUSTAMANTE-MONTES et al., 2013). Alterações nesses parâmetros indicam atraso na instalação da puberdade, comprometimento do comportamento sexual ou infertilidade na idade adulta (US EPA, 1996; MARTINO-ANDRADE e CHAHOUD, 2010; XIE et al., 2015).

A redução da distância anogenital tem sido observada em ratos machos expostos ao DBP durante o período gestacional (MYLCHREEST et al., 1999, 2000; EMA et al., 2000; CARRUTHERS & FOSTER, 2005; PEIXOTO et al., 2015). No presente estudo, foi observada a redução da distância anogenital nos grupos DBP em relação ao CN. Portanto, este resultado corrobora com diversos estudos já publicados e sugere que o tratamento, em ambas as doses, altera fenotipicamente o desenvolvimento normal deste parâmetro.

Comparando-se animais tratados com seus respectivos controles, em DPN1 e DPN21, não foram observadas alterações de peso corpóreo, peso da próstata ventral ou no peso do testículo direito. Estes resultados sugerem que a exposição ao DBP, nas doses utilizadas, não provoca sinais de toxicidade metabólica e, portanto, não interfere no desenvolvimento intrauterino ou pós-natal da prole. Segundo a literatura, o tratamento de fêmeas prenhes, com diferentes doses do DBP durante o período gestacional, não produz efeitos significativos nos parâmetros reprodutivos maternos, considerando desta forma que o DBP não apresenta toxicidade sistêmica às progenitoras (MYLCHREEST et al., 1999; ZHANG et al., 2004; PEIXOTO et al., 2015).

A morfogênese da próstata é dependente de andrógeno e resultante das interações entre epitélio e mesênquima (E-P) que são modulados por fatores de crescimento (CUNHA et al., 1995; PU et al., 2007; PRINS e PUTZ, 2008). O mesênquima expressa receptores de andrógeno (AR) adquirindo a capacidade de induzir o brotamento dos lobos prostáticos e a

citodiferenciação (COOKE et al., 1991; MARKER et al., 2003; PRINS e PUTZ, 2008; TAKEDA et al., 2013). Neste estudo, o padrão de brotamento epitelial foi semelhante entre os grupos experimentais no DPN1, porém qualitativamente, foi nítida a diminuição do número e comprimento dos brotos no grupo DBP500 em relação aos demais.

A localização, por imunomarcção, do AR seguiu o mesmo padrão em todos os grupos experimentais, com predominância de marcação nas células mesenquimais que circundam os brotos prostáticos. Porém, observou-se maior heterogeneidade na proporção de células AR-positivas em relação a células AR-negativas nos grupos experimentais DBP100 e 500 em relação ao grupo CN. Esse resultado se confirmou nas análises semi-quantitativas por *Western Blot* que mostrou redução nos níveis proteicos de AR entre os grupos tratados, e entre o DBP500 e o CN. Também, no DPN1, houve redução nos níveis séricos de testosterona no grupo DBP500, evidenciando que a dosagem de 500mg/kg gera maiores alterações (FOSTER, 2006; JIANG et al., 2011), além de sugerir redução dose-dependente dos grupos tratados quando comparados ao CN, mostrando que o DBP atuou nos testículos fetais em desenvolvimento prejudicando a sua função (FISHER et al., 2003; VEERAMACHANENI e KLINEFELTER, 2014). Estes resultados reforçam o papel inibitório do DBP, como agente anti-androgênico, alterando a expressão do receptor de andrógenos e da testosterona sérica nos animais expostos durante a fase gestacional (TIMMS et al., 1994; PU et al., 2007; SCARANO et al., 2010; LIU et al., 2014).

Durante o período perinatal os brotos e os ductos prostáticos são maciços e o processo de canalização destas estruturas, começa somente após o nascimento do indivíduo. A canalização destes ductos tem início na parte proximal (uretra) progredindo distalmente em direção às extremidades dos ductos e é durante este processo que ocorre a diferenciação das células epiteliais basais e secretoras (LOPES et al., 1996; MARKER et al., 2003). Neste estudo, a imunomarcção para as células basais, através da proteína p63, foi restrita às células basais do epitélio prostático dos brotos e ausente no mesênquima circundante. Não houve diferença entre a quantidade de células P63 positivas entre os grupos experimentais, sugerindo que o DBP não alterou o padrão de diferenciação das células basais.

A imunorreatividade para α -actina foi mais fraca nos grupos DBP, principalmente no DBP500, quando comparados ao grupo CN. A α -actina evidenciou células que circundam os brotos prostáticos, região onde as células mesenquimais se diferenciam em células musculares lisas (PRINS e PUTZ, 2008). Estes resultados propõem que houve atraso na diferenciação destas células quando comparados os grupos experimentais e reforça o papel inibitório da dosagem de 500mg de DBP.

De acordo com Peehl *et al.* (2005), o epitélio prostático da glândula já diferenciada é composto por cinco tipos celulares, dentre elas estão as células epiteliais secretoras, que expressam altos níveis de AR e as células epiteliais basais, que são as principais células proliferativas. Entremendo as partes glandulares há estroma conjuntivo com células musculares lisas dispostas concentricamente que exercem importante papel contrátil durante a ejaculação (CARVALHO e LINE, 1996; VILAMAIOR *et al.*, 2005).

Nesse trabalho, o AR foi localizado, predominantemente, no núcleo das células epiteliais secretoras dos ácinos da próstata ventral, nos animais DPN21, porém o padrão de marcação mostrou-se diferente entre os grupos. Os grupos DBP100 e 500 apresentaram maior heterogeneidade de imunorreatividade entre células positivas. Este resultado se confirmou via análise da expressão tecidual do AR, a qual mostrou redução nos grupos tratados em relação ao CN. Assim, o padrão de marcação para AR permaneceu semelhante entre as duas idades e os efeitos da administração perinatal permaneceram após a fase lactacional e não foram potencializados (dias pós-natais 1 e 21).

Bem como observado nos animais DPN1, nos DPN21 as células musculares lisas apresentaram aparente redução na espessura da camada muscular no DBP500 em relação aos demais grupos, o que pode prejudicar a funcionalidade contrátil que desempenha na próstata madura (VILAMAIOR *et al.*, 2005) e reforça as alterações ocasionadas pela alta dosagem de DPB (FOSTER, 2006; JIANG *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2015). Já, as células basais, marcadas positivamente para p63, mantiveram marcação semelhante entre os grupos experimentais DPN21, bem como observado em DPN1, não havendo diferença significativa. Ou seja, o tratamento não alterou o padrão de diferenciação deste tipo celular.

Além da ação indutora dos andrógenos, da expressão de genes e de fatores de transcrição específicos, o brotamento e ramificação dos brotos prostáticos são impulsionados por uma complexa interação entre células epiteliais e mesenquimais, através da secreção de fatores parácrinos e autócrinos (PRINS e PUTZ, 2008). Enquanto muitos sinais secretórios desta interação epitélio-mesênquima têm sido caracterizados, apenas algumas moléculas de sinalização, altamente conservadas, foram descritas como essenciais durante a embriogênese (HOGAN, 1999). Dentre estas moléculas, estão as SonicHedgehog (Shh), as Wnts, as Fgfs e as Bmps, as quais têm como função controlar sutil e detalhadamente o desenvolvimento dos tecidos (RISBRIDGER *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005; PU *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2014). Dentre elas destaca-se a BMP-4, proteína morfogênica amplamente expressa no mesênquima circundante das extremidades dos brotos epiteliais prostáticos, a qual permanece ativa antes e durante o brotamento (PRINS e PUTZ, 2008).

