

Potencial quimioprotetor do DIM (3,3'-Di-indolil-metano) e da
Genisteína em linhagens de células tumorais prostáticas humanas
LNCaP e PC-3 expostas ao Bisfenol A

Cristiane Figueiredo Pinho

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.

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Co-orientadora: Flávia Karina Dellela

**Botucatu – SP
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Potencial quimioprotetor do DIM (3,3'-Di-indolil-metano) e da
Genisteína em linhagens de células tumorais prostáticas humanas
LNCaP e PC-3 expostas ao Bisfenol A

Cristiane Figueiredo Pinho

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.

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Co-orientadora: Flávia Karina Dellela

**Botucatu – SP
2015**

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

Pinho, Cristiane Figueiredo.

Potencial quimioprotetor do DIM (3,3'-Di-indolil-metano) e da Genisteína em linhagens de células tumorais prostáticas humanas LNCaP e PC-3 expostas ao Bisfenol A / Cristiane Figueiredo Pinho. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Co-orientadora: Flávia Karina Dellela

Capes: 20601000

1. Células cancerosas. 2. Próstata - Câncer. 3. Genisteína. 4. Estrogênios.

Palavras-chave: Bisfenol A; Células tumorais prostáticas ; DIM (3,3'-Di-indolil-metano); Genisteína; Quimioproteção.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a
minha família, de onde veio
todo o estímulo para que eu
lutassem por meus sonhos. O
amor de vocês me guia por
onde eu for.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Luis e Maria Inêz, por toda a dedicação e esforço em prol da minha formação. O desejo de que sintam por mim, metade do orgulho que sinto por vocês, é o que me move!

As minhas irmãs, Andréia e Simone, por toda a proteção e amor destinados a essa caçula.

Ao meu namorado, Rafael, pelos sonhos cada vez maiores que desperta em mim.

A Teka, pela companhia, amor e cumplicidade.

Às amigas de infância, Bárbara, Beatriz, Laís e Renata, por todos esses anos de incentivo, carinho e compreensão.

À Profa. Soraia, que fez brotar em mim o amor pela Biologia, no Ensino Médio.

Aos meus irmãos de faculdade, Laís, Marcela, Marcelo, Muriel, Renan e Viviane, por se fazerem tão presentes em minha vida, me encorajarem e divertirem sempre.

À parceira sem igual, Isabella, pela amizade e torcida pelo meu sucesso.

Aos amigos, Amanda, Ana Carolina, André, Carla, Juliana, Larissa, Marina e Mayara, por todo o apoio e momentos incríveis que dividimos nesses anos de estudo.

Aos queridos colegas de laboratório, André, Bianca, Joyce, Leonardo, Letícia, Livia, Lucas, Mariana e Talita pela cooperação e momentos de descontração, capazes de tornar o ambiente de trabalho tão saudável.

Aos amigos de departamento, Bruno, José Eduardo e Warlen, fontes cotidianas de ajuda, ensinamentos e risadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, que eu sigo desde a minha primeira Iniciação Científica, pelos ensinamentos, companheirismo e, principalmente, confiança depositada em mim.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Flávia Karina Delella, por toda a atenção, por me apresentar o mundo novo da Cultura Celular e, acima de tudo, pelas prazerosas conversas de corredor sobre nossa paixão em comum por cachorros, sempre capazes de aquecer meu coração!

Aos docentes e funcionários da UNESP – Botucatu, que contribuíram para minha formação até aqui e me motivaram, muitas vezes sem saber, a ser a melhor profissional possível.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, pela estrutura indispensável à realização desta pesquisa.

Por fim, a Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro, processo 2013/05038-6.

***"Somente quem caminha sabe
o valor, o tamanho e a conquista
de que é feita a história
de cada único passo."***

(Ana Jácomo)

RESUMO

A Iniciação e Progressão das neoplasias prostáticas apresentam base hormonal, onde se destacam as alterações envolvendo estrógenos e andrógenos inerentes ao processo de envelhecimento, com incremento dos níveis estrogênicos em relação aos androgênicos. O Bisfenol A (BPA) é o xenoestrógeno mais estudado na atualidade e sua atividade estrogênica tem despertado interesse devido à ampla dispersão do composto no meio ambiente. Assim sendo, o BPA poderia contribuir para o aumento da incidência, agressividade e capacidade metastática dos tumores prostáticos. Por outro lado, a quimioproteção com os fitoquímicos dietéticos está associada à redução na incidência e na progressão de diferentes neoplasias, diminuição de processos inflamatórios e estresse oxidativo ocasionados por substâncias potencialmente nocivas. Desta forma, este estudo objetivou avaliar os efeitos dos fitoquímicos 3,3'-Di-indolil-metano (DIM) e Genisteína (Gen) isolados e/ou associados em células tumorais prostáticas humanas expostas ao BPA. Para tanto, as linhagens LNCaP e PC-3 foram cultivadas e submetidas, por 96h, aos tratamentos **C** (controle), **B** (BPA 10nM/L), **BD** (BPA 10nM/L + DIM 25µM/L), **BG** (BPA 10nM/L + Gen 25µM/L) e **BDG** (BPA 10nM/L + DIM 25µM/L + Gen 25µM/L); cujas doses foram estabelecidas pelo ensaio de viabilidade celular. Posteriormente, foi realizado *Western Blotting* para estudo das proteínas envolvidas com processos de sobrevivência, proliferação, morte celular, modulação hormonal e estresse oxidativo. A análise dos resultados mostrou que os tratamentos **BD**, **BG** e **BDG**, na linhagem LNCaP, apresentaram capacidade de sub-regular a expressão de AR. Acerca das proteínas ERK1/2 em PC-3, **B** provocou um aumento de expressão, enquanto **BDG** ocasionou uma diminuição. Já na linhagem LNCaP, a redução da expressão desta MAPK ficou por conta do tratamento **BG**. Para as proteínas JNK1/2, verificou-se a capacidade de **B** sub-regular a expressão e, em contrapartida, dos 3 tratamentos fitoquímicos (**BD**, **BG** e **BDG**), a aumentarem em LNCaP. Para a mesma linhagem celular, a expressão de ERα se apresentou aumentada em **B**, quadro revertido pelos tratamentos **BG** e **BDG**. As células LNCaP tratadas com DIM (**BD** e **BDG**) exibiram uma regulação aumentada da proteína pró-apoptótica PAR4. Para a proteína SIRT1, o tratamento **B** foi capaz de provocar um aumento de expressão nas duas linhagens celulares. Em contrapartida, **BD**, **BG** e **BDG** reduziram a expressão proteica, para a linhagem LNCaP, assim como **BDG**, para PC-3. Em geral, foram observados efeitos moduladores de BPA e dos fitoquímicos DIM e Gen sobre a expressão de proteínas envolvidas com processos celulares importantes do desenvolvimento da neoplasia prostática, com destaque para aumento da agressividade tumoral por parte da exposição ao BPA e para o fato de que, o tratamento em conjunto (**BDG**) foi, por vezes, capaz de alcançar respostas celulares quimioprotetoras não obtidas em monoterapia, com possível incremento da eficácia antitumoral dos compostos.

Palavras-chave: Bisfenol A, Células tumorais prostáticas, DIM (3,3'-Di-indolil-metano), Genisteína, Quimioproteção.

ABSTRACT

The prostate cancer initiation and progression present hormonal basis and this is mainly related to changes involving estrogens and androgens inherent aging process, where there is an increment of estrogens levels relative to androgens. Nowadays, Bisphenol A (BPA) is the most studied xenoestrogen and its estrogenic activity has attracted attention for its wide dispersion in the environment. Thus, this compound could contribute to the increased incidence, aggressiveness and metastatic ability of prostate tumors. Moreover, the chemoprotection with dietary phytochemicals is associated with a reduction in the incidence and progression of different cancers, decrease inflammatory processes and oxidative stress caused by potentially harmful substances. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of phytochemicals 3,3'-Di-indolyl-methane (DIM) and Genistein (Gen) isolated and/or associated to prostatic tumor cells exposed to BPA. For this purpose, LNCaP and PC-3 cells were cultured and exposed, for 96 hours, to the treatments **C** (control), **B** (BPA10nM/L), **BD** (BPA 10nM/L + DIM 25μM/L), **BG** (BPA 10nM/L + Gen 25μM/L) e **BDG** (BPA 10nM/L + DIM 25μM/L + Gen 25μM/L); which doses were established by cell viability assay. Subsequently, the cells were subjected to protein extraction for Western Blotting in order to analyze proteins involved in survival, proliferation, cell death, hormonal modulation and oxidative stress processes. The results showed that **BD**, **BG** and **BDG** treatments, in LNCaP cells, were able to down-regulate AR expression. About the ERK1/2 proteins in PC-3 lineage, **B** caused an increase of expression, while **BDG** was responsible for a decrease. However, in LNCaP, reducing the expression of MAPK was due to **BG** treatment. For the JNK1/2 protein, **B** had ability to down-regulate its expression and, on the other hand, phytochemicals from 3 treatments (**BD**, **BG** and **BDG**), increasing its expression in LNCaP. For the same cell lineage, the ERα expression appeared increased in **B**, which was reversed by **BG** and **BDG** treatments. LNCaP cells treated with DIM (**BD** and **BDG**) exhibited an up-regulation of pro-apoptotic protein PAR4. For SIRT1 protein, **B** treatment was able to causing increased expression in both cell lines. In contrast, **BD**, **BG** and **BDG** reduced protein expression, in LNCaP, as well as **BDG**, in PC-3. In general, we observed modulators effects by BPA and the phytochemicals, DIM and Gen, on the expression of proteins involved in important cellular processes of Prostate Cancer development, with emphasis to the increased tumor aggressiveness by the exposure to BPA and to the fact that the conjunct treatment (**BDG**), sometimes, was able to achieve chemoprotective cell responses were not obtained in monotherapy, with potential increase in the antitumor efficacy of the compounds.

Keywords: Bisphenol A, Prostatic tumor cells, DIM (3,3'-Di-indolyl-methane), Genistein, Chemoprotection,.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 <i>A Próstata Humana</i>	8
1.2 <i>O Câncer de Próstata</i>	11
1.3 <i>Desreguladores Endócrinos</i>	16
1.4 <i>Quimioproteção contra o Câncer de Próstata</i>	18
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	24
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 <i>Linhagens Celulares</i>	25
4.2 <i>Análise da Viabilidade Celular</i>	25
4.3 <i>Tratamentos</i>	26
4.4 <i>Western Blotting</i>	27
4.5 <i>Análise Estatística</i>	28
5. RESULTADOS	29
5.1 <i>Viabilidade Celular</i>	29
5.2 <i>Western Blotting</i>	30
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Próstata Humana

A próstata é a maior glândula acessória do sistema genital masculino e está presente, exclusivamente, em mamíferos (Cunha *et al.*, 1987). Nos homens, ela é responsável pela produção, armazenamento e secreção de componentes não celulares do sêmen, assim como manutenção do gradiente iônico e pH adequado do fluido seminal (Untergasser *et al.*, 2005).

A estrutura prostática é constituída de tecido glandular, fibroso e de musculatura lisa, formando um órgão ímpar, localizado na pelve menor, imediatamente inferior à bexiga urinária, posterior à sínfise púbica e anterior ao reto (Drake *et al.*, 2005) (**Figura 1**). Trata-se de uma glândula exócrina, atravessada em toda sua extensão pela uretra prostática (Cunha *et al.*, 1987).

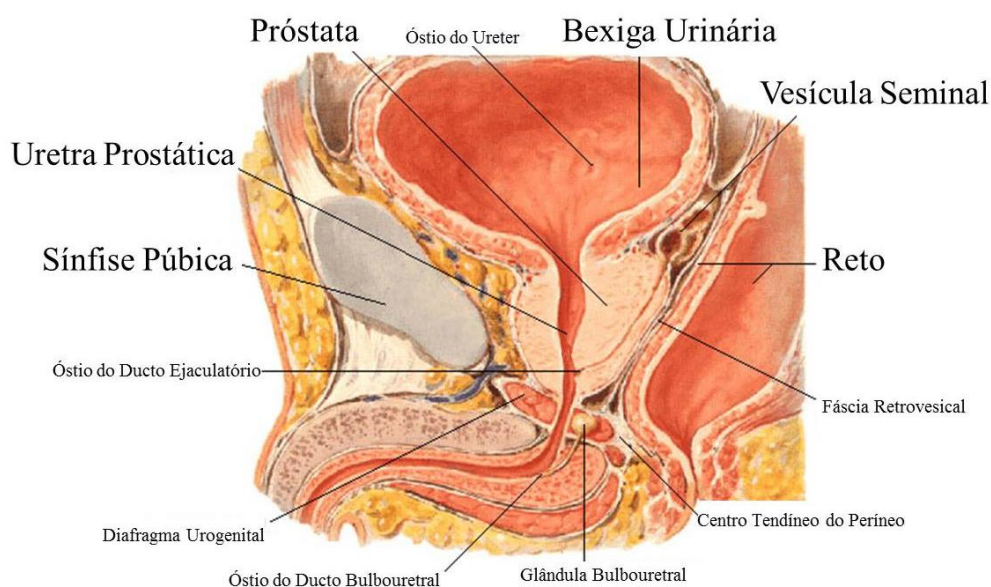


Figura 1: Vista medial da região onde está localizada a próstata.
Adaptado de Netter (2000), Atlas de Anatomia Humana.

