

*Associação entre a curcumina e o
bisfenol A e seus efeitos sobre o
microambiente prostático do
gerbilo da Mongólia*

Camila Helena Facina

DOUTORADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



Biologia
Estrutural



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

Camila Helena Facina

Associação entre a curcumina e o bisfenol A e seus efeitos sobre o
microambiente prostático do gerbilo da Mongólia

São José do Rio Preto
2019

Camila Helena Facina

Associação entre a curcumina e o bisfenol A e seus efeitos sobre o
microambiente prostático do gerbilo da Mongólia

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto
2019

F141a Facina, Camila Helena

 Associação entre a curcumina e o bisfenol A e seus efeitos sobre o
microambiente prostático do gerbilo da Mongólia / Camila Helena
Facina. -- São José do Rio Preto, 2019
134 f. : il., tabs., fotos

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

 Orientador: Sebastião Roberto Taboga

 1. Morfologia. 2. Próstata. 3. Gerbilos. 4. Curcumina. 5. Bisphenol
A. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Camila Helena Facina

Associação entre a curcumina e o bisfenol A e seus efeitos sobre o
microambiente prostático do gerbilo da Mongólia

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
UFG – Câmpus Goiânia

Profa. Dra. Ana Paula da Silva Perez
UFG – Câmpus Jataí

Profa. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos
UFSJ – Centro-Oeste Dona Lindu.

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
30 de abril de 2019

AGRADECIMENTOS

Este espaço eu dedico àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado, pois nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos objetivos.

Agradeço...

Ao meu orientador **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga**, obrigada pela oportunidade de tê-lo como orientador de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Agradeço o incentivo e a confiança.

À **Profª Drª Silvana Gisele Pegorin de Campos, Profª Drª Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Profª Drª Ana Paula da Silva Perez, Prof. Dr. Luis Octávio Regasini** membros titulares e aos membros suplentes **Profª Drª Ana Cláudia Polli Lopes, Prof. Dr. Classius de Oliveira e Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano**, por aceitarem a indicação para formarem minha banca examinadora e, pela contribuição futura neste trabalho.

À **Juliana Bilachi**, por estar presente no momento em que mais precisei de incentivo e por ter vivenciado comigo os momentos finais e mais tensos da elaboração deste manuscrito. Obrigada pelo seu carinho, amizade e por me fazer acreditar que eu conseguiria atingir meus objetivos. Você sempre estará em meu coração!

Ao **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/São José do Rio Preto**, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, que proporcionou meu aprendizado.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal** que contribuíram no aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e na minha formação profissional.

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

Em especial, agradeço...

À **Deus** por guiar meus caminhos e sempre estar ao meu lado. Toda gratidão do mundo pelos momentos que passei e por todos os aprendizados. Obrigada Senhor, pelo seu maravilhoso amor!

Aos meus pais **Benedito S. Facina** e **Rosa Maria P. P. Facina** que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Essa conquista não é só minha, mas nossa. Obrigada pelo amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. **Amo muito vocês!** Mãezinha, minha companheira de todas as horas. Obrigado por ter me oferecido todo o apoio e carinho, dia após dia, por me entender e me ajudar nos momentos difíceis que passamos juntas. Sem você e suas orações eu não teria conseguido passar por cada um deles. Todo amor e gratidão a você, minha rainha e minha inspiração!

A toda a **minha família** pelo amor, apoio, torcida e confiança e por compreender as minhas ausências. Obrigada pela preocupação e, principalmente, por todas as orações feitas ao meu favor. Amo todos vocês!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado que a exposição a substâncias químicas presentes no ambiente pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na próstata. Estas substâncias, denominadas desreguladores endócrinos, mimetizam hormônios esteroides, agindo diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo. O bisfenol-A, uma das substâncias químicas de maior produção no mundo, é utilizado na composição de diversos produtos. Estudos epidemiológicos indicam que compostos polifenólicos naturais reduzem a incidência de vários tipos de cânceres. Dentre eles, a curcumina possui um alto potencial farmacológico incluindo atividades anti-inflamatória e antitumoral, no entanto este fitoquímico possui baixa biodisponibilidade. A piperina pode aumentar a concentração de curcumina no soro e sua absorção e biodisponibilidade. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar se a curcumina reverte as alterações impostas pelo bisfenol-A sobre a glândula prostática, bem como avaliar se o composto piperina aumenta a possível atividade protetora da curcumina. Foram utilizados gerbilos machos/adultos (*Meriones unguiculatus*) divididos em nove grupos experimentais: **C:** água *ad libitum*; **CO:** óleo de milho, via gavagem, a cada dois dias; **BPA:** BP-A 50µg/kg/dia na água; **Cm:** 100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias; **P:** 20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias; **BCm:** BP-A 50µg/kg/dia na água+100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias; **BCmP:** BP-A 50µg/kg/dia na água+100mg/kg/dia de curcumina+20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias; **BP:** BP-A 50µg/kg/dia na água+20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias; **CmP:** 100mg/kg/dia de curcumina+20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias. A eutanásia dos animais aconteceu vinte e nove semanas após o início do experimento e foram analisados os lobos Ventral e Dorsolateral prostáticos. As metodologias utilizadas envolveram análises quantitativas e estatísticas da ingestão de bisfenol-A, peso corpóreo e prostático, dosagens hormonais, cálculo da incidência e multiplicidade de lesões prostáticas e inflamações, fator forma nuclear, análises estereológicas bem como análises morfológicas e imunohistoquímicas. Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram constatadas em ambos os lobos prostáticos. Contudo, os animais dos grupos BPA e BCm apresentaram uma maior incidência e multiplicidade de lesões prostáticas. Este dado enfatiza que, a dose ambiental de 50 µg kg/dia de bisfenol-A não é segura para a homeostase prostática. Por outro lado, os animais dos grupos BP e BCmP apresentaram redução na frequência dessas lesões, revelando incidência e multiplicidade com valores bem próximos aos do grupo controle. O compartimento estromal dos grupos BPA e BCm apresentou remodelação das fibras de

colágeno, além de diversos pontos de desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a invasão estromal. A expressão de VEGF, MMP-9, MMP-2, IL-6 e IL-10 aumentou significativamente nestes grupos, enquanto que nos demais grupos estes elementos não sofreram alteração. A curcumina isoladamente promoveu efeitos benéficos sutis nos lobos prostáticos. A adição de piperina resultou em efeitos mais significativos para a glândula prostática, como a redução das lesões pré-malignas e a ausência das lesões malignas em ambos os lobos. O entendimento dos fatores capazes de modular o microambiente prostático torna possível o desenvolvimento de estratégias terapêuticas na prevenção ou na redução da evolução dos distúrbios prostáticos.

Palavras-chave: Bisfenol A. Desregulador Endócrino. Curcumina. Piperina. Fitoquímicos. Gerbilo da Mongólia. Próstata.

ABSTRACT

Recent studies have shown that exposure to chemicals present in the environment can cause permanent morphophysiological changes in the prostate. These substances, called endocrine disruptors, mimic steroid hormones, acting directly on the organs of the reproductive tract. Bisphenol-A, one of the highest-producing chemicals in the world, is used in the composition of various products. Epidemiological studies indicate that natural polyphenolic compounds reduce the incidence of various types of cancers. Among them, curcumin has a high pharmacological potential including anti-inflammatory and antitumor activities, however this phytochemical has low bioavailability. Piperine can increase the concentration of curcumin in serum and its absorption and bioavailability. Thus, the objectives of this study were to evaluate whether curcumin reverses the changes imposed by bisphenol-A on the prostate gland, as well as assess whether the piperine compound increases the possible protective activity of curcumin. Adult male gerbils (*Meriones unguiculatus*) were divided into nine experimental groups: **C:** water ad libitum; **CO:** corn oil, via gavage, every two days; **BPA:** BP-A 50µg/kg/day in water; **Cm:** 100mg/kg/day of curcumin, via gavage, every two days; **P:** 20mg/kg/day of piperine, via gavage, every two days; **BCm:** BP-A 50µg/kg/day in water+100mg/kg/day of curcumin, via gavage, every two days; **BCmP:** BP-A 50µg/kg/day in water+100mg/kg/day of curcumin+20mg/kg/day of piperine, via gavage, every two days; **BP:** BP-A 50µg/kg/day in water+20mg/kg/day of piperine, via gavage, every two days; **CmP:** 100mg/kg/day of curcumin+20mg/kg/day of piperine, via gavage, every two days. Euthanasia of the animals occurred twenty-nine weeks after the beginning of the experiment and the Ventral and Dorsolateral lobes of the prostate were analyzed. The methodologies used involved quantitative and statistical analyzes of bisphenol-A intake, body and prostate weight, hormonal dosages, calculation of the incidence and multiplicity of prostatic lesions and inflammations, nuclear form factor, stereological analyzes as well as morphological and immunohistochemical analyzes. Pre-malignant and malignant lesions were found in both prostate lobes. However, the animals of the BPA and BCm groups had a higher incidence and multiplicity of prostatic lesions. This data emphasizes that the environmental dose of 50 µg/kg/day of bisphenol-A is not safe for prostate homeostasis. On the other hand, the animals of the BP and BCmP groups presented a reduction in the frequency of these lesions, revealing incidence and multiplicity with values very close to those of the control group. The stromal compartment of the BPA and BCm groups showed remodeling of the collagen fibers, as well as several points of disassembly of the smooth muscle cell layer, favoring stromal invasion.

The expression of VEGF, MMP-9, MMP-2, IL-6 and IL-10 increased significantly in these groups, whereas in the other groups these elements did not change. Curcumin alone promoted subtle benefic effects in the prostate lobes. The addition of piperine resulted in more significant effects on the prostate gland, such as reduction of premalignant lesions and absence of malignant lesions in both lobes. The understanding of factors capable of modulating the prostatic microenvironment makes possible the development of therapeutic strategies in the prevention or reduction of the evolution of prostatic disorders.

Key words: Bisphenol A. Endocrine disruptor. Curcumin. Piperine. Phytochemicals. Mongolian's Gerbil. Prostate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 – Visão lateral (A), dorsal (B, D) e ventral (C) do Complexo Prostático do gerbilo adulto (esquemáticamente e fresco).	21
Figura 2 – Fórmula Estrutural do bisfenol A.	24
Figura 3 – Fórmula Estrutural da Curcumina (<i>Curcuma longa</i> L.)	26
Figura 4 – Fórmula Estrutural da Piperina (<i>Piperis Nigrum</i>)	26

Artigo 1

Figura 1 – Delineamento Experimental do estudo.	33
Figura 2 – Consumo semanal de bisfenol A (mL) por grupo experimental.	59
Figura 3 – Análise Morfológica do lobo Dorsolateral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos.	60
Figura 4 – Análise Morfológica do lobo Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos.	61
Figura 5 – Volume absoluto (mm ³) epitelial (A e B) e luminal (C e D) na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos.	62
Figura 6 – Dados Cariométricos do lobo Dorsolateral.	63
Figura 7 – Dados Cariométricos do lobo Ventral.	64
Figura 8 – Incidência de lesões histopatológicas (%) no lobo Dorsolateral (A) e Ventral (B) de gerbilos adultos após 29 semanas de tratamento.	65
Figura 9 – Multiplicidade de lesões prostáticas Pré-Malignas (A e B) e Malignas (C e D) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por 29 semanas.	66
Figura 10 – Multiplicidade de Inflamações Intraluminais (IIL) (A e B), Inflamações Subepiteliais (ISE) (C e D) e Inflamações Periductais (E e F) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por 29 semanas.	67
Figura 11 – Imunoexpressão do Receptor de Andrógeno (AR) na próstata Dorsolateral e Ventral de gerbilos adultos.	68
Figura 12 – Níveis séricos de testosterona (ng/mL) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	69

Artigo 2

Figura 1 – Desenho experimental do estudo.	76
Figura 2 – Elementos Colagênicos do lobo Dorsolateral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	100
Figura 3 – Elementos Colagênicos do lobo Ventral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	101
Figura 4 – Fibras Reticulares do lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	102
Figura 5 – Fibras Reticulares do lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	103
Figura 6 – Volume absoluto (mm^3) de colágeno na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos.	104
Figura 7 – Elementos elásticos do lobo Dorsolateral prostático de gerbilos adultos.	105
Figura 8 – Elementos elásticos do lobo Ventral prostático de gerbilos adultos.	106
Figura 9 – Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso no lobo Dorsolateral.	107
Figura 10 – Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso no lobo Ventral.	108
Figura 11 – Volume absoluto (mm^3) de músculo liso na próstata dorsolateral e ventral de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos.	109
Figura 12 – Imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no lobo Dorsolateral de gerbilos adultos.	110
Figura 13 – Imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no lobo Ventral de gerbilos adultos.	111
Figura 14 – Volume absoluto (mm^3) de vasos sanguíneos na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos.	112
Figura 15 – Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 2 (MMP-2) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	113
Figura 16 – Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 2 (MMP-2) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	114
Figura 17 – Volume absoluto (mm^3) de Metaloproteinase de Matriz tipo 2 (MMP-2) nos lobos Dorsolateral e Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	115
Figura 18 – Imunoexpressão de Metaloproteinase de Matriz tipo 9 (MMP-9) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	116
Figura 19 – Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 9 (MMP-9) no	

lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	117
Figura 20 – Volume absoluto (mm ³) de Metaloproteínases de Matriz tipo 9 (MMP-9) nos lobos Dorsolateral e Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	118
Figura 21 – Imunoexpressão de Interleucina tipo 6 (IL-6) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	119
Figura 22 – Imunoexpressão de Interleucina tipo 6 (IL-6) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	120
Figura 23 – Imunoexpressão de Interleucina tipo 10 (IL-10) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	121
Figura 24 – Imunoexpressão de Interleucina tipo 10 (IL-10) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos.	122

LISTA DE TABELAS

Artigo1

Tabela 1 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o ganho de peso, gordura corporal e cintura de gerbilos adultos após 29 semanas. 70

Tabela 2 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo dos lobos e complexo prostático de gerbilos adultos após 29 semanas. 71

Artigo 2

Tabela 1 – Multiplicidade de lesões prostáticas de gerbilos adultos após 29 semanas de tratamento. 123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de Andrógeno
B	Bexiga Urinária
BCm	Grupo tratado com bisfenol A e curcumina
BCmP	Grupo tratado com bisfenol A e curcumina e piperina
BP	Grupo tratado com bisfenol A e piperina
BpA	Bisfenol A
BPA	Grupo tratado com bisfenol A
C	Grupo controle
CO	Grupo tratado com óleo de milho
Cm	Grupo tratado com curcumina
CM	Carcinoma Microinvasivo
CmP	Grupo tratado com curcumina e piperina
CP	Complexo Prostático
DAB	Diaminobenzidina
EDCs	Desreguladores Endócrinos
ENM	Estroma Não Muscular
Ep	Ep�t�lio Prostático
ER	Receptor de Estrógeno
ER�	Receptor de Estrógeno tipo Alfa
ER�	Receptor de Estrógeno tipo Beta
FE	Fibras Elásticas
FR	Fibras Reticulares
GC	Glândula Coaguladora
HE	Coloração por Hematoxilina-Eosina
IIL	Inflamação Intraluminal
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IPD	Inflamação Periductal
ISE	Inflamação Subepitelial
L	Lúmen Acinar
LA	Lobo Anterior

LD	Lobo Dorsal
LDL	Lobo Dorsolateral
LL	Lobo Lateral
LV	Lobo Ventral
MEC	Matriz Extracelular
ML	Músculo Liso
MMP-2	Metaloproteinases de Matriz tipo 2
MMP-9	Metaloproteinases de Matriz tipo 9
P	Grupo tratado com piperina
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
SUG	Seio Urogenital
VEGF-A	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VS	Vesícula Seminal
U	Uretra Pélvica e Músculo Uretral
α-actina	Alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>Próstata: Estrutura, Desenvolvimento e Morfofisiologia.</i>	17
1.2	<i>Meriones unguiculatus</i> : Um modelo experimental para o estudo da próstata.	19
1.3	Ação de químicos ambientais sobre a próstata: uma visão sobre o BP-A.	21
1.4	Fitoquímicos e carcinogênese prostática: Curcumina e Piperina.	24
2	OBJETIVOS	27
3	ARTIGO 1	29
	Associação entre a curcumina, a piperina e o bisfenol A e seus efeitos sobre o ambiente prostático do gerbilo da Mongólia.	
4	ARTIGO 2	72
	Remodelação estromal na próstata dorsolateral e ventral do gerbilo após exposição prolongada ao BPA e aos fitoquímicos curcumina e piperina.	
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Próstata: Estrutura, Desenvolvimento e Morfofisiologia.*

O câncer de próstata, diagnosticado nos homens e também em animais experimentais, tem os andrógenos e estrógenos altamente envolvidos como fatores de sobrevivência e progressão, porém, os mecanismos moleculares desse problema são complexos, pois além de ser uma doença relacionada à idade, raça, fatores hereditários e andrógeno-dependente, também é influenciada por fatores ambientais, dietas, repostas imunes e inflamatórias (HUYNH et al., 2001; DE MARZO et al., 2007; WALKER; HO, 2012; BOSLAND et al., 2015). O grande interesse em se compreender a morfofisiologia da glândula prostática deve-se tanto ao seu complexo processo de desenvolvimento, quanto à alta incidência de doenças prostáticas, como hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma (MARKER et al., 2003).