No DPN1 as análises mostraram redução na expressão da proteína BMP-4 entre os grupos DBP500 e CN. No entanto, no DPN21 não houve alteração na expressão tecidual para esta proteína morfogênica. Estes resultados sugerem que o DBP gerou possível atraso no tempo de formação dos botões iniciais que emergem do epitélio do seio urogenital e também na futura diferenciação do epitélio prostático, pois é fator chave para a citodiferenciação. Porém, os níveis da BMP-4 de expressão local no período pós-natal diminuem normalmente, fato que pode justificar a recuperação da expressão desta proteína no DPN21 (RISBRIDGER et al., 2005; PRINS e PUTZ, 2008., OMORI et al., 2014)

Outro aspecto importante, observado nos animais neonatos, é a relação direta entre a expressão das proteínas AR e BMP-4, ambas estão reduzidas, sinalizando que o AR possa regular a expressão da BMP-4 nas células mesenquimais através da regularidade de expressão destes receptores, indicando que a BMP-4 é alterada por fatores hormonais (PU et al., 2007; OMORI et al., 2014).

Risbridger *et al.* (2005), utilizaram camundongos nocaute para o receptor de BMP em células epiteliais prostáticas e avaliaram aspectos importantes do desenvolvimento da próstata relacionado com o surgimento de doenças na próstata adulta. Demonstraram que houve aumento no volume e comprimento da próstata ventral no mutante BMP-4 na idade adulta, revelando a natureza permanente dos efeitos da BMP-4 no desenvolvimento da próstata, mostrando que alterações precoces (vida intra-uterina) podem estar relacionadas com doenças do envelhecimento.

Visto o exposto, pode-se considerar que houve uma importante interferência do DBP, em ambas as doses, na morfogênese da próstata de ratos expostos nos períodos gestacional e lactacional, alterando a produção hormonal e importantes proteínas regulatórias responsáveis pela modulação dos processos do desenvolvimento prostático, fato que levou ao atraso na diferenciação da glândula em sua fase jovem. Além de ressaltar que a dosagem de 500mg/kg promoveu maiores efeitos deletérios nos parâmetros avaliados.

Referências Bibliográficas

- Adibi JJ, Hauser R, Williams PL, Whyatt RM, Calafat AM, Nelson H, Herrick R, Swan SH. 2009. Maternal urinary metabolites of Di-(2-Ethylhexyl) phthalate in relation to the timing of labor in a US multicenter pregnancy cohort study. *Am J Epidemiol.* 15;169(8):1015-24.
- Aydoğan Ahabab M1, Barlas N. 2013. Developmental effects of prenatal di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate exposure on reproductive tract of male rats: Postnatal outcomes. *Food Chem Toxicol.* 51:123-36.
- Bello UM, Madekurozwa MC, Groenewald HB, Aire TA, Arukwe A. 2014. The effects on steroidogenesis and histopathology of adult male Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) testis following pre-pubertal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 166:24-33.
- Bischoff A, Levitt MA, Peña A. 2013. Update on the management of anorectal malformations. *Pediatr Surg Int.*29(9):899-904.
- Blount BC, Milgram KE, Silva MK, Malek NA, Reidy JA, Needham LL. 2000. Quantitative detection eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 72:4127-4134.
- Boberg J, Johansson HK, Hadrup N, Dreisig K, Berthelsen L, Almstrup K, Vinggaard AM, Hass U. 2015. Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative lesions in rat prostate. *Prostate* 75(2):126-40.
- Bustamante-Montes LP, Hernández-Valero MA, Flores-Pimentel D, García-Fábila M, Amaya-Chávez A, Barr DB, Borja-Aburto VH. 2013. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns *J Dev Orig Health Dis.* 4(4):300-6.
- Carruthers CM, Foster PMD. 2005. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. *Birth Defects Res,* 74: 277-285.
- Carvalho HF, Line SRP. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int.* 20, 809-819.
- Chang JW, Yan BR, Chang MH, Tseng SH, Kao YM, Chen JC, Lee CC. 2014. Cumulative risk assessment for plasticizer-contaminated food using the hazard index approach. *Environ. Pollut.* 189:77-84.
- Cooke OS, Young P, Cunha GR. 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 128, 2867–2873.
- Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour A, Boutin EL, Foster BA. 1995. Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *Journal of Andrology.*13, 465-475.
- Foster, PMD. 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Intern. J. Androl.* 29:140-147.
- Fisher JS, Macpherson S, Marchetti, N, Sharpe RM. 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod.* 18(7):1383-94.
- George FW1, Peterson KG. 1988. 5 alpha-dihydrotestosterone formation is necessary for embryogenesis of the rat prostate. *Endocrinology.* 122(3):1159-64.
- Hogan BLM. 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Gen Dev ;* 6:432– 438.

- Howdeshell KL, Rider CV, Wilson VS, Gray LE Jr. 2008. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res.* 108(2):168-76.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 2005. The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression in the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol*; 278:396-414.
- Jarfelt K, Dalgaard M, Hass U, Borch J, Jacobsen H, Ladefoged O. 2005. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol.* 19(4): 505-15
- Jiang JT, Sun WL, Jing YF, Liu SB, Ma Z, Hong Y, Ma L, Qin C, Liu Q, Stratton HJ, Xia SJ. 2011. Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate induces anorectal malformations in male rat offspring. *Toxicology* 18:322-326.
- Jiang J, Ma L, Yuan L, Wang X, Zhang W. 2007. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* 11;232(3):286-93.
- Jornet-Martínez N, Antón-Soriano C, Campíns-Falcó P. 2000. Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method. *Sci Total Environ.* 532:239-244.
- Kim HS, Kim TS, Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim IY, Oh JY, Han SY. 2004. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health A* 67(23-24):2045-60.
- Kohn MC, Parham F, Masten, AS, Portier CJ, Shelby MD, Brock JW, Needham LL. 2000. Human exposure estimates for phthalates. *Environ Health Perspect*, 108: 440-442.
- Korenbrodt, CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod*, 17:298-303.
- Liang P, Zhang L, Peng L, Li Q, Zhao E. 2010. Determination of phthalate esters in soil samples by microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:147-151.
- Liu H, Liang H, Liang Y, Zang D, Wang C, Cai H, Shvartsev SL. 2010. Distribution of phthalate esters in alluvial sediment: A case study at Jiang Han Plain, Central China. *Chemosphere* 78:382-388.
- Lopes ES, Foster BA, Donjacour AA, Cunha GR. 1996. Initiation of secretory activity of rat prostatic epithelium in organ culture. *Endocrinology* 137, 4225-4234.
- Maff. 1996. Phthalate in Food. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), Food Surveillance Information Sheet No 82, UK.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253, 165-174.
- Martino-Andrade AJ1, Chahoud I. 2010. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res.* 54(1):148-57.
- Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM. 2002. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol.* 16(1):19-28.

- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD. 2000 Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats exposed to Di(n-butyl) Phthalate during late gestation. *Toxicological Sciences* 55, 143-151.
- Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PM. 1999. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;156(2):81-95.
- Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci.* 43(1):47-60.
- Omori A, Miyagawa S, Ogino Y, Harada M, Ishii K, Sugimura Y, Ogino H, Nakagata N, Yamada G. 2014. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development. *Endocrinology.* 155(7):2534-44.
- Peehl DM. 2005. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 12(1):19-47.
- Peixoto AR, Santos TM, Brandt JZ, Delella FK, Gonçalves BF, Campos SG, Taboga SR, Favaro WJ, Domeniconi RF, Scarano WR. 2015. 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. *Environ Toxicol.* DOI: 10.1002.
- Prins GS, Putz O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation;* 76(6): 641–659.
- Prins GS, Woodham C, Lepinske M, Birch L. 1993. Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology.* 132 (6):2387-98.
- Pu Y, Huang L, Birch L, Prins GS. 2007. Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology;* 148:1697–1706.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res* 322: 173–181.
- Rogan, WJ. 1996. Pollutants in breast milk. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 150(9):981-90.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Felisbino SL, Campos SG, Taboga SR, Kempinas WG. 2010. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A* 73(13-14):972-84.
- Santos FCA, Leite RP, Custódio, AMG, Carvalho KP, MonteiroLeal LH, Santos AB, Goes RM, Carvalho HF, Taboga, SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol. Reprod.* 75, 370–379.
- Su PH, Chang CK, Lin CY, Chen HY, Liao PC, Hsiung CA, Chiang HC, Wang SL. 2015. Prenatal exposure to phthalate ester and pubertal development in a birth cohort in central Taiwan: a 12-year follow-up study. *Environ Res.* 136:324-30.
- Takeda H, Mizuno T, Lasnitzki I. 2013. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus

and postnatal prostate. *J. Endocrinol.* 104, 87-92.