A próstata pode ser dividida em três zonas anatômicas, distinguíveis morfologicamente, tendo a uretra como ponto central de referência (McNeal, 1988; Junqueira & Carneiro, 2008). A primeira, denominada zona central, tem cerca de 25% da massa prostática total. A seguir, vem a zona de transição que, apesar de limitada, é a região mais acometida pela hiperplasia prostática benigna e por 25% dos carcinomas. Finalmente, a zona periférica, que ultrapassa 70% do tecido glandular prostático e

representa o local mais frequentemente afetado por lesões pré-neoplásicas e carcinomas nesse órgão (Junqueira & Carneiro, 2008; Lee *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da glândula prostática começa na vida fetal e se completa na maturidade sexual. Sua formação se dá a partir da região pélvica do seio urogenital, estrutura derivada da septação da cloaca na extremidade caudal do intestino primitivo posterior do embrião (Cunha *et al.*, 2004). O seio urogenital aparece, em humanos, por volta da sétima semana gestacional e é composto por uma camada epitelial derivada da endoderme, circundada por mesênquima originado da mesoderme (Marker *et al.*, 2003).

Há, então, crescimento, evaginação e ramificação de brotos celulares sólidos partindo do epitélio do seio urogenital em direção ao tecido conjuntivo mesenquimal circundante, o que ocorre em torno da décima semana de gestação (Cunha *et al.*, 1987; Marker *et al.*, 2003). Interações recíprocas entre o epitélio e mesênquima são estabelecidas durante a embriogênese prostática e desempenham um papel crítico em seu desenvolvimento. Regulado por sinalização parácrina vinda do epitélio, o mesênquima passa por um processo de diferenciação, com aparecimento de camadas de músculo liso e fibroblastos circundando os ductos recém-formados a partir dos brotos epiteliais. Simultaneamente aos eventos de diferenciação do estroma, ocorrem processos de ramificação e canalização dos ductos alveolares e, ainda, proliferação e citodiferenciação epitelial, também via sinalização parácrina, agora advinda do mesênquima sob estímulos hormonais androgênicos (Hayward, Cunha & Dahiya, 1996; Cunha *et al.*, 2004).

Após sua maturação, a próstata humana é constituída por cerca de trinta a cinquenta unidades glandulares túbulo-alveolares ramificadas que se dispõem de forma concêntrica ao redor da uretra prostática, onde desembocam seus ductos (Junqueira & Carneiro, 2008). Sua atividade secretora se dá, principalmente, na região alveolar (Thomson *et al.*, 2002). As unidades secretoras são constituídas de células epiteliais colunares, com núcleo deslocado para o polo basal e organelas deslocadas para o polo apical; células epiteliais basais, que se orientam seguindo a membrana basal e estão envolvidas com o *turnover* epitelial; e células neuroendócrinas (**Figura 2**) (Marker *et al.*, 2003).

O componente estromal da próstata engloba todos os elementos celulares e extracelulares sobre os quais dispõe-se a lâmina basal epitelial. Ele conta com a presença de vasos sanguíneos e linfáticos, células musculares, fibroblastos, células endoteliais, terminações nervosas e células infiltrantes, tais como mastócitos e linfócitos

(Cunha *et al.*, 1987; Feldman & Feldman, 2001; Marker *et al.*, 2003). As células musculares lisas exercem papel contrátil durante a ejaculação e, juntamente com os fibroblastos, são responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular, que mantem um microambiente adequado para as células epiteliais (Vilamaior, Taboga e Carvalho, 2005).

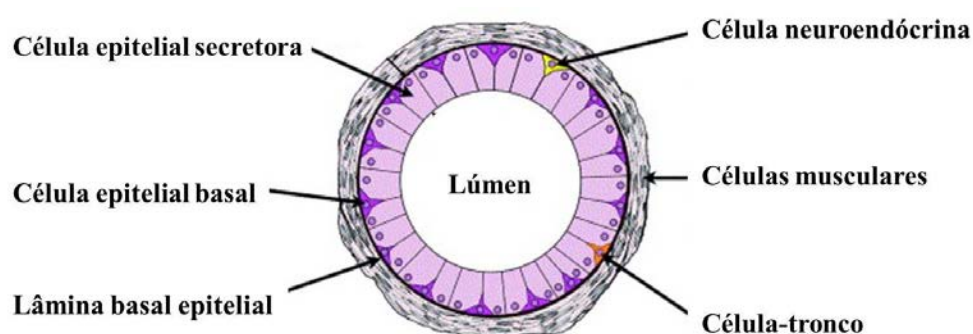


Figura 2: Representação esquemática de um corte histológico da próstata, identificando os tipos celulares presentes na glândula. Adaptado de Marker *et al.*, 2003.

Andrógenos e estrógenos exercem funções importantes tanto na morfogênese, quanto na homeostasia da próstata adulta, regulando epitélio e estroma (Marker *et al.*, 2003). Suas ações são mediadas por receptores específicos, como é o caso do receptor de andrógenos (AR – *Androgen Receptor*) e do receptor de estrógenos (ER – *Estrogen Receptor*) dos subtipos α e β (Yang *et al.*, 2007), com o ER α sendo encontrado, principalmente, em células estromais e o ER β no epitélio (Prins & Korach, 2008). O equilíbrio entre estes dois hormônios é essencial para as atividades de crescimento, proliferação e secreção da glândula (Scarano *et al.*, 2008).

A ação androgênica se dá por meio de um eixo que envolve a síntese de testosterona testicular, o seu transporte via corrente sanguínea até os tecidos-alvo e a sua conversão pela enzima 5 α -redutase, ao metabólito mais ativo 5 α -diidrotestosterona (DHT). A testosterona e a DHT exercem seus efeitos biológicos – como, por exemplo, crescimento e proliferação de células epiteliais prostáticas – através da ligação ao AR, havendo, assim, a indução da atividade de transcrição e resposta desencadeada por genes-alvo (Pienta & Smith, 2005). Na próstata saudável, a taxa de proliferação celular epitelial é de 1% a 2% ao dia, que é equilibrada por uma taxa de morte celular semelhante (Heinlein & Chang, 2004).

1.2 O Câncer de Próstata

Além da clara relevância da próstata para a biologia da reprodução, ela é local de origem de importantes doenças do envelhecimento humano (Ho, 2004; Lee *et al.*, 2011). As desordens prostáticas estão entre as afecções mais incidentes no sexo masculino (Ellem & Risbridger, 2010). São exemplos de doenças comumente encontradas, as prostatites, a hiperplasia prostática benigna e o adenocarcinoma (Ho *et al.*, 1997).

As prostatites consistem em lesões crônicas inflamatórias ocorridas na próstata, de origem infecciosa ou não (Ho *et al.*, 1997). Casos de hiperplasia prostática benigna advêm de um aumento anormal do volume prostático devido ao crescimento do número de suas células – podendo levar à morbidez por conta de obstrução uretral, comprometendo a passagem urinária – sem, no entanto, envolver processos carcinogênicos (Oesterling, 1991), diferentemente do adenocarcinoma prostático. Este, por sua vez, é caracterizado por tumores neoplásicos predominantemente originados de células epiteliais da zona periférica, que podem progredir em direção aos vasos sanguíneos e originar metástases em locais distantes, como nódulos linfáticos e ossos (Mora *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm concentrado esforços para elucidar como os vários fatores responsáveis pelas enfermidades que acometem a próstata somam-se e contribuem para o desenvolvimento de doenças mais severas nesta glândula, como o câncer (Hsing & Devesa, 2001). O câncer de próstata (CaP) é altamente heterogêneo, variando desde formas latentes e assintomáticas da doença até formas tumorais altamente agressivas, indiferenciadas, com altas taxas mitóticas e metastáticas (Mora *et al.*, 2001). Ele permanece como a segunda neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada em homens (INCA, 2014) – se forem levados em conta ambos os sexos, ocupa a quarta posição dentre os cânceres – e totaliza mais de 200 mil óbitos anualmente em todo o mundo (Wang *et al.*, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência desta doença vem aumentando em razão de fatores como: aumento da expectativa de vida – e, conseqüentemente, da proporção de idosos na população; melhoria dos métodos de detecção – através de testes sorológicos de antígeno prostático específico (PSA) em larga escala (Mora *et al.*, 2001); fatores ambientais – estilo de vida, dieta e exposição a agentes carcinogênicos (Prins & Korach, 2008; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009;

Scarano *et al.*, 2009). Além disso, componentes genéticos e étnicos também parecem estar envolvidos com a ocorrência de CaP: homens com casos da doença na família têm risco até 3 vezes maior de a desenvolver (Rittmaster *et al.*, 2009); assim como a população afro-americana apresenta taxas de incidência até 60 vezes maior do que a asiática (Hsing & Devesa, 2001).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 foi de 68,8 mil novos casos de câncer de próstata, ficando atrás apenas das projeções de incidência para o câncer de pele não melanoma (INCA, 2014). Há também estimativas mundiais alarmantes de, aproximadamente, 1,7 milhão de novos casos e 500 mil mortes até o ano de 2030 (Center *et al.*, 2012).

A carcinogênese é um processo biológico complexo, resultante de diversas alterações genéticas e epigenéticas acumulativas que acometem células-alvo, principalmente as de origem epitelial. Tal processo começa com a Iniciação – mutação resultante da exposição celular a um carcinógeno, tornando-a potencialmente capaz de dar origem a um tumor; seguida pela Promoção – expansão clonal das células iniciadas e aparecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas; e Progressão – instalação irreversível da neoplasia com aquisição de malignidade e invasividade (**Figura 3**). Tais etapas contribuem, sequencialmente, para o desenvolvimento do câncer através da interação de fatores endógenos e exógenos (Loeb *et al.*, 2003; Belpomme *et al.*, 2007; Stricker & Kumar, 2010). Esses caminhos são acompanhados pela ativação de proto-oncogenes específicos e inativação de genes supressores de tumor. A maioria desses genes está envolvida com o reparo e manutenção da integridade do DNA, a regulação da proliferação e as vias de manutenção da sobrevivência e morte celular (Safe *et al.*, 2008).

As neoplasias prostáticas apresentam base hormonal para sua Iniciação e Progressão. Estes acontecimentos estão relacionados a alterações envolvendo estrógenos e andrógenos (Taplin & Ho, 2001; Heinlein & Chang, 2004; Ho, 2004), que regulam o crescimento epitelial. Evidências experimentais relatam associação entre a exposição prolongada à testosterona e estradiol, em modelos animais, e a maior ocorrência de adenocarcinoma no lobo prostático dorsolateral dos mesmos (Leav *et al.*, 1989).

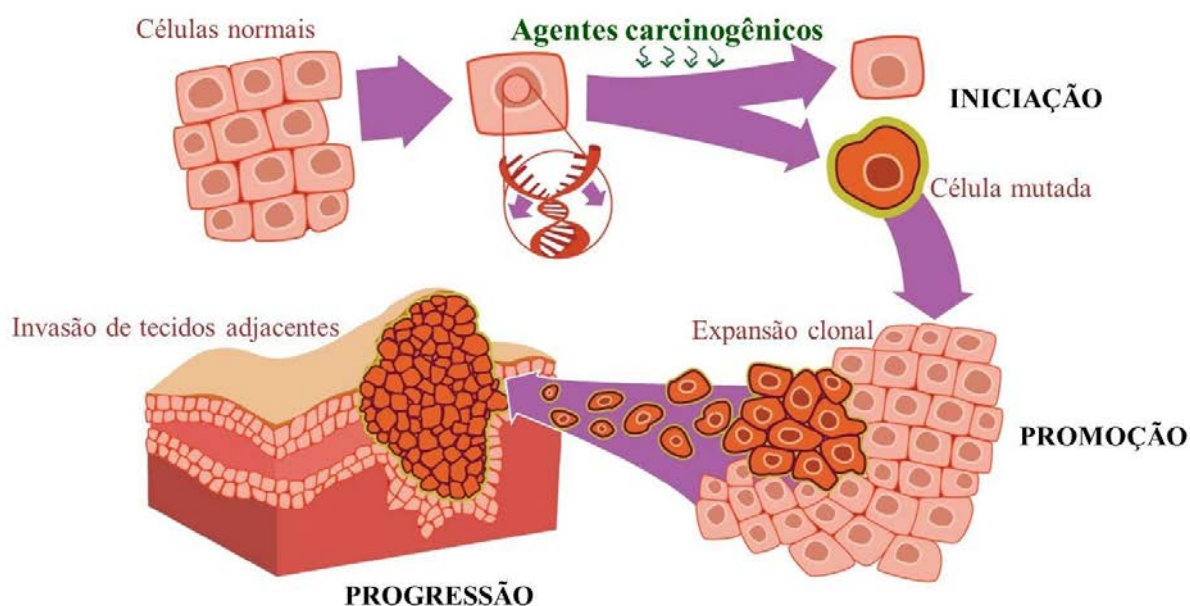


Figura 3: Evolução do processo carcinogênico representando as etapas de Iniciação, Promoção e Progressão tumoral. Adaptado de <http://www.ihoba.com.br> (Instituto de Hematologia e Oncologia da Bahia); fonte: Revista Nova Escola.

Os andrógenos têm papel crucial no processo carcinogênico e o estado funcional do AR é importante mediador da progressão do CaP (Heinlein & Chang, 2004). É a ele que a DHT se liga no citoplasma, sendo translocada para o núcleo e ativando uma série de genes que induzem a síntese de proteínas ligadas à promoção do crescimento celular, inibição da apoptose e estímulo da produção de PSA (Pienta & Smith, 2005).