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino, que juntamente com a vesícula seminal contribui com a produção de nutrientes que constituem o fluido seminal. Essa glândula promove a conservação do pH apropriado e do gradiente iônico desta secreção (UNTERGASSER; MADERSBACHER; BERGER, 2005) e garante a viabilidade, motilidade e sobrevivência aos espermatozóides, contribuindo no processo de fertilização (ROCHEL et al., 2007; TABOGA et al., 2009). Adicionalmente, as células prostáticas possuem mecanismos enzimáticos capazes de ativar e coordenar a síntese de hormônios sexuais, responsáveis pela manutenção e crescimento glandular (HERMANN et al., 2000).

A glândula prostática está presente na maioria dos mamíferos, no entanto com morfologia bastante variável entre os grupos (ROCHEL et al., 2007). A próstata humana adulta apresenta zonas distintas intimamente associadas, constituindo um órgão com morfologia compacta (PRICE, 1963). É dividida em três zonas: periférica, central e de transição (MCNEAL et al., 1983). Estas zonas possuem diferentes origens embrionárias e podem ser distinguidas por meio da posição anatômica, de análises histológicas, funções biológicas e sensibilidade ao desenvolvimento de doenças prostáticas (LEE; OLUGBADE; KISCHEBAUM, 2011). Em roedores a próstata é composta por quatro lobos distintos, os quais são nomeados de acordo com sua posição em relação à uretra (JESIK; HOLLAND; LEE, 1982; ROCHEL et al., 2007). Esses lobos são bilateralmente simétricos e

circundam a uretra na base da bexiga e são designados como Lobo Lateral (LL), Lobo Ventral (LV), Lobo Dorsal (LD) e ligado às vesículas seminais, o Lobo Anterior (LA) ou Glândula Coaguladora (GC) (JESIK; HOLLAND; LEE, 1982; PRICE, 1963). Em um mesmo lobo, os ductos prostáticos apresentam variações quanto ao tipo celular, resposta a andrógenos, síntese e secreção de proteínas (HAYASHI et al., 1991; KINBARA; CUNHA, 1996; BANERJEE et al., 1998). No gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) a próstata é uma glândula tubuloacinar dividida em quatro lobos: Lobo Dorsolateral (LDL), Lobo Ventral (LV), Lobo Dorsal (LD) e Glândula Coaguladora (GC) que são muito semelhantes aos de outros roedores (ROCHEL et al., 2007) (Figura 1). Apesar das diferenças anatômicas, estudos recentes encontraram semelhanças nos mecanismos moleculares básicos para o desenvolvimento do câncer de próstata em roedores e homens, sendo os primeiros modelos válidos para estudar a neoplasia humana (NASCIMENTO-GONÇALVES et al., 2018).

A camada epitelial é constituída por células secretoras, intermediárias, basais e neuroendócrinas. Essas células são dependentes dos hormônios esteroides e reagem diferentemente a cada um deles (DE MARZO et al., 2007). As células secretoras, as basais e as neuroendócrinas se diferem quanto à regulação hormonal e são responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular que compõem o fluido prostático (BONKHOFF; FIXEMER; REMBERGER, 1998). O estroma prostático é composto por células musculares lisas e fibroblastos concentrados em uma matriz extracelular ao redor dos ductos e ácinos. A matriz extracelular é composta por fibras colagênicas, elásticas, proteoglicanos, moléculas reguladoras, moléculas que se associam a fatores de crescimento e enzimas remodeladoras (TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2005). Além desses componentes teciduais há também células endoteliais vasculares, células do sistema imune e macrófagos teciduais (TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001).

Em humanos e roedores, as etapas da embriogênese prostática apresentam similaridades e diferenças (CUNHA; COOKE; KURITA, 2004a). Esse evento inicia-se a partir de uma estrutura de origem endodérmica indiferenciada, o seio urogenital (SUG), uma extensão derivada do intestino grosso denominada cloaca (CUNHA; DONJACOUR; SUGIMURA, 1986). O SUG é formado por um componente epitelial e um componente mesenquimal. O desenvolvimento prostático a partir do seio urogenital ocorre na presença de andrógenos como resultado de interações entre a região epitelial e mesenquimal (CUNHA et al., 2004b). As células mesenquimais produzem e secretam fatores parácrinos específicos que

ditam o crescimento e diferenciação da glândula prostática. Os fatores de transcrição da família homeobox NKx3.1, Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13, os fatores da família FGF (FGF-7 e 10) são de extrema importância na morfogênese prostática (PRINS; PUTZ, 2008). Em humanos o desenvolvimento prostático inicia-se, aproximadamente, no primeiro trimestre e se completa logo em seguida ao nascimento. Por outro lado, em roedores o desenvolvimento inicia-se próximo ao décimo sétimo dia embrionário e o completo crescimento e maturação ocorre durante a puberdade (25° - 40° dia) (PRINS; KORACH, 2008).

O crescimento e desenvolvimento da próstata se estendem até que a maturidade sexual seja atingida e manutenção da homeostase prostática no indivíduo adulto é garantida por hormônios esteroides (CUNHA; DONJACOUR; SUGIMURA, 1986; MARKER et al., 2003). O receptor de andrógeno (AR) bem como o receptor de estrógeno tipo alfa (ER α) e tipo beta (ER β) são determinantes para o desenvolvimento prostático. Esses receptores passam a ser expressos em locais e momentos específicos. Enquanto o ER α é expresso predominantemente no mesênquima, durante estágios iniciais do desenvolvimento, o ER β tem sua expressão localizada no epitélio nas fases de diferenciação das células epiteliais prostáticas (PRINS; KORACH, 2008; PRINS; PUTZ, 2008).

1.2 Meriones unguiculatus: Um modelo experimental para o estudo da próstata.

Modelos animais têm sido utilizados para estudar diversas doenças, como câncer, diabetes, Alzheimer, obesidade, entre outras. Os modelos animais podem contribuir com informações para o entendimento de muitos aspectos envolvidos no desenvolvimento da doença e para a descoberta e desenvolvimento de terapias farmacológicas e não farmacológicas e estratégias preventivas, que podem ser testadas em ensaios clínicos (NASCIMENTO-GONÇALVES et al., 2018).

Os gerbilos (*Meriones unguiculatus*) são roedores murídeos da subfamília Gerbillinae. São utilizados em pesquisas laboratoriais desde a década de 1960 (WILLIAMS, 1974). Possuem anatomia similar à do rato e do camundongo e na idade adulta, ambos os sexos, apresentam 11,5 a 14,5 cm de comprimento corporal e pesam cerca de 70 gramas. A próstata dos gerbilos, na faixa etária de aproximadamente 100 dias, possui ácinos com epitélio prismático simples e altamente secretor. Entre as porções glandulares, há estroma conjuntivo vascularizado, com poucas fibras elásticas e conjuntivas. As células musculares lisas são bastante compactadas e estão dispostas ao redor dos ácinos (ROCHEL et al., 2007).

A próstata do gerbilo (Figura 1), apesar de ser multilobular, possui lobos compactos e suas características teciduais, disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares são muito semelhantes às encontradas na próstata humana (PINHEIRO et al., 2003; GÓES et al., 2007). Assim, as semelhanças morfofuncionais estabelecidas até o momento favorecem situações experimentais e correlações com o homem, já que a próstata é de extrema importância para a homeostase e a funcionalidade do aparelho reprodutor masculino.

Os gerbilos são cada vez mais utilizados em diversas áreas da pesquisa científica tais como morfologia (AOKI-KOMORI et al., 1994; ARKIN et al., 2003; SANTOS et al., 2000; PEREZ et al., 2012, 2017; BIANCARDI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2010, 2013, 2017; CAMPOS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; GOMES et al., 2019), inflamação (QUINTAR et al., 2017), imunologia (NAWA et al., 1994; KHAN; HORII; NAWA, 1993; KHAN, 1995; KUROKAWA et al., 1998), fisiologia (NOLAN; BROWN; CAVANAGH, 1990; GIUFFRIDA et al., 1992; FUJII et al., 1994), parasitologia (HORII; ISHIKAWA; NAWA, 1992; OKADA et al., 1997), culturas de células (MINAKAWA, 1989; FENTEM; HAMMOND; FRY, 1991; HERMAN et al., 1992; HASHIMOTO et al., 1993, 1995), embriologia (SANCHES et al., 2014, 2017 a), microbiologia (TATEMATSU; TSUKAMOTO; MIZOSHITA, 2005; BLEICH et al., 2012; BECKETT et al., 2018), comportamento animal (ARKIN et al., 2003).

Este roedor tem se revelado um bom modelo para o estudo da próstata apresentando respostas significativas quanto a tratamentos hormonais (ROCHEL-MAIA et al., 2011; CAMPOS et al., 2014; ANTONIASSI et al., 2017; BIANCARDI et al., 2017; SANCHES et al., 2017b; PINTO et al., 2018), exposição a desreguladores endócrinos (BIANCARDI et al., 2012; CAMPOS et al., 2015; FALLEIROS-JÚNIOR et al., 2016; PEREZ et al., 2016; COSTA et al., 2017; CHRISTANTE et al., 2018; FACINA et al., 2018), drogas contra hiperplasia prostática humana (CORRADI; GOES; TABOGA, 2004; CORRADI et al., 2009), desenvolvimento de neoplasias associadas ao envelhecimento (PEGORIN DE CAMPOS et al., 2006; CAMPOS et al., 2008; CUSTÓDIO et al., 2008; CAMPOS et al., 2010, 2014; OLIVEIRA et al., 2011), carcinogênese química (CAO et al., 2002; KAWAZOE et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010, 2013, 2017).

O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia desta glândula.

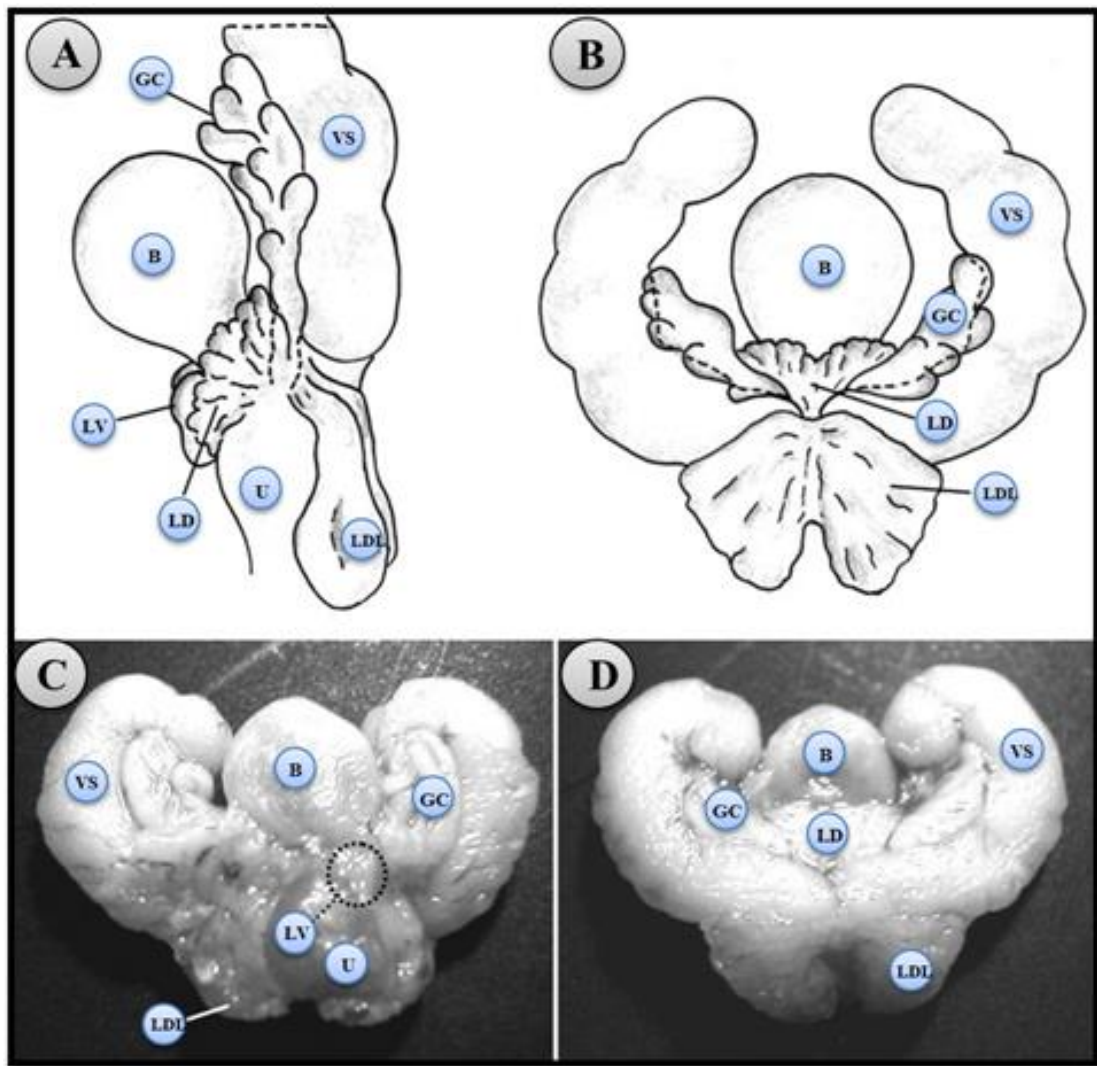


Figura 1. Visão lateral (A), dorsal (B, D) e ventral (C) do Complexo Prostático do gerbilo adulto (esquemáticamente e fresco). B- Bexiga Urinária; GC – Glândula Coaguladora; LD – Lobo Dorsal; LDL – Lobo Dorsolateral; LV – Lobo Ventral; VS – Vesícula Seminal; U – Uretra Pélvica e Músculo Uretral. FONTE: Modificado de ROCHEL *et al.*, 2007).

1.3 Ação de químicos ambientais sobre a próstata: uma visão sobre o BP-A

O câncer de próstata representa 15% de todos os novos casos de câncer em todo o mundo, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados a cada ano (PURSHOUSE; PROTHEROE, 2019). Nos países desenvolvidos é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de mortalidade, é passível de prevenção e cura (BARRY; SIMMONS, 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018; PDQ®, 2019). A patologia molecular do câncer de próstata é bastante complexa, pois é

uma doença relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno dependentes, além de ser influenciada por hormônios sexuais, dietas, respostas imunes e inflamatórias e fatores ambientais (BARDIA et al., 2009; COONEY, 2017; KIM; KIM, 2017; DOBBS et al., 2018; PASCUAL-GELER et al., 2018; SFANOS et al., 2018; WALSH et al., 2018).

Estudos recentes têm demonstrado que a exposição a uma gama de substâncias químicas presentes no meio ambiente pode causar alterações morfológicas e fisiológicas permanentes na próstata. Estas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos (EDC's) e são encontrados em vários materiais tais como pesticidas, metais, aditivos e contaminantes de alimentos, produtos industrializados e de cuidados pessoais (WHO/UNEP, 2013; PATERNI; GRANCHI; MINUTOLO, 2016). A exposição humana aos EDCs ocorre pela ingestão de alimentos, água, poeira, inalação de partículas e gases no ar e pela pele. Também pode ocorrer da gestante para o feto ou criança em desenvolvimento por meio da placenta e do leite materno (WHO/UNEP, 2013).

Os desreguladores endócrinos são compostos que interagem com receptores hormonais como agonistas, antagonistas ou mistura de ambos. Essas substâncias podem ativar inadequadamente um receptor hormonal, mesmo quando o hormônio não está presente ou alterar a ação ou o metabolismo desses hormônios no organismo (BIGSBY et al., 1999). Consequentemente podem agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo de machos e fêmeas, pois competem com os esteroides endógenos pelos sítios de ligação dos seus receptores (BIGSBY et al., 1999; TOPPARI, 2008).

Muitos destes EDC's pertencem à classe dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos produzidos industrialmente. Os xenoestrogênios incluem compostos que podem alterar a síntese, a atividade e o metabolismo de estrógenos endógenos afetando, assim, o desenvolvimento e a reprodução de organismos (JIN et al., 2013). Atualmente é conhecida uma infinidade de xenoestrógenos com ação de desregulador endócrino. Um exemplo bastante conhecido devido a sua ampla distribuição e pelos impactos causados sobre a saúde dos seres humanos e também sobre o meio ambiente é o bisfenol A (BP-A). O crescente interesse em estudar as ações do BP-A é devido ao fato de que a exposição a essa substância pode estar associada ao aumento da incidência de tipos de cânceres hormônio-dependente, como o câncer de próstata, mama e ovário (BRODY; RUDEL, 2003; MAFFINI et al., 2006; GAO et al., 2015).