- Taplin, M.E; Ho, S. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 3467-3477, 2001.
- Timms TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, 134, 1039-1045.
- Timms TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, 134, 1039-1045.
- Veeramachaneni DN, Klinefelter GR. 2014. Phthalate-induced pathology in the foetal testis involves more than decreased testosterone production. *Reproduction* 2;147(4):435-42.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol. Int.* 29, 809-816.
- Wang WX, Zhang YL, Wang SL, Fan CQ, Xu H. 2012. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. *Environ Monit Assess* 184:6789-6798.
- US Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009 Washington DC.
- Wittassek M, Koch HM, Angerer J, Bruning T. 2011. Assessing exposure to phthalates- the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 7-31.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Dados quantitativos dos grupos experimentais no DPN1.

<u>Parâmetros</u>	<u>Grupos Experimentais</u>		
	CN	DBP100	DBP500
Peso corpóreo (g)	7,46±0,27	6,71±0,23	6,75±0,25
Distância Anogenital (mm)	4,12±0,11	3,35±0,21*	2,98±0,17*

Dados expressos pela Média ± Erro Padrão da Média. *p<0,05.

Tabela 2 – Dados quantitativos dos grupos experimentais no DPN21.

<u>Parâmetros</u>	<u>Grupos Experimentais</u>		
	CN	DBP100	DBP500
Peso Corpóreo (g)	45,13±2,32	48,40±3,93	47,61±2,11
Peso da Próstata Ventral (g)	0,033±0,0034	0,035±0,00368	0,034±0,0018
Peso do Testículo Direito (g)	0,145±0,0044	0,175±0,0118	0,154±0,0067

Dados expressos pela Média ± Erro Padrão da Média. p<0,05.

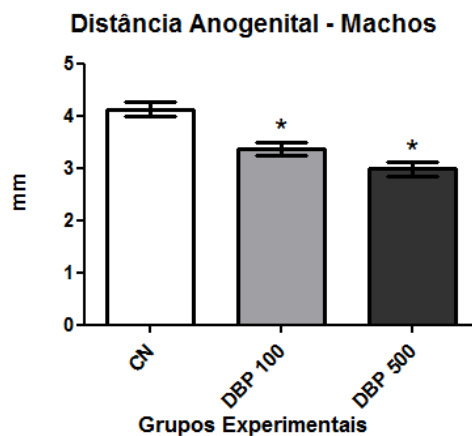


Figura 2: Média \pm EPM da distância anogenital dos animais no DPN1. O asterisco representa a diferença estatística em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

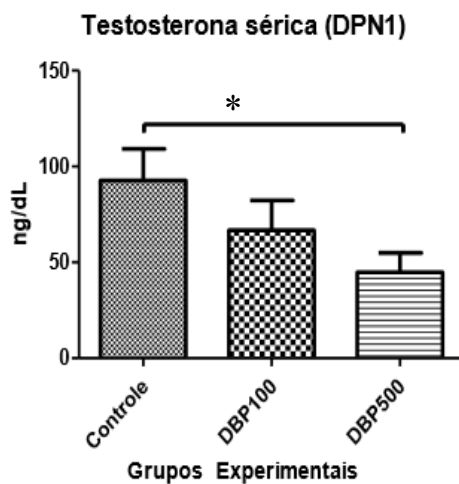


Figura 3: Dosagem sérica de testosterona nos animais no DPN1 nos diferentes grupos experimentais. $p < 0,05$.

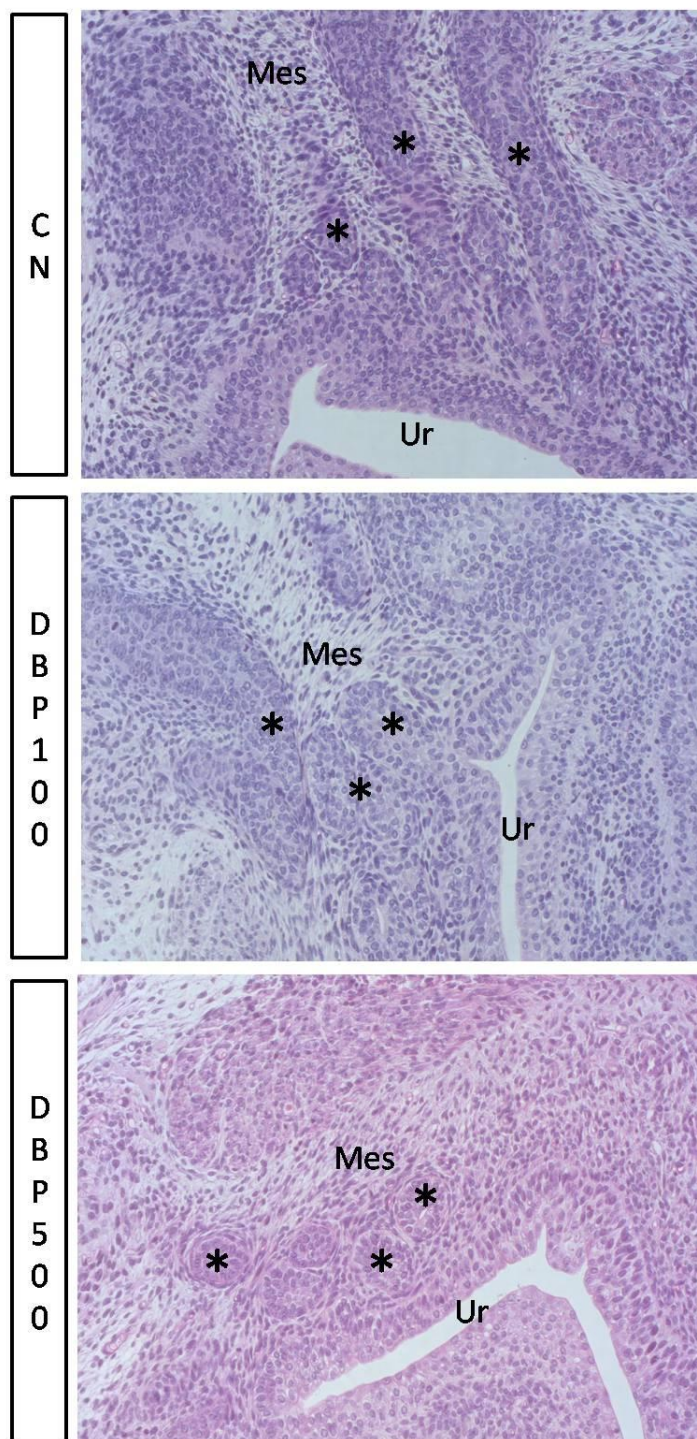


Figura 4: Cortes histológicas da parte pélvica da uretra de animais dos grupos experimentais no DPN1 após coloração de Hematoxilina-Eosina. Asterisco = brotos prostáticos; Ur: uretra, Mes: mesênquima. Aumento: 200x.