Aproximadamente 90% dos cânceres de próstata são dependentes de andrógeno em sua fase inicial. Assim sendo, a terapia hormonal – ou de ablação androgênica – é, inicialmente, dirigida para a redução dos níveis séricos de andrógenos e inibição do AR na tentativa de frear o crescimento do CaP (Denis & Griffiths, 2000; Pienta & Smith, 2005).

Por um dado tempo, a terapia funciona e há regressão do câncer dada à baixa taxa de proliferação das células tumorais e aumento da morte celular (Feldman & Feldman, 2001). No entanto, o quadro tende a progredir para um estado hormônio-refratário e a terapia de supressão androgênica não gera mais resultados, embora o AR ainda esteja sendo expresso em 80% dos casos (Kikuchi *et al.*, 2003; Heinlein & Chang, 2004) – o que sugere que as células mantêm uma sinalização de AR funcional (Wen *et al.*, 2000). Isto ocorre porque as células do CaP desenvolvem diferentes estratégias que as permitem se multiplicar mediante concentrações muito baixas de andrógenos – mesmo doses nano-molares produzidas no próprio microambiente tumoral podem estimular AR

com sensibilidade aumentada (Feldman & Feldman, 2001) – ou, até mesmo, mediante mecanismos independente do estímulo da DHT (Pienta & Smith, 2005). Dentre eles, estão mutações que diminuem a especificidade de AR, desencadeando a cascata de respostas não só pela ligação a andrógenos, mas também por moléculas de outras vias de sinalização celular não-androgênicas, como esteroides e antagonistas de andrógenos (Wen *et al.*, 2000; Feldman & Feldman, 2001).

Estudos mostram que as proteínas Akt (*PKB - Protein Kinase B*) e MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinases*) são capazes de regular a via de sinalização do AR pela fosforilação do receptor (**Figura 4**). Elas se ligam especificamente ao AR, ativando-o (Wen *et al.*, 2000; Bhuiyan *et al.*, 2006) e contribuem para sobrevivência e crescimento andrógeno-independente de células cancerosas da próstata (Feldman & Feldman, 2001). Sendo assim, essas proteínas têm sido associadas à progressão do câncer de próstata para o estágio hormônio-refratário (Murillo *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 2003) e consequente resistência à terapia hormonal (Murillo *et al.*, 2001; Heinlein & Chang, 2004).

A proteína Akt desenvolve, também, função antiapoptótica sob condições de estresse celular (Amaravadi & Thompson, 2005). O sinal de sobrevivência envolve fosforilação de proteínas pró-apoptóticas, tais como Bad (*Bcl-2-associated death protein*) e pró-caspase 9 (*pro apoptosis-related cysteine peptidase*), suprimindo sua atividade (Feldman & Feldman, 2001).

As serina-treonina-quinases MAPK congregam um grupo de proteínas envolvidas com os processos de desenvolvimento celular, sendo que as principais são JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e ERK (*Extracellular Signal -Regulated Kinase*). As proteínas JNK (isoformas JNK1 e JNK2) estão envolvidas com a resposta imediata ao estresse celular, promovendo apoptose (Shimada *et al.*, 2003). Sendo assim, em ambientes tumorais prostáticos, a expressão destas proteínas, geralmente, está reduzida (Uzgare *et al.*, 2003). Por outro lado, a ativação das proteínas ERK (ERK1 e ERK2) tem controle sobre processos como ciclo celular, proliferação, diferenciação, senescência, morte celular, migração e adesão (Ramos, 2008 a). Estudos associaram ERK à proliferação epitelial prostática e início de desenvolvimento do câncer (Uzgare *et al.*, 2003); progressão do CaP, envolvendo a ativação de AR (Gioeli *et al.*, 1999), proliferação epitelial prostática descontrolada e mau prognóstico da doença (Uzgare *et al.*, 2003).

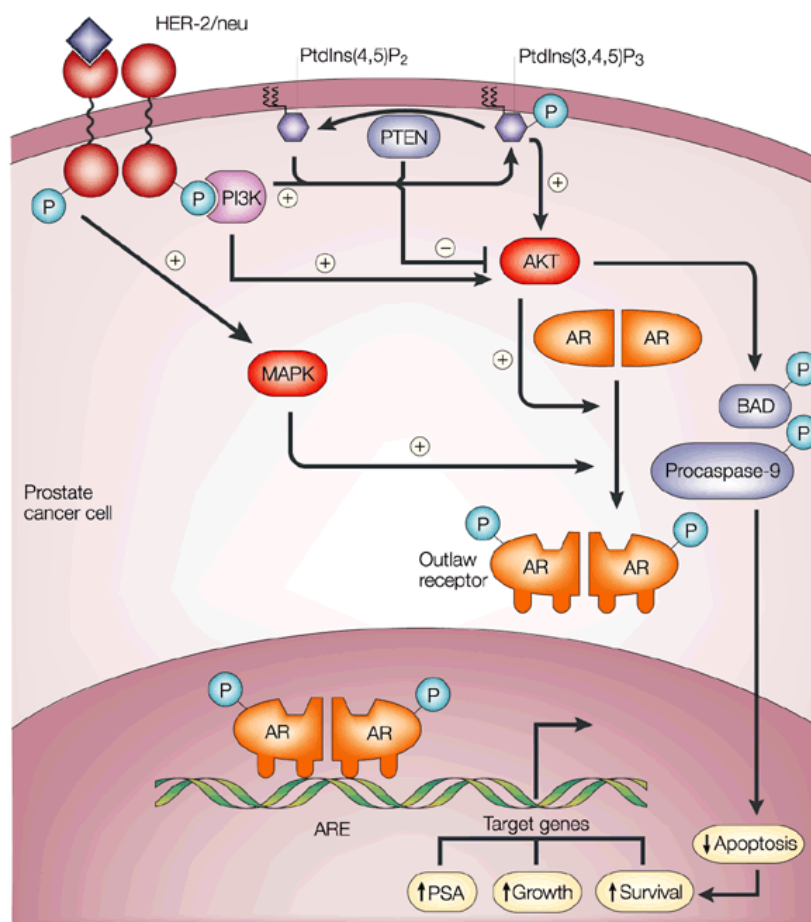


Figura 4: Representação esquemática da via de ativação de receptores de andrógeno “outlaw” em células prostáticas tumorais sem modulação androgênica. As proteínas AKT e MAPK são essenciais para a ativação de vias proliferativas e inibidoras de apoptose. Extraído de Feldman & Feldman, 2001.

Foi recentemente sugerido que a atividade antiapoptótica de outra proteína está envolvida com o processo carcinogênico (Saunders & Verdin, 2007). A SIRT1 (*Silent Information Regulation 1*) tem papel-chave na sobrevivência celular sob estresse genotóxico e oxidativo (Kojima *et al.*, 2008) e foi associada à manutenção das células prostáticas tumorais, seguida de progressão do câncer (Kuzmichev *et al.*, 2005).

Os estrógenos também influenciam o desenvolvimento e progressão de cânceres hormônio-relacionados, exercendo funções biológicas distintas. O receptor do subtipo α (ER α) tem sido associado à proliferação anormal, inflamação e desenvolvimento de malignidade. Já ER β apresenta ações contrárias ao subtipo anterior sobre a proliferação celular, além de efeitos antimigratórios e anti-invasivos sobre células cancerosas (Thomas & Gustafsson, 2011). Estudos demonstraram redução na expressão de ER β durante a progressão carcinogênica, sugerindo sua importância para a manutenção do epitélio prostático normal (Horvath, *et al.*, 2001).

De acordo com o INCA (2014), aproximadamente 62% dos casos mundiais dessa patologia se manifesta em homens com 65 anos ou mais. Evidências sugerem que os estrógenos e seus metabólitos estão intimamente ligados ao fato de a incidência de CaP crescer exponencialmente com o aumento da idade (Steiner *et al.*, 2001). Enquanto os níveis de testosterona diminuem com o passar dos anos, os níveis estrogênicos permanecem relativamente inalterados ou, até mesmo, aumentados - devido à aromatização de andrógenos adrenais pelo tecido adiposo periférico, tecido que também tende a aumentar com o envelhecimento (Ellem & Risbridger, 2009). Isto conduz a um ambiente estrógeno-dominante que leva ao aumento da estimulação estrogênica da próstata, reativando seu crescimento, ocasionando inflamações e, possivelmente, contribuindo para a carcinogênese prostática (Steiner *et al.*, 2001). Estudos *in vitro* mostraram que os estrógenos são capazes de aumentar a proliferação de células prostáticas cancerígenas humanas (Smith *et al.*, 2008). Do mesmo modo, compostos presentes em materiais sintéticos com características estrogênicas estão ligados à transformação neoplásica em modelo animal (Ho *et al.*, 2006).

A progressão ao CaP pode levar várias décadas para ocorrer e envolve diferentes estágios desde as agressões ao epitélio prostático, atrofia inflamatória proliferativa (PIA - *Proliferative Inflammatory Atrophy*), neoplasia intraepitelial prostática (PIN - *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*), adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasivo (Wu *et al.*, 2011). A longa latência proporciona excelente oportunidade para a quimioprevenção do câncer (Cimin o *et al.*, 2012). Mas, no que se refere ao tratamento da doença em sua fase metastática e invasiva, há uma enorme necessidade de novas descobertas. Pesquisas cujos alvos potenciais sejam AR, ER, Akt e MAPK, por exemplo, são de extrema relevância.

1.3 Desreguladores Endócrinos

Evidências em modelos humanos e cobaias elencam o ambiente como um fator potencial para indução de mudanças significativas na concentração e no metabolismo dos hormônios esteroides sexuais, podendo contribuir para o desenvolvimento e agressividade do câncer de próstata (Curruba, 2006; Prins *et al.*, 2007; Rittmaster *et al.*, 2009).

O conjunto de moléculas exógenas capazes de perturbar o sistema endócrino é tratado por Interferentes ou Desreguladores Endócrinos (DEs) (Prins *et al.*, 2007;

Zoeller *et al.*, 2012). Estes compostos têm propriedades semelhantes a hormônios endógenos, afinidade pela ligação a receptores hormonais específicos ou capacidade de alterar enzimas envolvidas na síntese, secreção, transporte, ligação, metabolismo e degradação hormonal (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Zoeller *et al.*, 2012).

Entre os DEs ambientais, há compostos de caráter estrogênico, como o Bisfenol A (BPA, **Figura 5**), que é alvo de atenção em virtude da alta exposição à espécie humana. O BPA é um monômero, originalmente desenvolvido em 1890, cuja utilização atual se dá no processo de fabricação de diversos plásticos policarbonato e resinas epóxi. Assim sendo, pode ser encontrado em produtos comuns, incluindo embalagens reutilizáveis de alimentos e bebidas, enlatados revestidos por resina, brinquedos infantis, mamadeiras, lentes ópticas, forros de proteção, tubulação plástica, aparelhos eletrônicos, cremes, selantes dentais, equipamentos odontológicos e médicos (Markey *et al.*, 2001; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Rubin, 2011).

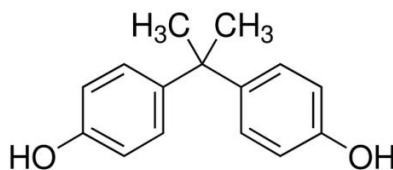


Figura 5: Estrutura química do 2,2-Bis(4-hidroxifenil)propano (BPA). Extraído do catálogo de produtos da empresa Sigma-Aldrich®.

Os seres humanos estão expostos a este composto através da dieta, por absorção cutânea e inalação de partículas (Vandenberg *et al.*, 2012). Pesquisas alertam para a presença vestigial de BPA em níveis detectáveis nos fluidos corporais humanos – como urina, leite materno, e sangue (Calafat *et al.*, 2005; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Segundo relatórios da empresa de consultoria de mercado norte-americana *Grand View Research Inc.*, em 2013, a demanda global de BPA para produção de policarbonato ficou em torno de 5 toneladas, seguida pela demanda para resina epóxi, com 1,4 toneladas. Suas projeções afirmam, ainda, que a produção mundial de Bisfenol A totalizará 9,6 toneladas em 2020.

Tendo em vista a atividade estrogênica do BPA – capacidade de ligação aos receptores de estrógenos – observada em ensaios *in vivo* e *in vitro*, há uma preocupação constante com os efeitos adversos que ele pode causar à saúde já que tal composto tem potencial influência sobre todos os sistemas fisiológicos sensíveis a hormônios, como é

o caso do tecido adiposo, neuroendócrino, cardiovascular, pâncreas, glândula mamária, útero, ovário, testículo e próstata (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009)

Estudos fornecem evidências de que há interferência direta do BPA sobre o desenvolvimento prostático em roedores, podendo ser associado com o aumento da incidência de CaP na vida adulta (Prins & Korach, 2008; Rubin, 2011; Brandt *et al.*, 2014), por um possível aumento de sensibilidade aos níveis estrogênicos do processo de envelhecimento (Ho *et al.* 2006). Além de ter sido envolvido a processos de Iniciação tumoral, o composto também parece estar ligado com a Progressão, apresentando efeitos proliferativos sobre células cancerígenas prostáticas, aquisição de andrógeno-independência (Wetherill *et al.*, 2002; Wetherill *et al.*, 2005) e indução do potencial de migração e invasividade das mesmas (Derouiche *et al.*, 2013).