O BP-A é um composto químico cristalino com fórmula $C_{15}H_{16}O_2$ e uma estrutura composta por dois grupos hidroxifenil (Figura 2) que lhe dão um leve odor fenólico

(CARIATI et al., 2019), muito utilizado na produção de plásticos policarbonato, selantes dentais, resinas epóxi, papéis térmicos, sendo um dos produtos químicos de maior volume de produção no mundo (VANDERBERG, 2007; PRINS et al., 2007). Possui rápida eliminação ($t_{1/2}$ 5.3 hours) após sua absorção (VÖLKE et al., 2002), mas a maioria dos seres humanos tem esse composto mensurável em sua urina indicando que há exposição crônica (CALAFAT et al., 2008). Estudos de Fernandez e colaboradores (2007) também apontam acúmulo de BP-A no tecido adiposo, com níveis detectáveis em 50% das amostras de tecido adiposo mamário de mulheres. Além disso, é capaz de interferir ou competir com hormônios endógenos em muitas atividades fisiológicas, tendo efeitos adversos na homeostase do organismo (D'ANGELO; SCAFURO; MECCARIELLO, 2019).

Diversos estudos com humanos e animais identificaram efeitos adversos para a saúde resultantes da exposição ao BP-A, tais como a obesidade, síndrome metabólica e resistência a insulina (BODIN et al., 2013, 2014; AMIN et al., 2019), doenças da glândula mamária (MURRAY et al., 2007; IBRAHIM; ELBAKRY; BAYOMY, 2016) e doenças prostáticas (CASTRO et al., 2013; FACINA et al., 2018), alterações neurológicas e comportamentais (ZHANG et al., 2014 a; WANG et al., 2016), alterações nos processos reprodutivos masculino (LI et al., 2016) e feminino (ZHANG et al., 2014b) entre muitos outros.

O BP-A possui efeitos estrogênicos e antiandrogênicos que podem alterar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Além disso, possui capacidade de alterar padrões epigenéticos normais com efeitos prejudiciais ao sistema reprodutor masculino (CARIATI et al., 2019). O BP-A liga-se tanto ao receptor de estrógeno nuclear ($ER\alpha$ e $ER\beta$) quanto aos receptores de estrógeno ligados à membrana plasmática. (GOULD et al., 1998; KUIPER et al., 1998; WOZNIAK; BULAYEVA; WATSON, 2005). A afinidade de ligação do BP-A ao $ER\alpha$ e $ER\beta$ é aproximadamente dez mil vezes menor que a dos estrógenos endógenos. Não obstante, ele é um completo agonista destes receptores estrogênicos (PRINS et al., 2008). Também, pode ligar-se aos receptores de andrógenos (AR) (SOHONI; SUMPTER, 1998) e aos receptores tireoidianos (MORIYAMA et al., 2002).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos a dose considerada segura para ingestão diária de BP-A é de 50 $\mu\text{g/kg/dia}$, segundo nível de efeito adverso mais baixo observado (LOAEL) e o fator de segurança de 1000 (ALONSO-MAGDALENA; QUESADA; NADAL, 2011; CORRALES et al., 2015; CASTRO et al., 2018). A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) baixou recentemente os níveis de exposição segura ao BP-A, baseado na ingestão diária segura, de 50 para 4

$\mu\text{g/kg/dia}$ (CORRALES et al., 2015). Entretanto, diversos estudos com roedores têm mostrado efeitos adversos da administração do bisfenol A em baixas concentrações sobre os diversos tecidos responsivos a hormônios (PRINS et al., 2011; CASTRO et al., 2013; WADIA et al., 2013; PRINS et al., 2018). Castro e colaboradores (2018) reportaram que a exposição a doses baixas de bisfenol A (2,4 e $10\mu\text{g/kg/dia}$) durante o desenvolvimento fetal e neonatal altera a expressão das enzimas aromatase e 5α -redutase, interferindo na produção *in situ* de estrógeno e andrógeno. A administração oral de bisfenol A ($2\mu\text{g/kg}$) em ratos adultos por um período de 14 dias reduziu significativamente a contagem de espermatozóides e o número de células germinativas. Além disso, os níveis séricos de testosterona e hormônio folículo-estimulante foram menores que os de animais controle (JIN et al., 2013). Adicionalmente, Facina e colaboradores (2018) reportaram que a exposição prolongada a doses baixas de bisfenol A aumentou a incidência e a multiplicidade de lesões prostáticas em gerbilos adultos.

Por muitos anos a próstata tem sido alvo de diversos estudos devido à sua importância clínica e a prevalência de doenças graves que afetam esse órgão. O impacto do bisfenol A na próstata tornou-se o centro de diversas pesquisas atuais com foco especial no entendimento de como o BP-A afeta a fisiopatologia prostática. Além disso, pouco se sabe a respeito dos efeitos da exposição prolongada ao BP-A durante a vida adulta sobre a histofisiologia prostática. Dessa forma, torna-se extremamente relevante o estudo dos efeitos desses agentes desreguladores endócrinos e seus possíveis mecanismos sobre a glândula prostática de animais adultos.

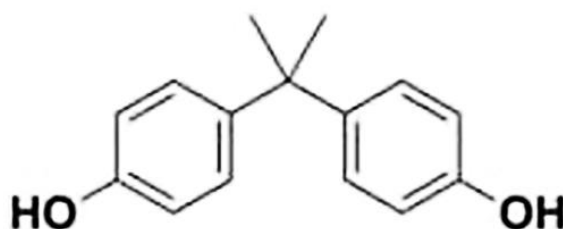


Figura 2. Fórmula Estrutural do bisfenol A. FONTE: Modificado de GRAMEC SKLEDAR; PETERLIN MAŠIČ, 2016.

1.4 Fitoquímicos e carcinogênese prostática: Curcumina e Piperina

A quimioprevenção é definida como a utilização de substâncias químicas naturais ou sintéticas que permitem a supressão, retardo ou inversão da carcinogênese (DUVOIX, 2005).

A maioria dos agentes quimiopreventivos conhecidos até hoje são extratos de plantas, que podem ser subdivididas em duas classes: agentes de bloqueio, os quais inibem a etapa de iniciação por prevenção da ativação cancerígena e agentes supressores, os quais inibem a proliferação de células malignas durante as etapas de promoção e progressão da carcinogênese (DUVOIX, 2005).

Medicamentos anticâncer causam danos às células saudáveis e toxicidade para órgãos normais. Estudos epidemiológicos indicam que compostos polifenólicos naturais utilizados na dieta diária reduzem o risco e incidência de vários tipos de cânceres. Estes compostos podem beneficiar a saúde geral e aumentar a longevidade. Dentre muitos agentes naturais anticâncer, a curcumina é um composto fitoquímico que tem demonstrado notável potencial terapêutico para diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de próstata. (KANAI, 2014).

A curcumina, *Curcuma longa* L. (Família Zingiberaceae), tem sido amplamente utilizada popularmente há séculos na cultura asiática. Suas propriedades medicinais têm sido atribuídas principalmente aos curcuminoides e o principal componente presente no rizoma inclui curcumina (diferuloilmetano) - (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadiene-3,5-diona). A estrutura da curcumina (Figura 3) foi descrita pela primeira vez por MILOBEDSKA; KOSTANECKI, em 1910. A base molecular dos efeitos anticâncer e quimiopreventivo da curcumina é atribuída ao seu efeito sobre vários processos celulares, incluindo fatores de transcrição, reguladores de crescimento, moléculas de adesão, os genes reguladores de apoptose, angiogênese e moléculas de sinalização celular (AKBIK et al., 2014).

A utilização da curcumina foi aprovada pela Food and Drug Administration e pela Organização Mundial da Saúde. O uso seguro foi fortemente apoiado no fato de este agente ter sido usado na medicina tradicional chinesa e hindu há milhares de anos (KANAI, 2014).

A curcumina mostrou potencial contra numerosos distúrbios humanos, no entanto este fitoquímico possui baixa biodisponibilidade devido à má absorção, metabolismo rápido e eliminação sistêmica. Estas condições demonstraram limitar sua eficácia terapêutica (ANAND et al., 2007). Estudos de Shoba e colaboradores (1998) mostraram o efeito da combinação de piperina, um conhecido inibidor da glucuronidação hepática e intestinal, com a curcumina. O estudo revelou que, a piperina aumenta a concentração de curcumina no soro e o grau de absorção e biodisponibilidade deste fitoquímico, tanto em ratos quanto em seres humanos, sem efeitos adversos.

A piperina (1-piperoyl piperidine) (Figura 4) é o principal alcalóide da pimenta do reino (*Piper nigrum*) e das pimentas longas (*Piper longum*) (SUNILA; KUTTAN, 2004). Possui inúmeras atividades anticâncer e muitos mecanismos para sua atividade foram sugeridos, incluindo a apoptose, a inibição da angiogênese, a supressão metastática e o bloqueio da invasão pela regulação das metaloproteínas de matriz (HWANG et al., 2011; LAI et al., 2012; DOUCETTE et al., 2013). Possui baixa toxicidade e alta taxa de absorção *in vitro* sem que haja alterações de sua estrutura durante o processo de absorção (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983; SURESH; SRINIVASAN, 2007).

Atualmente há poucos estudos na literatura que abordam os efeitos da curcumina sobre as doenças prostáticas. Além disso, pouco se sabe sobre seus efeitos em indivíduos adultos. Desta forma a administração da curcumina durante o tratamento com BP-A pode ter um efeito benéfico sobre a glândula prostática, revertendo ou retardando as alterações impostas pelo BP-A. Ademais, a associação da curcumina com a piperina poderá favorecer uma maior absorção daquela aumentando assim os benefícios do fitoterápico.

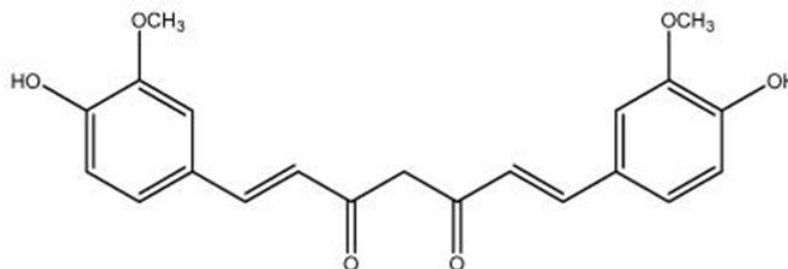


Figura 3. Fórmula Estrutural da Curcumina (*Curcuma longa* L.) FONTE: Retirado de: ZHENG et al., 2016.

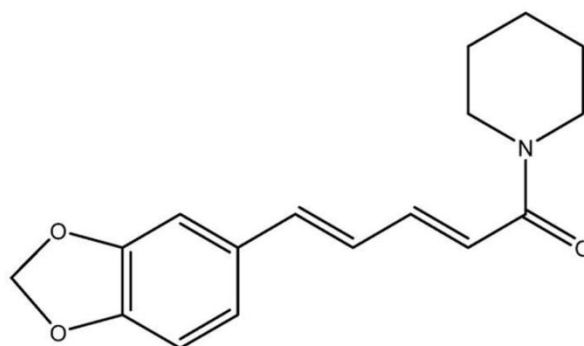


Figura 4. Fórmula Estrutural da Piperina (*Piperis Nigrum*) FONTE: Retirado de: ZHENG et al., 2016.

2 OBJETIVOS

- Avaliar as principais alterações morfofisiológicas na próstata do gerbilo adulto após exposição prolongada ao desregulador endócrino bisfenol A.
- Avaliar se a curcumina reverte as alterações impostas pelo desregulador endócrino bisfenol A sobre a glândula prostática.
- Avaliar se o composto fitoquímico piperina aumenta a possível atividade protetora da curcumina.

Esta tese foi escrita na forma de dois artigos científicos, os quais serão submetidos a revistas internacionais relacionadas ao tema.

ARTIGO 1. ASSOCIAÇÃO ENTRE A CURCUMINA, A PIPERINA E O BISFENOL A E SEUS EFEITOS SOBRE O AMBIENTE PROSTÁTICO DO GERBILO DA MONGÓLIA.

ARTIGO 2. REMODELAÇÃO ESTROMAL NA PRÓSTATA DORSOLATERAL E VENTRAL DO GERBILO APÓS EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO BISFENOL A E AOS FITOQUÍMICOS CURCUMINA E PIPERINA.

3. ARTIGO 1: ASSOCIAÇÃO ENTRE A CURCUMINA, A PIPERINA E O BISFENOL A E SEUS EFEITOS SOBRE O AMBIENTE PROSTÁTICO DO GERBILO DA MONGÓLIA.

Camila Helena Facina¹; Rejane Maira Góes¹, Patrícia Simone Leite Vilamaior¹, Sebastião Roberto Taboga¹.

¹ *Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.*

Correspondência: Sebastião Roberto Taboga (taboga@ibilce.unesp.br) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP. Rua Cristovão Colombo 2265 – Jardim Nazareth. São José do Rio Preto – SP. CEP: 15054-000. Brasil - (17) 3221-2386.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata representa 15% de todos os novos casos de câncer em todo o mundo, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados a cada ano [1]. Nos países desenvolvidos é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de mortalidade, é passível de prevenção e cura [2-4]. A patologia molecular do câncer de próstata é bastante complexa, pois é uma doença relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno dependentes, além de ser influenciada por hormônios sexuais, dietas, respostas imunes e inflamatórias e fatores ambientais [5-11]

Estudos recentes têm demonstrado que a exposição a uma gama de substâncias químicas presentes no meio ambiente pode causar alterações morfológicas e fisiológicas permanentes na próstata. Estas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos (EDC's) e são encontrados em vários materiais tais como pesticidas, metais, aditivos e contaminantes de alimentos, produtos industrializados e de cuidados pessoais [12-13]. Um exemplo bastante conhecido devido a sua ampla distribuição e pelos impactos causados sobre a saúde dos seres humanos e também sobre o meio ambiente é o bisfenol A (BP-A). O crescente interesse em estudar as ações do BP-A é devido ao fato de que a exposição a essa substância pode estar associada ao aumento da incidência de tipos de cânceres hormônio-dependente, como o câncer de próstata, mama e ovário [14-16].

Medicamentos anti-câncer causam danos às células saudáveis e toxicidade para órgãos normais. Estudos epidemiológicos indicam que compostos polifenólicos naturais utilizados na dieta diária reduzem o risco e incidência de vários tipos de cânceres. Estes compostos podem beneficiar a saúde geral e aumentar a longevidade. Dentre muitos agentes naturais anti-câncer, a curcumina é um composto fitoquímico que tem demonstrado notável potencial terapêutico para diversos tipos de cânceres [17]. Entre muitos agentes naturais anti-câncer, a curcumina é um fitoquímico que tem demonstrado notável potencial terapêutico para o câncer de próstata. Diversos estudos observaram que a curcumina induz apoptose de forma eficiente por meio de um número de alvos moleculares diferentes e inibe a metástase, invasão e angiogênese.

Outro fitoquímico bastante estudado na atualidade é a piperina. Este composto possui inúmeras atividades anti-câncer e muitos mecanismos para sua atividade foram sugeridos, incluindo a apoptose, a inibição da angiogênese, a supressão metastática e o bloqueio da invasão pela regulação das metaloproteínases de matriz [18-20]. Possui baixa toxicidade e alta taxa de absorção *in vitro* sem que haja alterações de sua estrutura durante o processo de absorção [21-22]. Além disso, a piperina aumenta a concentração de curcumina

no soro e o grau de absorção e biodisponibilidade deste fitoquímico, tanto em ratos quanto em seres humanos sem efeitos adversos [23].

Atualmente há poucos estudos na literatura que abordam os efeitos da curcumina e da piperina sobre as doenças prostáticas. Além disso, pouco se sabe de seus efeitos sobre indivíduos adultos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar por métodos histopatológicos qualitativos e quantitativos, se a administração da curcumina ou da piperina durante o tratamento com BP-A pode ter um efeito benéfico sobre a glândula prostática, revertendo ou retardando as alterações impostas pelo BP-A. Ademais, analisar se o composto fitoquímico piperina aumenta a possível atividade protetora da curcumina, favorecendo uma maior absorção desta e aumentando assim os benefícios do fitoterápico.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Animais

Foram utilizados gerbilos machos adultos (*Meriones unguiculatus*) com 100 dias de idade mantidos no biotério do grupo de pesquisa em *Biologia da Reprodução* do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto (SP) (Protocolo 122/2015 – CEUA-IBILCE/UNESP). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, alimentados com ração *ad libitum* e regime especial de hidratação. O experimento foi conduzido de acordo com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Compostos Químicos

Bisfenol A

BPA (Sigma-Aldrich >99 % purity), 50µg/kg/dia, foi dissolvido em 0,5 mL de álcool etílico 100% (Merch) e diluído em água filtrada.