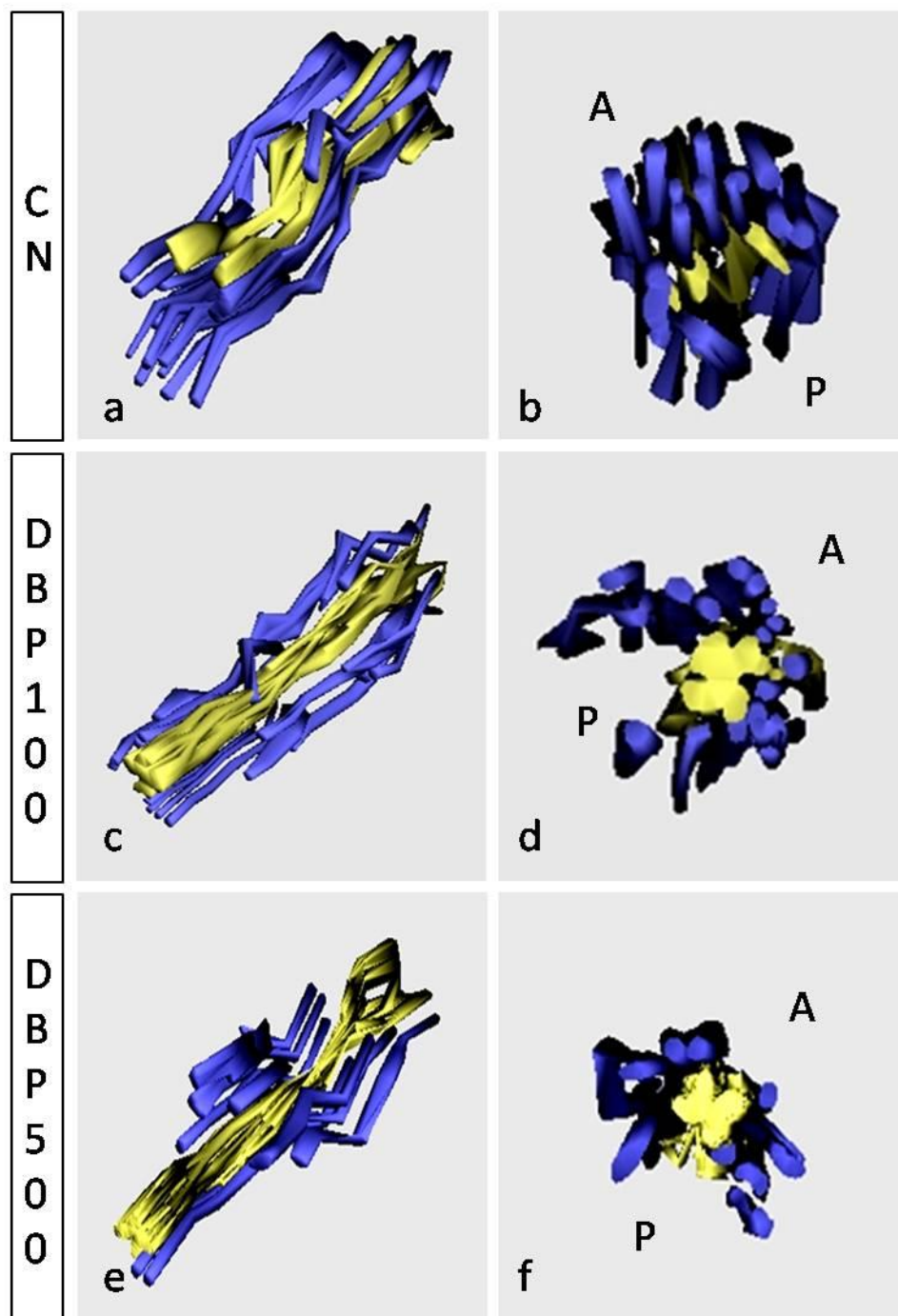


Figura 5: Figura representativa da reconstrução tridimensional dos brotos prostáticos e da parte pélvica da uretra em ratos machos no DPN1 dos grupos CN (Figs. a e b), DBP100 (Figs. c e d) e DBP500 (Figs. e e f). Os brotos prostáticos (azul) aparecem ao redor da parte pélvica da uretra (amarelo). As figuras b, d e f representam a visão transversal da imagem gerada, onde foi sinalizado o eixo ântero-posterior (A e P). As imagens foram reconstruídas a partir de secções histológicas seriadas da parte pélvica da uretra (cortes de 5 μ m) obtidos de três animais de cada grupo experimental.

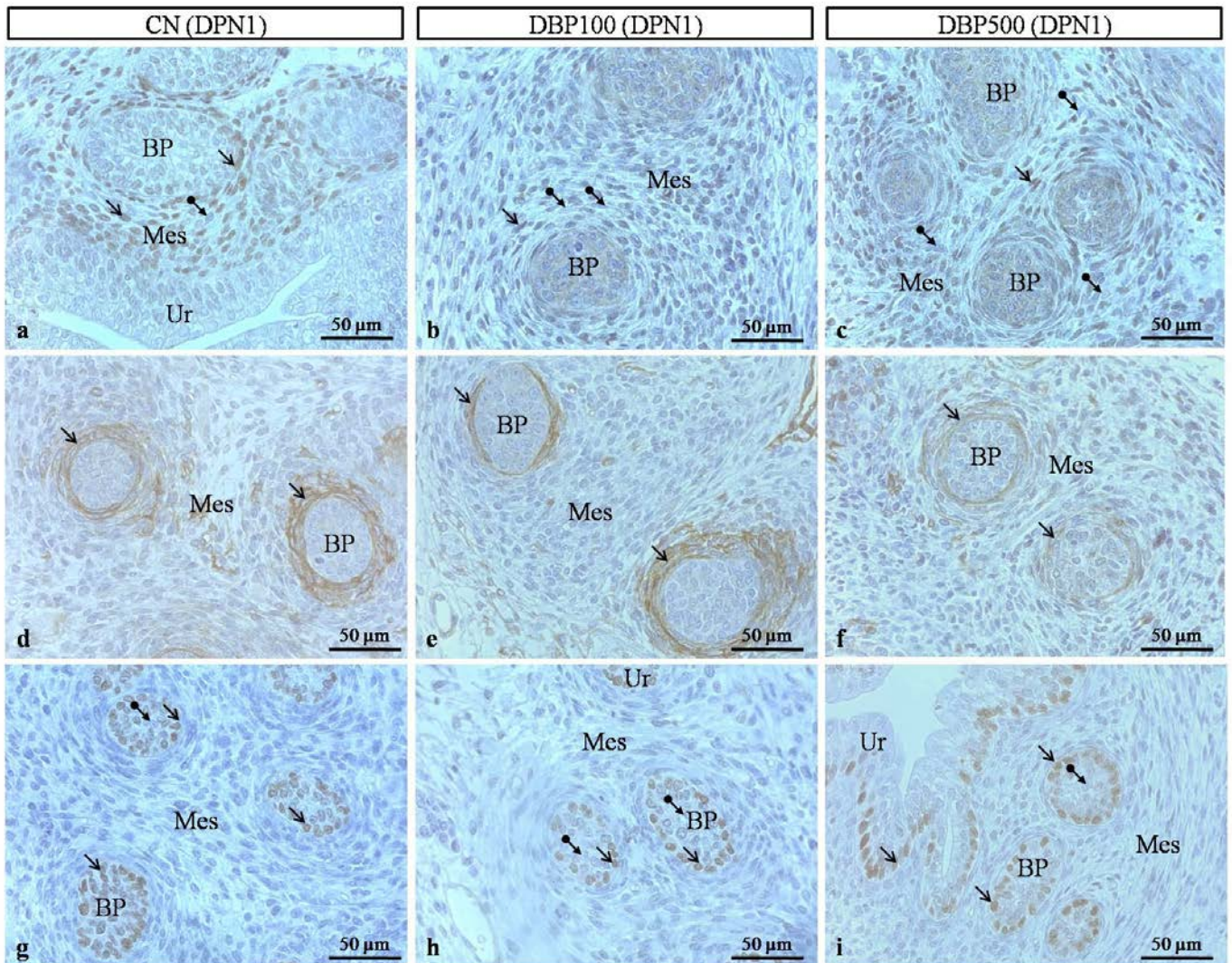


Figura 6: Cortes histológicos parte pélvica da uretra de animais dos grupos experimentais no DPN1 submetidos às reações imunohistoquímicas para o **AR**- Receptor de Andrógeno (figuras a-c), para a **α -Actina** (figuras d-f) e para o antígeno **P63** (figuras g-i). A coloração castanha indica imunorreatividade positiva (seta) para os antígenos correspondentes. As setas com um círculo na extremidade apontam para estruturas com imunorreatividade fraca ou negativa. **Abreviações:** Broto Prostático (**BP**); Mesênquima (**Mes**); Uretra (**Ur**).