O Bisfenol A pode desencadear efeitos significativos mesmo em casos de exposição em baixas doses, dentro da faixa de exposição humana ambientalmente relevante (Welshons *et al.*, 2006; Vandenberg *et al.*, 2012). Além disso, esses efeitos podem não ser detectáveis em doses mais elevadas, como as usadas nos estudos toxicológicos tradicionais (Vandenberg *et al.*, 2012).

Níveis de BPA inferiores à atual concentração mínima responsável por efeitos adversos (LOEL - *lowest observed effect level*), que é de 50 ug/kg/dia, foram considerados de baixa dosagem para estudos *in vivo*. Para pesquisas *in vitro*, concentrações de baixa dose em meio de cultura devem ser menores que 50 ng/mL ou 219 nM (Welshons *et al.*, 2006).

1.4 Quimioproteção contra o Câncer de Próstata

A busca por ações quimioprotetoras naturais capazes de alterar o desenvolvimento tumoral, sem efeitos colaterais secundários como os enfrentados por pacientes que passam por técnicas cirúrgicas, quimio ou radioterápicas para o tratamento do CaP, tornou-se uma questão importante (Clinton & Giovannucci, 1998). Nesse contexto, a interferência dietética na progressão da doença tem sido amplamente estudada (Ramos, 2008 b).

Hábitos alimentares ricos em gordura animal, carne vermelha, produtos processados e embutidos estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de próstata e, contrariamente, a alimentação rica em vegetais tem sido apontada como fator protetor (Safe *et al.*, 2008; INCA, 2012). Isto se dá porque os componentes

dietéticos podem interferir em diversos processos celulares e, potencialmente, influenciar o risco de câncer e o comportamento do tumor (Singletary *et al.*, 2005).

Estudos afirmam que mais de 65% dos tumores humanos podem ser prevenidos pela modificação do estilo de vida – incluindo a alimentação (Sarkar & Li, 2004). Dentre os alimentos que podem apresentar efeitos benéficos à saúde estão os fitoquímicos, compostos naturais de fonte vegetal, muitas vezes relacionados a efeitos pró-apoptóticos, anti-inflamatórios e antiproliferativos (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Indivíduos que consomem dieta contendo diversos produtos à base de soja apresentam baixa incidência de tumores na mama, próstata e cólon (Adlercreutz, 1990), assim como aqueles que ingerem frequentemente dieta baseada em vegetais (Cohen *et al.*, 2000).

A população asiática, em geral, apresenta taxa muito menor de aparecimento de CaP do que americanos e europeus (Sarkar & Li, 2004). No entanto, orientais que emigraram de seus países de origem e adotaram o estilo de vida tipicamente ocidental, apresentaram aumento no número de casos de câncer relacionados a hormônios (Deapen *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2002), sugerindo que a dieta dos países asiáticos tem importante participação na prevenção desse tipo de doença (Sarkar & Li, 2004).

A soja tem papel de destaque na baixa incidência de CaP em países como China e Japão, isso porque, tal leguminosa é parte significativa da dieta oriental. A Genisteína (4,5,7-tri-hidroxi-isoflavona, **Figura 6**), principal isoflavona da soja, é o composto ativo responsável por seu caráter benéfico (Setchell, 1998; Delclos *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

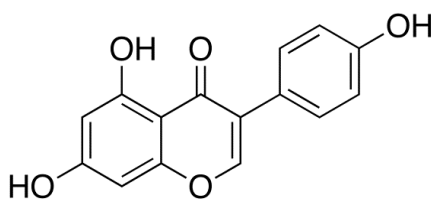


Figura 6: Estrutura química da Genisteína (4,5,7-tri-hidroxi-isoflavona). Extraído do catálogo de produtos da empresa Sigma-Aldrich®.

Vários efeitos bioquímicos da Genisteína têm sido propostos como fundamentais para a sua atividade anticarcinogênica, entre eles estão: a inibição da atividade de tirosina-quinases, incluindo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*), resultando na atenuação do crescimento de células

cancerígenas mediado por seus mecanismos de sinalização (Bektic *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2003); a atividade antioxidante, através da inibição da expressão de genes relacionados à resposta ao estresse e eliminação de radicais livres (Barnes, 1998); a indução de apoptose (Banerjee *et al.*, 2008), através da inibição das vias de sinalização da Akt e de fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$ - *nuclear fator $\kappa\beta$*) (ambos conhecidos por manter o equilíbrio homeostático entre a sobrevivência celular e a apoptose), da ativação de caspases e da sub-regulação da expressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) e Bcl-xL (*Bcl-2-like protein 1*) (Bektic *et al.*, 2005); e a inibição da angiogênese e metástases (Fritz *et al.*, 2003).

Resultados *in vitro* demonstraram que este composto natural, por conta de sua semelhança estrutural com estradiol, é capaz de se ligar ao ER (Setchell, 2001), em especial ER- β , que é antiproliferativo e pró-apoptótico, inibindo a proliferação de células do CaP (Kim *et al.*, 2002). Também foi constatada a alteração da atividade do ciclo celular, mediada pela modulação de genes relacionados ao seu controle (Banerjee *et al.*, 2008); e a inibição da expressão PSA (Perabo *et al.*, 2008), sendo eficiente na inibição do crescimento de células cancerígenas tanto dependentes quanto independentes de andrógeno.

Além da soja, os vegetais crucíferos também contêm amplo espectro de fitoquímicos ativos. Dentre eles, a molécula que se destaca por suas propriedades anticarcinogênicas para cólon, endométrio, mama e próstata é o indol-3-carbinol (I3C, 3-Hidroxitilindol), um componente natural encontrado em altas concentrações nos vegetais do gênero das Brassicas que incluem brócolis, couve, couve-flor e couve-flor de bruxelas, sempre que eles são esmagados ou cozidos. Assim que entra em contato com a acidez do ambiente estomacal, o I3C é convertido a sua forma dimérica, o 3,3'-Di-indolil-metano (DIM, **Figura 7**) (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Kim & Milner, 2005; Safe *et al.*, 2008).

A correlação entre a dieta rica em vegetais crucíferos e a reduzida taxa de incidência de CaP tem sido sugerida (Cohen *et al.*, 2000) baseada nas evidências experimentais que indicaram que o DIM suprime o crescimento e a proliferação de células tumorais por modular a expressão de vários genes e proteínas que conduzem esta via (Cohen *et al.*, 2000). Tal fitoquímico promove, ainda, a indução de apoptose, envolvendo produtos da sub-regulação de Bcl-2, sobreexpressão da proteína pró-apoptótica Bax (Sarkar & Li, 2004) e ativação de caspases (Aggarwal & Ichikawa, 2005).

Outros efeitos são a inibição da progressão do ciclo celular, com seu bloqueio em G1 correlacionado com a inibição da expressão de quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Aggarwal & Ichikawa, 2005); inibição da angiogênese e da invasão tumoral, por mecanismos ainda não elucidados totalmente; e o efeito antioxidante, protegendo as células do estresse oxidativo, que está envolvido com o desenvolvimento e com a progressão do câncer (Wu *et al.*, 2011).

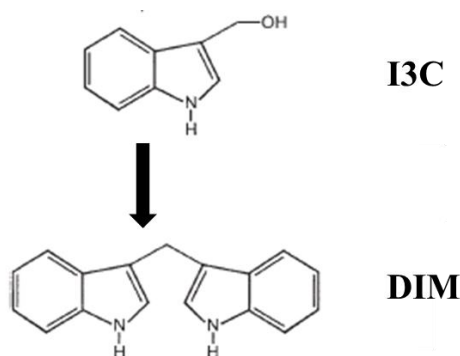


Figura 7: Estrutura molecular e conversão de I3C a DIM, ocorrida sob condições ácidas. Adaptado de Sarkar & Li, 2004.

O DIM promove a regulação negativa da via de sinalização da proteína Akt, que é ativada em estágios avançados do CaP e está envolvida no controle do crescimento e da proliferação celular (Pfeil *et al.*, 2004). A redução na fosforilação de Akt diminui a sobrevivência celular (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Banerjee *et al.*, 2008), já que não há inativação de diversas proteínas pró-apoptóticas, incluindo a Bad (del Peso *et al.*, 1997) e caspases (Cardone *et al.*, 1998).

Além disso, o DIM apresenta atividade antitumoral, seja *in vitro* ou *in vivo*, por antagonizar o AR, mediando assim, a proliferação das células de câncer de próstata pela inativação das vias de sinalização desse receptor (Hsu *et al.*, 2005). Este fitoquímico também apresenta atividade estrogênica, como a Genisteína (Aggarwal & Ichikawa, 2005).

A quimioproteção com agentes não farmacológicos, como a Genisteína e o DIM, está associada à redução na incidência e na progressão de diferentes neoplasias. Tais fitoquímicos se tornaram atrativos focos de pesquisa e considerados estratégias eficazes no combate a tumores por induzirem a apoptose em células malignas, que são conhecidas justamente por sua capacidade de evasão à morte celular programada (Cho

et al., 2011). No entanto, uma restrição importante no uso isolado de cada composto é a fraca biodisponibilidade e toxicidade em doses eficazes para resultar em potentes efeitos antitumorais (Kumar *et al.*, 2011).

Algumas dietas vegetarianas contêm combinações de fitoquímicos que podem agir sinergicamente para modulação das vias de sinalização das células cancerosas, resultando em um efeito quimioprotetor eficaz em concentrações fisiológicas (Kumar *et al.*, 2011) e toxicidade reduzida quando comparada ao uso dos agentes individuais (Kelloff *et al.*, 2000).

Genisteína e DIM apresentaram atividade antitumoral sinérgico na linhagem celular HT-29 de câncer de colo, com efeitos em concentrações quatro vezes mais baixas do que os de cada um dos agentes em monoterapia (Nakamura *et al.*, 2009), mas não há relatos na literatura de pesquisas envolvendo o uso destas substâncias, de forma complementar entre si, para avaliação de seus efeitos no CaP.

2. JUSTIFICATIVA

A incidência dos tumores prostáticos está relacionada com o envelhecimento dos indivíduos, período no qual ocorre um desbalanço nas taxas hormonais, com incremento nos níveis de estradiol e queda nos níveis androgênicos. Tal consideração traz à tona o envolvimento dos estrógenos com o processo de carcinogênese na próstata.

Adicionalmente, o Bisfenol A é o xenoestrógeno mais estudado na atualidade e sua atividade estrogênica tem preocupado a comunidade científica por sua ampla dispersão no meio ambiente. Desta forma, o composto poderia contribuir para o aumento da incidência, agressividade e capacidade metastática dos tumores prostáticos.

Por outro lado, a quimioproteção com agentes não farmacológicos, como os fitoquímicos dietéticos, está associada à redução na incidência e na progressão de diferentes neoplasias, diminuição de processos inflamatórios e estresse oxidativo ocasionados por substâncias potencialmente nocivas.

Sabe-se que altas doses de fitoquímicos isolados têm sido relacionadas a potentes efeitos antitumorais e que as propriedades quimioprotetoras dos vegetais podem ser resultado da interação entre vários componentes que potencializam a atividade de um composto. Com isso, pesquisar estratégias de quimioproteção relacionadas à exposição a agentes potencialmente carcinogênicos, como o BPA, é de extrema importância, principalmente, tendo em vista os mecanismos celulares de proteção proporcionados por compostos naturais como o DIM e a Genisteína.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar os efeitos da quimioproteção através dos fitoquímicos 3,3'-Di-indolil-metano e Genisteína isolados e/ou associados em células tumorais prostáticas humanas das linhagens LNCaP e PC-3 expostas ao Bisfenol A.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a viabilidade celular das linhagens LNCaP e PC-3 após 96 horas de exposição a cinco doses diferentes de BPA (5nM, 10nM, 100nM, 500nM e 1μM), DIM e Gen (ambos 10μM, 25μM e 50μM).
- Avaliar proteínas chave dos processos de proliferação e morte celular: ERK1/2; JNK e PAR4; das vias de sobrevivência e modulação hormonal: AR e ERα; e relacionada ao estresse celular e modulação metastática: SIRT1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

Para este estudo, foram utilizadas as linhagens celulares epiteliais prostáticas tumorais LNCaP e PC-3, adquiridas da empresa *American Type Cell Culture* (ATCC, Manassas, VA, USA). A linhagem celular LNCaP é proveniente do linfonodo supraclavicular esquerdo de um homem caucasiano de 50 anos com diagnóstico de carcinoma de próstata metastático, enquanto a PC-3 foi obtida do osso de um homem caucasiano de 62 anos com diagnóstico de metástase de carcinoma de próstata em estágio avançado. Estas linhagens foram selecionadas para representar duas situações distintas do câncer de próstata: a doença em sua fase andrógeno-sensível (representada *in vitro* pelas células LNCaP) e em uma fase posterior, já resistente à supressão androgênica (representada por PC-3).

As células foram cultivadas, sob estritas condições estéreis, em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) suplementado com soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) a 10%, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml anfotericina B (Gibco/Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Durante a expansão clonal, foi realizado acompanhamento celular ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Oberkochen, BW, Germany) e troca dos meios de cultura a cada 2 dias.

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

4.2 Análise da Viabilidade Celular

Diferentes concentrações dos compostos BPA, DIM e Genisteína (Gen) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, USA) foram testadas, sempre em triplicatas, a fim de averiguar possíveis efeitos citotóxicos às linhagens durante 96 horas (4 dias) de incubação.

