



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

Carolina Marques Bedolo

**Exposição da próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a doses ambientais de Bisfenol A e 17 $\beta$  estradiol.**

São José do Rio Preto  
2020

Carolina Marques Bedolo

**Exposição da próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a doses ambientais de Bisfenol A e 17 $\beta$  estradiol.**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga  
Coorientador<sup>a</sup>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Gisele Pegorin de Campos

São José do Rio Preto  
2020

B412e Bedolo, Carolina Marques  
Exposição da próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a doses ambientais de bisfenol A e 17beta estradiol / Carolina Marques Bedolo. -- São José do Rio Preto, 2020  
58 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Sebastião Roberto Taboga  
Coorientadora: Silvana Gisele Pegorin de Campos

1. Gerbilo da Mongólia. 2. Próstata feminina. 3. Bisfenol A. 4. 17beta estradiol. 5. Disruptores endócrinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Carolina Marques Bedolo

**Exposição da próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a doses ambientais de Bisfenol A e 17 $\beta$  estradiol.**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Claudia Polli Lopes  
Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) – Dep. De Biologia Molecular - São José do Rio Preto, SP.

Prof. Dr. Rodrigo Zieri  
Instituto Federal de São Paulo (IFSP) – Barretos, SP.

São José do Rio Preto  
4 de março de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

À minha filha Elis pela compreensão nos momentos de ausência e pela ajuda nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais João Luiz e Maria Aparecida pelo apoio e confiança nesse novo momento da minha vida.

À minha irmã Cecília que mesmo sem entender sobre o assunto, foi a escuta.

Ao meu orientador prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela confiança, pelos ensinamentos, pelo incentivo e principalmente pela oportunidade no ingresso da carreira acadêmica.

À minha co-orientadora profa Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos pelos ensinamentos, pela paciência e pela amizade.

À minha amiga Ellen pelos ensinamentos, pela paciência, pela oportunidade de fazer parte de seu projeto e pelo apoio emocional.

Às professoras Patricia Vilamaior e Claudia Bonini pelos ensinamentos e pela paciência durante as disciplinas obrigatórias do programa.

Às professoras Ana Paula Girol e Maria Etelvina Pinto Fochi pela participação na banca examinadora da qualificação.

Aos professores Rodrigo Zieri e Ana Claudia Polli Lopes pela aceitação como membros da banca examinadora.

Aos professores Marília Calmon e Ricardo Alexandre Fochi pela aceitação como suplentes da banca examinadora.

Ao técnico do laboratório Luiz Roberto por tornar a rotina de trabalho menos estressante.

Aos meus amigos Gustavo e Mariele pelo companheirismo durante esses 2 anos de mestrado e pelos ensinamentos, principalmente em informática.

Aos meus amigos Luiz Henrique, Nayara, Fernanda pelos ensinamentos e por tornar esse período mais agradável.

À minha prima Suzi pelo exemplo de perseverança na carreira acadêmica.

À minha psicóloga Juliana Corazza Scalabrin por me trazer a realidade.

Ao Paulo pela correção ortográfica e pelo apoio emocional.

Ao IBILCE/UNESP por proporcionar minha formação e as condições adequadas para que esse trabalho fosse executado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências bem como aos funcionários de Seção de Pós-graduação pelo apoio durante esse período do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A próstata é uma glândula componente do sistema genital dos mamíferos e sua principal função prostática é secretar um fluido levemente alcalino (pH 7,29) que contribui para a formação do líquido seminal. As fêmeas em certas espécies, como o roedor gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), apresentam próstata cuja morfologia se assemelha à porção ventral do complexo prostático masculino e à próstata feminina em humanos. Nas últimas décadas tem sido relatado um constante aumento da exposição a substâncias capazes de interferir na ação hormonal, conhecidas como disruptores endócrinos. O bisfenol A (BPA) pertence a uma das categorias de disruptores endócrinos presentes no meio ambiente. Estudos demonstram que a exposição a esse composto interfere negativamente na morfofisiologia prostática, favorecendo o estabelecimento de lesões pré-malignas e malignas. Além do BPA, uma das constantes problemáticas dos dias atuais é a exposição ambiental a hormônios exógenos como o estradiol (E2). Desta forma, a administração de fármacos com estrutura semelhante a hormônios esteroides pode exercer efeitos sobre a glândula, uma vez que os mesmos se ligam a seus receptores hormonais afetando a homeostasia prostática. O presente estudo teve como objetivo verificar as alterações morfofuncionais na próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia após tratamento perinatal com dose diária ambiental, ou seja, dose ambiental segura de BPA (50 µg/kg) e doses de 17-β estradiol (35 µg/kg), 3 vezes por semana por 38 dias. Foram realizadas análises estereológicas, morfométricas, citoquímicas e imunohistoquímicas. As análises morfológicas demonstraram a presença de alterações como focos inflamatórios associados a células claras e neoplasias intraepiteliais prostáticas (PINs) nos grupos E2, BPA e controle óleo (CO) tratados em relação ao grupo controle água (CA). Nas análises imunohistoquímicas, foram observadas a presença de macrófagos e a imunexpressão de alfa-actina do músculo liso. Além disso, foi observado aumento nos compartimentos lúmen e estroma não muscular do grupo E2 (grupo estradiol) em relação ao grupo BPA e CA. Concluiu-se que os disruptores endócrinos, BPA e E2 interferem na homeostasia prostática em fêmeas, promovendo alterações morfológicas à semelhança do que ocorre em machos. Nosso estudo sugere que a próstata feminina tem relevância clínica e a fêmea do gerbilo é um bom modelo para se avaliar as repercussões morfofisiológicas de disruptores endócrinos sobre essa glândula do trato genital.

**Palavras-chave:** Gerbilo da Mongólia. Bisfenol A. 17β estradiol. Próstata feminina. Disruptores endócrinos.

## ABSTRACT

The prostate gland is a component of mammals genital system and its main function is to secrete a slightly alkaline fluid (pH 7.29) that contributes to the composition of the seminal fluid. Females in certain rodent species, such as the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), have a prostate which morphology resembles the ventral portion of the male prostate complex and the female prostate in humans. In the last decades, there has been a constant increase in the exposure to substances capable of interfering with hormonal action, known as endocrine disruptors. Bisphenol A (BPA) belongs to one of the categories of endocrine disruptors present in the environment. Studies show that exposure to this compound negatively interferes with prostate morphophysiology, favoring the establishment of premalignant and malignant lesions. In addition to BPA, one of the current constant issues is the environmental exposure to exogenous hormones such as estradiol (E2). Thus, the exposure to drugs with a structure similar to steroid hormones can exert effects on the glands, since they bind to their hormone receptors, affecting prostatic homeostasis. The present study aimed to verify the morphofunctional changes in the female Mongolian gerbil prostate after perinatal exposure to daily safe environment doses of BPA (50 µg / kg) and doses of 17-β estradiol (35 µg / kg). Stereological, morphometric, cytochemical and immunohistochemical analysis were performed. Morphological analysis showed presence of alterations such as inflammatory foci associated with clear cells and prostatic intraepithelial neoplasms (PINs) in the E2, BPA and oil control (CO) groups in comparison to the water control group (CA). The immunohistochemical analysis showed presence of macrophages and the immunoexpression of alpha-actin. In addition, the non-muscular stromal compartment and lumen of the E2 group increased in comparison to the BPA and CA groups. In conclusion, the endocrine disruptors BPA and estradiol interfere in prostatic homeostasis in females, leading to morphological changes, similarly to what happens in males. Our study suggests that the female prostate has clinical relevance and the female gerbil is a good model for assessing the morphophysiological repercussions of endocrine disruptors on this genital gland.

**Keywords:** Mongolian gerbil. Bisphenol A. 17β estradiol. Female prostate. Endocrine disruptors.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 4.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 5.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 6.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 7.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 10.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 12.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 15.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 16.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 17.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 2.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 3.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

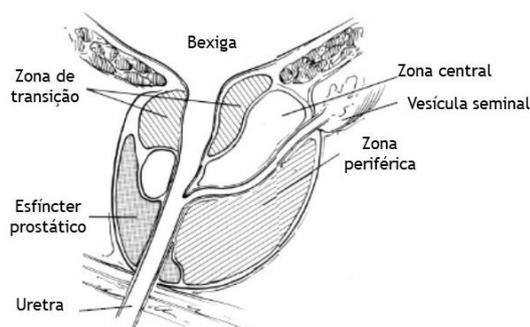
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
 $\alpha$ SMA - alfa actina do músculo liso  
AR - Receptor de andrógeno  
BMP - Proteína Morfogenética Óssea  
BPA - Bisfenol A  
CA - grupo controle água  
CO - grupo controle óleo  
DHEA - Deidroepiandrosterona  
DHT - Diidrotestosterona  
E2 - Estradiol  
EDC - Disruptores endócrinos  
EFSA - *European Food Safety Authority*  
ER $\alpha$  - Receptor de estrógeno  $\alpha$   
ER $\beta$  - Receptor de estrógeno  $\beta$   
FGF - Fator de crescimento de fibroblasto  
HPB - Hiperplasia prostática benigna  
Igf1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
LME - Limite de Migração Específica  
pam - mesênquima parauretral  
pm - mesênquima periuretral  
PIN - Neoplasia intraepitelial prostática  
PSA - Antígeno prostático específico  
Shh - glicoproteína Sonic hedgehog  
UGS - Seio urogenital  
UGE - Seio urogenital epitelial  
UGM - Seio urogenital mesenquimal  
US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*  
TDI – *Tolerable Daily Intake*  
vmp - camada mesenquimal ventral  
Wnt - Via de sinalização wingless/integrated

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Desenvolvimento prostático.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Histofisiologia prostática.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. Disruptores endócrinos.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4. Estrógenos.....</b>	<b>20</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS DA PESQUISA.....</b>	<b>24</b>
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS RESUMIDAS...25</b>	
<b>4.1. Processamento de material biológico.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Técnicas de colorações específicas.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Análises quantitativas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.1. Análises estereológica e morfométrica.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.2. Análise das lesões prostáticas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.4. Análise por incidência de lesão e multiplicidade.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.5. Análise biométrica dos compartimentos prostáticos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. Imunohistoquímica.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.1. Análise imunohistoquímica.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5. Análise estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1.INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula que compõe o sistema genital masculino dos mamíferos sendo a maior glândula sexual acessória. Em homens, seu tamanho e forma são comparados a uma noz. A glândula está localizada na pélvis, abaixo da bexiga, onde circunda a parte prostática da uretra. Apresenta três divisões conhecidas como zonas central, periférica e de transição. A principal função prostática é secretar um fluido levemente alcalino (pH 7,29) que contribui para a formação do líquido seminal (ROSS e PAWLINA, 2011) (Figura 1).



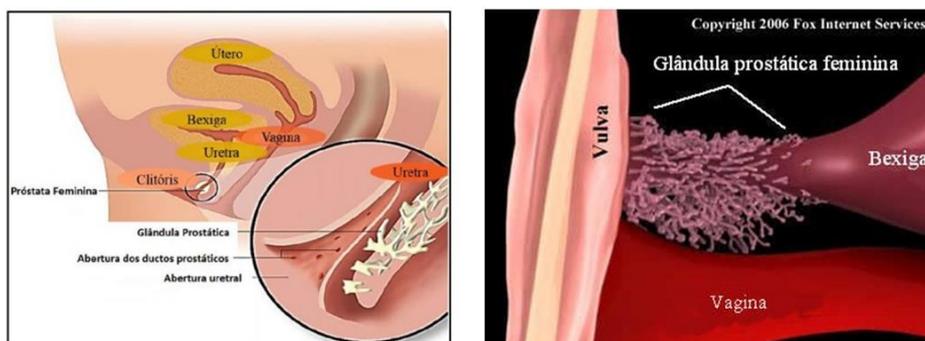
**Figura 1:** Corte sagital da próstata masculina em humanos, dividida em 3 zonas: zona de transição, zona central e zona periférica. Fonte: adaptado de TOIVANEN; SHEN, 2017.

Em certas espécies de mamíferos as fêmeas apresentam próstata, dentre elas, as fêmeas humanas, como descrito por ZAVIVAČIČ et al. (2000). Segundo ZAVIVAČIČ e RABLIN (2000), a próstata em mulheres é conhecida como próstata feminina, pois assim como na próstata masculina, a enzima PSA (antígeno prostático específico) é encontrada no epitélio luminal glandular. Junto ao PSA, o fluido prostático nas fêmeas é composto pela proteína fosfatase ácida específica, frutose e zinco (SANCHES et al., 2019). Ainda, para ZAVIVAČIČ e RABLIN (2000), o termo glândula parauretral de Skene é utilizado incorretamente pois implica num órgão vestigial na mulher. Conseqüentemente, é necessário adaptar um modelo experimental de glândula prostática similar à próstata feminina humana, a fim de extrapolar os dados desta espécie (SANTOS e TABOGA, 2006).

Para tanto, alguns autores adotaram o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental em seus grupos de pesquisa, pois as próstatas das fêmeas desse roedor têm homologia com as próstatas de mulheres e com a porção ventral das próstatas de macho dos gerbilos (TABOGA et al., 2001). Além disso, a

ocorrência de próstata na fêmea desta espécie é muito comum, podendo ser encontrada em 80% das fêmeas adultas estudadas. (SANTOS e TABOGA, 2006).

Como pode ser observado na Figura 2, os ductos prostáticos femininos se abrem na luz uretral para que o líquido prostático seja liberado na parede uretral. O fenômeno é conhecido como ejaculação feminina pois a composição bioquímica do fluído prostático é semelhante ao sêmen dos homens apresentando altas concentrações de fosfatase ácida prostática e antígeno prostático específico (PSA) e, baixo nível de creatinina (MOALEM e REINDERBERG, 2009).



**Figura 2:** Representação da próstata feminina em humanos: localização parauretral da glândula e a presença de ductos prostáticos que se abrem na luz uretral. Fonte: adaptado de [www.newscientist.com](http://www.newscientist.com).

Em estudo realizado através da autópsia da uretra de 31 mulheres, foi constatado, através de análise morfológica, presença da próstata nas regiões distal, mediana e proximal da uretra. Além disso, foi observado aumento de glândulas prostáticas em mulheres pós-menopausa (COSTA, CURY e CUSTÓDIO, 2016)

Apesar do câncer de próstata feminino ser raro, recentemente MUTO et al. (2017) descreveram um caso de adenocarcinoma de glândula de Skene. Neste estudo, o diagnóstico só foi preciso após a reação de imunohistoquímica positiva para fosfatase ácida específica para próstata.