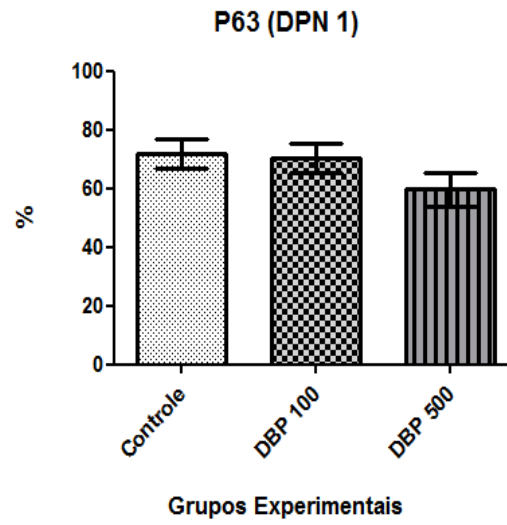


Figura 7: Gráfico dos índices de células basais positivas para a P63 nos três grupos.

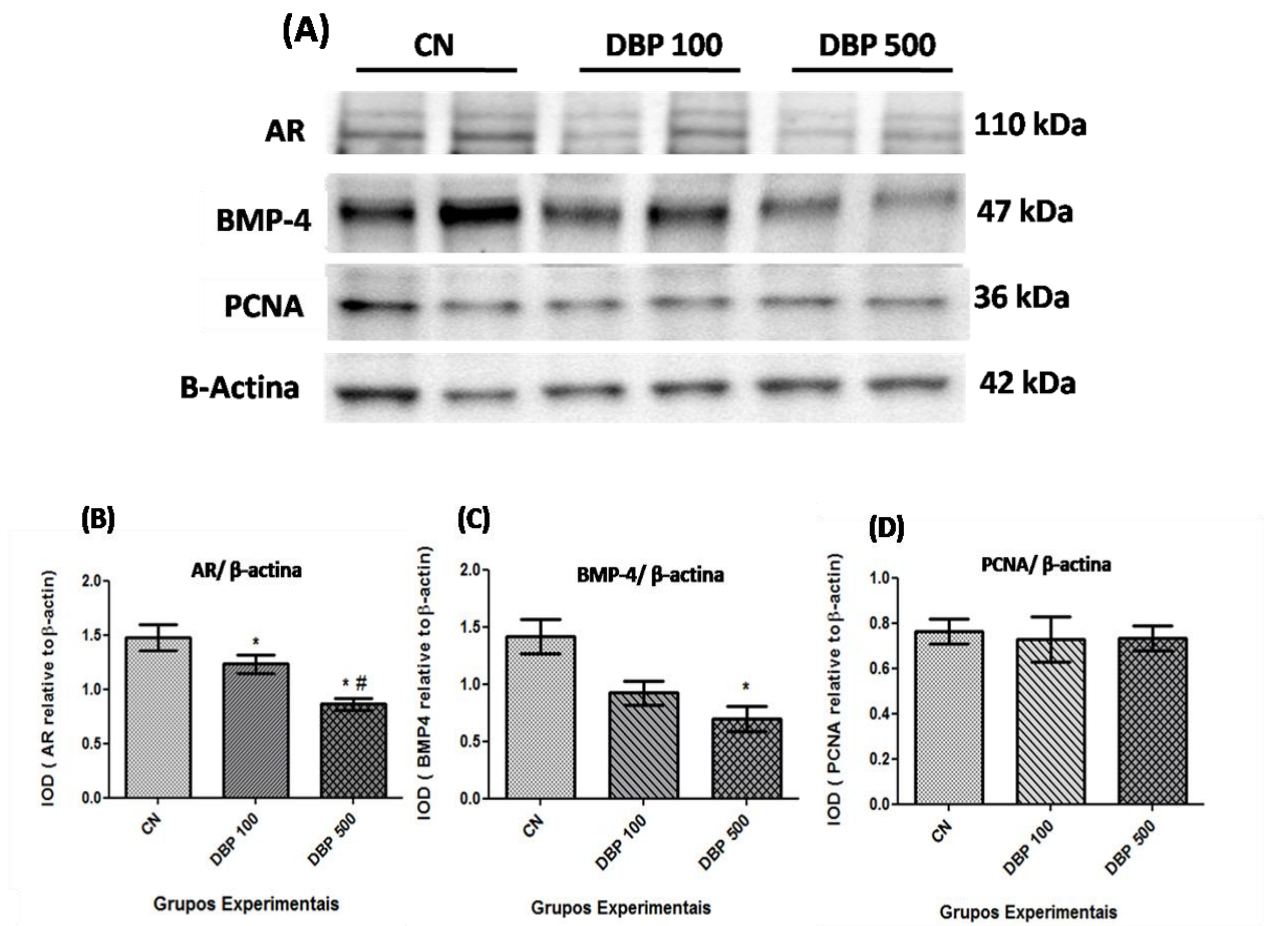


Figura 8: Análise dos níveis proteicos de AR, BMP-4, PCNA no DPN1 (A). Níveis proteicos das amostras da parte pélvica da uretra, cada banda representa *pool* de 5 animais. Os gráficos representam a expressão relativa da densidade óptica integrada para as proteínas AR (B), BMP-4 (C), PCNA (D) normalizadas pela β -actina e expressa pela média \pm EPM. Os asterisco representam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo Controle e o # a diferença estatística entre grupos tratados DBP 100 vs DBP 500 ($p < 0,05$).