O presente estudo buscou avaliar os efeitos destes compostos sobre a viabilidade das células tumorais prostáticas em baixas doses, dentro da faixa de exposição humana

ambiental. Para isso, a literatura serviu de base na escolha do intervalo de concentrações a se testar. Foram levadas em consideração as doses descritas por Smith *et al.* (2008), Wang *et al.* (2012) e Derouiche *et al.* (2013) para os mesmos tipos celulares e as concentrações escolhidas para a análise de viabilidade foram de 5nM, 10nM, 100nM, 500nM e 1000nM (1 μ M) de BPA; de 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M de DIM e Gen; além de um grupo submetido a apenas meio de cultura com Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,027%.

Ao término das 96h de exposição, foi realizada a tripsinização celular e o tratamento das amostras com azul de tripiano 0,4% (Gibco/Invitrogen™) (volume 1:1), corante seletivo de células em processo de morte, devido a sua capacidade de transportar membranas comprometidas. As células foram visualizadas por microscopia de luz e contadas em câmara de Neubauer. Foram consideradas inviáveis as células coradas pelo azul de tripiano e, viáveis, as células translúcidas, dado que a membrana celular intacta bloqueia a passagem do corante para seu interior.

Com base na análise da viabilidade celular e nos efeitos já apresentados na literatura, foi escolhida a dose de cada composto a ser utilizada nos tratamentos com a menor taxa de efeitos citotóxicos às linhagens:

- **BPA:** 10nM/L
- **DIM e Gen:** 25 μ M/L

4.3 Tratamentos

As células das linhagens LNCaP e PC-3 foram expostas por 96 horas aos seguintes tratamentos:

- **C:** meio de cultura padrão (controle)
- **B:** meio de cultura + BPA
- **BD:** meio de cultura + BPA + DIM
- **BG:** meio de cultura + BPA + GEN
- **BDG:** meio de cultura + BPA + DIM + GEN

Assim como para a expansão, o meio de cultivo, adicionado dos agentes químicos nas doses escolhidas, foi trocado a cada 2 dias durante os tratamentos (**Figura 8**). DMSO estéril foi diluído ao meio de cultura dos cinco tratamentos, sua concentração final foi sempre de 0,027%.

Seguindo a descrição dos tratamentos, a exposição foi realizada em triplicatas para as células destinadas à extração proteica para as análises por *Western Blotting*.

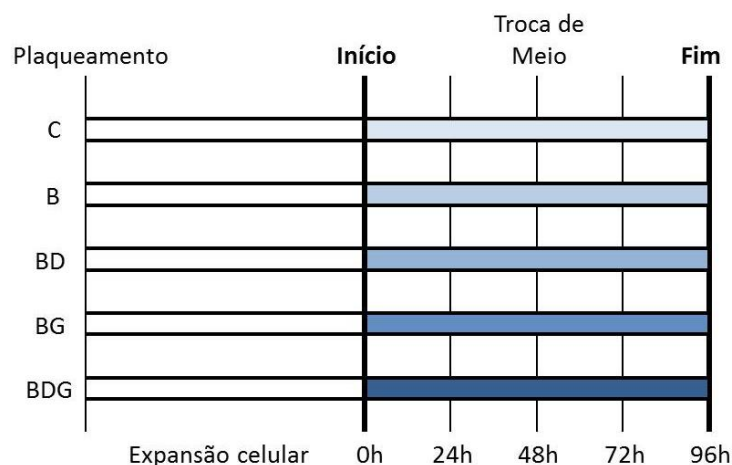


Figura 8: Delineamento esquematizado dos 5 tratamentos, com duração de 96h: 0h representando o início dos tratamentos (adição de meio de cultura com os compostos diluídos); 48h, a troca dos meios de cultura diluídos como explicado anteriormente; e 96h, o término dos tratamentos.

4.4 Western Blotting

Após realização dos 5 tratamentos, os *pellets* celulares obtidos foram divididos em alíquotas contendo, aproximadamente, 1×10^6 células para a extração de proteínas, realizada com tampão RIPA (1mL para $\sim 5 \times 10^6$ células) adicionado ao coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, USA). Em seguida, as amostras foram transferidas para um tubo do tipo *ependorf*, mantidas no gelo por 5 minutos, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 14.000 RPM por 15 minutos, a 4° C. Realizou-se a coleta do sobrenadante e posterior quantificação proteica em placas com 96 poços por método colorimétrico em leitor de ELISA.

As alíquotas (com 50µg de proteína cada) foram tratadas com solução tampão *Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e β -mercaptoetanol a, aproximadamente, 95°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e, após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose. As ligações inespecíficas foram bloqueadas através da incubação das membranas em leite desnatado 5% em tampão Tris-NaCl contendo 0,1% de Tween 20 (TBST) por cerca de 1 hora em temperatura ambiente.

As membranas foram subsequentemente incubadas com os seguintes anticorpos primários em TBST *overnight*:

- **anti-ERK1/ERK2** - *Extracellular Signal -Regulated Kinase* (ab17942)
- **anti-ER α** - *Estrogen Receptor α* (ab80922)

- **anti-JNK1+JNK2** - *c-Jun N-terminal Kinase* (ab85139)
adquiridos da Abcam Inc., Cambridge, MA, USA;
- **α -Tubulina** (SC5286)
- **β -actina** (SC47778)
- **AR** - *Androgen Receptor* (SC816)
- **PAR4** - *Prostate Apoptosis Response 4* (SC1666)
- **SIRT1** - *Silent Information Regulation 1* (SC15404)
adquiridos da Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA.

Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído em TBST por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente (Super Signal® West Pico Chemi Luminescent Substrate) adquirido da Thermo Scientific® (Rockford, IL, USA) e a densidade óptica de cada banda foi avaliada pelo software ImageJ®, normalizada pela densidade da α -Tubulina e, posteriormente comparada entre os diferentes tratamentos.

4.5 Análise Estatística

Os dados de expressão proteica foram expressos pela média $\pm$ EPM. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada dois a dois, onde foram comparados: C vs. B; B vs. D; B vs. G; B vs. BDG. Foi utilizado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* e foram consideradas diferenças onde o $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular

Foi observada uma diminuição na porcentagem de células vivas a partir da dose de 10nM de BPA em ambas as linhagens tumorais (**Figura 9**).

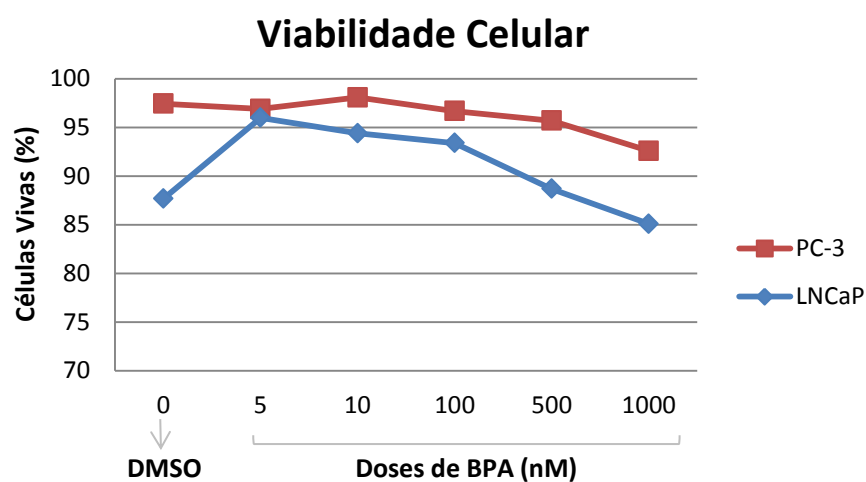


Figura 9: Viabilidade celular das linhagens LNCaP e PC-3 realizada após 96 horas de exposição a DMSO e diferentes doses de Bisfenol A.

Com exceção das células expostas somente ao veículo DMSO (dose 0 de DIM), a dose de 25 μ M de DIM apresentou a maior viabilidade celular para as linhagens LNCaP e PC-3 (**Figura 10**).

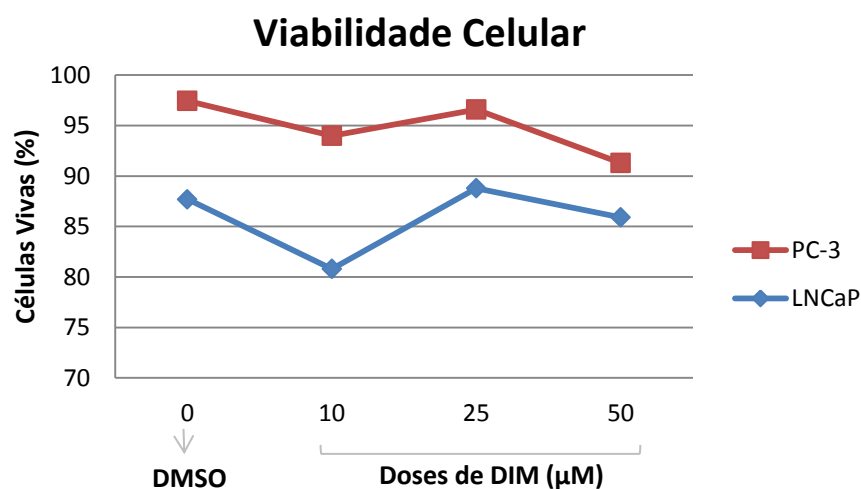


Figura 10: Viabilidade celular das linhagens LNCaP e PC-3 realizada após 96 horas de exposição a DMSO e diferentes doses de DIM.

A dose de 25 μM apresentou a maior viabilidade dentre as células LNCaP expostas às diferentes doses de Genisteína. Foi observada uma queda acentuada, para ambas as linhagens, na porcentagem de células vivas a partir dessa dose (**Figura 11**).

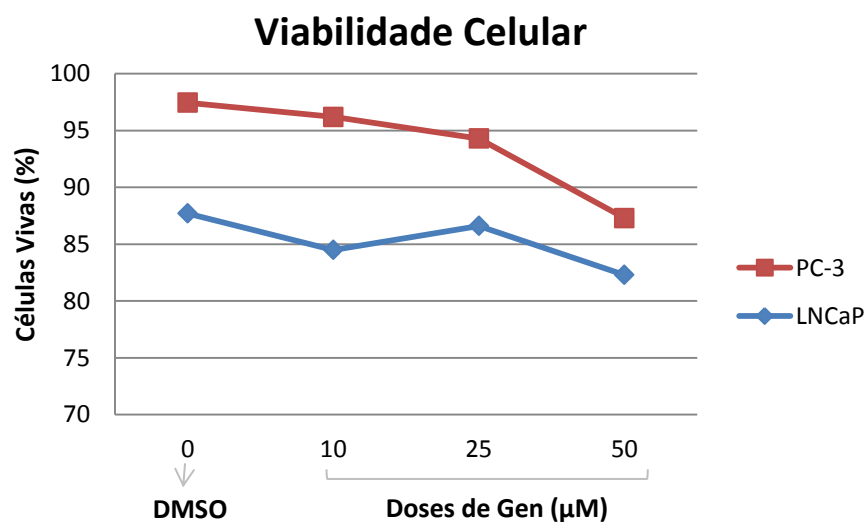


Figura 11: Viabilidade celular das linhagens celulares LNCaP e PC-3 realizada após 96hrs de exposição a DMSO e diferentes doses de Gen.

5.2 Western Blotting

- **AR**

As técnicas de *Western Blotting* revelaram diminuição significativa da expressão de AR, nas células da linhagem LNCaP, quando aplicados os tratamentos tanto com os fitoquímicos isolados – DIM (BD) e Gen (BG) –, quanto em conjunto – DIM + Gen (BDG) –, em células antes tratadas apenas com BPA (B) (**Figura 12**).

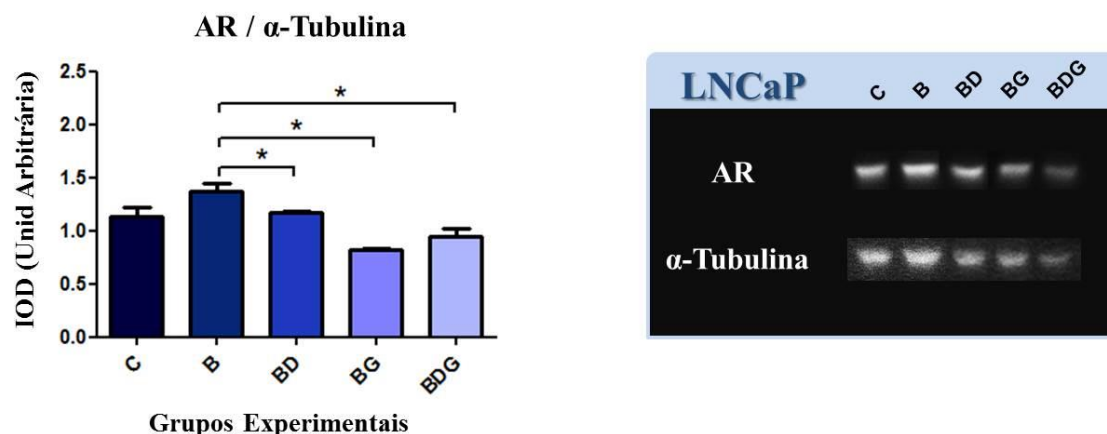


Figura 12: Gráfico de expressão relativa de AR (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

• MAPK (ERK1/2)

Para a linhagem tumoral LNCaP, a expressão das proteínas MAPKs (ERK1/2) por *Western Blotting* não apresentou variações significativas entre a maioria dos grupos tratados. O destaque ficou por conta da diferença estatística encontrada entre o tratamento B (BPA) e BG (Gen), no qual houve uma diminuição da expressão de ERK1/2 (**Figura 13**).