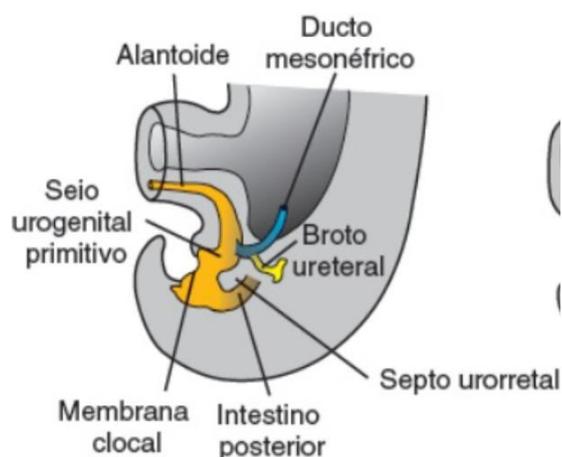
Em fêmeas de gerbilo da Mongólia com 18 meses de idade, ou seja, senis, verificou-se alto índice de lesões, dentre elas hiperplasia, prostatite, lesões pré-neoplásicas como displasia, provavelmente influenciadas pela desregulação do balanço hormonal que ocorre na senilidade. Assim, a próstata em mulheres deveria ser observada como um dos órgãos que compõem o aparelho genital feminino, diante da homologia da próstata de fêmeas de gerbilo com a próstata da mulher (CUSTÓDIO et al., 2010).

Em busca de novas alternativas para complementar o conhecimento vigente sobre a histofisiologia e a patologia prostática, nosso grupo de pesquisa adotou o roedor gerbilo da Mongólia como modelo experimental alternativo para o estudo de patologias

prostáticas por sua similaridade com a glândula humana. Este animal desenvolve uma quantidade expressiva de neoplasia espontânea associada ao envelhecimento e também tumores induzidos, bem como respostas significativas mediante tratamentos hormonais (CAMPOS et al, 2008, 2010, GONÇALVES et al., 2010, 2017).

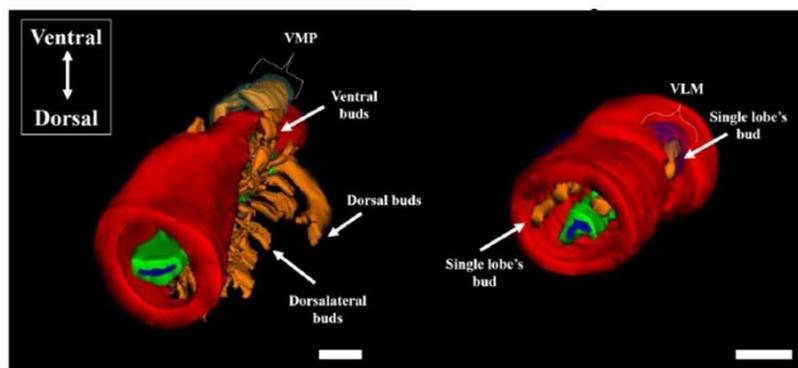
### 1.1. Desenvolvimento prostático

A próstata humana se desenvolve a partir do seio urogenital (UGS) derivado da porção posterior do intestino (Cloaca). A cloaca é dividida pelo septo urorretal em UGS, reto e canal anal (Figura 3). O epitélio do UGS tem origem no folheto endodérmico, formando o seio urogenital epitelial (UGE) e o tecido mesenquimal de origem mesodérmica, forma o seio urogenital mesenquimal (UGM) (SADLER et al., 2016).



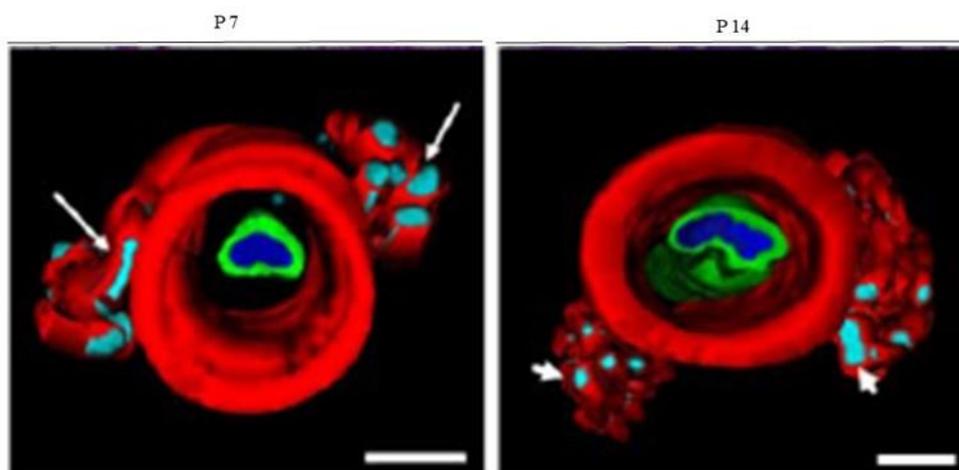
**Figura 3:** Vista lateral. Esquema representativo da origem do seio urogenital primitivo (UGS). Fonte: adaptado de SADLER et al., 2016.

Brotos sólidos do UGE invadem o tecido adjacente (UGM). Três porções distintas são encontradas na UGM (Figura 4): mesênquima periuretral (pm), que se conecta com tecido conjuntivo na uretra adulta; camada adjacente diferencia-se em uma camada de músculo liso e se torna a musculatura da uretra; camada mesenquimal ventral que corresponde ao mesênquima condensado que se encontra na parte ventral do UGE, responsável pela indução da morfogênese ramificada tornando-se o estroma da parte ventral da próstata de machos de gerbilos. (SANCHES et al., 2014).



**Figura 4:** Reconstrução em 3D do complexo prostático de macho e fêmea do gerbilo no primeiro dia pós-natal (P1). Fonte: adaptado de SANCHES et al., 2019.

A próstata da fêmea do gerbilo origina-se no UGS: os brotos de epitélio prostático surgem no UGS, invadem o mesênquima periuretral (pm localizado no UGM) ao redor do epitélio uretral e alongam-se dentro deste tecido mesenquimal em direção ao mesênquima parauretral (pam), um mesênquima condensado no qual os brotos sofrerão morfogênese ramificada (Figura 4). Na fêmea apenas dois brotos atingem o mesênquima indutivo como observado na figura 5. (SANCHES et al., 2017).



**Figura 5:** Vista ventral. Reconstrução 3D do complexo prostático de fêmea de gerbilo. Legenda: P7: 7º dia pós-natal; P14: 14º dia pós-natal; vermelho: camada de músculo liso; ciano: ramificação prostática; verde: uretra; azul escuro: luz da uretra. Setas em P7 e P14: brotamento prostático. Fonte: adaptado de SANCHES et al., 2009.

A próstata da fêmea de gerbilo surge mais cedo em comparação a próstata de machos. Há a liberação da enzima fosfatase ácida pelo epitélio secretor cúbico na região, ocorrendo a diferenciação da camada de músculo liso no 30º dia de vida pós-natal; no macho ocorre no 45º dia (CUSTÓDIO, GÓES e TABOGA, 2004). Essa diferença de maturação da próstata entre macho e fêmea, segundo SANCHES et al. (2016a), é possivelmente devido a uma maior diminuição na expressão do ER $\alpha$  em fêmeas (45%) se comparado ao receptor de andrógeno (AR) em machos (13%) entre o 7º e 30º dia pós-

natal. Isso justifica um declínio rápido da atividade proliferativa e o início mais precoce da embriogênese prostática em fêmeas de gerbilo. SANCHES et al., (2016b) constataram que o epitélio e o estroma se desenvolvem simultaneamente durante o período pós-natal.

O desenvolvimento e a diferenciação do complexo prostático dependem do balanço entre os hormônios andrógenos e estrógenos bem como seus receptores AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  (MCPHERSON, ELLEM e RISBRIDGER, 2008). O AR é responsável pela diferenciação e desenvolvimento prostático na vida embrionário e pós-natal assim como suporte e manutenção na vida adulta. O aumento do estrógeno causa proliferação do epitélio prostático, inflamação e câncer e a diminuição do estrógeno provoca hipertrofia e hiperplasia prostática. A atuação estrógeno depende da interação entre ER $\alpha$  e ER $\beta$ . ER $\alpha$  apresenta ação proliferativa quando expresso na vida fetal e neonatal em humanos e roedores enquanto que ER $\beta$  atua na puberdade e na vida adulta com uma ação antiproliferativa e na diferenciação celular. Alterações na expressão de ER $\alpha$  na puberdade e fase adulta ocasiona uma atividade inadequada na glândula, incluindo inflamação e lesões pré-malignas. Assim, o balanço entre AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  é crucial para o desenvolvimento prostático (MCPHERSON, ELLEM e RISBRIDGER, 2008).

Em estudo realizado por ROCHEL-MAIA et al., (2010) demonstrou-se a predominância de ER $\alpha$  no núcleo de células estromais como fibroblastos e células da camada muscular lisa em relação ao epitélio (células secretoras) nas próstatas de fêmeas de gerbilo enquanto que ER $\beta$  foi expresso em maior quantidade no núcleo de células epiteliais. Foi observado diferenças entre a expressão de ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos machos e nas fêmeas entre os grupos controle, castrado, tratado com testosterona e tratado com DHEA (deidroepiandrosterona). O grupo tratado com testosterona nas fêmeas teve um decréscimo significativo na expressão de células positivas para ER $\alpha$ , porém o número de células estromais positivas mantiveram-se aumentadas em relação aos grupos machos não tratados. Por outro lado, o grupo castrado nos machos não apresentou redução de expressão de ER $\alpha$ , ou seja, o uso da testosterona provoca regulação dos níveis de ER $\alpha$  em fêmeas.

O desenvolvimento prostático é andrógeno dependente e a testosterona é o principal hormônio na atuação da próstata do macho. A testosterona liberada pelos testículos, entra em contato com os tecidos que compõem a próstata como o epitélio e o estroma, sofre a ação da enzima 5  $\alpha$ -redutase e, assim, é convertida em diidrotestosterona (DHT). O DHT age no crescimento prostático na fase pré-natal, neonatal e na manutenção morfofuncional da glândula na vida adulta (SANCHES et al., 2016a).

A organogênese prostática se dá pela expressão de AR na camada mesenquimal ventral (vmp). Embora exista a expressão de AR no UGE, isso é dispensável para indução inicial do desenvolvimento prostático. A expressão de AR mesenquimal sofrida por um estímulo andrógeno produz fatores parácrinos que atuam no UGE, conduzindo o início do brotamento prostático (PRINS e PUTZ, 2008).

Ainda, segundo PRINS e PUTZ (2008), o primeiro broto prostático em humanos surge por volta da oitava semana de vida embrionária, enquanto que nos roedores esse fenômeno ocorre entre o décimo sexto e décimo oitavo dia de vida embrionária.

DONJACOUR, THOMSON e CUNHA (2003) descreveram os fatores de crescimento FGF7, FGF10 e Igf1 na organogênese prostática de machos. TOIVANEN e SHEN (2017) citaram mais de 100 genes envolvidos nas vias de sinalização da organogênese prostática, dentre eles: glicoproteína *Sonic hedgehog* (Shh), fatores de transcrição parácrinos como via de sinalização wingless/integrated (Wnt), família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fatores de transcrição da família homeobox Hoxa10, Hoxa13, Hoxb13 entre outros. Além desses fatores, os receptores de andrógeno e estrógeno sofrem a ação da testosterona e estradiol, assim como de disruptores endócrinos (EDC) que mimetizam a ação hormonal. Um número significativo de estudos realizados durante anos permitiu a formação de um “Código Morfogenético Prostático” (PRINS e PUTZ, 2008) onde a interação entre os tecidos epitelial e mesenquimal da próstata e as diferentes famílias de genes promovem proliferação, diferenciação ou crescimento da próstata.

O desenvolvimento da glândula prostática, que ocorre durante a vida fetal em humanos e no período perinatal (desenvolvimento embrionário e primeira semana pós-natal) em roedores, é extremamente sensível ao *imprinting* estrogênico, que consiste em efeitos em longo prazo da exposição ao estrógeno durante o período de desenvolvimento glandular (POWELL & MEYNSKES, 2001). Por exemplo, o ambiente estrogênico *in utero* de mães afro-americanas tem sido sugerido como um agente para o aumento do risco de câncer de próstata nos filhos, uma vez que estas apresentam níveis mais elevados de estradiol durante a gravidez, quando comparadas a mães caucasianas (POWELL & MEYNSKES, 2001). Em roedores, uma breve exposição perinatal (período entre a vida embrionária e primeira semana pós-natal) a doses farmacológicas de estrógenos naturais ou sintéticos altera o crescimento e a diferenciação prostática (PRINS, 1992).

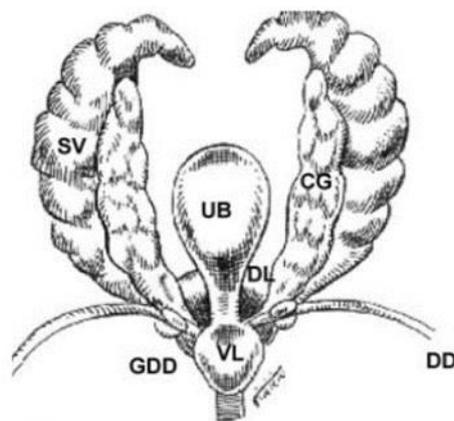
PEREZ et al. (2016a) mostraram que a exposição ao etinilestradiol, um estrógeno sintético, em doses encontradas nos anticoncepcionais (15 µg/kg/dia), causou mudanças

no epitélio e estroma da próstata de gerbilos machos e fêmeas durante o envelhecimento. A exposição pré-natal a este estrógeno afeta o nível de testosterona e estradiol endógenos nas fêmeas senis. Com isso, observou-se aumento da altura do epitélio e mudança na camada muscular das próstatas das fêmeas, alterando a morfologia da glândula e aumentando o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Estes autores também descreveram os efeitos da exposição ao etinilestradiol durante a puberdade em próstata de fêmeas e machos de gerbilo. Novamente, em fêmeas de gerbilo, o hormônio teve um efeito anabólico na próstata e aumentou as chances de lesões neoplásicas. Portanto, o desenvolvimento prostático pós-natal durante a puberdade também deve ser considerado período crítico para a exposição ao etinilestradiol, resultando em efeitos prostáticos significativos no envelhecimento (PEREZ et al., 2016b).