Curcumina

Curcuma longa (Turmeric), power (Sigma-Aldrich - C1386-50G), 100mg/kg/dia, foi diluída em 0,1 mL de óleo de milho.

Piperina

Piperine (Sigma-Aldrich $\geq 97\%$ purity - P49007-5G), 20mg/kg/dia, foi diluída em 0,1 mL de óleo de milho.

Delineamento Experimental

Foram utilizados 63 (n=7/grupo) animais adultos (100 dias) divididos de maneira aleatória em 9 grupos experimentais (Figura 1):

- **Grupo Controle (C):** animais que receberam água *ad libitum*.
- **Grupo Controle Óleo (CO):** animais que receberam óleo de milho, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A (BPA):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber.

- **Grupo Curcumina (Cm):** animais que receberam 100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Curcumina (BCm):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Curcumina + Piperina (BCmP):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 100mg/kg/dia de curcumina associada à 20mg/kg/dia de piperina (administradas conjuntamente), via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Piperina (BP):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Curcumina + Piperina (CmP):** animais que receberam 100mg/kg/dia de curcumina associada à 20mg/kg/dia de piperina, (administradas conjuntamente), via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Piperina (P):** animais que receberam 20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias.

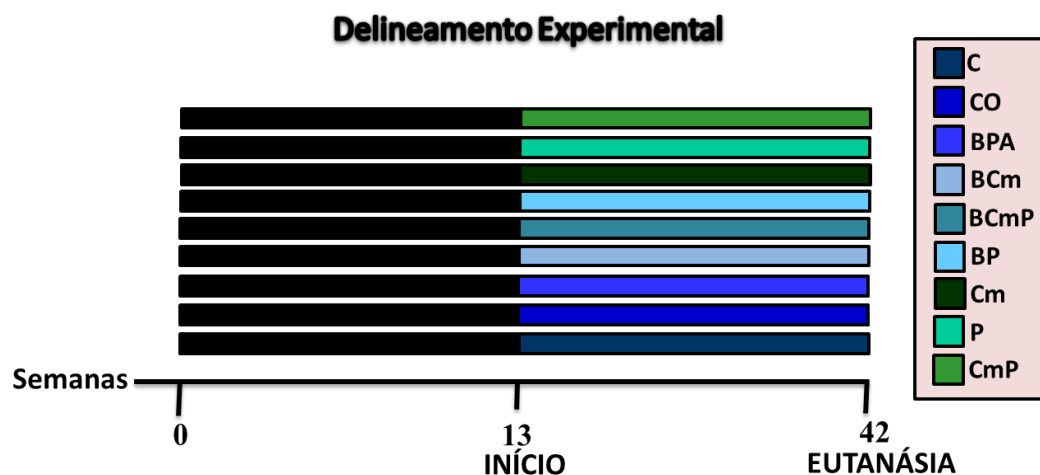


Figura 1. Delineamento Experimental do estudo.

O sacrifício dos animais aconteceu 29 semanas após o início do experimento. Os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico e decapitados para a coleta de sangue que foi submetido à dosagem hormonal.

A concentração de 100mg/kg/dia de curcumina foi baseada em trabalhos que sugerem essa dose como sendo não tóxica para o organismo. Segundo estudos de Shoba e colaboradores (1998) [23], a associação da piperina com a curcumina aumenta o grau de absorção e a biodisponibilidade da curcumina. A concentração de 20mg/kg/dia de piperina foi baseada no trabalho acima referido que sugere que esta dose é a ideal para aumentar a absorção e biodisponibilidade da curcumina. Foi avaliado a ingestão semanal de BP-A para os grupos BPA, BCm, BCmP e BP. A concentração de 50µg/kg/dia de bisfenol A foi baseada em trabalhos que reportam essa como a dose considerada segura para ingestão diária de BP-A por seres humanos [24-26]. Foram previamente realizadas medidas periódicas do volume de água ingerido por cada animal e determinado o peso corporal dos espécimes. Os dados referentes à ingestão diária de água e do peso corporal foram utilizados para os cálculos de conversão e diluição do BP-A, de forma que cada animal ingerisse uma quantidade de BP-A correspondente a 50 µg/kg/dia.

METODOLOGIA

Análise biométrica

Os animais foram pesados no início e ao final do período experimental para o monitoramento do ganho de peso. Além disso, a cintura dos animais foi medida ao final do experimento. Após a remoção do complexo prostático os lobos Ventral e Dorsolateral foram separados e pesados para determinação do peso absoluto e do peso relativo de cada lobo. O peso relativo (PR) foi determinado pela razão entre o peso do lobo prostático e o peso do animal. Em seguida foi removida e pesada a gordura corporal (retroperitoneal, epididimal, visceral e prostática).

Análise Morfológica

Os lobos Ventral e Dorsolateral prostáticos foram removidos e pesados. Posteriormente, os lobos do complexo prostático foram fixados por imersão em Paraformaldeído tamponado a 4%, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast (Histosec, Merk). Os cortes de 4µm obtidos em micrótomo rotativo automático (Leica®) foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para estudos morfológicos gerais da próstata e diagnósticos histopatológicos, classificação dos tipos de lesões (pré-malignas e malignas), classificação de inflamações (Inflamação Periductal,

Inflamação Subepitelial e Inflamação Intraluminal), guia para análises imunohistoquímicas e quantitativas.

Classificação das Lesões histopatológicas

Foram obtidos cortes seriados dos lobos Ventral e Dorsolateral da próstata do gerbilo e as lesões histopatológicas detectadas nos mesmos foram classificadas de acordo com o sistema de Classificação Bar Harbor para próstata de camundongos [27]. Ao longo da série de secções histológicas obtidas foram escolhidos cerca de quinze a vinte cortes do lobo Dorsolateral e quinze cortes do lobo Ventral de cada animal, os quais foram corados por HE e utilizados para a classificação e determinação da multiplicidade e incidência de lesões prostáticas.

Multiplicidade e Incidência de lesões prostáticas

Foi quantificada a incidência de lesões prostáticas (número de animais acometidos por uma das classes de lesão – expresso em porcentagem) de cada lobo e nos diferentes grupos. Para tanto, foi considerada apenas a lesão de caráter mais avançado que ocorreu em cada animal, ou seja, lesões pré-malignas (Neoplasia Intraepitelial Prostática - PIN) ou malignas (Carcinoma Microinvasivo - CM). Adicionalmente, foi quantificada a multiplicidade de lesões e inflamações, que corresponde ao número médio de focos alterados presentes nos lobos prostáticos de cada grupo animal. Para sua determinação foi estimado o número total de focos de cada tipo de lesão em cada corte histológico da série avaliada e posteriormente foi calculada sua média e erro padrão. Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos para determinação da significância entre os grupos.

Análise Cariométrica

Imagens nucleares foram selecionadas aleatoriamente a partir de secções coradas por hematoxilina-eosina (ampliação de 100 ×) a partir de cada grupo após 29 semanas de tratamento. As áreas nucleares (μm^2) e os perímetros (μm) foram determinados para núcleos de 200 células secretórias epiteliais para obter o parâmetro fator forma [$= 4\pi \cdot \text{área nuclear} / (\text{perímetro nuclear})^2$]. O parâmetro fator forma mede o arredondamento nuclear e valores <1 estão associados a núcleos menos arredondados [28].

Análise Esterológica

Análises estereológicas foram realizadas para se obter o volume absoluto do compartimento epitelial e luminal dos ácinos prostáticos dos grupos avaliados. Foram capturadas imagens de 42 campos de cada grupo (6 campos por animal, n=7) a partir de lâminas coradas pela técnica Picrossírius-Hematoxilina, por meio do Sistema Analisador de Imagens Olympus BX60, com o programa Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M168 proposto por Weibel (1978) [29] e aplicado à próstata por Huttunen *et al.* (1981) [30]. Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência absoluta por milímetro cúbico.

Análise Imunohistoquímica

Os seguintes testes imunohistoquímicos foram aplicados nas próstatas dos gerbilos:

- Receptor de andrógeno (AR): anti-AR (SC816/ Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

Procedimentos gerais para as avaliações imunohistoquímica:

AR: Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6.0 a 97°C (45 minutos) em banho maria. Os cortes foram lavados em PBS (3x5 minutos). O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com H₂O₂ (3% em metanol) durante 20 minutos. Os cortes foram lavados em PBS (3x5 minutos). O bloqueio de proteínas foi feito em leite (2,5 gramas em 50mL de PBS) por 30 minutos. Anticorpos primários para o componente acima mencionado foi utilizado em diluição de 1:100, overnight a 4°C. Após serem lavados em PBS (3x5 minutos) os cortes foram incubados com o Post Primary (Novolink, Novocastra) por 45 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (3x5 minutos) e incubados com o Polímero (Novolink, Novocastra) por 45 minutos. Os cortes foram lavados em PBS (3x5 minutos). Em seguida, os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB, Sigma). A contra coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

Contagem de núcleos com marcações positivas para AR

Um total de 42 campos foram obtidos, em aumento de 40x, por grupo (n= 7 animais/grupo) e por lobo, por meio do Sistema Analisador de Imagens Olympus BX60, com o programa Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics. O índice de células positivas por campo foi determinado pelo número de células marcadas em relação ao número total de células.

Dosagem hormonal sérica

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4 ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3000 rpm, e o soro foi separado e congelado para posterior análise. As amostras de soro foram usadas para determinação por ELISA Captura/Sanduíche (anticorpo-antígeno-anticorpo). A análise foi realizada em aparelho automatizado (Leitor de Elisa Digital, Microprocessado, Modelo: DNM-9602. Perlong - CH). Foram feitas dosagens para o hormônio testosterona. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando dados comerciais específicos. Os resultados foram analisados em planilhas e gráficos dos softwares Microsoft Excel e GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Análise Estatística

A análise exploratória dos dados coletados foi feita em planilhas e gráficos do *software* Excel 2013. Os testes estatísticos utilizados para averiguação da significância foram o teste ANOVA seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para dados não paramétricos, por meio do *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), significância com valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Dados Biométricos

A análise dos dados biométricos provenientes de animais submetidos a diferentes tratamentos durante o período de 29 semanas mostrou que, o ganho de peso foi superior nos animais submetidos ao desregulador endócrino bisfenol A isoladamente em relação ao grupo C. (Tabela 1). Em relação aos animais dos grupos BCm e BP houve uma diminuição do ganho peso ao compararmos com o grupo BPA, no entanto esta não foi significativa. Por outro lado, quando se associou os fitoquímicos curcumina e piperina, os animais apresentaram uma diminuição significativa no ganho de peso em relação ao grupo BPA. Os grupos BCm, BP e BCmP não apresentaram diferenças significativas entre si e permaneceram com ganho de peso similar aos demais grupos que não receberam o bisfenol A (Tabela 1). Complementarmente, verificou-se uma maior deposição de gordura corporal nos animais do grupo BPA em relação aos animais dos grupos que não receberam esse composto (Tabela 1). Apesar de não apresentar uma diminuição estatisticamente significante na deposição de gordura corporal, os animais dos grupos BCm, BP e BCmP apresentaram tendência de diminuição da gordura corporal em relação ao grupo BPA (Tabela 1). Ao se tratar da medida de cintura foi possível notar um aumento significativo na cintura dos animais que constituem o grupo BPA, quando comparados aos demais grupos estudados (Tabela 1).

O lobo Dorsolateral do grupo BPA apresentou menor peso relativo em relação aos demais grupos, no entanto não apresentou diferença estatística em relação aos grupos C e CO. Por outro lado, os demais grupos estudados apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo BPA (Tabela 2). Quanto ao peso relativo do lobo Ventral, este permaneceu com peso relativo similar, resultando em diferenças não significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Tabela 2). O complexo prostático também apresentou peso relativo semelhante entre os grupos analisados (Tabela 2).

O consumo de bisfenol A na água de beber foi semelhante entre os grupos BPA, BCm, BP e BCmP, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos que ingeriram este composto (Figura 2). Estes dados garantem que todos os grupos ingeriram quantidade muito similar do desregulador endócrino.

Análise Morfológica e Quantitativa

Mediante a análise morfológica foi possível notar que o lobo Dorsolateral dos animais que compõe o grupo C e o grupo CO é formado por alvéolos e ductos circundados por um estroma fibromuscular. O epitélio acinar é composto de células com aspecto cuboide, com células secretoras, células basais e vastos lumens que possuem a função de armazenamento de fluido prostático (Figura 3A, B). O lobo Ventral, destes mesmos grupos, possui estrutura semelhante. Contudo, o epitélio dos ácinos é composto por células com aspecto colunar simples (Figura 4A, B).

Ao contrário do epitélio normal, lesões pré-malignas e lesões malignas foram encontradas na próstata dos gerbilos submetidos aos diversos tratamentos (Figuras 3 e 4). Lesões pré-malignas são caracterizadas por estratificação celular com proliferação anômala, aumento do volume epitelial seguido de redução luminal (Figura 3, 4, 5), nucléolos evidentes, pleomorfismo nuclear, perda de polaridade celular e cromatina heterogênea (Figura 6 e 7). Lesões malignas apresentaram células neoplásicas com capacidade de invadir o estroma adjacente por meio da ruptura da membrana basal e da camada de músculo liso (Figura 3, 4). Todavia, não foi constatada nenhuma evidência de metástases, ou seja, apenas a invasão periglandular.

Por meio da análise histológica também foi possível determinar a incidência, a multiplicidade e a distribuição das lesões histopatológicas que acometeram os lobos prostáticos nos diversos tratamentos estudados. Lesões de caráter pré-maligno (representadas por PIN) e maligno (representadas por Carcinoma Microinvasivo) foram observadas em ambos os lobos prostáticos, mas, principalmente e com maior frequência, nos grupos submetidos ao desregulador endócrino bisfenol A (Figura 8 e 9). Além disso, foi possível notar a ocorrência de Inflamações Subepiteliais, Inflamações Intraluminais e Inflamações Periductais isoladas ou associadas a essas lesões (Figura 3 e 4). Os demais grupos também apresentaram lesões histopatológicas, no entanto com fenótipos mais brandos e em menor extensão (Figura 3, 4). O compartimento estromal dos grupos tratados com bisfenol A apresentou remodelação das fibras de colágeno, além de pontos de desestruturação da camada de células musculares lisas (Figura 3C, D e 4C, D). Essa desestruturação permite a migração de células neoplásicas, favorecendo, assim, a invasão estromal.

Em relação ao fator forma nuclear, no qual núcleos mais arredondados possuem valores mais próximos de um, no lobo Dorsolateral foi possível observar que os animais que receberam bisfenol A apresentaram o menor índice de fator forma, ou seja, núcleos menos

arredondados (Figura 6). Os grupos BCm, BP e BCmP não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo BPA. Os dados cariométricos dos grupos Cm, P e CmP mostraram semelhanças quando comparados aos fenótipos nucleares dos grupos C e CO (Figura 6). Ao se tratar do lobo Ventral (Figura 7), foi possível notar núcleos atípicos de formato irregular frequentemente nos grupos tratados com bisfenol A. Estes grupos também apresentaram os menores índices de fator forma (Figura 7). No entanto, os grupos BCm, BP e BCmP apresentaram valores maiores quando comparados ao grupo BPA (Figura 7). Os dados cariométricos dos grupos Cm, P e CmP foram semelhantes aos dos grupos C e CO (Figura 7).

Um padrão homogêneo de distribuição da cromatina estava presente nos núcleos dos grupos C, CO, Cm, P e CmP (Figura B, C, H, I, J e Figura 7B, C, H, I, J) e os corpúsculos nucleolares foram menos evidentes, em ambos os lobos. Os núcleos observados nos grupos tratados com bisfenol A apresentaram textura heterogênea da cromatina, formas bizarras, tamanho ampliado e nucléolos grandes e visíveis (Figura 6D, E, F, G e Figura 7D, E, F, G).

A análise da incidência de lesões prostáticas mostrou que, todos os grupos estudados apresentaram lesões de caráter pré-maligno (Figura 8). No entanto, o grupo BPA, em ambos os lobos, foi o que apresentou maior frequência desse tipo de neoplasia (Figura 8A, B). Em relação às lesões de caráter maligno, no lobo Dorsolateral, apenas os grupos BPA, BCm e BP apresentaram lesões malignas (Figura 8A). Já no lobo Ventral, lesões de caráter invasivo acometeram somente os animais dos grupos BPA e BCm (Figura 8B). Os demais grupos estudados não apresentaram essa classe de lesão (Figura 8A, B).

Ao se tratar de lesões pré-malignas, a multiplicidade de lesões mostrou que, essas são mais comuns nos animais tratados apenas com o bisfenol A (Figura 9A, B). No lobo Dorsolateral (Figura 9A), o grupo BPA apresentou um aumento no número dessas lesões, diferindo estatisticamente do grupo Controle. O grupo BCm não diferiu do grupo BPA, revelando que a curcumina administrada isoladamente não foi capaz de reduzir a frequência dessas lesões. Por outro lado, os grupos BP e BCmP apresentaram redução na frequência dessa classe de lesões em relação ao grupo BPA. Os grupos Cm, P e CmP apresentaram a multiplicidade de lesões pré malignas semelhantes aos grupos C e CO (Figura 9A). Já no lobo Ventral (Figura 9B), os grupos BCm, BP e BCmP apresentaram redução significativa no número de lesões em relação ao grupo BPA, apresentando a multiplicidade semelhante aos demais grupos (Figura 9B).