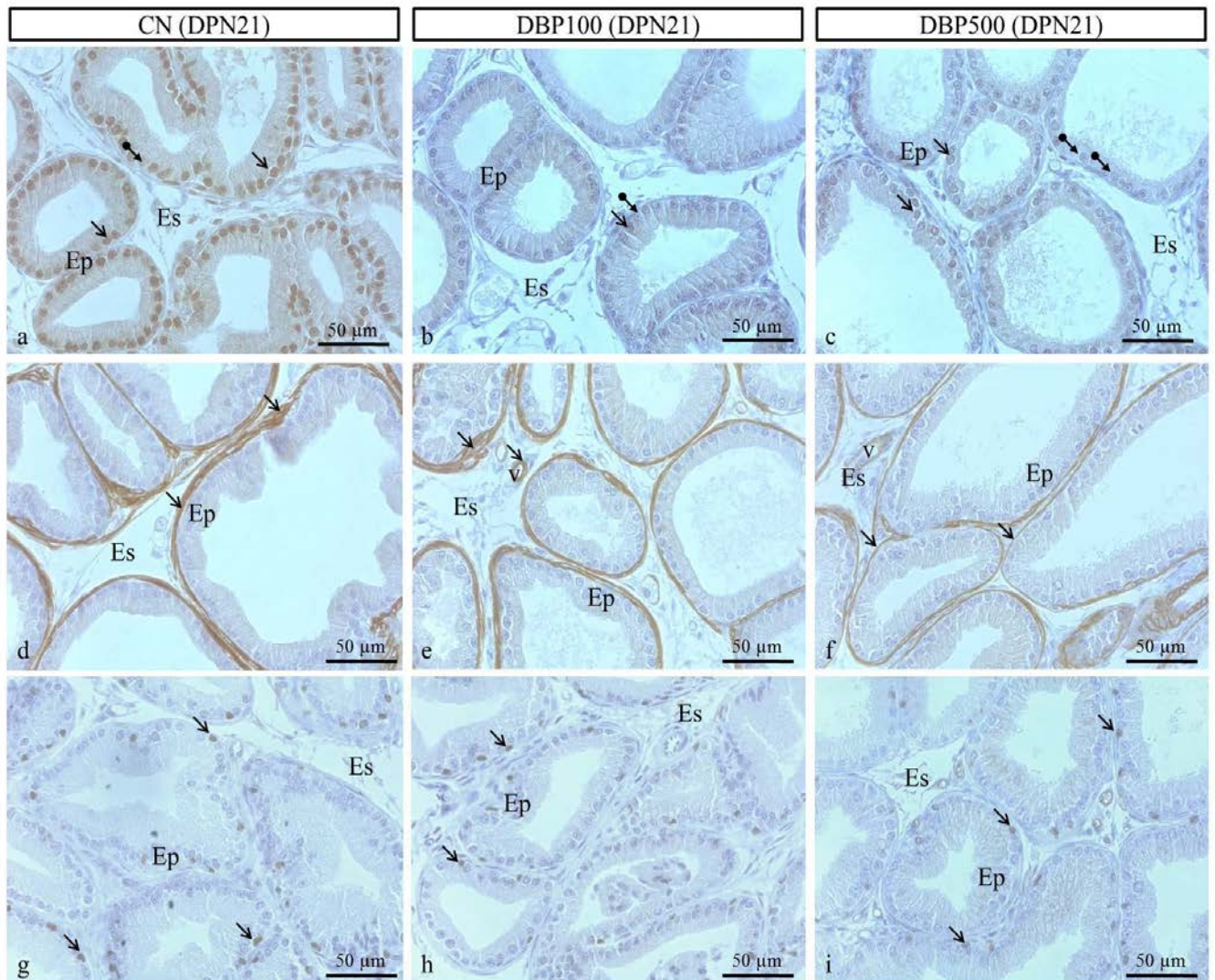


Figura 9: Cortes histológicas da próstata ventral de animais dos grupos experimentais no DPN21 submetidos às reações imunohistoquímicas para o **AR**- Receptor de Andrógeno (figuras a-c), para a **α -Actina** (figuras d-f) e para o antígeno **P63** (figuras g-i). A coloração castanha indica imunorreatividade positiva (seta) para os antígenos correspondentes. As setas com um círculo na extremidade apontam para estruturas com imunorreatividade fraca ou negativa. **Abreviações:** Epitélíio Prostático (**Ep**); Estroma Fibromuscular (**Es**); Vaso sanguíneo (**v**).

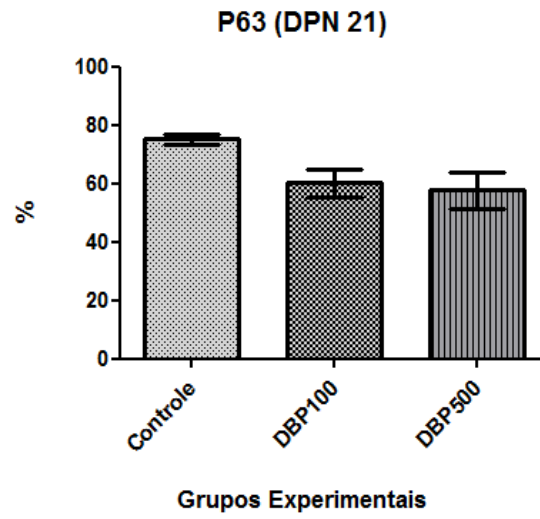


Figura 10: Gráfico dos índices de células basais positivas para a P63 nos três grupos.

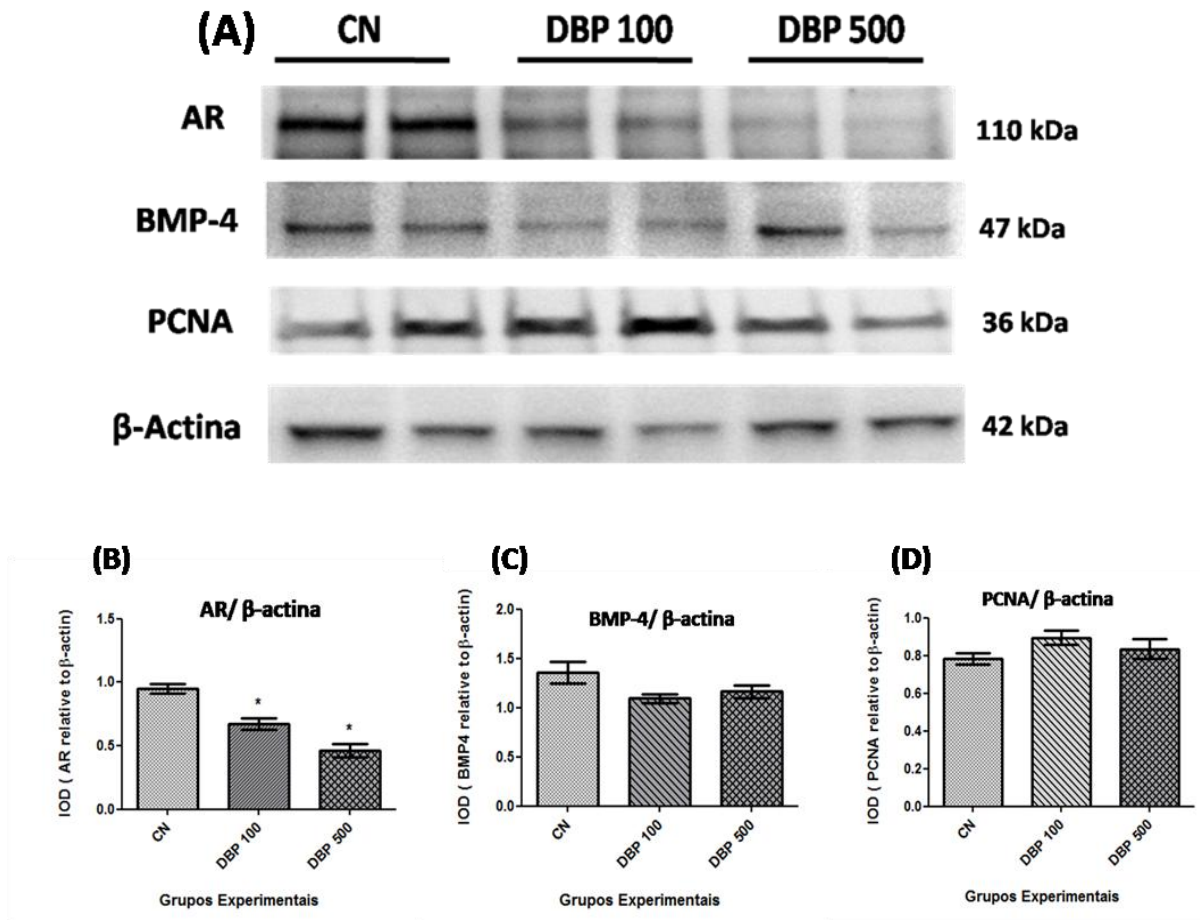


Figura 11: Análise dos níveis proteicos de AR, BMP-4, PCNA (A). Níveis proteicos das amostras da próstata ventral, cada banda representa dois *pools* de 6 animais. Os gráficos representam a expressão relativa da densidade óptica integrada para as proteínas AR (B), BMP-4 (C), PCNA (D) normalizadas pela β -actina e expressa pela média \pm EPM. Os asterisco representam a diferença estatística dos grupos tratados em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO GERAL

O DBP, em ambas as doses, interferiu na morfogênese da próstata de ratos expostos nos períodos gestacional e lactacional, de modo que:

1. Alterou a produção hormonal nos animais expostos durante a gestação;
2. Mostrou a sua capacidade de alterar a expressão de proteínas regulatórias na modulação do desenvolvimento prostático, como o AR e a BMP-4;
3. Mostrou atraso no desenvolvimento e mudança nos padrões de diferenciação da glândula.