## **1.2. Histofisiologia prostática**

Na próstata humana, as glândulas são classificadas como túbulo-alveolares, apresentando epitélio classificado como cúbico simples no revestimento da estrutura alveolar da glândula, ou prismático quando o revestimento epitelial estiver na estrutura ductal da glândula. As glândulas são circundadas por um estroma fibromuscular. São subdivididas em zona central, zona de transição e zona periférica (Figura 1). A próstata consiste num arranjo de 30 a 50 glândulas túbulo-alveolares em 3 camadas concêntricas: mucosa, intermediária e periférica. Mudanças morfológicas no epitélio glandular prostático são influenciadas por hormônios sexuais, tais como testosterona e andrógenos produzidos pela adrenal (ROSS e PAWLINA, 2011).

Nos roedores, a próstata é descrita como complexo prostático multilobular, sendo subdividida em próstata ventral, dorsal e dorsolateral (Figura 6) pois apresentam morfologia e funcionalidade distintas (LEE et al., 1990). ZANATELLI et al. (2016) descreveram os diferentes tipos celulares encontrados no epitélio prostático de fêmeas de gerbilo: células mucinas, espumosas, ciliadas e claras.



**Figura 6:** Vista ventral. Esquema do trato genital de macho de gerbilo da Mongólia. SV: vesícula seminal; CG: glândula coaguladora; UB: bexiga urinária; DD: ducto deferente; DL: lobo dorsal; VL: lobo ventral; GDD: glândula do ducto deferente. Fonte: adaptado de PINHEIRO et al., 2003.

Quanto à fisiologia, a próstata feminina é conhecidamente responsiva a hormônios. ZANATELLI et al, (2014) concluíram que hormônios ovarianos são importantes na manutenção da fisiologia da próstata feminina de gerbilos, que apresenta efeitos regulatórios de acordo com variações nos níveis de progesterona e testosterona. Outro estudo demonstrou que a oscilação hormonal no ciclo estral de fêmeas de gerbilos promove mudanças morfológicas no tecido prostático onde a concentração dos níveis séricos de progesterona se encontra aumentada (FOCHI et al., 2008).

Os principais hormônios reguladores da glândula prostática, andrógenos (testosterona) e estrógenos (estradiol), são sintetizados nos testículos e ovários. Sua síntese envolve ação de enzimas da superfamília de proteínas citocromo P-450 (NELSON e COX, 2013). Estes hormônios afetam o desenvolvimento e o comportamento sexuais, além de possuírem uma grande variedade de outras funções reprodutivas e não reprodutivas. Todos os hormônios esteroides, incluindo estrógeno e progesterona atuam por meio de receptores nucleares e alteram o nível de expressão de genes específicos. Eles também podem ter efeitos mais rápidos, provavelmente mediados por receptores na membrana plasmática (NELSON e COX, 2013). Desta forma, a administração exógena

de fármacos com estrutura semelhante a estes hormônios pode exercer efeitos sobre a glândula, uma vez que se ligam a seus receptores nucleares.

### 1.3. Disruptores endócrinos

No contexto de uma potencial função do ambiente no desenvolvimento e progressão do câncer, disruptores endócrinos (EDCs) têm sido importantes alvos de estudo. Eles estão presentes em vários tipos de produtos, como pesticidas, produtos de limpeza e higiene pessoais, subprodutos da indústria e medicamentos. O principal mecanismo de exposição ao EDCs são os alimentos e a maioria deles são bioacumulados, permanecendo na cadeia alimentar (JENG, 2014).

Segundo BERNARDO, MURATA e ALCANTARA (2015) em 2006, a *European Food Safety Authority* (EFSA) estabeleceu o *Tolerable Daily Intake* (TDI) em 0,05 mg de Bisfenol A BPA/kg corpóreo no consumo diário de alimentos. Em 2011 a Comissão Europeia permitiu o uso de BPA em embalagens destinadas ao armazenamento de alimentos e criou o Limite de Migração Específica (LME). O LME corresponde ao valor permitido de BPA proveniente das embalagens para o alimento e tem valor seguro de 0,6 mg de BPA/ kg corpóreo. A *US Environmental Protection Agency* (US- EPA) definiu, como valor seguro de consumo diário de BPA em 2006, 0,05 mg/kg. Este valor permanece até os dias atuais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Brasil, estabeleceu o valor de 0,05 mg/kg diários para consumo de BPA.

Dessa forma, podem interferir nas funções endócrinas, ativando diretamente, ou inativando receptores endócrinos, interrompendo a síntese de hormônios, ou pelo controle local de ativação e inativação de hormônios através das atividades metabólicas das enzimas (GIULIVO et al. 2016).

O bisfenol A (BPA) pertence a uma das categorias de disruptores endócrinos presentes no meio ambiente. O BPA é um fenol sintético amplamente utilizado na fabricação de policarbonato e resina de epóxi (JALAL et al., 2018).

Entre os EDCs estão também os ftalatos e os parabenos. São utilizados na produção de materiais plásticos, como garrafas, mamadeiras, e na resina epóxi que compõe os revestimentos de alguns alimentos e selante dentário. Sua liberação do plástico ocorre pelo aumento de temperatura, mudanças de pH ou devido a repetidas lavagens. A presença de BPA no plasma humano em altas concentrações, bem como na placenta e tecidos fetais é amplamente descrita (SCHONFELDER et al. 2002; PRINS et al. 2008).

Estudos destacaram que o BPA pode atuar como estrógeno artificial, ao interagir diretamente com ER $\alpha$  e ER $\beta$  (KUIPER *et al.*, 1998), assim determinando o crescimento e a diferenciação neoplásica de culturas celulares em câncer de mama e próstata (WETHERHILL *et al.*, 2007; RICHTER *et al.*, 2007). RODRÍGUEZ *et al.* (2015) evidenciaram que a próstata de fêmea de gerbilo é mais sensível aos efeitos xenoestrógenos do BPA do que a próstata de macho. A exposição por longo período ao BPA, mesmo em doses consideradas seguras segundo a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA), aumenta os índices de proliferação do epitélio, a expressão de ER $\alpha$  e favorece o desenvolvimento de focos de hiperplasia prostática em fêmeas de gerbilo adultas (CAMPOS *et al.*, 2015). Esses resultados, em resumo, demonstraram que níveis seguros de BPA foram suficientes para uma interferência estrogênica na próstata feminina.

Em estudo realizado com a próstata de filhotes de fêmeas de gerbilo tratadas com baixa e alta dosagem de BPA, identificaram-se baixas taxas de proliferação celular no brotamento parauretral que ocorre durante o processo de ramificação do desenvolvimento prostático, no período neonatal. Comparada com o grupo controle, essa taxa de diminuição de proliferação foi 50% menor (LIMA *et al.*, 2015), levando à conclusão de que o BPA causa um efeito antiproliferativo nas próstatas de gerbilo, similar ao efeito do ER $\beta$ .

#### 1.4. Estrógenos

Os hormônios sexuais femininos, conhecidos como estrógenos, podem ser classificados em 17 $\beta$  estradiol (E2) e outros dois metabólitos conhecidos como estrona (E1) e estriol (E3). Há um quarto tipo de estrógeno sintético conhecido como 17 $\alpha$  etinilestradiol (EE2) ministrado como reposição hormonal para mulheres na menopausa. Os estrógenos classificados como naturais são formados quimicamente por 18 carbonos que possuem um anel A aromático com um hidroxil fenólico (ACCONCIA e MARINO, 2018).

SANCHES *et al.*, 2017 verificaram que a exposição intrauterina de E2 em gerbilos da Mongólia provocou desenvolvimento precoce na próstata de fêmeas quanto à redução proliferativa do estroma.

Segundo REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA (2006) esses estrógenos, tanto os naturais como o sintético, despertam atenção pela potência e pela quantidade contínua introduzido no meio ambiente através da excreção pela urina ou pelas fezes. No presente estudo o E2 foi utilizado como uma referência de controle, como um estrógeno endógeno que apresenta padrões de ligação adequados aos receptores hormonais, possibilitando a comparação com efeitos do um disruptor endócrino BPA, de ligação não usual aos receptores.

## 2.JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento prostático depende das variações hormonais que ocorrem no organismo. Portanto, verificar o efeito dos níveis seguros ambientais de BPA e estradiol na próstata feminina é relevante. Assim, o conhecimento dos efeitos destes compostos nas glândulas reprodutivas é importante para o estabelecimento de novos limites críticos para sua utilização.

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens (INCA, 2018). Assim, há um grande interesse em melhor compreender a biologia do desenvolvimento e homeostasia prostática devido à sua alta propensão em desenvolver neoplasias.

Segundo METZ (2016) o BPA está envolvido em uma variedade de alterações como o câncer de mama e próstata, desregulação menstrual, puberdade precoce em meninas, anomalias no desenvolvimento de órgãos genitais masculinos, infertilidade masculina e feminina e distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade.

Sendo a próstata responsiva a hormônios, o estudo dos efeitos do estradiol administrado oralmente é necessário, uma vez que mimetiza tratamentos anticoncepcionais frequentemente adotados por mulheres. Além de possuir uma composição química e efeitos fisiológicos bastante semelhantes ao BPA, o uso do estradiol ou compostos sintéticos como o etinilestradiol, por via oral, tem efeitos deletérios na morfologia das glândulas, como mencionado anteriormente.

Porém, de acordo com SANTOS e TABOGA (2006), a obtenção da próstata de mulheres, para fins de pesquisa básica e estudos de fisiologia endócrina é limitada.

Devido ao crescente aumento de informações sobre a próstata masculina e feminina do gerbilo e sua versatilidade na resposta a diferentes condições experimentais e ser suscetível ao desenvolvimento de lesão neoplásica, acreditamos que este seja um importante modelo para a compreensão da biologia e da histopatologia glandular. Somados aos vários estudos indicando a ação de EDCs sobre a morfofisiologia prostática e a crescente necessidade de maior atenção à próstata feminina, acreditamos ser esta uma temática que acrescentará um novo parâmetro sobre as repercussões de EDCs sobre o trato genital feminino. Como o 17- $\beta$  estradiol e o BPA são amplamente utilizados e existem várias rotas de exposição, a caracterização dos mecanismos de sinalização molecular modulados por estes, em diferentes órgãos e em períodos importantes do desenvolvimento (como o perinatal que compreende a vida embrionário e se estende até

logo após o nascimento), parecem promissoras para a compreensão sobre os riscos da exposição.

Devido ao crescente aumento de informações sobre a próstata masculina e feminina do gerbilo e sua versatilidade na resposta a diferentes condições experimentais e ser suscetível ao desenvolvimento de lesão neoplásica, acreditamos que este seja um importante modelo para a compreensão da biologia e da histopatologia glandular.

### 3. OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo geral desta pesquisa foi verificar as alterações morfológicas na próstata feminina de gerbilos da Mongólia após tratamento perinatal com doses ambientais de BPA e baixa dose de 17- $\beta$  estradiol.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar a existência de alterações morfológicas através de reações citoquímicas tais como colorações de Hematoxilina-Eosina, Picrossírius e Reticulina de Gomori;

Os objetivos específicos realizados foram:

- Quantificar os tipos de lesões nos grupos considerando a presença de hiperplasia prostática benigna (HPB) e neoplasia intraepitelial de baixo grau (LGPIN) e neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN);

- Verificar a presença de células claras, focos inflamatórios intraluminais e periglandular, atipia epitelial planar e papilar e quantificar a presença de alvéolos através da área total prostática dos grupos;

Diante dos resultados obtidos nas análises das imagens das fotomicrografias e os resultados obtidos na esterologia e morfometria, foram realizadas as análises de diferentes lesões por área prostática, a incidência de lesões por animais de cada grupo e multiplicidade de lesões e a análise dos diferentes compartimentos pelo peso relativo prostático.

- Quantificar as lesões e alterações morfológicas por incidência e multiplicidade de lesões;

- Quantificar os compartimentos prostáticos (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) pelo peso relativo da próstata;

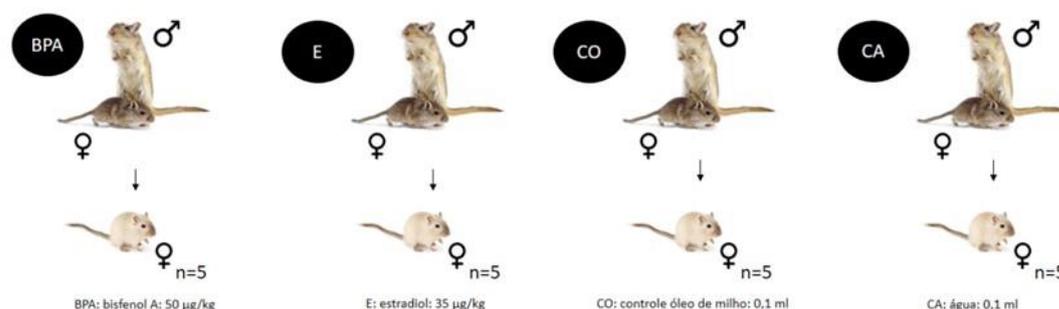
- Verificar a presença de macrófagos inespecíficos através de imunohistoquímica F4-80;

- Verificar alterações morfológicas na camada muscular lisa através de imunohistoquímica  $\alpha$ -SMA.

#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIAS RESUMIDAS

Foram analisadas as próstatas de fêmeas de gerbilo, na idade adulta (180 dias) provenientes das ninhadas de fêmeas tratadas com doses ambientais de BPA e 17- $\beta$  estradiol durante os períodos de gestação e lactação. Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – *campus* de São José do Rio Preto. As fêmeas analisadas foram mantidas em isoladores de polissulfona, livres de Bisfenol A – BPA (Alesco®), em estantes equipadas com exaustão de ar a uma temperatura de 22 +/- 2°C, com ração e água fresca *ad libitum* por 180 dias. O protocolo foi submetido à avaliação da CEUA deste instituto e aprovado (113/2015).

Uma fêmea e um macho comprovadamente férteis foram colocados nos isoladores de polissulfona. Após comprovação da gestação, as fêmeas foram tratadas a partir do 8º dia de gestação até o final da lactação (21º dia) da ninhada (n=5), totalizando 38 dias de tratamento. A gestação da fêmea de gerbilo dura em média 21 dias e a embriogênese prostática se inicia por volta do 12º e 13º dias de gestação. Foram administrados, através de gavagem (0,1 ml) os seguintes tratamentos: **Grupo 1 (BPA)**: doses diárias de 50  $\mu$ g/kg de BPA (VANDENBERG, et al. 2012) diluídos em óleo de milho; **Grupo 2 (E)**: doses de 35  $\mu$ g/kg de 17- $\beta$  estradiol (PINTO, et al.2008) diluídos em óleo de milho (0,1 ml) por 3 vezes na semana; **Grupo 3 (CO)**: a mesma quantidade de óleo de milho (veículo de diluição) dos outros grupos, em doses diárias de 0,1 ml, sem outros compostos associados e **Grupo 4 (CA)**: 0,1 ml de água em doses diárias, sem outros compostos associados.