Com relação às lesões malignas, ambos os lobos apresentaram essa classe de lesão (Figura 9C, D). Não houve diferenças significativas entre os grupos que apresentaram essas lesões. No lobo Dorsolateral (Figura 9C), essas lesões tiveram um incremento nos grupos

BPA, BCm e BP. O grupo BCmP, apesar de ter sido submetido ao bisfenol A, não apresentou lesões malignas. Já no lobo Ventral (Figura 9D), somente os grupos BPA e BCm apresentaram lesões de caráter maligno. Os grupos BP e BCmP não apresentaram essa classe de lesões.

Ao se tratar das desordens inflamatórias, foi possível notar uma correlação positiva entre estas e as lesões histopatológicas na próstata do gerbilo (Figura 3 e 4). Dentre as desordens inflamatórias, as mais comuns foram Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Intraluminal (IIL) e Inflamação Subepitelial (ISE).

As Inflamações Intraluminais, no lobo Dorsolateral (Figura 10A), foram mais comuns nos grupos BPA e BCm. Nos grupos BP e BCmP houve uma redução bastante significativa no número dessas lesões, evidenciando que a piperina ou a associação curcumina/piperina foram eficazes na redução dessas lesões. Já os grupos tratados apenas com os fitoquímicos permaneceram semelhantes ao grupo C e CO. No lobo Ventral (Figura 10B), o grupo mais afetado por essa classe de lesões foi o BPA. Os grupos BCm, BP e BCmP tiveram uma redução significativa no número de IIL quando comparados ao grupo BPA. Em relação aos grupos Cm, P e CmP, estes permaneceram com número de lesões semelhantes ao grupo C e CO.

Em relação às Inflamações Subepiteliais, no lobo Dorsolateral (Figura 10C), estas foram mais comuns no grupo BPA. Os demais grupos tratados com bisfenol A apresentaram uma redução significativa no número de ISE em relação ao grupo BPA, permanecendo com a multiplicidade semelhante aos demais grupos. Os grupos Cm, P e CmP apresentaram multiplicidade semelhante aos grupos C e CO. Em relação ao lobo Ventral (Figura 10D), todos os grupos estudados apresentaram resultados semelhantes àqueles do lobo Dorsolateral.

As Inflamações Periductais, no lobo Dorsolateral (Figura 10E), foram mais comuns nos grupos BPA e BCm. Houve uma redução no número de lesões nos grupos BCm, BP e BCmP quando comparados ao grupo BPA. O grupo BCmP apresentou a menor multiplicidade em relação aos grupos tratados com o desregulador endócrino. No entanto, essa diferença não foi significativa. Os grupos tratados com os fitoquímicos permaneceram com multiplicidade semelhante aos grupos C e CO. Ao se tratar do lobo Ventral (Figura 10F), o grupo BPA foi o que apresentou maior número de IPD. Os demais grupos tratados com bisfenol A apresentaram uma redução no número dessas lesões. Apesar de não haver diferenças significativas entre esses grupos, o grupo BCmP foi o que apresentou menor multiplicidade de IPD. Os grupos tratados com apenas com os fitoquímicos permaneceram com multiplicidade semelhante aos grupos C e CO.

A análise da expressão de AR na próstata do gerbilo mostrou que, a imunomarcacão para esse receptor foi detectada na maioria das células secretoras e mostrou distribuicão homogênea entre as diferentes regiões dos lobos. A frequência de células AR positivas foi maior em áreas de lesões histopatológicas, principalmente nos grupos tratados (Figura 11). No lobo Dorsolateral (Figura 11G), houve uma diferença significativa na expressão de AR quando comparamos o grupo C e os grupos BPA e BP. Nestes grupos tratados com bisfenol A houve um aumento na frequência de células AR positivas mesmo em áreas livres de lesões histopatológicas. Entre os grupos tratados com bisfenol A, foi possível notar uma diminuicão na expressão e na frequência de células AR positivas nos grupo BCm e BCmP em relacão ao grupo BPA. O grupo BP não apresentou diferença significativa em relacão ao grupo BPA (Figura 16). Já no lobo Ventral (Figura 11H) foi possível notar que há diferença significativa entre o grupo C e os grupos tratados com BPA. Nestes grupos, houve um aumento da frequência de células AR positivas. Dentre os grupos tratados com bisfenol A, houve uma reducão significativa na expressão desse receptor nos grupos tratados com a curcumina ou com a associacão curcumina/piperina. O grupo BP também não apresentou diferença significativa em relacão ao grupo BPA.

Dosagem hormonal sérica

Os níveis séricos de testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados quando comparados ao grupo controle. No entanto, houve uma tendência de aumento nos grupos BPA, BCm e BP. Por outro lado, o grupo BCmP apresentou uma reducão considerável nos níveis séricos deste hormônio quando comparado aos grupos citados anteriormente (Figura 12).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a influência do desregulador endócrino bisfenol A, dos fitoquímicos curcumina, piperina e da associação entre ambos sobre os lobos prostáticos do gerbilo da Mongólia, após vinte e nove semanas de tratamento, no que diz respeito ao microambiente prostático e ao estabelecimento, desenvolvimento e possível regressão de lesões histopatológicas na glândula prostática.

Diversos estudos tem mostrado a ligação entre o aumento de peso corporal e a ingestão de bisfenol A [31-33]. Animais que ingeriram bisfenol A por um período prolongado tiveram um aumento no peso corporal, na deposição de gordura e na cintura em relação ao grupo controle. Rubin e colaboradores (2001) [34] mostraram que mães de ratos que foram expostas a 1 mg /l de BP-A, aproximadamente 100 µ/kg/dia, na água de beber, durante a gravidez e lactação, tiveram filhotes com aumento no peso corporal que foi mantido durante a idade adulta. A exposição durante o desenvolvimento fetal é considerada mais prejudicial que a exposição de indivíduos adultos, já que pode afetar diretamente a organogênese, produzindo efeitos irreversíveis [15]. Não obstante, a exposição nos primeiros dias de vida e durante a vida adulta pode causar efeitos deletérios adicionais, como o aumento do ganho de peso e acúmulo de gordura corporal [33]. Estudos de Amim e colaboradores (2019) [35] detectaram bisfenol A na urina de crianças e adolescentes de ambos os sexos. Essa exposição gerou uma significativa associação com o aumento dos índices de obesidade abdominal e generalizada, bem como os fatores de risco cardiometabólicos.

Nos animais dos grupos BCm e BP houve uma diminuição do ganho peso ao compararmos com o grupo BPA, no entanto esta não foi significativa. Por outro lado, quando foram administrados os fitoquímicos curcumina e piperina juntamente com o bisfenol A, houve uma diminuição significativa no ganho de peso. Também houve uma tendência de diminuição na deposição de gordura corporal nos grupos BCm, BP e BCmP quando comparado ao grupo BPA. Em relação à cintura dos animais, houve uma redução dessa medida nos grupos BCm, BP e BCmP quando comparados ao grupo BPA. Diversos estudos demonstraram que a curcumina inibe a adipogênese e o ganho de peso em diversos modelos animais [36-38]. Uma maneira de melhorar a eficácia de alguns fitoquímicos pode ser combiná-los para se obter efeitos mais significativos. Panzhinskiy e colaboradores (2019) [38] analisaram o efeito da associação da curcumina com o ácido α -lipóico sobre o ganho de peso e a adiposidade em ratos e concluíram que, essa combinação exibiu um efeito aditivo na redução do ganho de peso e adiposidade em resposta à exposição à dieta rica em gorduras. A

suplementação em curto prazo com curcumina/piperina melhorou significativamente o estado oxidativo e inflamatório em pacientes com síndrome metabólica, bem como diminuiu as concentrações circulantes de proteína C-reativa [39]. Miyazawa e colaboradores (2018) [40] avaliaram a suplementação alimentar com curcumina e piperina em camundongos obesos sob restrição calórica. Os resultados obtidos indicaram que a suplementação da dieta hiperlipídica com a associação dos compostos curcumina e piperina aumenta a perda de gordura corporal e pode suprimir a inflamação induzida pela dieta hiperlipídica. No presente estudo, a associação da curcumina com a piperina trouxe efeitos benéficos adicionais para o animal, principalmente no que se diz respeito ao ganho de peso.

O lobo Dorsolateral do grupo BPA apresentou menor peso relativo em relação aos demais grupos, no entanto não apresentou diferença estatística em relação aos grupos C e CO. Por outro lado, os demais grupos estudados apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo BPA. Esta diminuição do peso relativo da próstata dorsolateral no grupo BPA está relacionada ao aumento significativo do peso corporal dos animais que receberam este composto. Quanto ao peso relativo do lobo Ventral e do Complexo Prostático, estes permaneceram com peso relativo similar entre os grupos estudados, resultando em diferenças não significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Estudos de Wu e colaboradores (2011) [41] constataram que o bisfenol A (10 µg/kg/dia) aumentou significativamente o peso relativo da próstata. Em relação aos lobos prostáticos, a dose acima citada aumentou significativamente o peso relativo da próstata ventral e dorsolateral. No entanto, o peso relativo dos lobos ventral e dorsolateral diminuíram em animais que receberam doses mais altas de bisfenol A (30 e 90µg/kg/dia).

Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram observadas em ambos os lobos prostáticos, mas principalmente e com maior frequência nos grupos submetidos ao desregulador endócrino bisfenol A. Os demais grupos também apresentaram lesões histopatológicas, contudo com fenótipos mais brandos e em menor extensão. Dentre as lesões, a mais comum foi a Neoplasia Intraepitelial Prostática. Essas lesões, caracterizadas por anormalidades genéticas, constantemente apresentaram crescimento papilar, gerando invaginações epiteliais restritas a determinados sítios e um elevado número de células atípicas, comprometendo as unidades glandulares. Estudos de Montironi e colaboradores (2011) [42] apontam evidências morfológicas e moleculares de que a PIN pode ser a precursora de alguns carcinomas da próstata. Lesões malignas apresentaram células neoplásicas com capacidade de invadir o estroma adjacente através da ruptura da membrana basal e da camada de músculo liso.

Como descrito acima, as células componentes das lesões apresentaram diversas atipias, tais como nucléolos evidentes, pleomorfismo nuclear, perda de polaridade celular e cromatina heterogênea. A arquitetura nuclear é um fator fundamental no funcionamento celular e na patogênese. Modificações nesses padrões podem acarretar em anormalidades genéticas e epigenéticas podendo resultar na iniciação ou progressão tumoral [43-44]. Essas alterações nucleares foram frequentes nos grupos submetidos ao tratamento com bisfenol A. A administração dos fitoquímicos não reverteu os efeitos causados pelo desregulador endócrino. Os núcleos prostáticos dos animais que receberam apenas curcumina e/ou piperina permaneceram semelhantes ao tecido controle.

A análise da multiplicidade de lesões pré-malignas mostrou que, essas são mais comuns nos animais tratados apenas com o bisfenol A. No lobo Dorsolateral, o grupo BPA e o grupo BCm não apresentaram diferenças significativas entre si, revelando que a curcumina administrada isoladamente não foi capaz de reduzir a frequência dessas lesões. Por outro lado, os grupos BP e BCmP apresentaram redução na frequência dessa classe de lesões em relação ao grupo BPA. Os grupos Cm, P e CmP apresentaram a multiplicidade de lesões pré-malignas semelhantes aos grupos C e CO. Já no lobo Ventral, os grupos BCm, BP e BCmP apresentaram redução significativa no número de lesões em relação ao grupo BPA, apresentando a multiplicidade semelhante aos demais grupos. Com relação às lesões malignas, ambos os lobos apresentaram essa classe de lesão. Não houve diferenças significativas entre os grupos que apresentaram essas lesões. No lobo Dorsolateral, essas lesões tiveram um incremento nos grupos BPA, BCm e BP. O grupo BCmP, apesar de ter sido submetido ao bisfenol A, não apresentou lesões malignas revelando que a associação da curcumina com a piperina foi eficaz em prevenir o desenvolvimento dessas neoplasias neste lobo. Já no lobo Ventral, somente os grupos BPA e BCm apresentaram lesões de caráter maligno. Os grupos BP e BCmP não apresentaram lesões malignas mostrando que o fitoquímico piperina e associação dos fitoquímicos curcumina e piperina foi eficaz em prevenir o desenvolvimento de lesões de caráter invasivo. Evidências crescentes indicam que o bisfenol A tem potencial para alterar a homeostase endócrina, afetando a síntese e o metabolismo dos hormônios, bem como pode desempenhar um papel na indução e progressão do câncer [45]. Ao se tratar do câncer de próstata, estudos recentes utilizando modelos de roedores e linhagens celulares de próstata humana, constataram que o bisfenol A pode influenciar a carcinogênese, modular a proliferação celular e estimular a progressão tumoral [46-47]. Estudos recentes revelaram que a exposição ao bisfenol A durante o desenvolvimento neonatal aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões prostáticas pré-malignas em

ratos idosos [47-48]. Ademais, promove alterações no padrão fisiológico da morfogênese prostática contribuindo para o desenvolvimento de hiperplasia, inflamação e câncer na idade adulta [49]. A exposição a doses de bisfenol A consideradas seguras para os seres humanos, por um período prolongado, evidenciou um aumento da incidência e multiplicidade de lesões pré- malignas e malignas na próstata de roedores adultos [33]. Análises *in vivo* do impacto do BPA no crescimento e recorrência de tumores prostáticos humanos utilizando xenoenxerto de células humanas contendo a mutação AR-T877A, constataram que a exposição a doses baixas de bisfenol A aumenta o tumor prostático quando comparado a animais não expostos [50]. A curcumina, sozinha ou em combinação com outros agentes, tem sido utilizada para a prevenção e tratamento de numerosos tipos de cânceres em humanos, incluindo o câncer próstata [51-52]. As propriedades antineoplásicas da curcumina devem-se a mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios, proapoptóticos e antiproliferativos [53-55]. Yang e colaboradores (2017) [56] investigaram os efeitos antitumorais e os mecanismos de atuação da curcumina em células das linhagens DU145 e PC3 de câncer de próstata e concluíram que, a curcumina inibiu a sobrevivência e a metástase de células de câncer de próstata por meio da via de sinalização Notch-1 a qual está intimamente associada à fisiopatologia do câncer de próstata. Estudos *in vivo*, com células de câncer de próstata LNCaP, injetadas subcutaneamente em camundongos nude, mostrou que a curcumina inibiu a proliferação celular, induziu a apoptose e inibiu a angiogênese, reduzindo o crescimento tumoral [57]. Hong e colegas (2006) [58] analisaram os efeitos da curcumina na invasividade na linhagem celular DU-145 de câncer de próstata independente de andrógeno. O estudo constatou que a exposição à curcumina resultou na diminuição da atividade da MMP-2 e MMP-9 com inibição significativa do volume do tumor e da proliferação celular. Diversos estudos constataram que a piperina possui atividades que contribuem para a prevenção e tratamento de numerosos tipos de cânceres. A proliferação de células de câncer de próstata das linhagens PC-3, LNCaP 22RV1e DU-145 foi inibida pela ação da piperina. O tratamento com este composto suprimiu o crescimento de tumores dependentes e independentes de andrógenos em camundongos nudes xenotransplantado [59]. Os efeitos inibitórios da piperina sobre o crescimento de células de linhagens celulares de câncer prostático humano também foram estudados por Ouyang e colaboradores (2013) [60]. O tratamento com piperina inibiu a proliferação, induziu a parada do ciclo celular em G0/G1 e promoveu autofagia nas células LNCaP e PC-3. Os efeitos benéficos da associação da curcumina com a piperina foram estudados em carcinoma hepatocelular induzido por dietilnitrosamina em ratos. O tratamento combinado destes compostos diminuiu as alterações morfológicas e histopatológicas, bem

como os parâmetros bioquímicos, proliferativos e apoptóticos no fígado e no soro em relação ao grupo controle e ao experimental que recebeu a curcumina isoladamente.