REFERÊNCIAS

- 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.* 59:1163-1170, 1998.
- Barlow, N.J.; McIntyre, B.S.; Foster, P.M. Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol.* 32:79-90, 2004.
- Bello, U.M.; Madekurozwa, M.C.; Groenewald, H.B.; Aire, T.A.; Arukwe, A. The effects on steroidogenesis and histopathology of adult male Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) testis following pre-pubertal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 166:24-33, 2014.
- Beverly, B.E.; Lambright, C.S.; Furr, J.R.; Sampson H, Wilson VS, McIntyre BS, Foster PM, Travlos G, Gray LE Jr. Simvastatin and dipentyl phthalate lower ex vivo testicular testosterone production and exhibit additive effects on testicular testosterone and gene expression via distinct mechanistic pathways in the fetal rat. *Toxicol Sci.* 141(2):524-37, 2014.
- Berry, P.A.; Maitland, N.J.; Collins, A.T. Androgen receptor signaling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 288:30-37, 2008.
- Blount, B.C.; Milgram, K.E.; Silva, M.K.; Malek, N.A.; Reidy, J.A.; Needham, L.L. Quantitative detection eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 72:4127-34, 2000.
- Brinkmann, A. O. Molecular mechanisms of androgen action— a historical perspective. *Methods Mol Biol* 776: 3-24, 2011.
- Brown, T.R. Human androgen insensitivity syndrome. *J Androl*; 16:299–303, 1995.
- Bustamante-Montes, L.P.; Hernández-Valero, M.A.; Flores-Pimentel, D.; García-Fábila, M.; Amaya-Chávez, A.; Barr, D.B.; Borja-Aburto, V.H. Prenatal exposure to phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male newborns. *J Dev Orig Health Dis.* 4(4):300-6, 2013.
- Carvalho, H.F.; Line, S.R.P. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int.* 20:809-819, 1996.
- Chang, J.W.; Yan, B.R.; Chang, M.H.; Tseng, S.H.; Kao, Y.M.; Chen, J.C.; Lee, C.C. Cumulative risk assessment for plasticizer-contaminated food using the hazard index approach. *Environ. Pollut.* 189:77-84, 2014.

Charest, N.J.; Zhou, Z.X.; Lubahn, D.B.; Olsen, K.L.; Wilson, E.M.; French, F.S. A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Mol Endocrinol.*, 5(4):573-81, 1991.

Cooke, P.S.; Young, P.; Cunha, G.R. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*, 128:2867–73, 1991.

Cunha, G.R.; Alarid, E.T.; Turner, T.; Donjacour, A.; Boutin, E.L.; Foster, B.A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *Journal of Andrology*. 13, 465-75, 1995.

Dart, D.A.; Waxman, J.; Aboagye, E.O.; Bevan, C.L. Visualising androgen receptor activity in male and female mice. *PLoS One*, 7:8(8), 2013.

De Marzo, A.M.; Nakai, Y.; Nelson, W.G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol.*, 25(5):398-400, 2007.

Debes, J.D.; Tindall, D.J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 187:1-7, 2002.

Fisher, J.S.; Macpherson, S.; Marchetti, N.; Sharpe, R.M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod.* 18(7):1383-94, 2003.

Foster, P.M.D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Intern. J. Androl.* 29: 140-47, 2006.

Gaspar, M.L.; Meo, T.; Bourgarel, P.; Guenet, J.L.; Tosi, M. A single base deletion in the Tfm androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs internal translation initiation. *Proc Nat Acad Sci.*; 88(19):8606-10, 1991.

Ge, R.S.; Chen, G.R.; Tanrikut, C.; Hardy, M.P. Phthalate ester toxicity in Leydig cells: developmental timing and dosage considerations. *Reprod Toxicol.* 23(3):366-73, 2007.

Hauser, R.; Calafat, A.M. Phthalates and human health. *Occup. Environ. Med.*, 62:806–81, 2005.

Hayward, S.W.; Rosen, M.A.; Cunha, G.R. Stromal–epithelial inter-actions in normal and neoplastic prostate. *Br. J. Urol.* 18–26, 1997.

Hsing, A.W.; Reichardt, J.K.V.; Stanczyk, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate*, 52:213-235, 2002.

Hogan, B.L.M. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Gen Dev*, 6:432–438, 1996.

Hogan, B.L.M. Morphogenesis. *Cell* 96:225–233, 1999.

Howdeshell, K.L.; Rider, C.V.; Wilson, V.S.; Gray, L.E. Jr. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats. *Environ Res.* 108(2):168-76, 2008.

Huang, L.; Pu, Y.; Alam, S.; Birch, L.; Prins, G.S. The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression in the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol*; 278:396–414, 2005.

Imamov, O.; Morani, A.; Shin, G-J.; Omoto, Y.; Thulin-Andersson, C.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(25): 9375-9380, 2004.

Jiang, J.T.; Sun, W.L.; Jing, Y.F.; Liu, S.B.; Ma, Z.; Hong, Y.; Ma, L.; Qin, C.; Liu, Q.; Stratton, H.J.; Xia, S.J. Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate induces anorectal malformations in male rat offspring. *Toxicology* 18:322-326, 2011.

Jiang, J.; Ma, L.; Yuan, L.; Wang, X.; Zhang, W. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* 11;232(3):286-93, 2007.

Jornet-Martínez, N.; Antón-Soriano, C.; Campíns-Falcó, P. Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method. *Sci Total Environ.* 532:239-244, 2015.

Karr, J.F.; Kantor, J.A.; Hand, P.H.; Eggenesperger, D.L.; Scholm, J. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.* 55, 2455-2462, 1995.

Kim, T.S.; Jung, K.K.; Kim, S.S.; Kang, I.H.; Baek, J.H.; Nam, H.S.; Hong, S.K.; Lee, B.M.; Hong, J.T.; Oh, K.W.; Kim, H.S.; Han, S.Y.; Kang, T.S. Effects of in utero exposure to di(n-butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in sprague-dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 73:1544–1559, 2010.

Kim, H.S.; Kim, T.S.; Shin, J.H.; Moon, H.J.; Kang, I.H.; Kim, I.Y.; Oh, J.Y.; Han, S.Y. Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health A* 67(23-24):2045-60, 2004.

Kinbara, H.; Cunha, G.R. Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. *Prostate* 28:58–64, 1995.

Kohn, M.C.; Parham, F.; Masten, S. A., Portier, C. J.; Shelby, M. D.; Brock, J.W.; Needham, L.L. Human exposure estimates for phthalates. *Environ Health Perspect*, 108:440-442, 2000.

Lamm, M.L.; Podlasek, C.A.; Barnett, D.H.; Lee, J.; Clemens, J.Q.; Hebner, C.M.; Bushman, W. Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. *Dev Biol*; 232:301-14, 2001.