**Figura 7:** Esquema representativo do delineamento experimental. Fonte: elaborado pela autora.

Após o desmame, apenas os animais do sexo feminino obtidos nas ninhadas foram mantidos e avaliados durante este projeto. As mães e os filhotes machos foram aproveitados para outros projetos.

As fêmeas obtidas nas ninhadas foram eutanasiadas após 180 dias do nascimento, ou seja, na fase adulta. Ao atingirem esta idade, foram submetidas à citologia vaginal diária, realizada com um swab adaptado para o modelo experimental e a aplicação da amostra em lâmina de microscopia, corada com azul de toluidina, com o intuito de identificar a fase do ciclo estral. Os animais foram eutanasiados apenas em estro para evitar alterações morfológicas ocasionadas por diferentes fases do ciclo. Os animais que não estavam em estro, foram reavaliados nos dias subsequentes e eutanasiados quando atingiram tal fase.

Para a eutanásia dos animais foi utilizada a associação dos anestésicos Cloridrato de Xilazina 3mg/kg e Cloridrato de Cetamina 10 mg/kg injetados de forma subcutânea. Em seguida, as fêmeas foram pesadas e decapitadas em guilhotina.

#### **4.1. Processamento dos tecidos**

As próstatas foram retiradas, imediatamente pesadas e transferidas para uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M utilizado como fixador. Os espécimes foram mantidos no fixador durante 24 horas e em seguida foi realizado o processamento histológico para inclusão do material em parafina.

#### **4.2. Técnicas de colorações específicas**

Após a microtomia (4 µm de espessura) nos blocos histológicos, as lâminas foram montadas a partir da visualização microscópica da próstata através da coloração Azul de Toluidina. Foram seriados dez cortes histológicos para a realização das análises morfológicas. Em seguida, as lâminas foram coradas com: Hematoxilina-eosina para avaliar a morfologia geral; Picrossírius para identificar e quantificar as fibras do estroma glandular, morfometria e verificar a birrefringência das fibras de colágeno; e Reticulina de Gomori para verificar as fibras reticulares ou fibras de colágeno tipo III estromais e fibras de colágeno do tipo I.

### **4.3. Análises quantitativas**

#### **4.3.1 Análises esterológica e morfométrica**

Para a quantificação dos elementos de estroma, foi realizada a estereologia nas lâminas de Picrossírius, identificando a porcentagem de epitélio, estroma muscular, estroma não muscular, lúmen, fibras colágenas, vasos sanguíneos e focos inflamatórios. Imagens de campos aleatórios (6 imagens por animal, n=5) de cada grupo foram capturadas a partir de lâminas coradas, através do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics em objetiva de 20x. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por WEIBEL (1963). Assim, a partir dos valores obtidos para cada campo analisado, foram calculadas as frequências relativas dos componentes teciduais em estudo.

Para a análise morfométrica foram medidas a altura do epitélio e da camada muscular circundante aos alvéolos. As imagens utilizadas foram as mesmas usadas para a análise esterológica, em lâminas coradas pela coloração Picrossírius.

#### **4.3.2. Análise das lesões prostáticas**

As análises das lesões prostáticas foram baseadas de acordo com SHAPPELL et al. (2004). Foram consideradas como lesões HPB, LGPIN e HGPIN. Segundo SHAPPELL et al (2004) as lesões HGPIN se caracterizam por focos de proliferação celular em crescimento papilar e cribiforme e as lesões LGPIN são representadas pela estratificação de células epiteliais.

Além disso, foram consideradas como alterações morfológicas o número de células claras, a presença de atipia epitelial planar ou papilar e focos inflamatórios intraluminais e periglandulares. Em seguida, os respectivos valores foram divididos pela área prostática ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada animal.

#### **4.3.3. Análise por incidência de lesão e multiplicidade**

A análise por incidência de lesão foi realizada através da frequência de animais afetados pelos diferentes tipos de lesões (número de animais acometidos por neoplasias exposto em porcentagem).

A multiplicidade corresponde à média de lesões encontradas por animais dos diferentes grupos.

A incidência de lesões por animais é a frequência de animais afetados nas diferentes lesões expressa em porcentagem. A multiplicidade de lesões corresponde ao número médio de focos alterados presentes na próstata da fêmea de cada grupo animal. Para sua determinação foi estimado o número de focos de cada tipo de alteração morfológica e lesão por animal e calculada sua média e desvio padrão. Tanto para a quantificação da incidência como para a multiplicidade foram utilizadas as seguintes alterações morfológicas: células claras, focos inflamatórios intraluminas e periglandulares, atipia epitelial planar e papilar e lesões como HPB e PIN.

#### **4.3.4. Análise biométrica dos compartimentos prostáticos**

A análise dos diferentes compartimentos que compõem a próstata como epitélio, lúmen, estroma muscular, estroma não muscular (colágeno e vasos sanguíneos) multiplicados pelo peso relativo da próstata. Foi considerado para o estroma não muscular o colágeno (camada concêntrica subepitelial e fibras dispersas, colágeno tipo I e III) e frequência dos vasos sanguíneos encontrados na esterologia.

#### **4.4. Imunohistoquímica**

Foram realizados testes para alfa-actina do músculo liso e macrófagos inespecíficos (F4-80).

O anticorpo utilizado para a imunohistoquímica alfa-actina é monoclonal, fabricado pela Santa Cruz Biotechnology (sc-32251). Foi usado na diluição 1:100 em BSA 1%.

O anticorpo utilizado para imunohistoquímica F4-80 é monoclonal, fabricado pela Cell Signaling Technology (#30325). Foi usado na diluição 1:100 em BSA 1%.

A imunohistoquímica para macrófagos inespecíficos (F4-80) foi utilizada para inferir a presença de focos inflamatórios na próstata de fêmeas.

#### 4.4.1. Análise Imunohistoquímica

Após a aplicação de técnicas imunohistoquímicas no material, foi realizada uma análise qualitativa da expressão de macrófagos inespecíficos (F4-80) presentes no epitélio glandular e estroma.

Os protocolos desenvolvidos para as reações imunohistoquímicas foram precedidos de desparafinização com banhos de xilol e reidratação com banhos de álcool e um último banho em água destilada. Basicamente, os protocolos seguiram uma ordem de procedimentos semelhante para todos os testes a serem desenvolvidos. Primeiramente foi realizado a recuperação antigênica (em geral, com tampão citrato pH 6,0). Esta etapa auxiliou a ligação do anticorpo com o antígeno alvo. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (com peróxido de hidrogênio 3% em metanol). Esta etapa foi essencial para evitar que ocorresse reação entre as peroxidases, que estavam presentes naturalmente no tecido, com o cromógeno DAB (3, 3'-*diaminobenzidina* tetrahidroclorato dihidratado). A seguir, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas (em geral, com leite em pó 5% ou soro fetal bovino 5% - BSA). Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário em questão (em uma diluição recomendada pelo fabricante) em cuba umidificada, a partir de 1h, em temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C (em refrigerador). Para a identificação dos anticorpos no tecido, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário em estufa a 37°C e logo após, com complexo avidina e biotina ou com polímeros específicos, para intensificar a visualização das marcações ao microscópio. A revelação dos sítios de ligação foi então realizada com DAB e a contracoloração com hematoxilina.

#### 4.5. Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e então comparados por *one-way* ANOVA (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Os resultados foram considerados estatisticamente significante quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

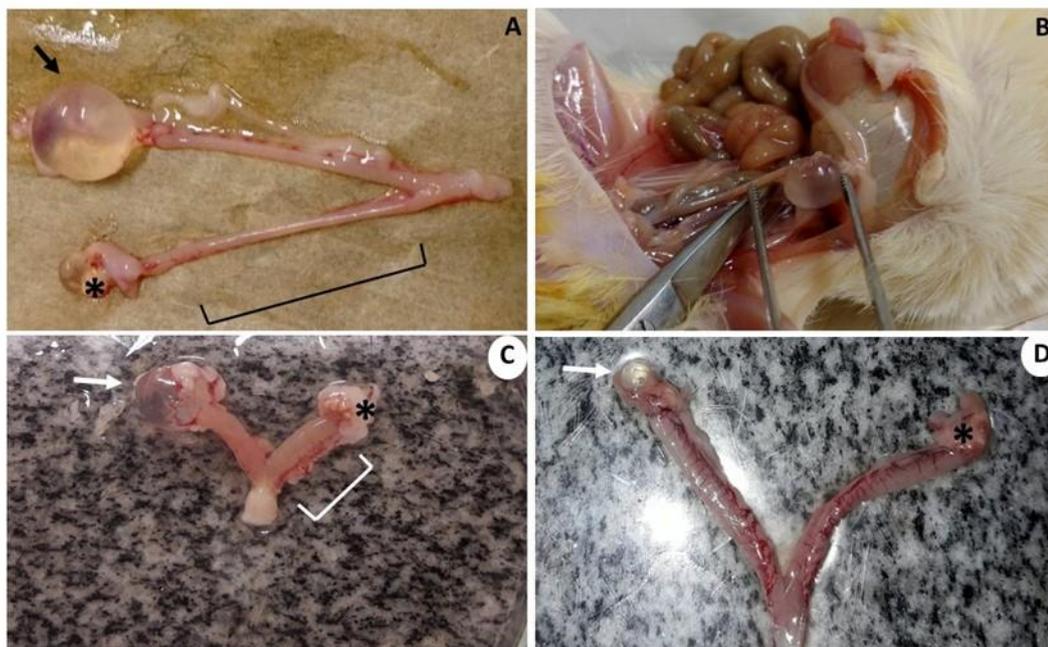
Os parâmetros biométricos são apresentados na tabela 1. Não houve alteração significativa entre o peso corpóreo dos grupos. O peso dos órgãos uretra+próstata apresentou diferenças significativas entre os grupos BPA ( $0,013\pm 0,002$ ) e E2 ( $0,028\pm 0,002$ ) e entre os grupos BPA ( $0,013\pm 0,002$ ) e CO ( $0,020\pm 0,004$ ). Concomitante a esse resultado, o peso relativo também apresentou uma diferença significativa entre os grupos BPA ( $0,018\pm 0,003$ ) e E2 ( $0,039\pm 0,003$ ) e BPA ( $0,018\pm 0,003$ ) e CO ( $0,029\pm 0,005$ ).

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos de fêmeas de gerbilo.

	<b>Grupos experimentais</b>			
	<b>CA</b>	<b>BPA</b>	<b>E2</b>	<b>CO</b>
<b>Corpóreo (g)</b>	66±1,673	74±3,847	70,8±1,356	68,8±2,059
<b>Uretra+próstata (g)</b>	0,008±0,001 <sup>a</sup>	0,013±0,002 <sup>b,a</sup>	0,028±0,002 <sup>c</sup>	0,020±0,004 <sup>b,c</sup>
<b>Peso relativo*</b>	0,012±0,002 <sup>a</sup>	0,018±0,003 <sup>b,a</sup>	0,039±0,003 <sup>c</sup>	0,029±0,005 <sup>b,c</sup>

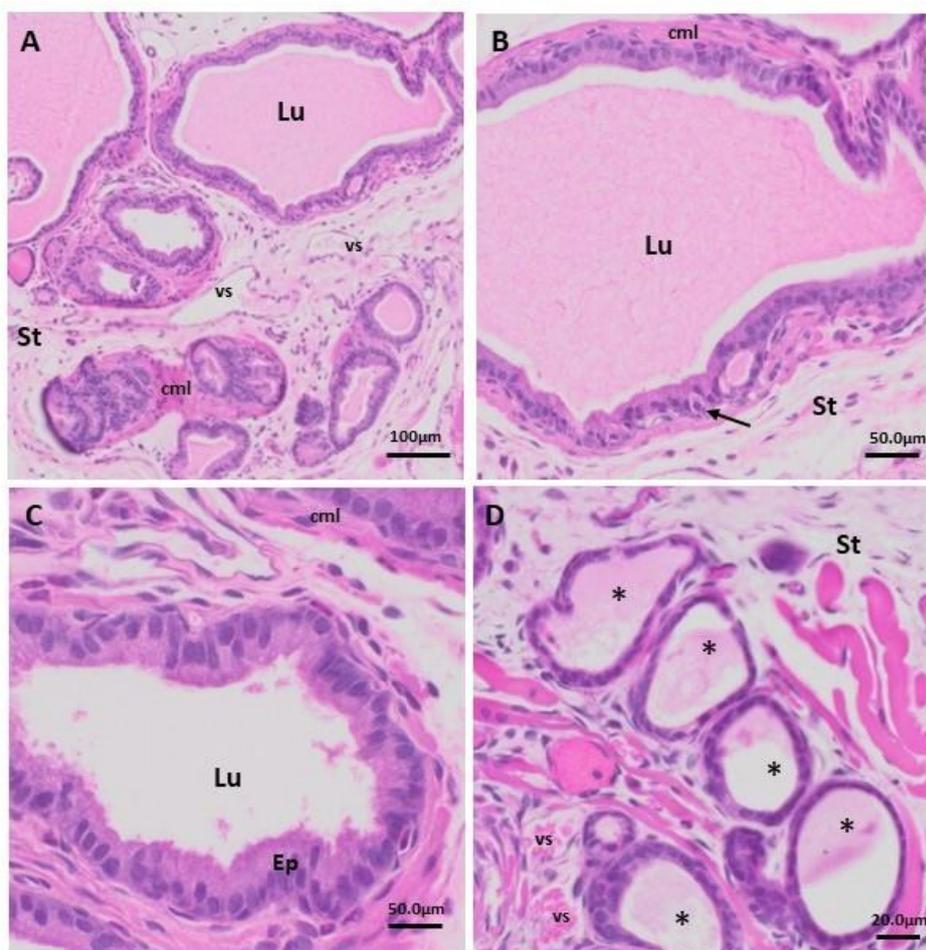
\*Relação uretra+próstata/peso corpóreo. Dados expressos em média ± erro padrão, estatística: *one-way* ANOVA. Sobrescritos indicam diferença estatística entre os grupos. Fonte: elaborado pela autora.

Durante a eutanásia dos animais, foram encontrados em algumas fêmeas cistos ovarianos e úteros edemaciados como apresentado na figura 8. Os ovários que apresentam cistos e úteros edemaciados correspondem aos animais tratados com BPA, E2 e CO. Não foram observadas alterações anatômicas no grupo CA.