O microambiente inflamatório crônico pode contribuir no desenvolvimento e na progressão do câncer de próstata [61-62]. Duas vias moleculares associam a inflamação e o câncer, sendo que em ambas as vias o microambiente inflamatório está presente. Uma delas é a via intrínseca, associada à ativação de oncogenes. A outra via é a extrínseca, na qual a inflamação é a promotora do desenvolvimento do câncer [62]. Sabe-se que a infiltração de células imunossupressoras e de macrófagos pode ter correlação positiva com a progressão do câncer de próstata [63]. Além disso, os macrófagos e alguns de seus produtos (IL-1, TNF, IL-6, e IL-18) aumentam a probabilidade de metástase, criando nichos para preservação de células tumorais [64]. Associado às lesões histopatológicas, foi possível constatar a presença de desordens inflamatórias representadas por Inflamações Intraluminais (IIL), Inflamações Subepiteliais (ISE) e Inflamações Periductais (IPD). Todas as classes de inflamações foram mais frequentes no grupo BPA, em ambos os lobos. Quando comparados ao grupo BPA, os grupos BCm, BP e BCmP apresentaram redução no número dessas classes de lesões, indicando a eficácia dos fitoquímicos em reduzir as inflamações em animais submetidos ao bisfenol A. Quando administrados isoladamente, ou seja, sem a presença de bisfenol A, os grupos Cm, P e CmP apresentaram multiplicidade de todas as classes de inflamações semelhantes aos grupos C. Estudos de Cho e colaboradores (2018) [65] analisaram a modulação do estresse oxidativo e das respostas inflamatórias em células endometriais estromais humanas mediada pelo BP-A. Os dados obtidos mostraram que este composto induz estresse oxidativo e ativa sinais inflamatórios em células endometrias em cultura via ER- α . Liu (2014) [66] estudou a modulação da expressão de citocinas em macrófagos humanos pelo bisfenol A e observou aumento das citocinas pró-inflamatórias, com aumento da produção de fator de necrose tumoral α e interleucina 6. Ademais, houve diminuição das citocinas anti-inflamatórias, interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador- β em macrófagos THP1 e em macrófagos humanos primários. A curcumina demonstrou ser uma molécula capaz de interagir com numerosos alvos moleculares inflamatórios. Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam que a curcumina pode ser um potencial agente terapêutico em muitas doenças crônicas, como artrite, pancreatite, diversos tipos de cânceres, entre outros [54-55, 67]. Além disso, este fitoquímico atuou como um modulador das vias de sinalização intracelular em alvos que controlam a inflamação, angiogênese, apoptose, invasão, crescimento tumoral e metástase [68]. Estudos demonstraram que o tratamento com curcumina induz a apoptose em linhagem celular de câncer de próstata dependente e

independente de andrógeno [69]. A curcumina diminuiu a proliferação celular e a angiogênese e aumentou o índice de morte celular em células de câncer de próstata LNCaP. Ademais, foi observada uma diminuição significativa na densidade microvascular [57]. Uma gama de estudos tem demonstrado que a piperina também possui efeito anti-inflamatório considerável [70]. Estudos de Umar e colaboradores (2013) [71] concluíram que a administração oral de piperina em ratos Wistar com artrite reumatoide resulta em redução significativa dos níveis de IL-1 β , TNF- α e PGE2 que são mediadores pró-inflamatórios, além de aumentar os níveis de IL-10, que possui papel antiinflamatório. Adicionalmente, os efeitos benéficos da piperina sobre a artrite reumatóide foram evidenciados pela diminuição no sistema de pontuação da artrite e da análise da histologia óssea. A administração oral de curcumina associada à piperina, após a alimentação com dieta hiperlipídica, diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de ratos C57BL/6J [72].

A próstata é um órgão sensível aos andrógenos e necessita de sinais adequados dos andrógenos e dos receptores de andrógeno para seu desenvolvimento normal e durante o desenvolvimento e a progressão das doenças prostáticas [73-75]. O receptor de andrógeno é expresso durante vários estágios da carcinogênese prostática, desde estágios iniciais até tumores invasivos ou metastáticos [76]. Este receptor tem sido alvo de muitos estudos, já que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão do câncer de próstata [77]. O crescimento tumoral está diretamente ligado com a razão entre a taxa de proliferação e morte celular. Os andrógenos são de extrema importância na regulação deste processo, já que estimulam a proliferação das células e inibe a apoptose [78]. Próstatas dorsolaterais de animais dos grupos BPA e BP mostraram maior expressão do receptor de andrógeno quando comparadas aos animais do grupo Controle, o que explica a maior proliferação celular e o maior número de lesões histopatológicas. No entanto, nos grupos BCm e BCmP houve uma redução significativa na frequência de células AR positivas. No lobo Ventral, todos os grupos tratados com bisfenol A apresentaram maior frequência de células AR positivas. Quando comparados com o grupo BPA, os grupos BCm e BCmP apresentaram menor expressão deste receptor. Esses dados sugerem que a curcumina e a associação curcumina/piperina foi eficaz em reduzir a expressão deste receptor. Zhou e colaboradores (2016) [79] estudaram análogos da piridina da curcumina sobre células CWR-22Rv1 do câncer de próstata humana e observaram uma alta atividade destes análogos em inibir o crescimento dessa linhagem celular e a ativação do receptor de andrógeno. Assim, os resultados deste estudo indicam que a inibição das vias de AR pode ser o potencial mecanismo para os efeitos anticancerígenos dessas substâncias em células humanas de câncer de próstata.

Os níveis de testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. No entanto, os grupos BPA, BCm e BP apresentaram os maiores níveis séricos deste hormônio. Desequilíbrios hormonais, como alterações na ação androgênica, podem contribuir para o surgimento e a evolução de alterações histopatológicas na glândula prostática [80]. Lesões histopatológicas espontâneas ou induzidas quimicamente podem ser reforçadas por altos níveis de testosterona [81-82]. Assim o desequilíbrio hormonal ocasionado pelo tratamento com o bisfenol A, pode ter contribuído para o aumento no número de lesões histopatológicas bem como para a evolução das mesmas. O grupo BCmP apresentou redução nos níveis de testosterona, quando comparado aos grupos BPA, BCm e BP, evidenciando que a associação da curcumina com a piperina foi eficaz em reduzir os níveis deste hormônio. Associado a esses dados, como foi descrito acima, este grupo também apresentou um menor número de lesões e a ausência de lesões de fenótipo maligno em ambos os lobos estudados quando comparado aos demais grupos expostos ao BP-A.

CONCLUSÃO

Em primeiro lugar, foi constatado que a ingestão prolongada de bisfenol A alterou morfollogicamente e fisiologicamente a glândula prostática de gerbilos adultos. Foi possível observar um aumento na incidência e na multiplicidade de lesões prostáticas no grupo BPA. Este dado enfatiza que, a dose de 50 $\mu\text{g/kg/dia}$ não é segura para a homeostase prostática. Ademais, foi averiguado que a curcumina isoladamente apresentou efeitos benéficos para a glândula prostática. No entanto, os potenciais benefícios da curcumina são limitados devido a diversos fatores como sua baixa absorção e metabolismo rápido. Vários estudos melhoraram a biodisponibilidade da curcumina adicionando compostos como a piperina. A adição deste fitoquímico gerou efeitos mais significativos para a glândula prostática, como a redução das lesões pré-malignas e a ausência das lesões malignas em ambos os lobos. A administração dos fitoquímicos sozinhos não promoveu alterações nos parâmetros estudados. Finalmente, os dados produzidos nos levam a continuidade da pesquisa e, atualmente estamos à procura de alvos moleculares promotores das alterações encontradas, na busca de elucidar como estes fitoquímicos atuam na redução das alterações oriundas da exposição ao bisfenol A.

REFERÊNCIAS

- [1] Purshouse K, Protheroe AS. Abiraterone acetate in combination with prednisone in the treatment of metastatic hormone-sensitive prostate cancer: clinical evidence and experience. *Ther Adv Urol*. 2019; doi: 10.1177/1756287218820804.
- [2] Barry MJ, Simmons LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am*. 2017; 101(4):787-806.
- [3] Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7–30.
- [4] PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Prostate Cancer, Nutrition, and Dietary Supplements (PDQ®): Patient Version. 2019 Jan 18. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83984/>
- [5] Bardia A, Platz EA, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Nelson WG. Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9(4):419-26.
- [6] Cooney KA. Inherited Predisposition to Prostate Cancer: From Gene Discovery to Clinical Impact. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2017; 128:14-23.
- [7] Kim JH, Kim J. Index-Based Dietary Patterns and the Risk of Prostate Cancer. *Clin Nutr Res*. 2017; 6(4):229-246.
- [8] Dobbs RW, Malhotra NR, Greenwald DT, Wang AY, Prins GS, Abern MR. Estrogens and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2018; doi: 10.1038/s41391-018-0081-6.
- [9] Pascual-Geler M, Urquiza-Salvat N, Cozar JM, Robles-Fernandez I, Rivas A, Martinez-Gonzalez LJ, Ocaña-Peinado FM, Lorente JA, Alvarez-Cubero MJ. The influence of nutritional factors on prostate cancer incidence and aggressiveness. *Aging Male*. 2018; 21(1):31-39.
- [10] Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol*. 2018; 15(1):11-24.
- [11] Walsh TJ, Shores MM, Krakauer CA, Forsberg CW, Fox AE, Moore KP, Korpak A, Heckbert SR, Zeliadt SB, Kinsey CE, Thompson ML, Smith NL, Matsumoto AM. Testosterone treatment and the risk of aggressive prostate cancer in men with low testosterone levels. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0199194.
- [12] WHO/UNEP. State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. 2013; ISBN: 978 92 4 150503 1
- [13] Paterni I, Granchi C, Minutolo F. Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016; 57(16), 3384–3404.
- [14] Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(8):1007-19.

- [15] Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 254–255: 179–86.
- [16] Gao H, Yang BJ, Li N, Feng LM, Shi XY, Zhao WH, Liu SJ. Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(1):e211.
- [17] Kanai M. Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(28): 9384–9391.
- [18] Hwang YP, Yun HJ, Kim HG, Han EH, Choi JH, Chung YC, Jeong HG. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α / ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicol Lett*. 2011; 203:9–19.
- [19] Lai LH, Fu QH, Liu Y, Jiang K, Guo QM, Chen QY, et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33:523–30.
- [20] Doucette CD, Hilchie AL, Liwski R, Hoskin DW. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. *J Nutr Biochem*. 2013; 24:231–9.
- [21] Piyachaturawat P, Glinsukon T, Toskulkao C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicol Lett*. 1983; 16:351–9.
- [22] Suresh D, Srinivasan K. Studies on the in vitro absorption of spice principles—curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45:1437–42.
- [23] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 1998; 64(4):353–356.
- [24] Alonso-Magdalena, P. Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol*. 2011; 7:346–353.
- [25] Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, Brooks BW. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*. 2015; 13(3):1559325815598308.
- [26] Castro B, Sánchez P, Torres JM, Ortega E. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the intraprostatic levels of aromatase and 5 α -reductase isozymes in juvenile rats. *Food Chem Toxicol*. 2018; 115:20–25.
- [27] Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*. 2004; 64:2270–2305.
- [28] Taboga SR, Santos AB, Rocha A, Vidal BC, Mello MLS. Nuclear phenotypes and morphometry on human secretory prostatic cells: a comparative study of benign and malignant lesions in Brazilian patients. *Cariologia*. 2003; 56:313–320).

- [29] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1978; 12:131-155.
- [30] Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat.* 1981; 132: 357-370.
- [31] Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*; 1999; 401:763–764.
- [32] Newbold RR. Developmental exposure to endocrine disruptors chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(6 Suppl):1939S-1942S.
- [33] Facina CH, Campos SGP, Gonçalves BF, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. *Prostate.* 2018; 78(2):152-163.
- [34] Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol-A affects body weight, patterns of estrous cyclicity and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* 2001; 109:675–680.
- [35] Amin MM, Ebrahim K, Hashemi M, Shoshtari-Yeganeh B, Rafiei N, Mansourian M, Kelishadi R. Association of exposure to Bisphenol A with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents. *Int J Environ Health Res.* 2019; 29(1):94-106.
- [36] Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, Lu H, Fantus IG, Jin T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One.* 2012; 7(1): e28784.
- [37] Bradford PG. Curcumin and obesity. *Biofactors.* 2013; 39(1): 78–87.
- [38] Panzhinskiy E, Bashir R, Bagchi D, Nair S. Effect of Curcumin and α -Lipoic Acid in Attenuating Weight Gain and Adiposity. *J Am Coll Nutr.* 2019; 8:1-6.
- [39] Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Majeed M, Sahebkar A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and na updated meta-analysis. *Clin Nutr.* 2015; 34(6):1101-8.
- [40] Miyazawa T, Nakagawa K, Kim SH, Thomas MJ, Paul L, Zingg JM, Dolnikowski GG, Roberts SB, Kimura F, Miyazawa T, Azzi A, Meydani M. Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric restriction modulates body fat and interleukin-1 β . *Nutr Metab (Lond).* 2018; 15:12.
- [41] Wu JH, Jiang XR, Liu GM, Liu XY, He GL, Sun ZY. Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats. *Toxicol Ind Health.* 2011; 27:810–9.
- [42] Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Cheng L. Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. *BJU International*, 2011; 108:1394–1401.

- [43] Nandakumar V, Kelbauskas L, Johnson R, Meldrum D. Quantitative characterization of preneoplastic progression using single-cell computed tomography and three-dimensional karyometry. *Cytometry A*. 2011; 79:25–34.
- [44] Zink D, Fischer A, Nickerson J. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:677–687.
- [45] Di Donato M, Cerner G, Giovannelli P, Galasso G, Bilancio A, Migliaccio A, Castoria G. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 ; 457:35-42.
- [46] Keri R, Ho SM, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A: report of NIEHS Expert Panel on BPA. *Reproductive Toxicology*. 2007; 24:240–252.
- [47] Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 14 15(3):649-56.
- [48] Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*. 2006; 66(11):5624-32.
- [49] Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures 12 predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 2007; 374–82
- [50] Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res*. 2005; 65(1):54-65.
- [51] Ide H, Tokiwa S, Sakamaki K, Nishio K, Isotani S, Muto S, Hama T, Masuda H, Horie S. Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen. *Prostate*. 2010; 70(10):1127-33.
- [52] Chen QH. Curcumin-based anti-prostate cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015; 15(2):138-56.
- [53] Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Padhye S. Lesson learned from nature for the development of novel anti-cancer agents: implication of isoflavone, curcumin, and their synthetic analogs. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(16):1801-12.
- [54] Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. *Biofactors*. 2013; 39(1):56-68.
- [55] Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors*. 2013; 39(1):27-36.
- [56] Yang J, Wang C, Zhang Z, Chen X, Jia Y, Wang B, Kong T. Curcumin inhibits the survival and metastasis of prostate cancer cells via the Notch-1 signaling pathway. *APMIS*. 2017; 125(2):134-140.
- [57] Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz A E. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate*. 2001, 47:293–303.

- [58] Hong JH, Ahn KS, Bae E, Jeon SS, Choi HY. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2006; 9:147–152.
- [59] Samykutty A, Shetty AV, Dakshinamoorthy G, Bartik MM, Johnson GL, Webb B, Zheng G, Chen A, Kalyanasundaram R, Munirathinam G. Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. PLoS One. 2013; 8(6):e65889.
- [60] Ouyang DY, Zeng LH, Pan H, Xu LH, Wang Y, Liu KP, He XH. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. Food Chem Toxicol. 2013; 60:424-30.
- [61] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420(6917):860-7.
- [62] Krušlin B, Tomas D, Džombeta T, Milković-Periša M, Ulamec M. Inflammation in Prostatic Hyperplasia and Carcinoma-Basic Scientific Approach. Front Oncol. 2017; 7:77.
- [63] Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:652–6.
- [64] Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. Genes Dev. 2008; 22(5):559-74.
- [65] Cho YJ, Park SB, Park JW, Oh SR, Han M. Bisphenol A modulates inflammation and proliferation pathway in human endometrial stromal cells by inducing oxidative stress. Reprod Toxicol. 2018; 81:41-49.
- [66] Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J, Xu M. Modulation of cytokine expression by endocrine disrupting chemical Bisphenol-A. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 451(4):592-8
- [67] Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*, a review of preclinical and clinical research. Altern. Med. Rev. 2009; 14:141–153.
- [68] Sung B, Prasad S, Yadav VR, Aggarwal BB. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. Nutr. Cancer. 2012; 64:173–197.
- [69] Aggarwal BB. Prostate cancer and curcumin. Cancer Biol. Thera. 2008; 7: 1436–1440.
- [70] Kaur S, Sharma R, Sarangal V, Kaur N, Prashar P. Evaluation of anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin, lycopene and piperine as an adjunct to scaling and root planing: A clinical study. Ayu. 2017; 38(3-4):117-121.
- [71] Umar S, Golam Sarwar AH, Umar K, Ahmad N, Sajad M, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis. Cell Immunol. 2013; 284(1-2):51-9.
- [72] Neyrinck AM, Alligier M, Memvanga PB, Névraumont E, Larondelle Y, Pr  at V, Cani PD, Delzenne NM. *Curcuma longa* extract associated with white pepper lessens high fat diet-induced inflammation in subcutaneous adipose tissue. PLoS One. 2013; 8(11):e81252.
- [73] Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. Castration-induced apoptotic cell death in 15 the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. Endocrinology. 2000; 821– 16 832.