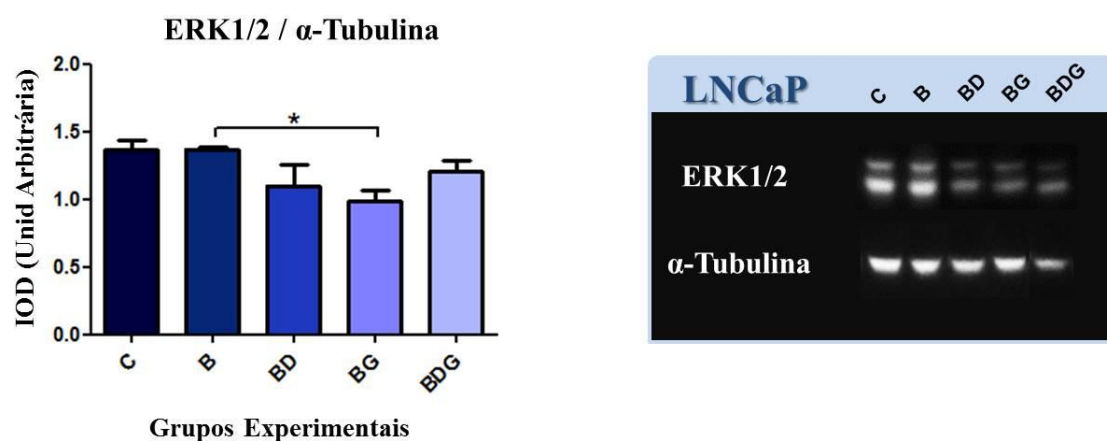


Figura 13: Gráfico de expressão relativa da proteína ERK1/2 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

Por outro lado, para a linhagem tumoral PC-3, a expressão da proteína MAPK (ERK1/2) aumentou significativamente com a adição de BPA (tratamento B) às células antes tratadas apenas com veículo controle (C). Outra diferença significativa encontrada

foi entre os grupos BDG (DIM + Gen) e B (BPA), evidenciando uma diminuição da expressão de ERK com a adição do tratamento com os dois fitoquímicos em conjunto, às células expostas ao Bisfenol A. Ainda sobre esse aspecto, os tratamentos isolados BD e BG não foram capazes de promover tal resposta (**Figura 14**).

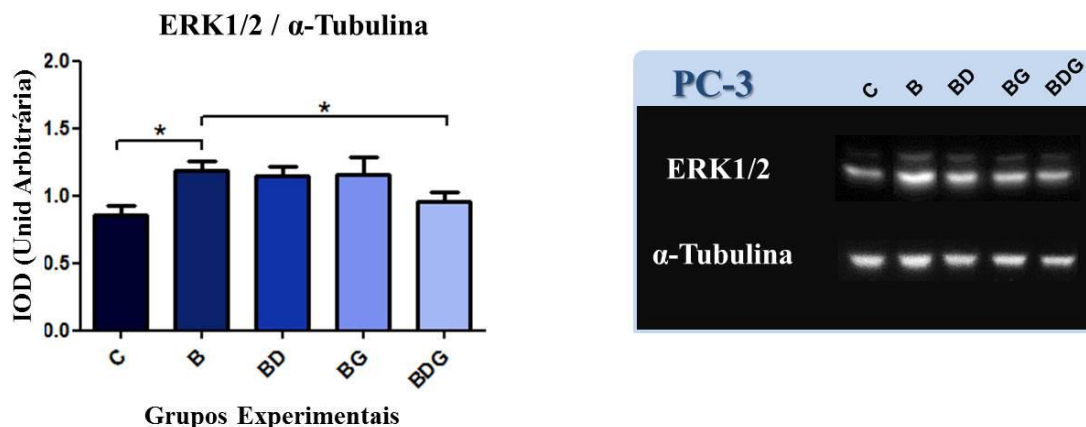


Figura 14: Gráfico de expressão relativa da proteína ERK1/2 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem PC-3, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

- **MAPK (JNK1/2)**

Os resultados de *Western Blotting* da linhagem LNCaP para a proteína JNK1/2 apontaram para uma diminuição de expressão em B (BPA), no que diz respeito a C (controle). Houve, ainda, aumento significativo da expressão proteica em todos os tratamentos fitoquímicos (BD, BG e BDG), em comparação a células tratadas apenas com o desregulador endócrino BPA (**Figura 15**).

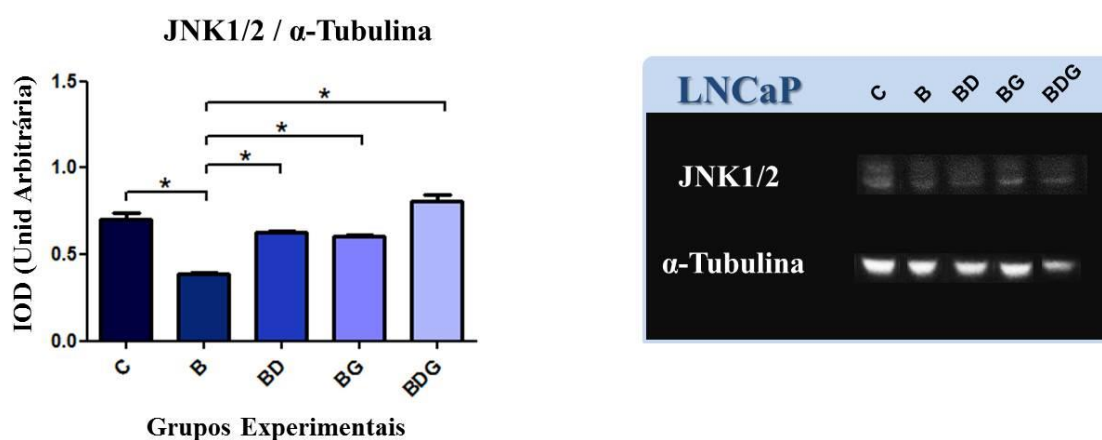


Figura 15: Gráfico de expressão relativa da proteína JNK1/2 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

- **ER α**

Houve um aumento relevante da expressão da proteína ER α , nas células LNCaP, em B (BPA) quando comparado a C (controle). O tratamento das células LNCaP com os fitoquímicos levou a uma redução dessa expressão (em relação a B), que se mostrou estatisticamente significativa em G (Gen) e BDG (DIM+Gen) (**Figura 16**).

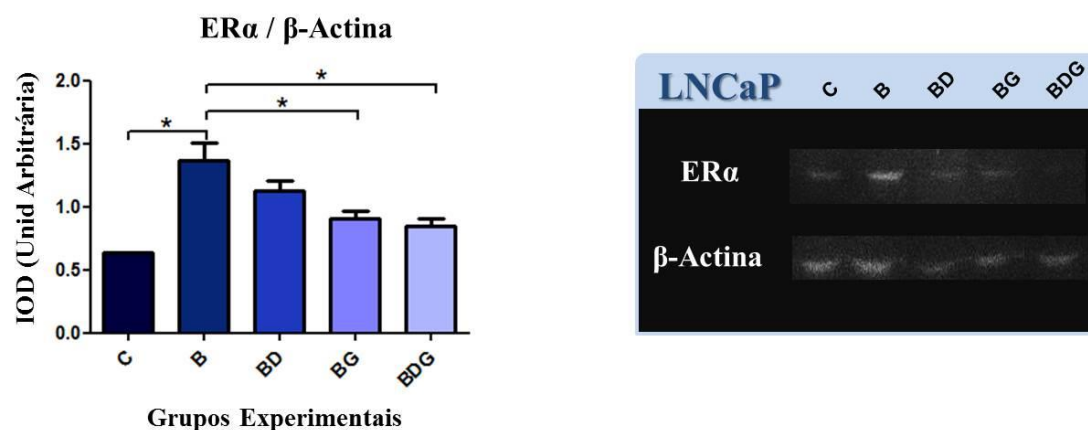


Figura 16: Gráfico de expressão relativa da proteína ER α (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela β -actina (esquerda); cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

- **PAR4**

As técnicas de *Western Blotting* da linhagem LNCaP revelaram aumento significativo da expressão da proteína PAR4 nos tratamentos BD (DIM) e BDG (DIM+GEN), se comparados a B (BPA) (**Figura 17**).

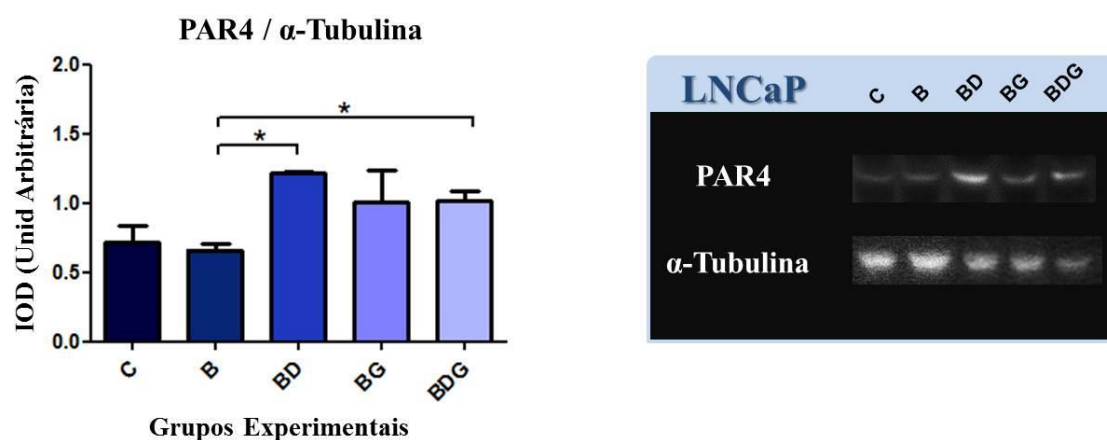


Figura 17: Gráfico de expressão relativa da proteína PAR4 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela α -Tubulina (esquerda); cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: * $p \leq 0,05$.

• SIRT1

Para a linhagem LNCaP, a expressão da proteína sofreu um aumento em B (BPA), no que diz respeito a C (controle). Houve, também, uma diminuição da expressão de SIRT1 em todos os tratamentos com fitoquímicos (BD, BG e BDG), quando comparados a B (Figura 18).

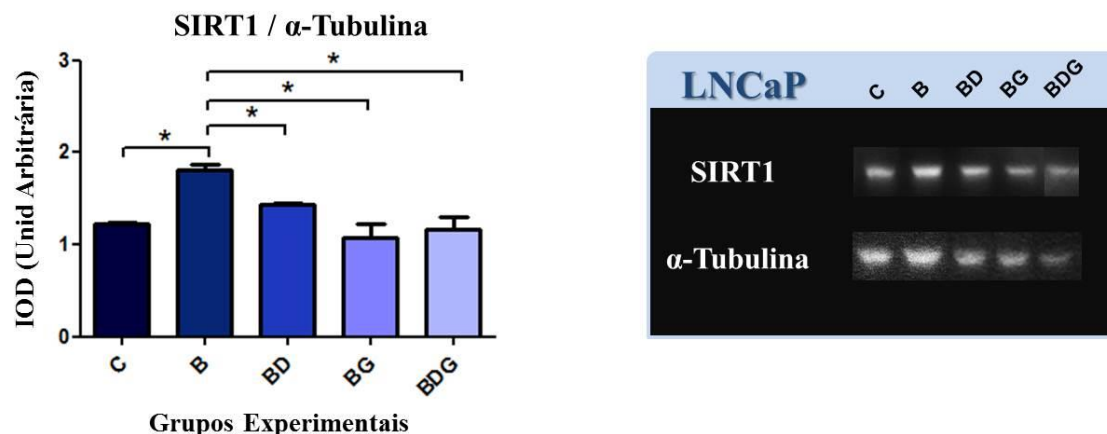


Figura 18: Gráfico de expressão relativa da proteína SIRT1 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem LNCaP, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: *p≤0,05.

De modo semelhante, a linhagem PC-3 contou com uma expressão aumentada de SIRT1 em B (BPA), se comparado a C (controle). Houve, ainda, uma diminuição da expressão da proteína no tratamento conjunto BDG (DIM+Gen), em relação a B (BPA). Ressaltando que o tratamento com nenhum dos fitoquímicos, de forma isolada, foi capaz de promover tal resposta (Figura 19).