**Figura 8:** Visão anatômica de útero bicorno (vista anterior) e ovários de fêmeas de gerbilo. Legenda: setas: ovários com cistos; \*ovários de aspecto normal; colchetes: útero. Fonte: elaborado pela autora.

A figura 9 demonstra aspectos histológicos da próstata das fêmeas de gerbilo. No grupo CA a próstata das fêmeas foi caracterizada por um fenótipo normal, onde os alvéolos apresentam epitélio cúbico secretor com células basais e secretoras, com estroma adjacente composto por fibras de colágeno, vasos sanguíneos e fibroblastos. Células claras foram observadas em todos grupos desse experimento, pois é característica da composição do epitélio em fêmeas de gerbilo (Figura 9B). Os alvéolos têm formato arredondado e são circundados por uma camada muscular lisa (Figuras 9A-C). O lúmen apresenta secreção clara e “fluída” sem a presença de focos inflamatórios (Figura 9D).



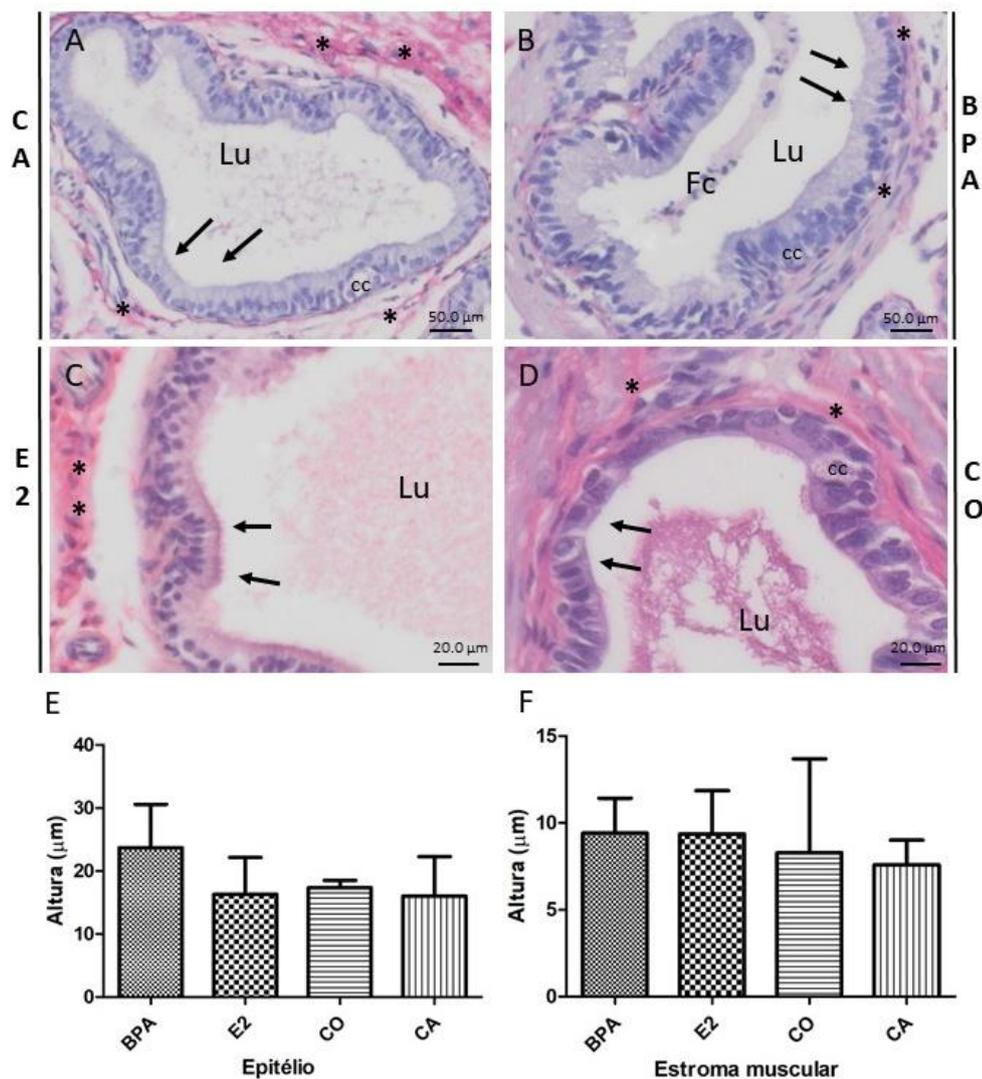
**Figura 9:** A-D: Fotomicrografia da próstata de fêmeas de gerbilo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Legenda: Lu: lúmen; cml: camada muscular lisa; St: estroma; vs: vaso sanguíneo; Ep: epitélio cúbico secretor. Seta: célula clara; \*: alvéolos. Fonte: elaborado pela autora.

As análises estereológicas de frequência dos compartimentos (epitélio, lúmen, estroma muscular, estroma não muscular, colágeno, vasos sanguíneos e foco inflamatório) e morfométricas (altura do epitélio e espessura da camada muscular circundante) não demonstraram diferenças estatísticas significativas na comparação entre os grupos, como mostram respectivamente os dados da figura 10 E e F da morfometria e esterologia na tabela 2.

Na análise morfométrica, houve um ligeiro aumento da altura do epitélio no grupo BPA (Figura 10E) ( $\pm 23\mu\text{m}$ ) comparando-se aos outros grupos (Figura 10E) que tem valores entre 10 e 20  $\mu\text{m}$ , apesar de esses valores não apresentaram dados estatísticos significativos. Na camada muscular circundante (Figura 10F) aos alvéolos não foram observadas alterações significativas entre os grupos.

Diante das porcentagens obtidas na análise esterológica (Tabela 2), pôde-se observar no grupo BPA uma ligeira redução, não significativa, do lúmen ( $22,38\pm 3,18$ )

em comparação aos grupos E2 ( $28,38\pm 6,68$ ), CO ( $28,38\pm 6,68$ ) e CA ( $28,31\pm 5,21$ ), demonstrando a manutenção da atividade secretora da glândula em todos os grupos. Uma discreta diferença foi observada entre o epitélio do grupo E2 ( $17,54\pm 3,07$ ) e os epitélios dos grupos CO ( $24,38\pm 4,06$ ) e BPA ( $21,23\pm 1,15$ ). Não houve alterações significativas nos grupos para estroma muscular, estroma não muscular, colágeno, vasos sanguíneos. No grupo BPA há um aumento não significativo dos focos inflamatórios nos lúmens ( $3,29\pm 2,73$ ) comparando-se aos grupos E2 ( $0,07\pm 0,07$ ), CO ( $0,0\pm 0,0$ ) e CA ( $0,0\pm 0,0$ ).

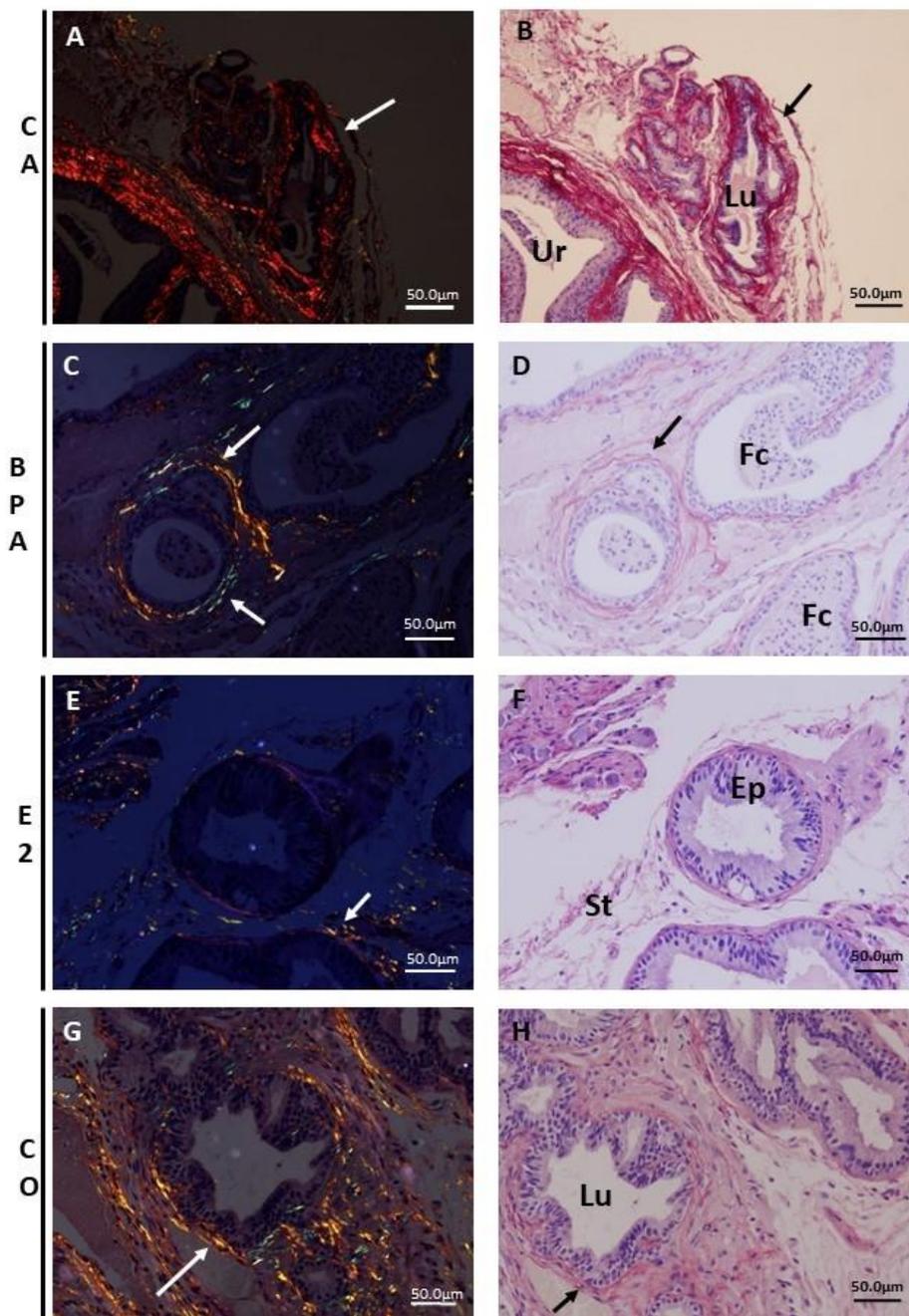


**Figura 10:** Dados morfométricos da altura do compartimento epitelial (E) e camada muscular circundante (estroma muscular- F) das próstatas de fêmeas de gerbilo. Coloração: Picrosirius. Legenda: Setas: epitélio cúbico secretor; \*: fibras de colágeno; Lu: lúmen; cc: células claras; Fc: foco inflamatório. Fonte: elaborado pela autora.

**Tabela 2:** Análise esterológica em valores relativos (%) dos componentes teciduais da próstata de fêmeas de gerbilo.

	<b>Grupos experimentais</b>			
	<b>CA</b>	<b>BPA</b>	<b>E2</b>	<b>CO</b>
<b>Epitélio</b>	18,23±1,62	21,23±1,15	17,54±3,07	24,38±4,06
<b>Lúmen</b>	28,31±5,21	22,38±3,18	28,38±6,68	29,38±4,11
<b>Estroma muscular</b>	15,85±5,90	16,31±3,11	16,03±2,87	17,09±4,70
<b>Estroma não muscular</b>	30,00±4,18	26,35±5,07	31,69±6,81	20,31±6,94
<b>Colágeno</b>	4,76±1,96	1,46± 0,22	3,00± 1,04	3,15± 1,62
<b>Vasos sanguíneos</b>	1,76± 0,56	2,53± 0,82	1,23± 0,41	1,00± 0,26
<b>Focos inflamatórios</b>	0,0±0,0	3,29±2,73	0,07±0,07	0,0± 0,0

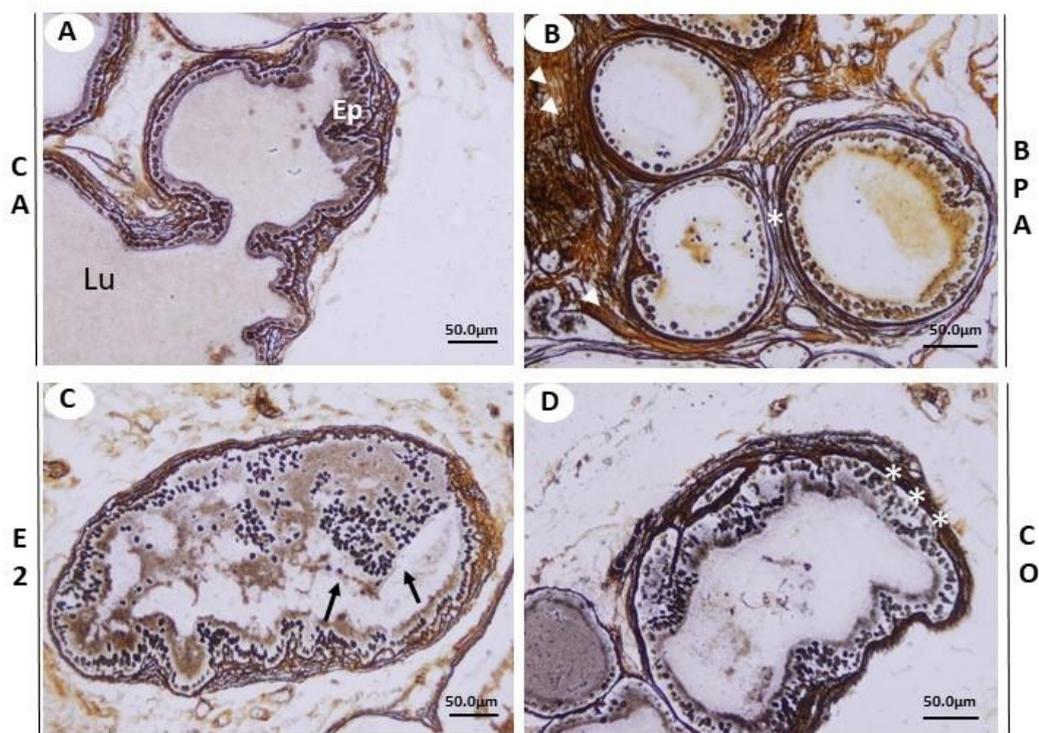
Dados expressos em porcentagem (média ± erro padrão): estatística: *one-way* ANOVA e Kruskal-Wallis. Fonte: elaborado pela autora



**Figura 11:** Fotomicrografia da próstata das fêmeas de gerbilo. Coloração: Picrosírius em luz polarizada e Picrosírius. Legenda: setas: fibras de colágeno; Ep: epitélio cúbico secretor; Lu: lúmen; St: estroma; Fc: foco inflamatório. Fonte: elaborado pela autora.