- Lehmann, K.P.; Phillips S.; Sar, M.; Foster, P. M. D.; Gaido, K. W. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di-n-butyl-phthalate. *Toxicol Sci*, 81: 60-68, 2004.
- Liang, P.; Zhang, L.; Peng, L.; Li, Q.; Zhao, E. Determination of phthalate esters in soil samples by microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:147-151, 2010.
- Liu, H.; Liang, H.; Liang, Y.; Zang, D.; Wang, C.; Cai, H.; Shvartsev, S.L. Distribution of phthalate esters in alluvial sediment: A case study at Jiang Han Plain, Central China. *Chemosphere* 78:382-388, 2010.
- Lopes, E.S.; Foster, B.A.; Donjacour, A.A.; Cunha, G.R. Initiation of secretory activity of rat prostatic epithelium in organ culture. *Endocrinology* 137:4225-4234, 1996.
- Maff. Phthalate in Food. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), Food Surveillance Information Sheet No 82, UK, 1996.
- Marker, P.C.; Donjacour, A.A.; Dahiya, R.; Cunha, G.R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253:165-174, 2003.
- Martino-Andrade AJ1, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res.* 54(1):148-57, 2010.
- Mc Neal. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr. Urol.* 4:3-37, 1983.
- Mylchreest, E.; Sar, M.; Wallace, D.G.; Foster, P.M.. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol.* 16(1):19-28, 2002.
- Mylchreest, E.; Wallace, D.G.; Cattley, R. C.; Foster, P.M.D. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats exposed to Di(n-butyl) Phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 55:143-151, 2000.
- Nemeth, J.A.; Lee, C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* 28:124-128, 1996.
- Omori, A.; Miyagawa, S.; Ogino, Y.; Harada, M.; Ishii, K.; Sugimura, Y.; Ogino, H.; Nakagata, N.; Yamada, G. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development. *Endocrinology.* 155(7):2534-44, 2014.
- Pant, N.; Kumar, G.; Upadhyay, A.D.; Patel, D.K.; Gupta, Y.K.; Chaturvedi, P.K. Reproductive toxicity of lead, cadmium, and phthalate exposure in men. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21(18):11066-74, 2014.

Peehl, D.M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*. 12(1):19-47, 2005.

Peixoto, A.R.; Santos, T.M.; Brandt, J.Z.; Delella, F.K.; Gonçalves, B.F.; Campos, S.G.; Taboga, S.R.; Favaro, W.J.; Domeniconi, R.F.; 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. *Environ Toxicol*. 2015. DOI: 10.1002.

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

Prins, G.S.; Putz, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, 76(6):641–659, 2008.

Prins, G.S.; Huang, L.; Birch, L.; Pu, Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann NY Acad Sci*; 1089:1–13, 2006.

Prins, G.S.; Birch, L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to oestrogen. *Endocrinology*; 136, 1303-14, 1995.

Prins, G.S.; Woodham, C.; Lepinske, M.; Birch, L. Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology*; 132(6):2387-98, 1993.

Pu, Y.; Huang, L.; Birch, L.; Prins, G.S. Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology*; 148:1697–1706, 2007.

Pu, Y.; Huang, L.; Prins, G.S. Sonic hedgehog-patchedgli signaling in the developing rat prostate gland: lobespecific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol*; 273:257–75, 2004.

Risbridger, G.P.; Almahbobi, G.A.; Taylor, R.A. Early prostate development and its association with late-lifeprostate disease. *Cell Tissue Res* 322: 173–181, 2005.

Rogan, W.J. Pollutants in breast milk. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 150(9):981-90, 1996.

Roy-Burman, P.; Wu, H.; Powell, W.C.; Hagenkord, J.; Cohen M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrinol. Relat. Cancer* 11, 225-254, 2004.

Scarano, W.R.; Toledo, F.C.; Guerra, M.T.; Pinheiro, P.F.; Domeniconi, R.F.; Felisbino, S.L.; Campos, S.G.; Taboga, S.R.; Kempinas, W.G. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A* 73(13-14):972-84, 2010.

- Schettler, T. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int. J. Androl.*, 29:181–185, 2006.
- Shirai, T.; Takahashi, S.; Cui, L.; Futakuchi, M.; Kato K, Tamano S, Imaida K. Experimental prostate carcinogenesis - rodent models. *Mutat Res.* 462(2-3):219-26. 2000.
- Specht, I.O.; Toft, G.; Hougaard, K.S.; Lindh, C.H.; Lenters, V.; Jönsson, B.A.; Heederik, D.; Giwercman, A.; Bonde, J.P. Associations between serum phthalates and biomarkers of reproductive function in 589 adult men. *Environ Int.* 66:146-56, 2014.
- Su, P.H.; Chang, C.K.; Lin, C.Y.; Chen, H.Y.; Liao, P.C.; Hsiung, C.A.; Chiang, H.C.; Wang, S.L. Prenatal exposure to phthalate ester and pubertal development in a birth cohort in central Taiwan: a 12-year follow-up study. *Environ Res.* 136:324-30, 2015.
- Takeda, H.; Nakamoto, T.; Kokontis, J.; Chodak, G.W.; Chang, C. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Prostate.* 177(1):488-96, 2013.
- Takeda, H.; Mizuno, T.; Lasnitzki, I. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. *J. Endocrinol.* 104:87-92, 1986.
- Taplin, M.E.; Ho, S. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:67-3477, 2001.
- Timms, T.L.; Truong, L.D.; Merz, V.W.; Krebs, T.; Kadmon, D.; Flanders, K.C.; Park, S.H.; Thompson, T.C. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, 134:1039-1045, 1994.
- Tuxhorn, J.A.; Ayala, G.E.; Rowley, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 166(6):2472-83, 2001.
- Untergasser, G.; Madersbacher, S.; Berger, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.* 40(3):121-8, 2005.
- US Environmental Protection Agency (EPA). Guidelines for reproductivetoxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009 Washington DC, 1996.
- Ventrice, P.; Ventrice, D.; Russo, E.; De Sarro, G. Phthalates European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 36:88–96, 2013.
- Vilamaior, P.S.; 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.* 29:809-816, 2005.
- Wang, W.X.; Zhang, Y.L.; Wang, S.L.; Fan, C.Q.; Xu, H. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. *Environ Monit Assess* 184:6789-98, 2012.

Welsh, M.; Saunders, P.T.; Fiskens, M.; Scott, H.M.; Hutchison, G.R.; Smith, L.B.; Sharpe, R.M. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118:1479-90, 2008.

Welsh, M.; Saunders, P.T.; Sharpe, R.M. The critical time window for androgen-dependent development of the Wolffian duct in the rat. *Endocrinology* 148:3185-95, 2007.

Wine, R.N.; Li, L.H.; Barnes, L.H.; Gulati, D.K.; Chapin, R.E. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect.* 105(1):102-7, 1997.

Wittassek, M.; Koch, H.M.; Angerer, J.; Bruning, T. Assessing exposure to phthalates-the human biomonitoring approach. *Mol. Nutr. Food Res.* 55:7-31, 2011.

Wozney, J. M; Rosen, V; Celeste, A. J; Mitsock, L. M; Whitters, M. J; Kriz, R. W; Hewick, R. M; and Wang, E. A. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34, 1988.

Xie, C.; Zhao, Y.; Gao, L.; Chen, J.; Cai, D.; Zhang, Y. Elevated phthalates' exposure in children with constitutional delay of growth and puberty. *Mol Cell Endocrinol.* 15;407:67-73, 2015.

Zhang, Y., Jiang, X., Chen, B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOEL. *Reprod Toxicol*, 18:669-76; 2004.

Zurmühl, T. Development of a method for the determination of phthalate esters in sewage sludge including chromatographic separation from polychlorinated biphenyls, pesticides and polyaromatic hydrocarbons. *Analyst* 115:1171-75, 1990.