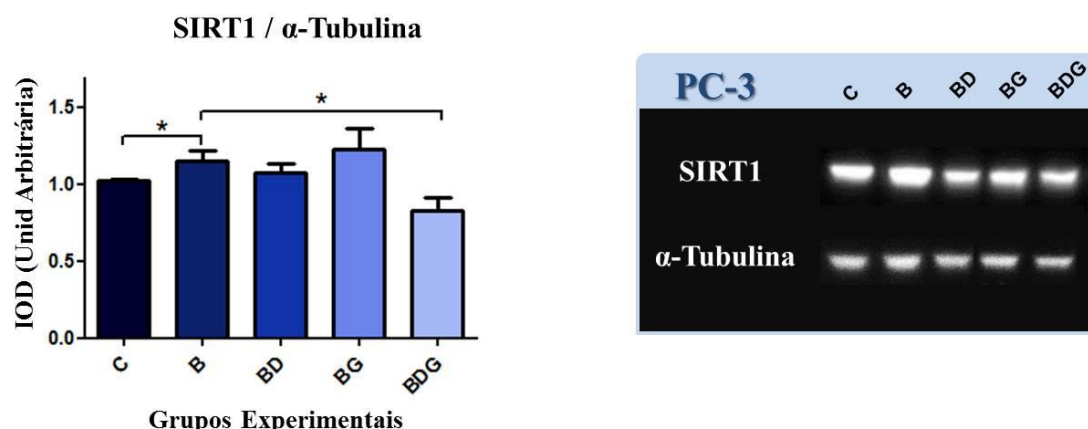


Figura 19: Gráfico de expressão relativa da proteína SIRT1 (IOD – densidade óptica integrada) nos diferentes tratamentos aplicados à linhagem PC-3, normalizada pela α -Tubulina (esquerda): cada barra representa a média seguida pelo Erro Padrão de três bandas referentes às triplicatas experimentais; e imagem representativa das bandas obtidas a partir da análise por *Western Blotting* (direita). Teste estatístico de Mann-Whitney, diferença estatística: *p≤0,05.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os debates levantados por parte da comunidade científica acerca da exposição humana ao Bisfenol A ganharam destaque. Embora este composto esteja sendo gradualmente substituído em algumas aplicações industriais (em produtos como mamadeiras e brinquedos infantis, por exemplo), sua produção global está em constante aumento, mantendo uma significativa exposição ambiental humana a este desregulador endócrino (Rubin, 2011). O estudo de Liao & Kannan (2013) constatou a presença vestigial de diversos tipos bisfenóis, dentre eles o BPA – ainda que em baixas concentrações – em 75% dos 267 produtos alimentícios analisados, tais como bebidas, óleos e gorduras, peixes e frutos do mar, cereais, laticínios, frutas e legumes.

Tendo em vista a potencialidade do BPA em desempenhar um papel-chave na iniciação e progressão do CaP (Wetherill *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006), é de extrema importância o estudo dos efeitos desse composto sobre o comportamento tumoral prostático em doses fisiologicamente relevantes.

Assim como os trabalhos de Wetherill *et al.* (2005), Derouiche *et al.* (2013) e Tarapore *et al.* (2014), o presente estudo buscou testar baixas concentrações de BPA, dentro da faixa de exposição humana ambiental, que não apresentassem efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares cancerígenas prostáticas. A análise dos resultados de viabilidade celular de LNCaP e PC-3 a partir da exposição a baixas doses de BPA (5nM a 1µM), apontou para uma redução contínua na porcentagem de células vivas a partir de 10nM. Visto que a viabilidade se manteve acima de 80%, as concentrações escolhidas não caracterizaram citotoxicidade do BPA às populações celulares.

Em sentido oposto aos efeitos dos desreguladores endócrinos, a quimioproteção com agentes não farmacológicos, como os fitoquímicos dietéticos, está associada à redução na progressão de neoplasias prostáticas, de processos inflamatórios e estresse oxidativo ocasionados por substâncias potencialmente nocivas (Dave *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Nesse contexto, destacam-se os efeitos antitumorais do 3,3'-Di-indolil-metano, presente no brócolis, couve e demais vegetais do gênero das Brassicas (Aggarwal & Ichikawa, 2005; Wu *et al.*, 2011), e da Genisteína, principal componente da soja (Kim *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2008).

O uso de fitoquímicos em doses fisiológicas – que pudessem ser consumidas pela dieta – se tornou atrativo foco de pesquisa a fim de se estabelecer estratégias eficazes no

combate a tumores prostáticos assim que estudos epidemiológicos mostraram que indivíduos com alimentação à base de vegetais (Cohen *et al.*, 2000) e soja (Adlercreutz, 1990) apresentam baixa incidência de tumores na mama, próstata e cólon. O presente estudo buscou, mais uma vez, elencar baixas doses dos compostos de interesse – agora DIM e Gen. A literatura (Smith *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012) serviu de base na escolha do intervalo de concentrações a se testar (10 μ M – 50 μ M) no ensaio de viabilidade celular.

Ambas as linhagens tumorais apresentaram, frente à exposição a DIM e Gen, queda na viabilidade após a dose 25 μ M. Outro aspecto importante foi o de que, dentre as diferentes concentrações de DIM, a dose de 25 μ M também representou o ponto máximo de viabilidade de LNCaP e PC-3. Assim como, para as concentrações de Gen, tal dose também marcou a máxima viabilidade da linhagem LNCaP. Desta forma, o estudo foi conduzido a partir das doses 25 μ M de DIM e Gen, representando concentrações químicas com capacidade de alterar o comportamento celular sem, no entanto, causar grandes danos à viabilidade.

Após determinação das doses dos compostos estudados, as atenções se voltaram sobre as respostas biológicas encontradas frente à exposição ao BPA, suplementada pelos fitoquímicos DIM e Gen, sobre as diversas vias de sinalização das linhagens tumorais prostáticas humanas.

É sabido que a perturbação de sinais ligados à sobrevivência e proliferação celular resulta na ruptura da homeostase do tecido (Prins *et al.*, 2007). Neste cenário, destaca-se o papel de AR na transdução de sinais de proliferação, crescimento, evasão à apoptose e produção de PSA, envolvidos com o desenvolvimento do CaP (Pienta & Smith, 2005; Bhuiyan *et al.*, 2006). A inativação da expressão de AR é tida como abordagem importante para o sucesso do tratamento da doença (Bhuiyan *et al.*, 2006).

Os resultados do presente estudo apontaram uma diminuição da expressão de AR quando instalado o tratamento fitoquímico com DIM (BD) às células tumorais LNCaP, corroborando com as pesquisas de Le *et al.* (2003) e Chinnakannu *et al.* (2009), que relataram as propriedades antiandrogênicas desse fitoquímico, capazes diminuir a expressão de AR para a mesma linhagem celular. O tratamento com Genisteína (BG), em relação às células tratadas apenas com BPA, também promoveu uma queda na expressão de AR, confirmando a capacidade de Gen sub-regular a expressão desse receptor em células tumorais prostáticas (Davis *et al.*, 2000; Bektic *et al.*, 2004). Como

esperado, uma resposta semelhante foi observada no tratamento com os dois compostos em conjunto (BDG).

Envolvida com a modulação da atividade de AR, está a via de transdução das MAPK, especialmente desreguladas em processos de carcinogênese. As proteínas ERK1 e ERK2 mantêm o controle positivo do ciclo celular constante e a proliferação ininterrupta (Hanahan & Weinberg, 2000), eventos de extrema relevância na Iniciação neoplásica prostática e Progressão de um tumor localizado e andrógeno-dependente para uma doença metastática hormônio-independente (Rasola *et al.*, 2010). O principal mecanismo envolvendo as MAPKs na transformação tumoral na próstata se relaciona à fosforilação e dimerização de AR (Feldman & Feldman 2001).

A análise da expressão de ERK1/2 na linhagem LNCaP revelou uma sub-regulação quando realizado o tratamento com Gen em células expostas ao BPA. O grupo BG (BPA + Gen) apresentou uma menor expressão do que o tratado apenas com BPA (grupo B), confirmando o papel de Gen na inibição de proteínas quinases envolvidas com os processos de gênese e desenvolvimento tumoral (Bektic *et al.*, 2005).

Já na linhagem tumoral PC-3, verificou-se um aumento da expressão das proteínas ERK 1/2 com a exposição de BPA (B) em relação a células antes tratadas apenas com veículo controle (C). Este achado aponta para o possível envolvimento de BPA na indução das vias de MAPK, associadas à sobrevivência celular e aquisição de andrógeno-independência tumoral (Wetherill *et al.*, 2002), possibilitando a progressão do câncer.

O estudo revelou, ainda, uma diminuição da expressão das proteínas ERK1/2 com o tratamento simultâneo de DIM e Gen (BDG), o que nenhum dos fitoquímicos foi capaz de executar de forma isolada nas células PC-3. Efeito semelhante foi observado por Kumar *et al.* (2011), onde a mesma dose de Gen não promoveu alterações na expressão de ERK1/2, quando em monoterapia, mas foi capaz de sub-regular sua expressão se usada sinergicamente a outros compostos quimioprotetores. Tal pesquisa demonstrou que a combinação inovadora de fitoquímicos podem provocar efeitos sinérgicos significativos resultando em maior eficácia antitumoral em concentrações fisiologicamente relevantes.

Evidências sugerem que outra MAPK, a JNK1/2, também pode modular a via de sinalização de AR, inibindo o receptor, o que repercute sobre a Progressão da neoplasia prostática (Lazarevic *et al.*, 2008). Sendo assim, são de extrema relevância os dados aqui obtidos, onde os tratamentos com DIM e Gen, isolados e associados, foram

capazes de aumentar a expressão de JNK1/2 na linhagem LNCaP, apontando para a atividade antitumoral dos fitoquímicos. Estes dados confirmam os efeitos do DIM (Zhu *et al.*, 2012) e da Genisteína (Lazarevic *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011) sobre a sinalização das proteínas pró-apoptóticas JNK.

Em microambientes tumorais prostáticos, além das vias de sinalização envolvendo os receptores de andrógenos e MAPKs, os receptores de estrógenos também mediam a indução de genes hormônio-responsivos e podem estimular a proliferação celular em resposta à ligação de esteroides. Em doses nanomolares, o xenoestrógeno BPA exhibe afinidade semelhante a do estradiol por ER (Watson *et al.*, 2005). Nesse sentido, foi observado um aumento significativo da expressão de ER α no grupo de células LNCaP tratado com o desregulador endócrino BPA (B) em relação ao grupo controle (C), podendo contribuir para eventos de proliferação celular e progressão tumoral. Os tratamentos fitoquímicos BG (Gen) e BDG (Gen+DIM), no entanto, revelaram capacidade de reverter esse quadro, levando à diminuição da expressão de ER α . Assim sendo, fica evidente a capacidade do fitoquímico Genisteína (presente em BG e BDG) modular a sinalização estrogênica, exercendo interferência sobre os processos carcinogênicos (Bektic *et al.*, 2005).

Quando se trata de desenvolvimento tumoral e alvos moleculares potenciais para terapias quimioprotetoras, os processos de sobrevivência e morte celular são de grande interesse. Com relação à morte celular, a proteína PAR4 está envolvida com a ativação da apoptose e inibição da sobrevivência de diversas linhagens de células tumorais, incluindo prostáticas (Garcia-Cao *et al.*, 2005). Os resultados deste estudo mostraram um aumento na expressão da proteína PAR4 no grupo tratado com DIM (BD) e no grupo tratado com os dois fitoquímicos em conjunto (BDG), em relação ao grupo exposto somente ao BPA (B). Este efeito benéfico do tratamento com DIM (presente nos dois grupos experimentais), em termos de supressão tumoral por apoptose dos clones celulares de LNCaP, está de acordo com os dados encontrados por Chinnakannu *et al.* (2009) e Cho *et al.* (2011), para a mesma linhagem celular.

Quanto à capacidade de manutenção celular, a proteína SIRT1 promove sobrevivência sob condições de estresse genotóxico e oxidativo. Estudos afirmam que sua atividade antiapoptótica está envolvida com o processo carcinogênico (Kojima *et al.*, 2008). Os resultados de *Western Blotting* apontam para um aumento da expressão de SIRT1, tanto em células LNCaP, quanto PC-3, expostas ao BPA (B), comparado ao

tratamento controle (C), reforçando a potencial contribuição do Bisfenol A para a agressividade tumorigênica e evasão à morte celular.

Com a instalação dos tratamentos com DIM (BD), Gen (BG) e BDG (DIM+Gen) às células LNCaP expostas ao BPA (B), a expressão da proteína antiapoptótica SIRT1 foi reduzida. Estes efeitos de Gen sobre a expressão de SIRT1, estão de acordo com os obtidos no estudo de Kikuno *et al.* (2008); e, pela primeira vez, é relatada relação entre o tratamento com DIM e a regulação da proteína SIRT1.

Já na linhagem tumoral PC-3, apenas o tratamento simultâneo com DIM e Genisteína (BDG) foi capaz de sub-regular a expressão de SIRT1, em relação a B (BPA), levantando novamente a atenção para o fato de que os dois fitoquímicos parecem exercer efeitos sinérgicos entre si, quando usados em tratamento conjunto, alcançando respostas celulares não obtidas em tratamentos isolados.