As fibras de colágeno que compõem o compartimento estromal da próstata das fêmeas de gerbilo dos grupos CA, BPA, E2 e CO estão apresentadas na figura 11. Nota-se, na técnica de Picrosírius com luz polarizada (Figura 11A, E, G) a birrefringência das fibras de colágeno. As cores amarelo alaranjado e verde representam diferentes tipos de maturação da fibra de colágeno. Nas cores verdes há um menor grau de agregação fibrilar em relação a cor amarelo alaranjado. Nos grupos BPA (Figura 11C), E2 (Figura 11E) e

CO representado na figura 11 G são observadas fibras de colágeno verdes o que não ocorre no grupo CA (Figura 11 A) onde há um predominância de fibras de colágeno na cor amarelo alaranjado. Há presença de foco inflamatório intraluminal no grupo BPA (Figura 11D).

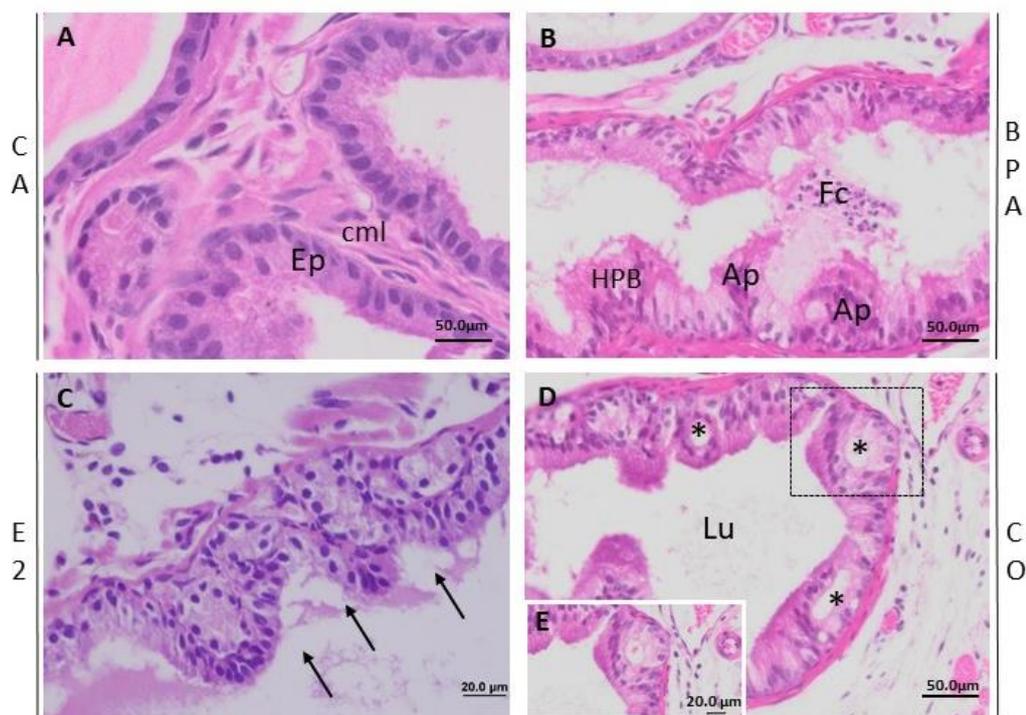


**Figura 12:** Fotomicrografia da próstata de fêmeas de gerbilo. Coloração: Reticulina de Gomori. Legenda: Ep: epitélio cúbico secretor; Lu: lúmen; Cabeças de setas: fibras de colágeno tipo I; \*: fibras reticulares; setas: foco inflamatório intraluminal. Fonte: elaborado pela autora.

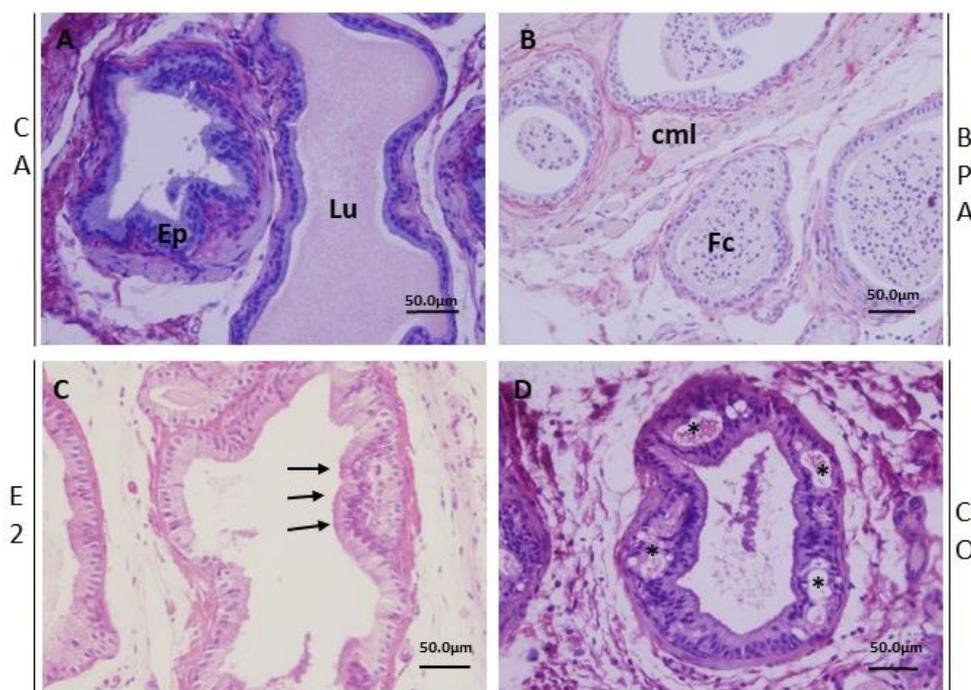
A coloração de reticulina de Gomori (Figura 12) possibilitou demonstrar as fibras de colágeno do tipo I e tipo III ou reticulares. As fibras de colágeno do tipo I estão coradas em marrom e as fibras de colágeno tipo III ou reticulares estão coradas em preto. No grupo CA observou-se o arranjo de fibras de colágeno tipo I, em marrom ao redor do alvéolo (Figura 11A). Observa-se na imagem do grupo BPA (Figura 11B) maior concentração de fibras de colágeno tipo I peri-alveolar em relação aos demais grupos. No grupo E2 (Figura 11C) há a presença de foco inflamatório intraluminal e discreto aumento de fibras de colágeno tipo I na transição epitélio estroma. No grupo CO (Figura 11D) são observadas fibras de colágeno e reticulares ao redor do alvéolo.

As lesões do tipo HGPIN, LGPIN e HPB são observadas na figura 13. Além das lesões, observa-se alterações morfológicas como focos inflamatórios intraluminais e periglandulares, estes localizados na região estromal. O grupo CA apresenta fenótipo

normal com epitélio cúbico secretor e camada muscular lisa (Figura 13A). No grupo BPA representado na figura 13 B há a presença de foco inflamatório intraluminal, HPB e atipia epitelial papilar, alteração que corresponde a estratificação de uma pequena região de células epiteliais para o lúmen. As amostras histológicas das próstatas das fêmeas de gerbilo do grupo E2 apresentam a formação de lesões proliferativas como LGPIN (figura 13C) e descontinuidade da camada muscular lisa. A figura 13 D, que corresponde ao grupo CO, demonstra lesões proliferativas classificadas como HGPIN. Inset (Figura 13E) representa a área delimitada na figura 13D com estratificação epitelial que corresponde a lesões proliferativas como HGPIN.



**Figura 13:** Fotomicrografia da próstata de fêmeas de gerbilo. Coloração HE. Legenda: Ep: epitélio cúbico secretor; cml: camada muscular lisa; HPB: hiperplasia prostática benigna; Fc: foco inflamatório; Ap: atipia epitelial papilar; setas: LGPIN; \*: HGPIN; Lu: lúmen. Fonte: elaborado pela autora.



**Figura 14:** Fotomicrografia da próstata de fêmeas de gerbilo. Coloração: Picrossírius. Legenda: Ep: epitélio cúbico secretor; Lu: lúmen, cml: camada muscular lisa; Fc: foco inflamatório; setas: LGPIN; \*: HGPIN. Fonte: elaborado pela autora.

Na figura 14A observa-se no grupo CA o fenótipo normal da próstata, com alvéolos circundados pela camada muscular lisa, epitélio cúbico com presença de células secretoras e basais e sem presença de foco inflamatório intraluminal. No grupo BPA representado na figura 14B verifica-se a presença de foco inflamatório intraluminal nos alvéolos. Associado aos alvéolos com presença de focos inflamatórios, a camada muscular lisa apresenta espessura maior em relação a camada representada no grupo CA (Figura 14A). No grupo E2 (Figura 14C) verifica-se a presença de lesões pré-malignas como LGPIN. A figura 14D representa o grupo CO a presença de HGPINs está associada ao espessamento das fibras de colágeno localizadas no estroma, caracterizando matriz extracelular reacional.

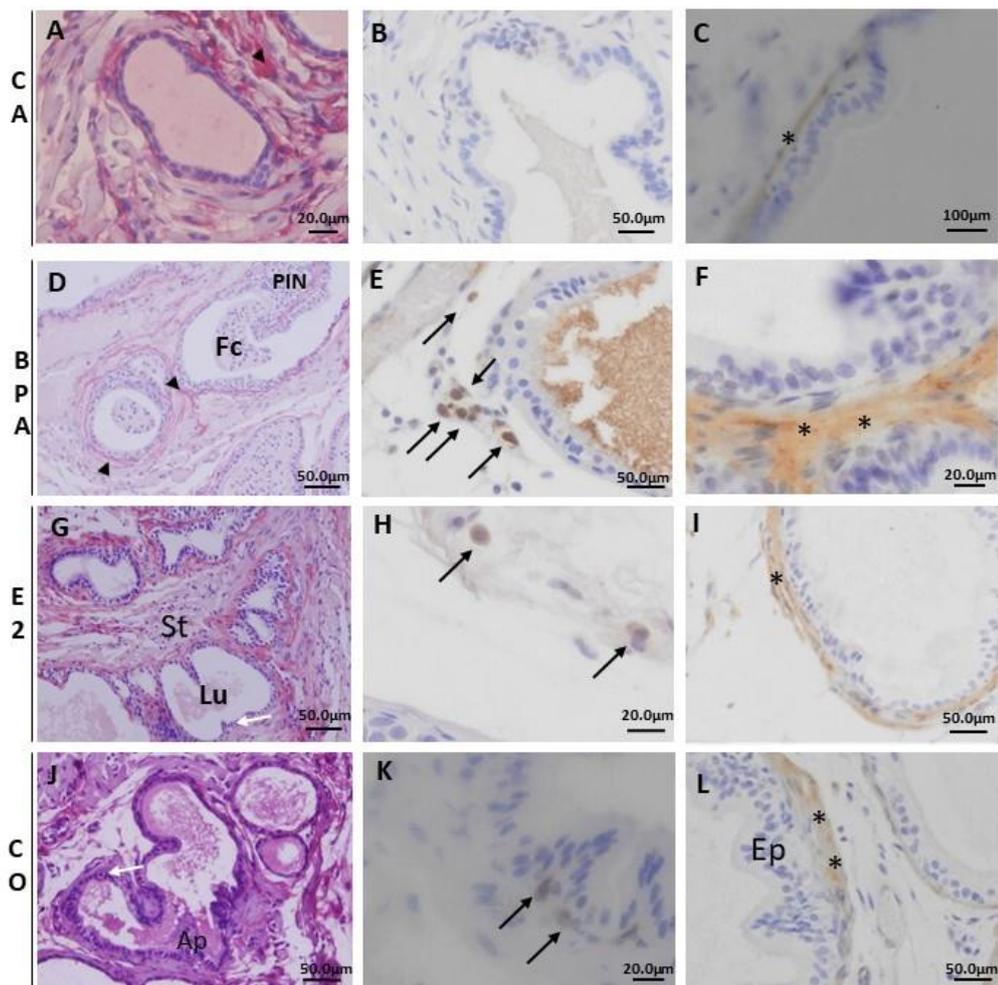
Houve incidência de células claras em todos os grupos (Tabela 3: CA: 40%; BPA: 80%; E2: 100% e CO: 100%). A inflamação intraluminal apresenta maior incidência no grupo BPA (60%) em relação ao grupo E2 (20%), grupo CO (40%) e grupo CA (0%). Em relação a inflamação periglandular, os grupos BPA e CO apresentaram uma incidência de (40%) e os grupos CA e E2 (0%). Não houve incidência de inflamação total no grupo CA (0%), enquanto que no grupo BPA todos os animais apresentaram inflamação intraluminal e periglandular (100%). No grupo E2 houve inflamação intraluminal, totalizando 20% dos animais. No grupo CO houve inflamação intraluminal

e periglandular, totalizando 80% dos animais. As lesões PINs foram observadas nos grupos E2 (60%) e CO (60%) e, nos grupos CA (0%) e BPA (0%) não houve incidências de lesões PIN. A HPB foi observada em todos os grupos (CA:40%; BPA:80%; E2: 40% e CO:20%).

Tabela 3: Incidência e multiplicidade de lesões.