- [74] Taplin ME, Ho SM. The endocrinology of prostate cancer. *Clin. Endocrinol.* 21 Metab. 2001; 3467–3477.
- [75] Wen S, Chang HC, Tian J, Shang Z, Niu Y, Chang C. Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. *Am J Pathol.* 2015; 185(2):293-301.
- [76] Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2010; 12(5):639-57.
- [77] Heinlein CA & Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews.* 2004; 25:276-308.
- [78] Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):34-45.
- [79] Zhou DY, Zhao SQ, DU ZY, Zheng XI, Zhang K. Pyridine analogues of curcumin exhibit high activity for inhibiting CWR-22Rv1 human prostate cancer cell growth and androgen receptor activation. *Oncol Lett.* 2016; 11(6):4160-4166.
- [80] Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. Dietary fat and prostate cancer. *J Urol.* 2004; 171(2 Pt 2):S19-24.
- [81] Cai LQ, Imperato-McGinley J, Zhu YS. Regulation of prostate 5 α -reductase-2 gene expression and prostate weight by dietary fat and caloric intake in the rat. *Prostate.* 2006; 66: 738–748.
- [82] Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Campos SGP. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(1):96-106.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental do estudo.

Figura 2. Consumo semanal de bisfenol A (mL) por grupo experimental. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

Figura 3. Análise Morfológica do lobo Dorsolateral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro. **C.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). As setas indicam desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a migração das células para o estroma. No detalhe da imagem é possível notar núcleos aumentados e com formatos bizarros e nucléolos evidentes neste sítio neoplásico. **D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. As setas indicam desestruturação da camada de células musculares lisas. **E.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), com invaginação do epitélio para o interior do lúmen. Além disso, é possível notar a presença de Inflamação Intraluminal (IIL) e a formação de um microácino (MA). **F.** Ácino acometido com PIN. Notar a presença de inúmeras células inflamatórias no lúmen acinar além da presença de Inflamação Periductal (IPD) no estroma prostático. **G.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de PIN. É possível observar a presença de IIL e IPD. **H-I.** Ácinos acometidos por PIN. Notar a presença de IIL e IPD. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Figura 4. Análise Morfológica do lobo Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro. **C.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar a migração das células neoplásicas para o estroma prostático e a desestruturação da camada de células musculares lisas (setas). **D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. As setas indicam desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a migração das células cancerosas para o estroma prostático. **E.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) e a formação de microácinos (MA). Notar a presença de Inflamação Intraluminal (IIL), Inflamação Periductal (IPD) e Inflamação Subepitelial em um ácino adjacente (seta). **F.** Ácino acometido com PIN. Notar a invaginação do epitélio para o interior do ácino e, conseqüentemente, a redução luminal. **G.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de PIN. **H-I.** Ácinos acometidos por PIN. Notar a presença de IPD no estroma prostático. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Figura 5. Volume absoluto (mm^3) epitelial (A e B) e luminal (C e D) na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 6. Dados Cariométricos do lobo Dorsolateral. **A.** Parâmetro Fator Forma. Análise estatística baseada no teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Valores representam média $\pm$ EP (n = 7). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos. **B, C.** Epitélio normal dos grupos C e CO. **D-G.**

Núcleos atípicos apresentam formas bizarras (setas) e nucléolos evidentes (cabeças de seta) nos grupos BPA, BCm, BP, BCmP, respectivamente. **H-J.** Epitélio similar ao normal nos grupos Cm, P, CmP, respectivamente.

Figura 7. Dados Cariométricos do lobo Ventral. **A.** Parâmetro Fator forma. Análise estatística baseada no teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Valores representam a média $\pm$ EP (n = 7). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos. **B, C.** Epitélio normal dos grupos C e CO. **D-G.** Núcleos atípicos apresentam formas bizarras (setas) e nucléolos evidentes (cabeças de seta) nos grupos BPA, BCm, BP, BCmP, respectivamente. **H-J.** Epitélio similar ao normal nos grupos Cm, P, CmP, respectivamente.

Figura 8. Incidência de lesões histopatológicas (%) no lobo Dorsolateral (A) e Ventral (B) de gerbilos adultos após 29 semanas de tratamento.

Figura 9. Multiplicidade de lesões prostáticas Pré-Malignas (A e B) e Malignas (C e D) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por 29 semanas. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn (A, B e C) e Mann Whitney (D). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 10. Multiplicidade de Inflamações Intraluminais (IIL) (A e B), Inflamações Subepiteliais (ISE) (C e D) e Inflamações Periductais (E e F) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por 29 semanas. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 11. Imunoexpressão do Receptor de Andrógeno (AR) na próstata Dorsolateral e Ventral de gerbilos adultos. **A e B.** Grupo Controle. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BPA. **F.** Grupo BCm. Frequência de células AR-positivas (%) dos lobos Dorsolateral (**G**) e Ventral (**H**) da próstata do gerbilo adulto após diferentes tratamentos. Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 12. Níveis séricos de testosterona (ng/mL) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