Em geral, foram observados efeitos moduladores de BPA e dos fitoquímicos DIM e Gen sobre a expressão de proteínas envolvidas com processos celulares importantes para o desenvolvimento da neoplasia prostática, com destaque para aumento da agressividade tumoral por parte da exposição ao BPA e para o fato de que, o tratamento em conjunto BDG foi, por vezes, capaz de alcançar respostas celulares quimioprotetoras não obtidas em monoterapia, com possível incremento da eficácia antitumoral dos compostos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados promissores obtidos nesse estudo mostraram que as linhagens tumorais prostáticas andrógeno-dependentes (LNCaP) e andrógeno-independentes (PC-3) sofreram a influência da exposição ao BPA, alterando marcadores moleculares que vislumbram aumento de agressividade tumoral. No entanto, o tratamento com os fitoquímicos, principalmente em sinergia, foi capaz de reduzir tais efeitos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz H. (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest (Suppl)*. 50: 3-23.
- Aggarwal BB, Ichikawa, H. (2005) Molecular targets and anti-cancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*. 4: 1201-15.
- Amaravadi R, & Thompson CB. (2005) The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest*. 115:2618-24.
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. (2008) Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett*. 269: 226-42.
- Barnes S. (1998) Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 217: 386-2.
- Bektic J, Berger AP, Pfeil K, *et al.* (2004) Androgen receptor regulation by physiological concentrations of the isoflavonoid genistein in androgen-dependent LNCaP cells is mediated by estrogen receptor beta. *Eur Urol*. 45:245-1.
- Bektic J, Guggenberger R, Eder IE, Pelzer AE, Berger AP, Bartsch G, *et al.* (2005) Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 4: 124-9.
- Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Calpp R, Montagnier L, Epstein S. (2007) The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*. 105:414-29.
- Bhuiyan MM, Li Y, Banerjee S, Ahmed F, Wang Z, *et al.* (2006) Down-regulation of androgen receptor by 3,3'-diindolylmethane contributes to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in both hormone-sensitive LNCaP and insensitive C4-2B prostate cancer cells. *Cancer Res*. 66:10064-72
- Brandt JZ, Silveira LTR, Grassi TF, Anselmo-Franci JA, Fávaro WJ, Felisbino SL, Barbisan LF, Scarano WR. (2014) Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod. Toxicol*. 43:56-66.
- Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 113:391-5.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282: 1318-1.
- Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. (2012) *Eur Urol*. 61:1079-1092.
- Chen WF, Huang MH, Tzang CH, Yang M, Wong MS. (2003) Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta*. 1638:187-6.
- Chinnakannu K, Chen D, Li Y, Wang Z, Dou QP, Reddy GP, *et al.* (2009) Cell cycle-dependent effects of 3,3' diindolylmethane on proliferation and apoptosis of prostate cancer cells. *J Cell Physiol*. 219:94-99.
- Cho, H. J., Park, S. Y., Kim, E. J., Kim, J.-K. and Park, J. H. Y. (2011) 3,3' diindolylmethane inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Mol. Carcinog*. 50:100-12.
- Cimino S, Sortino G, Favilla V, Madonia M, Sansalone S, Russo GI, Morgia G. (2012) Polyphenols: Key Issues Involved in Chemoprevention of Prostate Cancer. *Oxid Med and Cell Longev.*, doi:10.1155/2012/632959
- Clinton SK, Giovannucci E. (1998) Diet, nutrition, and prostate cancer. *Annu Rev Nutr*, 18: 413-40.

- Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. (2000) Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 61-8.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 8: 338-62.
- Cunha GR, Ricke WA, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. (2004) Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92:221-36.
- Curruba G. (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1089: 201-17.
- Dave B, Eason RR, Till SR, Geng Y, Velarde MC, Badger TM, Simmen RC. (2005) The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis.* 26: 1793-03.
- Davis JN, Muqim N, Bhuiyan M, Kucuk O, Pienta KJ, Sarkar FH. (2000) Inhibition of prostate specific antigen expression by genistein in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 16:1091-1097.
- Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK. (2002) Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int. J. Cancer.* 99: 747-50.
- Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR. (2001) Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol.* 15: 647-63.
- del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 278: 687-9.
- Denis LJ, Griffiths K. (2000) Endocrine treatment in prostate cancer. *Sem Surg Oncol* 18:52-74
- Derouiche S, Warnier M, Mariot P, Gosset P, *et al.* (2013) Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signaling. *SpringerPlus* 2:54.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 30 (4):293-342.
- Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. (2005) Gray's anatomia para estudantes. Rio de janeiro: Elsevier. 409.
- Ellem SJ, Risbridger GP. (2010) Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 118: 246-1.
- Feldman BJ, Feldman D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews* 1: 34-45.
- Fritz WA, Cotroneo MS, Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. (2003) Dietary diethylstilbestrol but not genistein adversely affects rat testicular development. *J Nutr.* 133: 2287-3.
- Garcia-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martin-Caballero J, Flores JM, *et al.* (2005) Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par-4. *EMBO Rep.* 6:577-583.
- Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HFJr. and Weber MJ. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59: 279-4
- Grand View Research, Inc. (2014) Bisphenol A (BPA) Market Analysis By Application (Polycarbonates, Epoxy resins) and Segment Forecasts To 2020. ISBN Code: 978-1-68038-169-6
- Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. (2000) *Cell.* 100: 57-70.
- Hayward SW, Cunha GR, Dahiya R. (1996) Normal development and carcinogenesis of the prostate: a unifying hypothesis. *Ann NY Acad Sci.* 784: 50-62.
- Heinlein CF, Chang C. (2004) Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews.* 25: 276-308.

- Ho SM, Lee KF, Lane K. (1997) Neoplastic transformation of the prostate. In: Rajesh K. Naz editor. Prostate: Basic and Clinical Aspects. *Boca Raton: CRC Press*.73.
- Ho SM. (2004) Estrogens and anti-estrogens: Key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem*. 91(3):491-03.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. (2006) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*, 66, 5624-2.
- Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, *et al*. (2001) Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer, *Cancer Res*. 61 (14):5331–5335.
- Hsing AW, Devesa SS. (2001) Trends and patters of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemol. Rev*. 23: 3-13.
- Hsu JC, Zhang J, Dev A, Wing A, Bjeldanes LF, Firestone GL. (2005) Indole-3-carbinol inhibition of androgen receptor expression and downregulation of androgen responsiveness in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 26: 1896-4.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. (2014) Ministério da Saúde. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em www.inca.gov.br/estimativa/2014/.
- Junqueira LCU, Carneiro J. (2008) Histologia Básica. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*; 428-30.
- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, *et al*. (2000) Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr*. 130: 467–1.
- Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, *et al*. (2003) Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor nB inhibitor in nude mice. *Cancer Res*. 63:107–10.
- Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, *et al*. (2008) Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer J Int Cancer*. 123:552–60.
- Kim IY, Kim BC, Seong DH, Lee DK, Seo JM, Hong YJ, *et al*. (2002) Raloxifene, a mixed estrogen agonist/antagonist, induces apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 62:5365–9.
- Kim YS, Milner JA. (2005) Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 16: 65–3.
- Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, *et al*. (2008) A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 423–8.
- Kumar R, Verma V, Jain A, Jain RK, Maikhuri JP, Gupta G. (2011) Synergistic chemoprotective mechanisms of dietary phytoestrogens in a select combination against prostate câncer. *J Nutr Biochem*. 22: 723–1.
- Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D. (2005) Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 102:1859–4.
- Lazarevic B, Karlsen SJ, Saatcioglu F. (2008) Genistein differentially modulates androgen-responsive gene expression and activates JNK in LNCaP cells. *Oncol Rep*. 19: 1231-5.
- Leav I, Merk FB, Kwan PW, Ho SM. (1989) Androgen supported estrogen enhanced epithelial proliferation in the prostates of intact Noble rats. *Prostate* 15: 23–40.
- Le GM, Gomez SL, Clarke CA, Glaser SL, West DW. (2002) Cancer incidence patterns among Vietnamese in the United States and Ha Noi, Vietnam. *Int. J. Cancer*. 102: 412–17.

- Le HT, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. (2003) Plant-derived 3,3'-Diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 278:21136–44.
- Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. (2011) Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 40: 565-5.
- Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. (2005) Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res.* 65: 6934-2.
- Liao C, Kannan K. (2013) Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem.* 61:4655–2.
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. (2003) Multiple mutation and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:776.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253: 165-4.
- Markey CM, Michaelson CL, Sonnenschein C, Soto AM. (2001) Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. In: Metzler M, editor. The handbook of environmental chemistry, vol. 3. Part L, endocrine disruptors - part I. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 129–53.
- McNeal, JE. (1988) Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 12, 619-33.
- Mora LB, Buettner R, Ahmad N, Bassel Y, Jove R, Seigne JD. (2001) Prostate adenocarcinoma: cellular and molecular abnormalities. *Cancer Control.* 8: 551-61.
- Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. (2001) Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology* 142:4795–05.
- Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, *et al.* (2009) A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer* 8: 100.
- Oesterling, J.E. (1991) The origin and development of benign prostatic hyperplasia. An age-dependent process. *J Androl*, 12, 348-5.
- Perabo FGE, Von Löw EC, Ellinger J, von Rücker A, Müller SC, Bastian PJ. (2008) Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 11(1):6–12.
- Pienta KJ, Smith DC. (2005) Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. *CA Cancer J Clin.* 55: 300-18.
- Pfeil K, Eder IE, Putz T, Ramoner R, Culig Z, Ueberall F, Bartsch G, Klocker H. (2004) Long-term androgen-ablation causes increased resistance to PI3K/Akt pathway inhibition in prostate cancer cells. *Prostate.* 58(3):259-8.
- Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. (2007) Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol.* 23: 374-2.
- Prins GS, Korach KS. (2008) The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids.* 73: 233–44.
- Ramos JW. (2008 a) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:2707–19.
- Ramos S. (2008 b) Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507 – 26.

- Rasola A, Sciacovellia M, Chiaraa F, Pantica B, Brusilowb WS, Bernardia P. (2010) Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proceedings of the National Acad. of Sciences of the USA*. 107: 726-31.
- Rittmaster RS, Fleshner NE, Thompson IM. (2009) Pharmacological approaches to reducing the risk of prostate cancer. *Eur Urol*. 55: 1064-3.
- Rubin BS. (2011) Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 127:27-4.
- Safe S, Papineni S, Chintharlapalli S. (2008) Cancer chemotherapy with indole-3-carbinol, bis(3'-indolyl)methane and synthetic analogs. *Cancer Letters*. 269:326–38.
- Sarkar FH & Li Y. (2004) Indole-3-Carbinol and Prostate Cancer. *J. Nutr*. 134: 3493S–3498S.
- Saunders LR, Verdin E. (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26:5489–504
- Scarano WR, Sousa DE, Campos SG, Corradi LS, Vilamaior PSL, Taboga SR. (2008) Estrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Intern. J. Exp. Pathol*. 89: 25-37.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Campos SGP, Justulin Jr. LA, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas WG. (2009) Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol*. 262: 215-3.
- Setchell KD. (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*. 68: 1333-46.
- Setchell KD. (2001) Soy isoflavones — benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr*. 20:354–83.
- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M, Konishi N. (2003) Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis*. 24:1067–75.
- Singletary K, Jackson S, Milner J. (2005) Non-nutritive components in foods as modifiers of the cancer process. In: Bendich A. and Deckelbaum R, editors. Preventive nutrition, the comprehensive guide for health professionals. *Totowa (NJ): Humana Press*. 55 – 88.
- Smith S, Sepkovic D, Bradlow HL, Auborn KJ. (2008) 3,3'-Diindolylmethane and Genistein Decrease the Adverse Effects of Estrogen in LNCaP and PC-3 Prostate Cancer Cells. *J. Nutr*. 138: 2379–5.
- Steiner MS, Raghov S, Neubauer B. (2001) Selective estrogen receptor modulators for the chemoprevention of prostate cancer. *Urology*. 57:68–2.
- Stricker TP, Kumar V. (2010) Robbins & Cotran Patologia Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier . 259-330.
- Taplin ME, Ho SM. (2001) Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:3467.
- Tarapore P, Ying J, Ouyang B, Burke B, Bracken B, et al. (2014) Exposure to Bisphenol A Correlates with Early-Onset Prostate Cancer and Promotes Centrosome Amplification and Anchorage-Independent Growth In Vitro. *PLoS ONE* 9(3): e90332
- Thomas C, Gustafsson JA. (2011) The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 11(8):597–08.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. (2002) The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development*. 129: 1905-2.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. (2005) Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol*. 40:121–8.

- Uzgar AR, Kaplan PJ and Greenberg NM. (2003). Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate* 55: 128-39.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee DH, *et al.* (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and non-monotonic dose responses. *Endocr Rev* 33:378–455.
- 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: 809-6.
- Wang X, Ma D, Olson WC, Heston WD. (2011) In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen. *Mol Cancer Ther* 10: 1728-39.
- Wang TTY, Schoene NW, Milner JA, Kim YS. (2012) Broccoli-derived phytochemicals Indole-3-carbinol and 3,3-Diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: comparison with other cancer preventive phytochemicals. *Mol Carcinogenesis* 51:244–56
- Watson CS, Bulayeva NN, Wozniak AL, Finnerty CC. (2005) Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor- α : estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids*. 70: 364-1.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. (2006) Large effects from small exposures, III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 147:S56–69.
- Wen Y, Hu MCT, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, *et al.* (2000) HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res* 60: 6841–5.
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. (2002) The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1:515–4.
- Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE. (2005) Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 65(1):54–65.
- Wu TY, Saw CL, Khor TO, Pung D, Boyanapalli SS, Kong AN. (2011) In vivo pharmacodynamics of indole-3-carbinol in the inhibition of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: involvement of Nrf2 and cell cycle/apoptosis signaling pathways. *Mol Carcinog*. 51(10):761-70.
- Yang GS, Wang Y, Wang P, Chen ZD. (2007) Expression of oestrogen receptor- α and oestrogen receptor- β in prostate cancer. *Chin Med J (Engl)*. 120: 1611-5.
- Zhu J, Li Y, Guan C, Chen Z. (2012) Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of 3,3'-diindolylmethane in human cervical cancer cells. *Oncol Rep*. 28:1063–1068.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Vom Saal FS. (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology*. 153:4097–10.