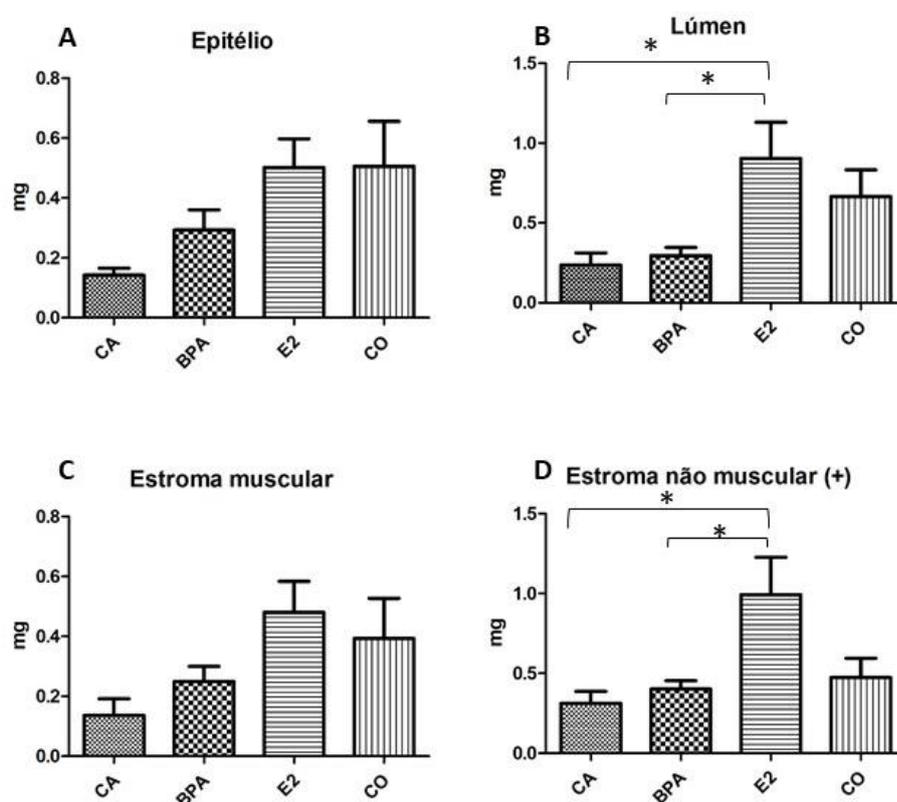
		Incidência (%)				Multiplicidade			
		CA	BPA	E2	CO	CA	BPA	E2	CO
Células claras		40	80	100	100	0-27 (6)	0-40 (21)	3-63 (22)	13-53 (36)
PIN total		-	-	60	60	-	-	0-10 (3)	0-17 (6)
Inflamação	Intraluminal	-	60	20	40	-	0-12 (0,4)	0-2 (0,4)	0-2 (0,6)
	Periglandular	-	40	-	40	-	0-8 (2,8)	-	0-11 (2,8)
	Total	-	100	20	80	-	0-20 (0,4)	0-2 (0,4)	0-13 (3,4)
Atipia epitelial	Planar	40	-	40	60	0-2 (0,4)	-	0-2 (0,6)	0-3 (1)
	Papilar	40	40	60	40	-	0-12 (4)	0-2 (0,4)	0-2 (0,6)
HPB		40	80	40	20	0-3 (0,8)	0-6 (3)	0-2 (0,4)	0-9 (2)

Dados de incidência expressos em porcentagem (média) e de multiplicidade expressos em frequência (média). Fonte: elaborado pela autora.



**Figura 15:** Fotomicrografia da próstata de fêmeas de gerbilo. A, D, G e J: coloração Picrossírius. B, E, H e K: imunohistoquímica F4-80. C, F, I e J: imunohistoquímica  $\alpha$ SMA. Legenda: Cabeça de seta: fibras de colágeno; Fc: foco inflamatório; PIN: Neoplasia intraepiteliai prostática; St: estroma; Lu: lúmen; setas brancas: células claras; Ap: atipia epitelial papilar; setas pretas: imunoexpressão para F4-80; \*: imunoexpressão para  $\alpha$ SMA. Fonte: elaborado pela autora.

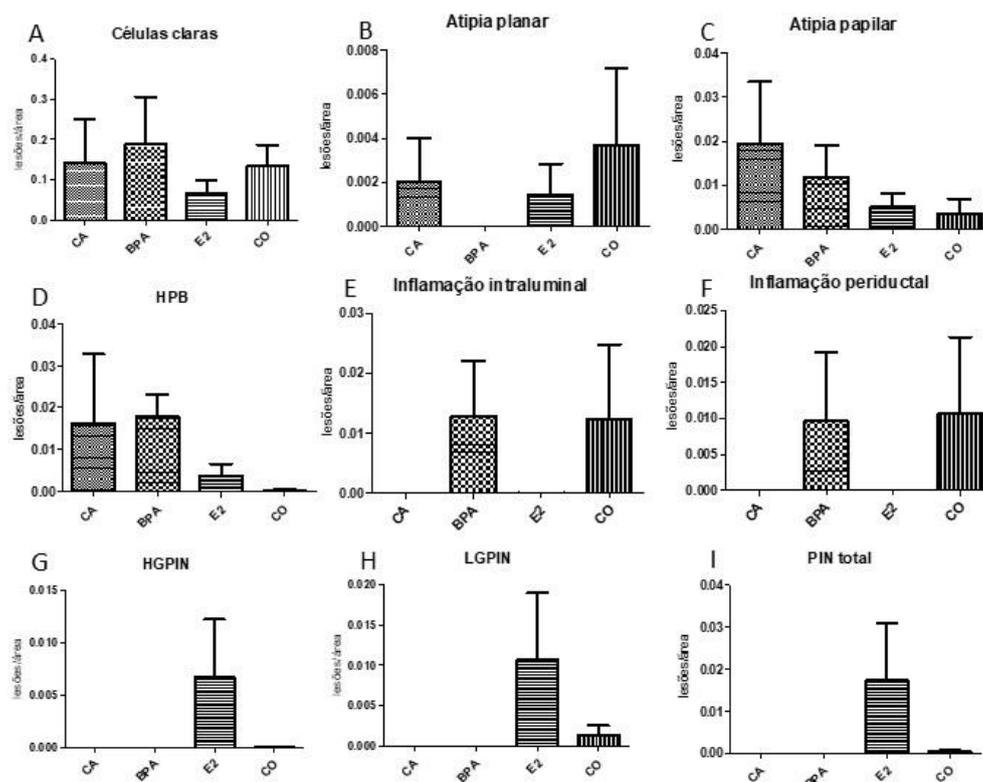
A figura 15 apresenta, na coloração Picrossírius (primeira coluna), as fibras de colágeno no grupo CA (Figura 15A). Observa-se a presença de foco inflamatório intraluminal e PIN no grupo BPA (Figura 15D). Células claras e um maior espessamento das fibras de colágeno estromais são demonstradas no grupo E2 (Figura 15G). No grupo CO (Figura 15J) há a presença de células claras e alterações como atipia epitelial papilar. Nota-se nas imagens de coloração Picrossírius uma marcação mais intensa mostrando maior número de fibras de colágeno dos grupos BPA (Figura 15D), E2 (Figura 15G) e CO (Figura 15J). Na segunda coluna (Figura 15B, 15E, 15H e 15K) observa-se a imunoeexpressão para macrófagos inespecíficos F4-80 na região estromal e na região intraepitelial. Na terceira coluna (Figura 15C, 15F, 15I e 15L) estão as imagens de imunoeexpressão para  $\alpha$ -SMA demonstrando a camada muscular lisa ao redor dos alvéolos.



**Figura 16:** Análise do peso relativo da próstata de fêmeas de gerbilo multiplicado pelos diferentes compartimentos. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Barras indicam diferença estatística entre grupos,  $n=5$ . Estatística: *one-way* ANOVA (\*  $p \leq 0.05$ ). Fonte: elaborado pela autora.

Na figura 16 são apresentados os gráficos do peso relativo prostático multiplicado pelos diferentes compartimentos que compõem a próstata: epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular. Nota-se uma diferença significativa nos

compartimentos lúmen e estroma não muscular do grupo E2 em relação aos grupos CA e BPA.



**Figura 17:** Dados referentes as alterações morfológicas e lesões prostáticas pela área da próstata de fêmeas de gerbilo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Estatística: *one-way* ANOVA. Fonte: elaborado pela autora.

Na figura 17 são apresentados os gráficos referentes a relação entre as alterações morfológicas e lesões prostáticas das fêmeas de gerbilo pela área da próstata. Nota-se a presença de células claras em todos os grupos, sendo essa que células claras são frequentes na próstata de fêmeas de gerbilo. Alterações morfológicas como atipia epitelial planar não foram encontradas no grupo BPA enquanto que atipia epitelial papilar foi observada em todos os grupos. Não houve ocorrência de hiperplasia prostática benigna no grupo CO. Os focos inflamatórios intraluminais e periglandular estão presentes nos grupos BPA e CO. Não houve diferença significativa, porém, observa-se um aumento de lesões como LGPIN, HGPIN e PIN total no grupo E2 em relação os grupos CA, BPA e CO.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da administração de doses ambientais de BPA e E2 na fase perinatal da próstata de fêmeas de gerbilo. O tratamento teve duração de 38 dias, com doses diárias através de gavagem de BPA e de E2 três vezes por semana.

Nas análises biométricas, o peso corpóreo não sofreu alterações significativas, enquanto que o peso uretra+próstata e peso relativo (relação peso uretra+próstata/peso corpóreo) demonstraram alterações entre os grupos BPA e E2. Estes dados corroboram com FALLEIROS-JÚNIOR et al (2016) que demonstraram aumento do peso do complexo prostático e do peso relativo na porção ventral de machos adultos de gerbilo após tratamento pós-natal com etinilestradiol das fêmeas em lactação.

As análises esterológica e morfométrica do epitélio e da camada muscular lisa não apresentaram alterações significativas.

Como pôde ser observado nas fotomicrografias das colorações Picrossírius e Reticulina de Gomori, houve alterações no arranjo de fibras de colágeno e reticulares nos grupos tratados. A reorganização das fibras de colágeno e o aumento do suprimento sanguíneo estão relacionados a lesões neoplásicas. Esses fatores controlam o microambiente estromal para a progressão de neoplasias ou supressão do tumor. FALLEIROS-JÚNIOR et al. (2016) demonstraram que o uso de etinilestradiol promoveu mudanças no modelo de fibras de colágeno e reticulares, aumentando a espessura da camada muscular lisa na porção ventral da próstata de gerbilos machos. Além disso, a administração de estradiol em machos pós castração aumentou a densidade e espessura de fibras de colágeno no estroma do lobo ventral da próstata (SCARANO et al., 2008). Outro estudo realizado por PEREZ et al (2016a) ressaltou que a exposição de etinilestradiol em momentos críticos do desenvolvimento alterou a interação epitélio-estroma e contribuiu para o surgimento de lesões proliferativas como PINs em fêmeas de gerbilo senis (12 meses).

Houve incidência de células claras em todos os grupos (CA: 40%, BPA: 80%, E2:100% e CO: 100%). GUERRA et al. (2019) descreveram que o uso de óleo de milho interferiu na população de células claras em gerbilo machos o que ratifica a diferença do número de células no grupo CO (100%) em relação ao grupo CA (40%). Segundo FRAUENHOFFER et al. (2016), a presença de células claras na próstata em humanos está relacionada com a HPB.

A incidência de alterações morfológicas como atipia epitelial papilar (CA: 40%, BPA: 40%, E2: 60% e CO:40%) foi observada em todos os grupos enquanto que a atipia epitelial planar não foi encontrada somente no grupo BPA (CA:40%, BPA: 0%, E2:40% e CO:60%). Assim, a atipia epitelial papilar e a atipia epitelial planar parecem ser uma característica da espécie estudada como foi observado em estudo de GUERRA et al. (2019) que descreveram que padrões como atipia epitelial papilar e planar são alterações morfológicas peculiares de gerbilo, uma espécie menos estudada que camundongos e outros roedores.

Em análises qualitativas das imagens das fotomicrografias, observou-se alterações morfológicas tais como inflamação intraluminal e periglandular nos grupos tratados com BPA (100%), E2(20%) e CO (80%) em relação ao grupo CA (0%). A HPB teve maior incidência no grupo BPA (80%) em relação aos grupos CA (40%), E2(40%) e CO (20%). Estes dados corroboram com CAMPOS et al. (2015) que demonstraram em estudo que o uso de BPA em idade pré-puberdade provoca focos inflamatórios e lesões como hiperplasia em próstatas de fêmeas adultas. GONÇALVES et al. (2010) verificaram em análises morfológicas a presença de lesões pré-neoplásicas e focos inflamatórios intraluminais da próstata de machos de gerbilo no grupo óleo. Os autores atribuíram a presença de lesões pré-neoplásicas ao microambiente inflamatório glandular.

Os resultados observados neste estudo, revelaram a presença de lesões PIN nos grupos BPA, E2 e CO com incidência significativa para os grupos E2 (60%) e CO (60%) o que corrobora com estudo de PEREZ et al., (2016b) que verificaram que o uso de etinilestradiol entre o 18º e 21º dia de gestação provoca alterações morfológicas nas próstatas das fêmeas das ninhadas como PIN. Em estudo realizado por SANTOS et al., (2006) o uso de ciproionato de testosterona durante 21 dias pós-natal, demonstrou aumento na proliferação celular, aumento da área luminal e glandular associados à elevação da atividade secretora. Nessas condições foi constatado aumento no número de lesões PIN.

A presença de PIN também pode ser relacionada à reprogramação epigenética causada pelo BPA administrado no período perinatal. WONG (2015) descreveu o aumento de secretoglobulina em ratos adultos tratados com BPA, uma das três subunidades da prostateína, principal proteína secretada no fluido prostático de ratos, relacionada com processos inflamatórios, tumorigênese e reparação tecidual. A prostateína se liga a esteroides para estabelecer um alto nível de andrógeno no lúmen dos alvéolos de próstatas normais. Outro fator encontrado pelo autor, foi a presença de PIN nas análises morfológicas. Nesse estudo foi encontrado um aumento na expressão de

secretoglobulina em ratos adultos o que implica numa reprogramação epigenética devido a exposição ao BPA em período neonatal.

SANTOS E TABOGA (2006) demonstraram que a espécie gerbilo da Mongólia tem propensão à formação de lesões prostáticas devido a aumento fisiológico de testosterona na gestação das fêmeas. Além disso, SANCHES et al (2019) constataram que a próstata de fêmeas de gerbilo sofre alterações hormonais durante o ciclo estral e na gestação, por influência da progesterona, tornando-se mais susceptível a lesões benignas se comparadas às dos machos da mesma espécie.

TAKAHASHI e OISHI (2000) observaram que a concentração na corrente sanguínea de BPA administrada para as mães diminuiu 50 vezes no feto, presumindo que o efeito da absorção de BPA no feto é menor que aplicada a mãe. Assim, as alterações morfológicas observadas no presente estudo podem estar relacionadas com a idade das fêmeas de gerbilo analisadas (idade adulta) o que corrobora com o estudo de CUSTÓDIO et al., (2010) onde a presença de alterações morfológicas nas próstatas das fêmeas foi observada no grupo adulto (120 dias) e maior incidência no grupo senil (546 dias), comparados ao grupo jovem (30 dias). Além desse efeito na diminuição da concentração de BPA na corrente sanguínea dos fetos, RODRIGUEZ et al., 2015 concluíram que o efeito das lesões na próstata das fêmeas de gerbilo deve ser mais leve, pois a absorção de BPA pelos fetos é menor que a concentração aplicada nas mães.

Estudos realizados com aplicações de BPA e  $17\beta$  estradiol em fêmeas de gerbilo no período gestacional também demonstraram alterações morfológicas em outros tecidos. LEONEL et al. (2017) verificaram que baixas doses de BPA (50  $\mu$ g/kg) aplicadas em fêmeas durante a gestação e a lactação promovem alterações morfológicas em mamas das fêmeas adultas das ninhadas. Entre as alterações foram encontradas presença de leucócitos no lúmen, hiperplasia e inflamação. A presença de leucócitos no lúmen da glândula mamária está relacionada com um mecanismo de controle do ambiente tumorigênico.

Em relação a análise do peso relativo da próstata de fêmeas de gerbilo multiplicado pelos diferentes compartimentos, houve aumento significativo do lúmen e do compartimento estroma não muscular (colágeno e vasos sanguíneos) no grupo E2 em relação aos grupos CA e BPA. Este dado se relaciona ao fato de que o peso relativo (peso próstata+uretra/peso corpóreo) no grupo E2 é maior em relação aos outros grupos (CA e BPA), o que ratifica com estudo realizado por FALLEIROS-JÚNIOR et al. (2016) onde o peso relativo do lobo ventral da próstata e peso do complexo prostático de machos de

gerbilo da ninhada aumentou com uso de etinilestradiol das fêmeas no período de lactação.

A presença de macrófagos inespecíficos, como foi observado pela imunoeexpressão de macrófago F4-80, pode estar relacionada à tumores malignos. BUCANA et al (1992) determinaram o padrão de TAM (macrófagos associados a tumores) em diversas neoplasias humanas e em roedores através de análises imunohistoquímicas com diferentes anticorpos, utilizando inclusive o anticorpo F4-80. Segundo YANG et al. (2018) os macrófagos associados ao tumor (TAM) são abundantes em vários tipos de câncer e promovem a angiogênese tumoral, suprimem o mecanismo de imunidade tumoral e auxiliam no mecanismo de escape de células tumorais para a circulação sanguínea.

A próstata feminina é responsiva a desreguladores endócrinos ambientais com uma remodelação de componentes glandulares como estratificação epitelial e remodelação estromal, e ativação ou modulação de vias de sinalização pró-neoplásicas e inflamatórias. Esses dados reforçam a importância de se incluir a próstata feminina como um componente funcional ativo do trato genital feminino e maior atenção clínica lhe deve ser atribuída.

## 7. CONCLUSÃO

As análises qualitativas realizadas nesse estudo demonstraram que os grupos tratados com BPA e  $17\beta$  estradiol apresentaram alterações morfológicas e lesões pré-neoplásicas nas próstatas de fêmeas de gerbilo. Além disso, foi demonstrada a ação inflamatória do BPA e tumorigênica do E2. Assim, o uso de BPA e  $17\beta$  estradiol no período gestacional e lactação, mesmo em doses consideradas seguras, promovem alterações na morfogênese prostática das fêmeas, bem como na homeostasia da glândula na fase adulta.

Diante das alterações morfológicas e lesões pré-neoplásicas em próstatas de fêmeas de gerbilo encontradas neste estudo e a homologia da próstata da fêmea de gerbilo com a próstata da fêmea em humanos, conclui-se pela importância da realização de estudos sobre a presença de alterações dessa glândula em mulheres e a revisão das doses seguras de disruptores endócrinos, considerando-se que a próstata da fêmea é mais sensível a esses compostos se comparada às dos machos.

## REFERÊNCIAS

ACCONCIA, F; MARINO, M. Steroid hormones: synthesis, secretion e transport. In: BELFIORE, A.; LeROITH, D. Principles of Endocrinology and Hormone Action. **Endocrinology**. Springer, Cham, 43-72, 2018.

BERNARDO, P.E. et al. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 74(1):1 – 11, 2015.

BUCANA, C. D. et. al. Different patterns of macrophage infiltration into Allogeneic-murine and Xenogeneic-human growing in Nude Mice. **American Journal of Pathology**, 141, 5, 1225-1236, 1992.

CAMPOS, M. S. et al. Prepubertal exposure to bisphenol-A induces ER $\alpha$  upregulation and hyperplasia in adult female prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, 96, 188-195, 2015.

CAMPOS, S. G. et al. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **International Journal of Experimental Pathology**, 89, 13–24, 2008.

CAMPOS, S.G. et al. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads in acquisition of androgen insensitivity. **International Journal of Experimental Pathology**, 91, 394-407, 2010.

COSTA, T. C.M.; CURY, P.M.; CUSTÓDIO, A.M.G. Features of the female prostate according to age: an autopsy study. **Jornal Brasileiro de. Patologia e Medicina Laboratorial**, 52(4), 246-252, 2016.

CUSTÓDIO, A.M.G.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. **Cell Biology International**, 28(5): 335-44, 2004.

CUSTÓDIO, A. M. G. et al. Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands). **International Journal of Experimental Pathology**, 91(2), 132–143, 2010.

DAYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picrossirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers. **Histochemistry**, 93, 27-29, 1989.

DONJACOUR, A.A., THOMSON, A.A. , CUNHA, G. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. **Developmental Biology**, 261: 39-54, 2003.

FALLEIROS-JÚNIOR, L.R. et al. Neonatal exposure to ethinylestradiol increases ventral prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils. **International Journal Experimental Pathology**, 97, 380-388, 2016.

FOCHI, R. A. et al. Hormonal oscillation during the estrous cycle influence the morphophysiology of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). **Biology of Reproduction**, 79, 1084-1091, 2008.

FRAUENHOFFER, E. et al. Clear Cell Cribriform Hyperplasia of the prostate: Immunohistochemical and DNA flow cytometric study. **Anatomic Pathology**, 95(4), 446-453, 2016.

GIULIVO, M. et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproduce system, metabolic syndrome and breast cancer. A review. **Environmental Research**, 151, 251–264, 2016

GONÇALVES, B.F. et al. Dual action of high estradiol doses on MNU-induced prostate neoplasms in a rodent model with high serum testosterone: protective effect and emergence of unstable epithelial microenvironment. **The prostate**, 77, 970-983, 2017.

GONÇALVES, B. F. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potencial invasiveness mediated by extracellular matrix componentes. **Experimental and Molecular Pathology**, 88, 96-106, 2010.

GUERRA, L. H. A. et al. Do mineral and corn oil serve as potential endocrine disruptors in the gerbilo prostate? **Reproductive Toxicology** . 90, 141–149, 2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer - BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em : <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.

JALAL, N. et al. Bisphenol A (BPA) the mighty and mutagenic. **Toxicology Reports**, 5, 76-84, 2018.

JENG, H.A. Exposure to endocrine disruption chemicals and male reproduction health. **Frontiers in**, 55(2), 1-12, 2014.

KANG, WB et al. Osteoprotective effect of combination therapy of low-dose oestradiol with G15, a specific antagonist of GPR30/GPER in ovariectomy-induced osteoporotic rats. **Journal Steroid of Biochemistry and Molecular Biology**, 154:237-44., 2015.

KUIPER, G.G. et al. Interaction of estrogen chemicals and phytoestrogen with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, (10):4252-63, 1998.

LATTOUF, R. et al. Picrossirius Red Staining: A useful toll to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62(10), 751-758, 2014.

LEE C. et al., Prostatic Ductal System in Rats: Regional Variation in Morphological and Functional Activities. **Biology of Reproduction**., 6 . 43, 1079-108, 1990.

LEONEL, ECR. Efeitos da exposição ao bisfenol A e ao 17- $\beta$  estradiol sobre a glândula mamária de fêmeas adultas do gerbilo da Mongólia. (Doutorado em Biologia Animal). UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, p. 1-150, 2017.

LIMA et al. Bisphenol-A promotes antiproliferative effects during neonatal prostate development in male and female gerbils. **Reproductive Toxicology**, 58: 238-245, 2015.

MCPHERSON, S. J., ELLEM, S.J., RISBRIDGER, G.P. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**. 76(6):660-70, 2008.

MELLO NETO, J. S. et al.. The effects of high doses of nandrolone decanoate and exercise on prostate microvasculature of adult and older rats. **Life Sciences**, 121, 16-21, 2015.

METZ, M. C. Bisphenol A: Understanding the controversy. **Workplace Health & Safety**. 26-36, 2016.

MOALEM, S.; REIDENBERG, J. S. Does female ejaculation serve an antimicrobial purpose? **Medical Hypotheses**. 73, 1069-1071, 2009.

MUTO, M. et al. Skene's gland adenocarcinoma with intestinal differentiation: A case report and literature review. **Pathology International**, 1-5, 2017.

NELSON, D. & COX, M. Princípios de bioquímica de Lehninger, 6<sup>a</sup>ed., Porto Alegre, 2013.

PEREZ et al. Prenatal exposure to ethinylestradiol alters the morphologic patterns and increases the predisposition for prostatic lesions in male and female gerbils during ageing. **International Journal Experimental Pathology**, 97, 5-17, 2016a.

PEREZ et al.. Pubertal Exposure to Ethinylestradiol Promotes Different Effects on the Morphology of the Prostate of the Male and Female Gerbil During Ageing. **Environmental Toxicology**, 2016b.

PIERARD, G. E. Sirius Red Polarization Method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. **Matrix**, v.9, 68-71, 1989.

PINHEIRO, P.F.F. et al. Structure of the pelvic and penile urethra – relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Journal Anatomy**, 202, 431-444, 2003.

PINTO, M. E. et al. Exposure of young rats to high estrogen doses leads to degeneration of elongated spermatids. **Tissue and Cell**, 40(1), 31-42, 2008.

POWELL, I.J. e MEYNSKES JR, F.L. African American men and hereditary/familial prostate cancer: Intermediate-risk population: chemoprevention trials. **Urology**, 57, 178-181, 2001.

PRINS, G.S. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. **Endocrinology**, vol. 130, nº 6, pág. 3703-3714, 1992.

PRINS, G.S.. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocrine-Related Cancer** 2008 Sep;15(3):649-56, 2008.

PRINS, G.S. e PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **International Society of Differentiation**, 76(6): 641-659, 2008.

REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C.; VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.817-822, 2006.

RICHTER, C.A. et al. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, 24 (2): 199-224, 2007.

ROCHEL-MAIA, S. S. Modulação androgênica das metaloproteínas e dos receptores de estrógeno na próstata masculina e feminina de gerbils. (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1-103, 2010.

RODRÍGUEZ, D. A. O. et al. Intrauterine Exposure to Bisphenol A Promotes Different Effects in Both Neonatal and Adult Prostate of Male and Female Gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Environmental Toxicology**, 2015.

ROSS e PAWLINA. Histology - A Text and Atlas: with correlated cell and molecular biology 6<sup>a</sup> ed., 2001.

SADLER, T.W. LANGMAN: Embriologia Médica. Editora Guanabara Koogan, 13<sup>a</sup> ed., 2016.

SANCHES, B. et al. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in Mongolian gerbil. **Microscopy research and technique** 77:458-466, 2014.

SANCHES, B. et al. Postnatal Development of Mongolian Gerbil Female Prostate: An Immunohistochemical and 3D Modeling Study. **Microscopy research and technique** 79:438-446, 2016a.

SANCHES, B. et al. The Expression of the Androgen Receptor and Estrogen Receptor 1 is Related to Sex Dimorphism in the Gerbil Prostate Development. **The anatomical record** 299:1130-1139, 2016b.

SANCHES, B. et al. Intrauterine exposure to 17 $\beta$ -oestradiol (E2) impairs postnatal development in both female and male prostate in gerbil. **Reproductive Toxicology**. 73, 30-40, 2017.

SANCHES, B. et al. Differences between males and females prostates in terms physiology, sensitivity to chemicals and pathogenesis – A review in a rodent model. **Cell. Biology International**, 2019.

SANTOS, F.C.A. et al. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Tissue & Cell**. 35, 447-457, 2003.

SANTOS, F.C.A. e TABOGA, S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Animal Reproduction**, 3(1): 3-18, 2006.

SANTOS, F.C.A. et al. Testosterone Stimulates Growth and Secretory Activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Biology of Reproduction**, 75,370-379, 2006.

SCARANO, R. W. et al. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodeling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. **International Journal Experimental Pathology**, 25-37, 2008.

SHAPPELL, S.B. et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee *Cancer Res.* **Cancer Research**, 15, 2270-2305, 2004.

SCHONFELDER G. et al. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. **Environmental Health Perspect**, 110: 703-707, 2002.

SWANSON, S.M., CHRISTOV, K. Estradiol and progesterone can prevent rat mammary cancer when administered concomitantly with carcinogen but do not modify surviving tumor histology, estrogen receptor alpha status or Ha-ras mutation frequency. **Anticancer Research**, 23(4), 3207-3213, 2003.

TABOGA S.R. et al. Ultrastructural characterization of the prostate secretory cells: a comparative study between the male and female organs. In Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Águas de Lindóia, Brasil, **Brazilian Society of Anatomy, Suppl C**, pp.205, 2001.

TOVAINEN R. e SHEN M.M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**. 144(8): 1382-1398, 2017.

VANDENBERG, L.N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-doses effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, 33(3), 378-455, 2012.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for the morphometrics study of the lung and the other organs. **Laboratory Investigate; a journal of a technical and methods and pathology**, 12: 131-155, 1963.

WEINBERGER, B. et al. Effects of maternal exposure to phthalates and bisphenol A during pregnancy on gestacional age, **Journal Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, 27(4), 323–327., 2014.

WETHERILL Y. B. et al. *In vitro* molecular mechanisms in bisphenol A action. **Reproductive toxicology**, 24, 178-198, 2007.

WONG et al. Identification of secretoglobin Scgb2a1 as a target for developmental reprogramming by BPA in the rat prostate. **Epigenetics**, 10(2), 127-134, 2015.

YANG, M. et al. Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments. **American Association for Cancer Research**. 78(19), OF1-OF12, 2018.

ZANATELLI, M. et al. Actions of estradiol and progesterone on the prostate in female gerbils: reversal of the histological effects of castration. **Reproduction, Fertility and Development**, 26, 540-550, 2014.

ZANATELLI, M. et al. Ovariectomy increases the phenotypic plasticity of the female prostate epithelium in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, A-L, 2016.

ZAVIAČIČ M. Update on the female prostate and the phenomenon of female ejaculation. **Journal of Sex Research**, 30, 148-151, 1993.

ZAVIAČIČ M. The female prostate: from vestigial Skene´s parauretral glands and ducts to women´s functional prostate. Bratislava, Slovakia: **Slovack Academic Press**, 171pp, 1999.

ZAVIAČIČ M, JAKUBOVSKÁ V, BELOŠOVIČ J, BREZA J. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland ( Skene`s gland). **Anatomy and Embriology (Berl)**, 201, 51-61, 2000a.

ZAVIAČIČ M.; ABLIN, RJ. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term “prostate” in the human female. **Histology & Histopathology** , 15:131-142, 2000b.