FIGURA 2

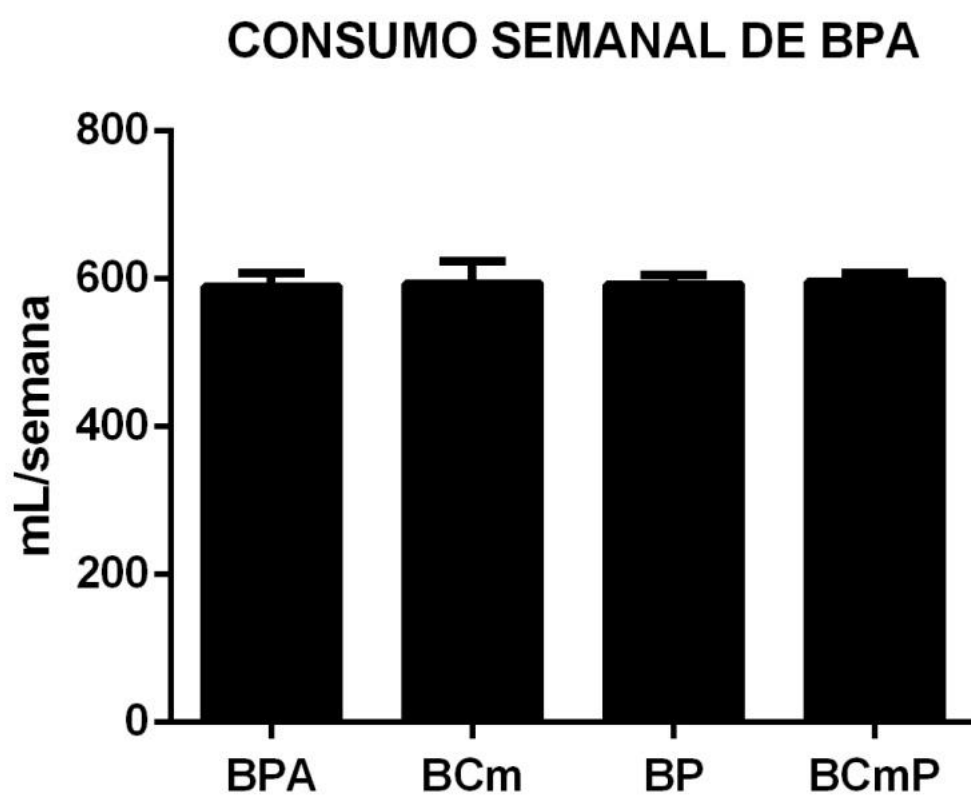


FIGURA 3

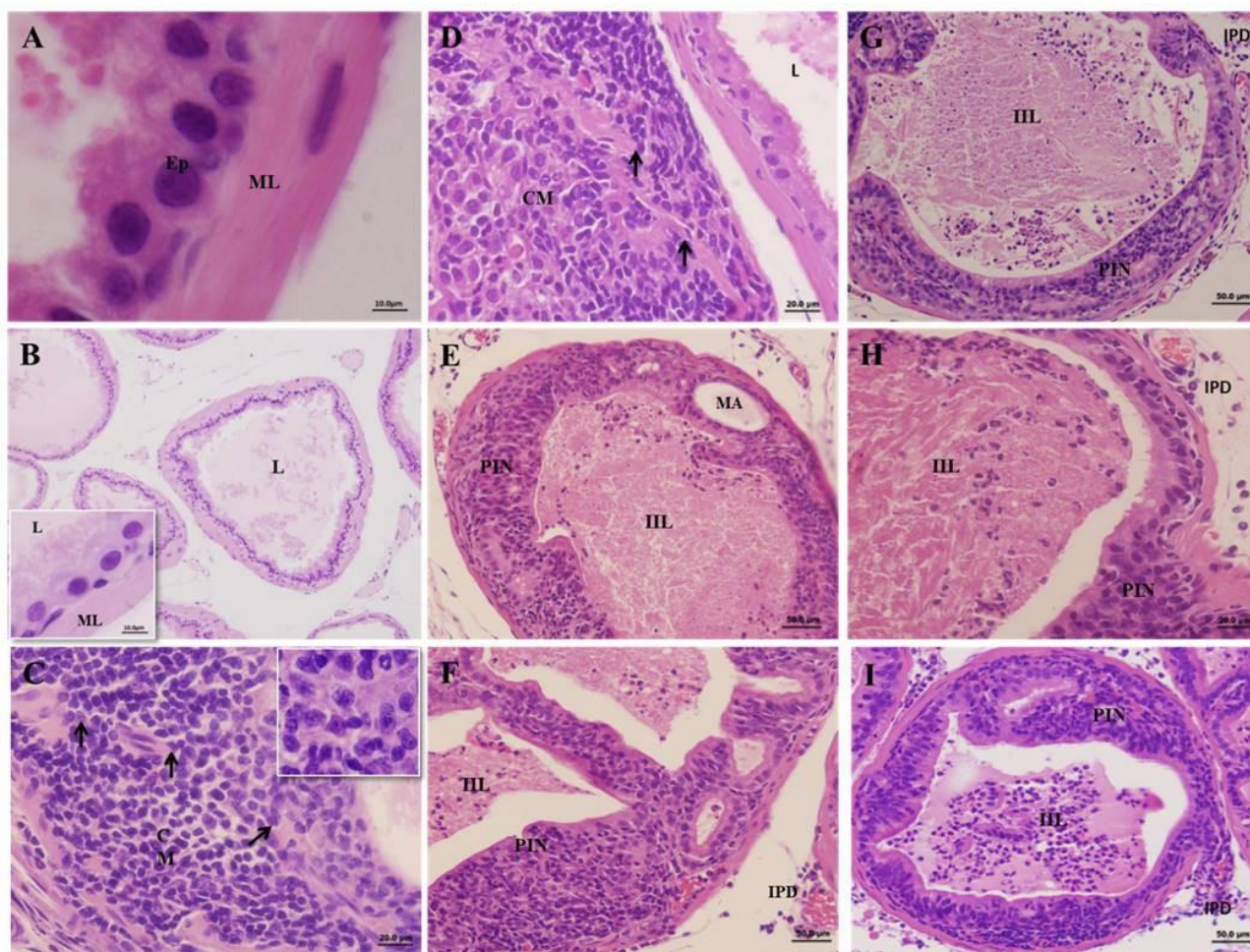
Lobo Dorsolateral

FIGURA 4

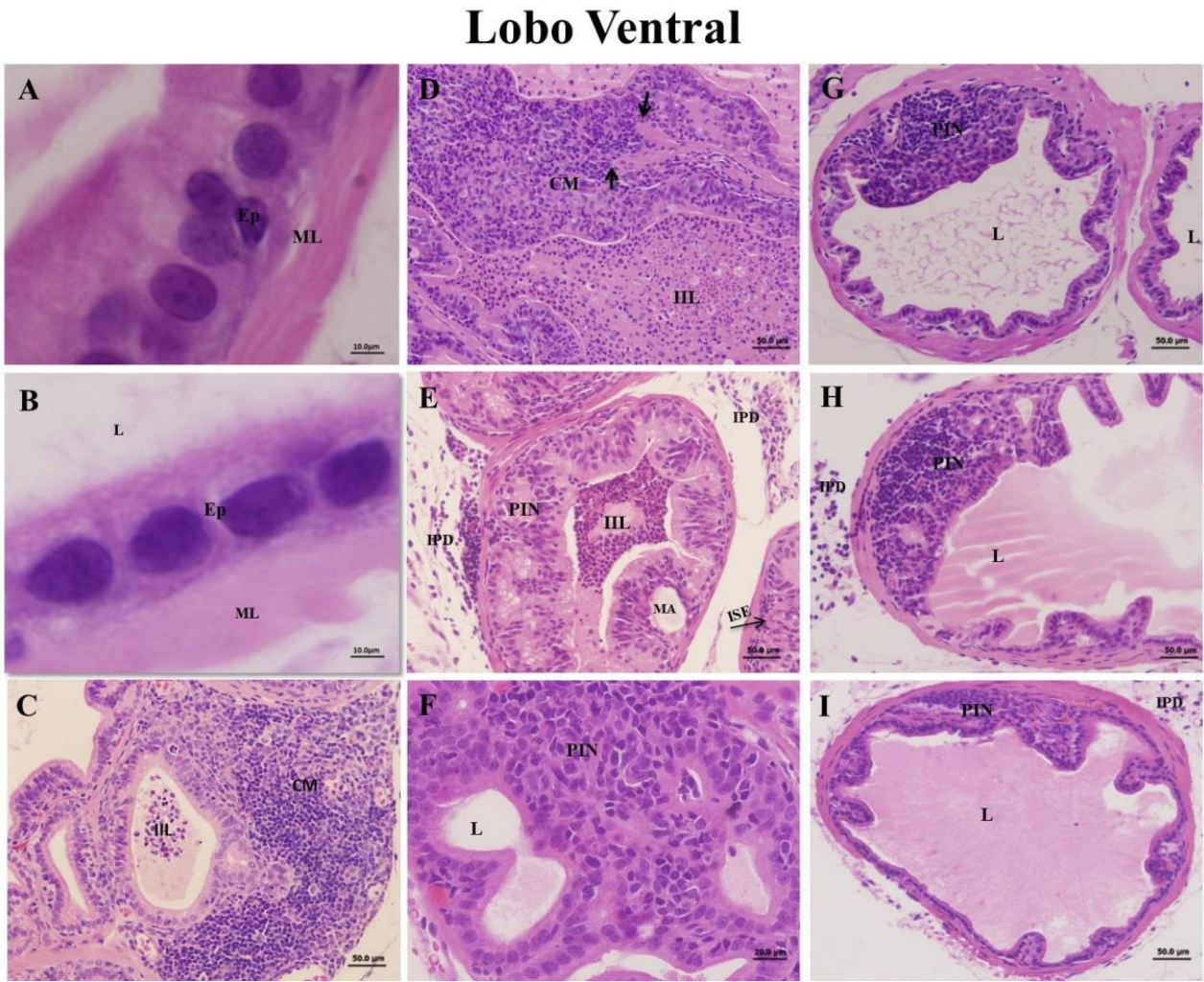


FIGURA 5

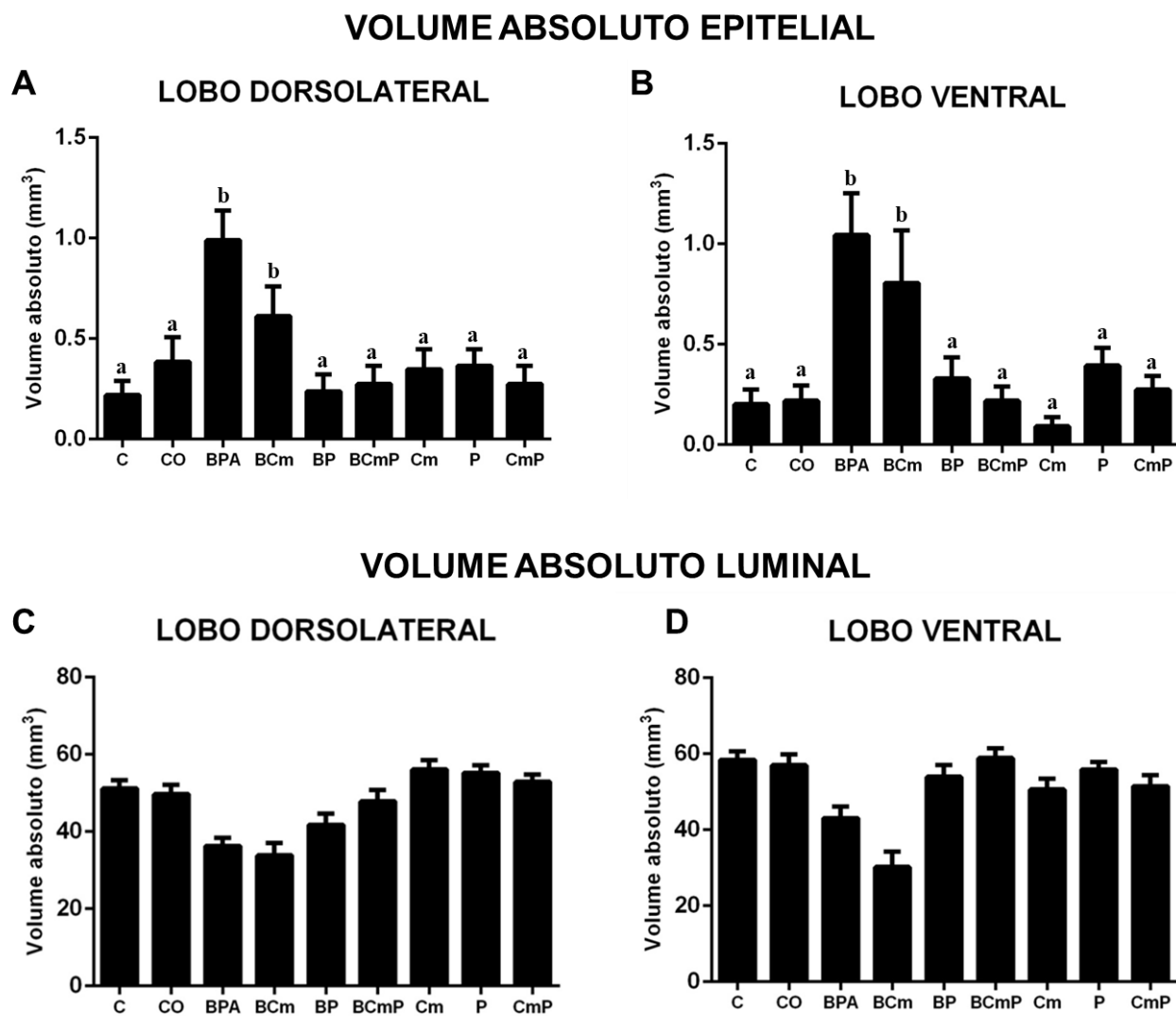


FIGURA 7

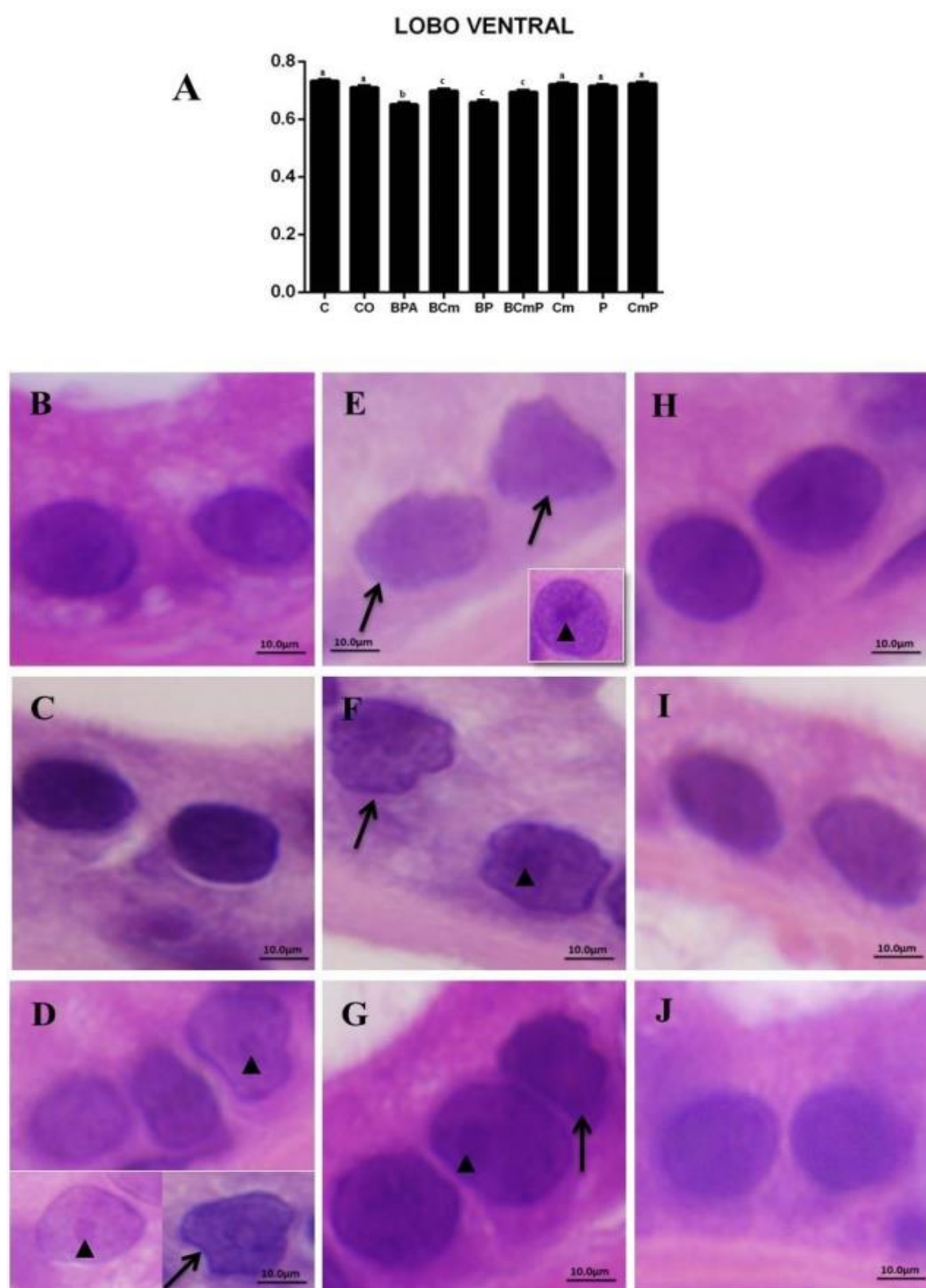


FIGURA 8

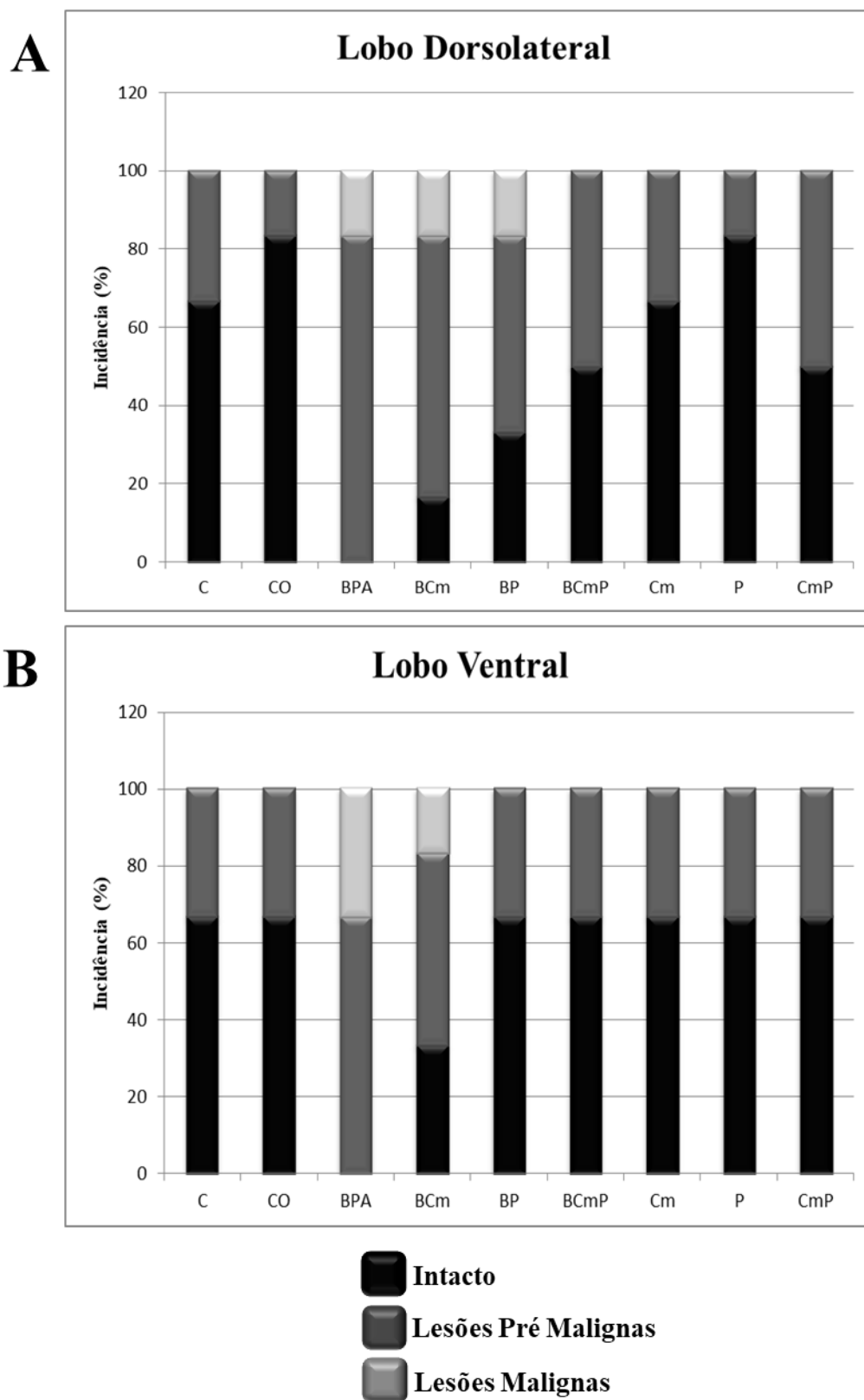


FIGURA 9

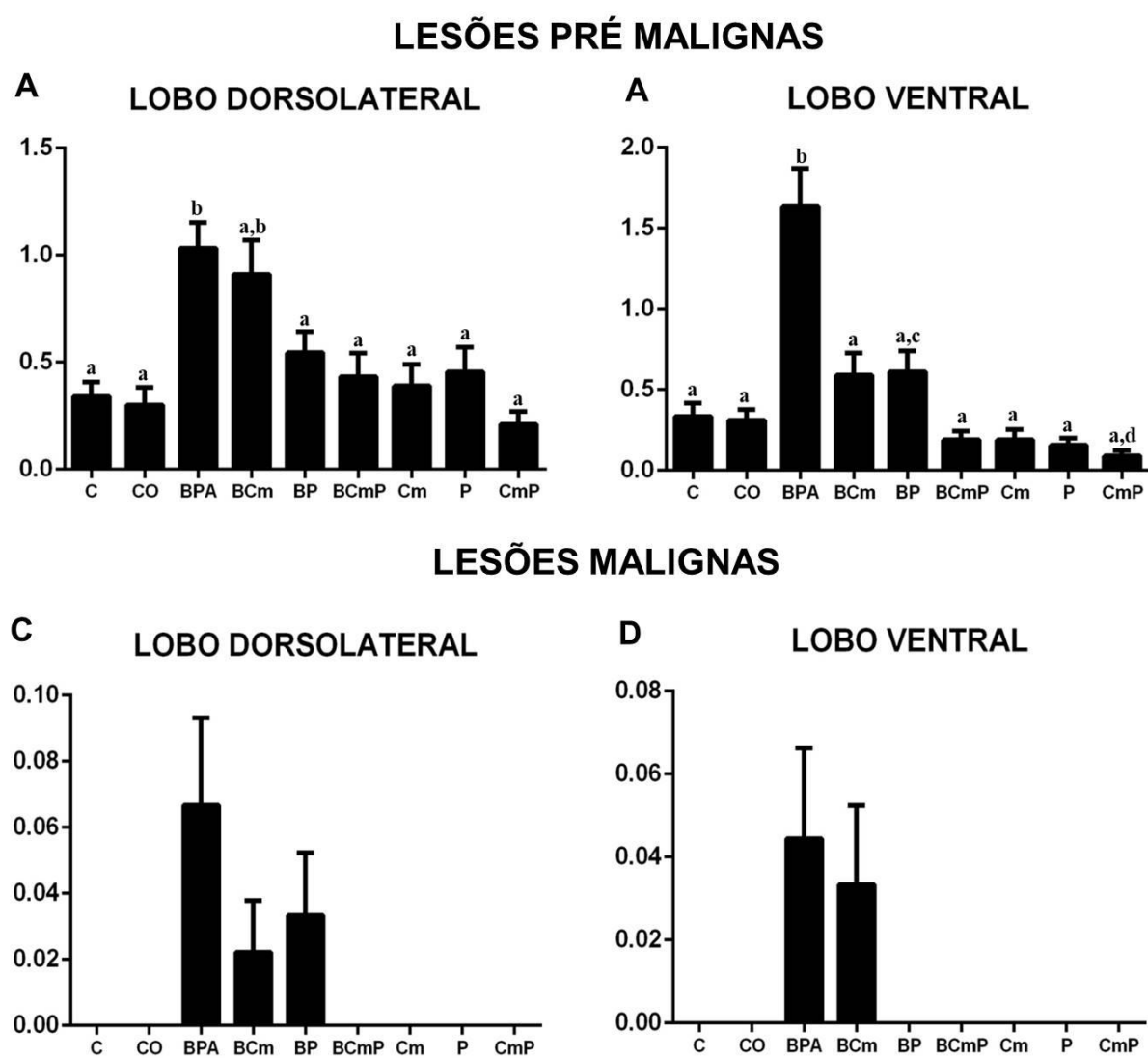


FIGURA 10

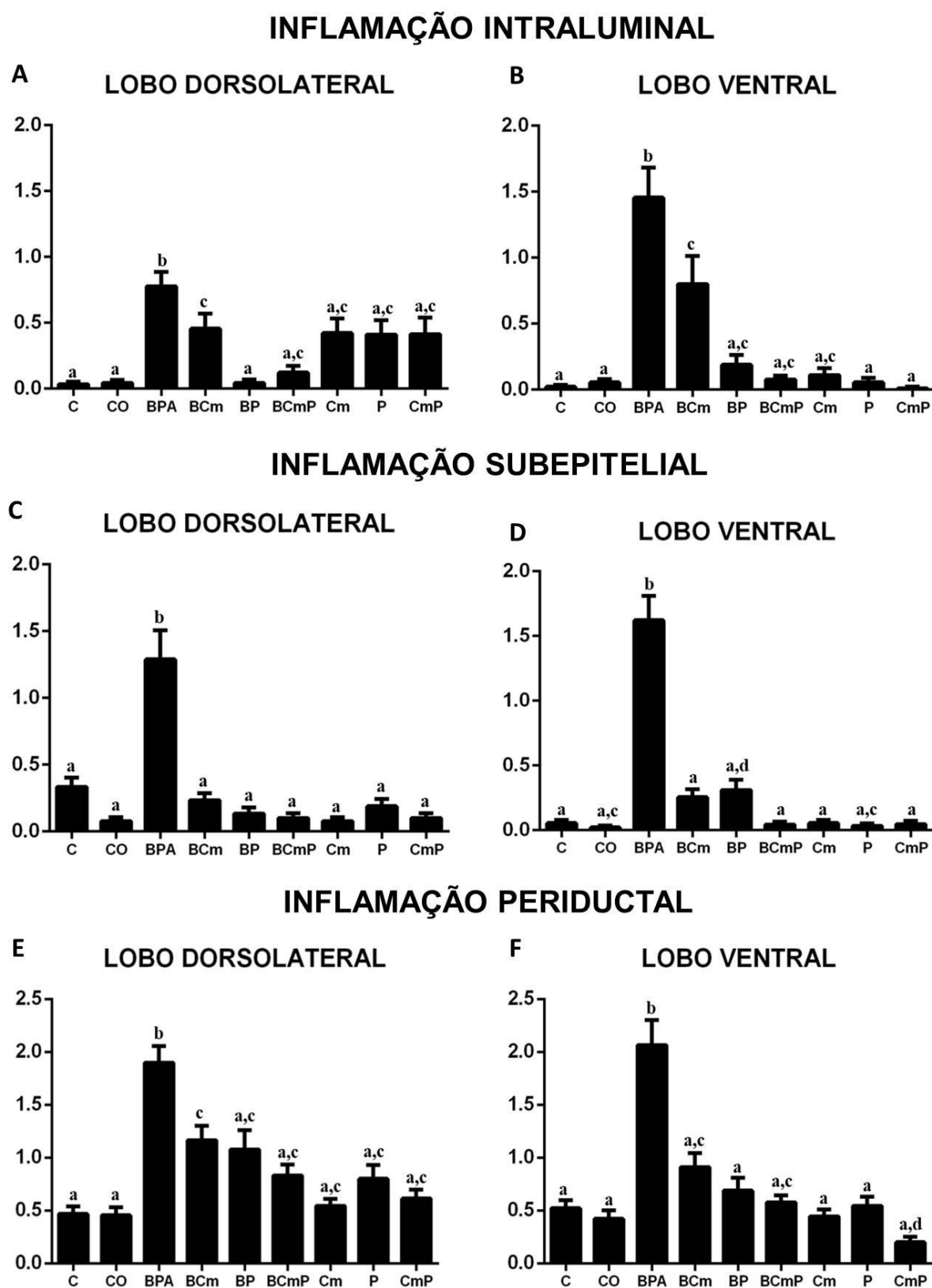


FIGURA 11

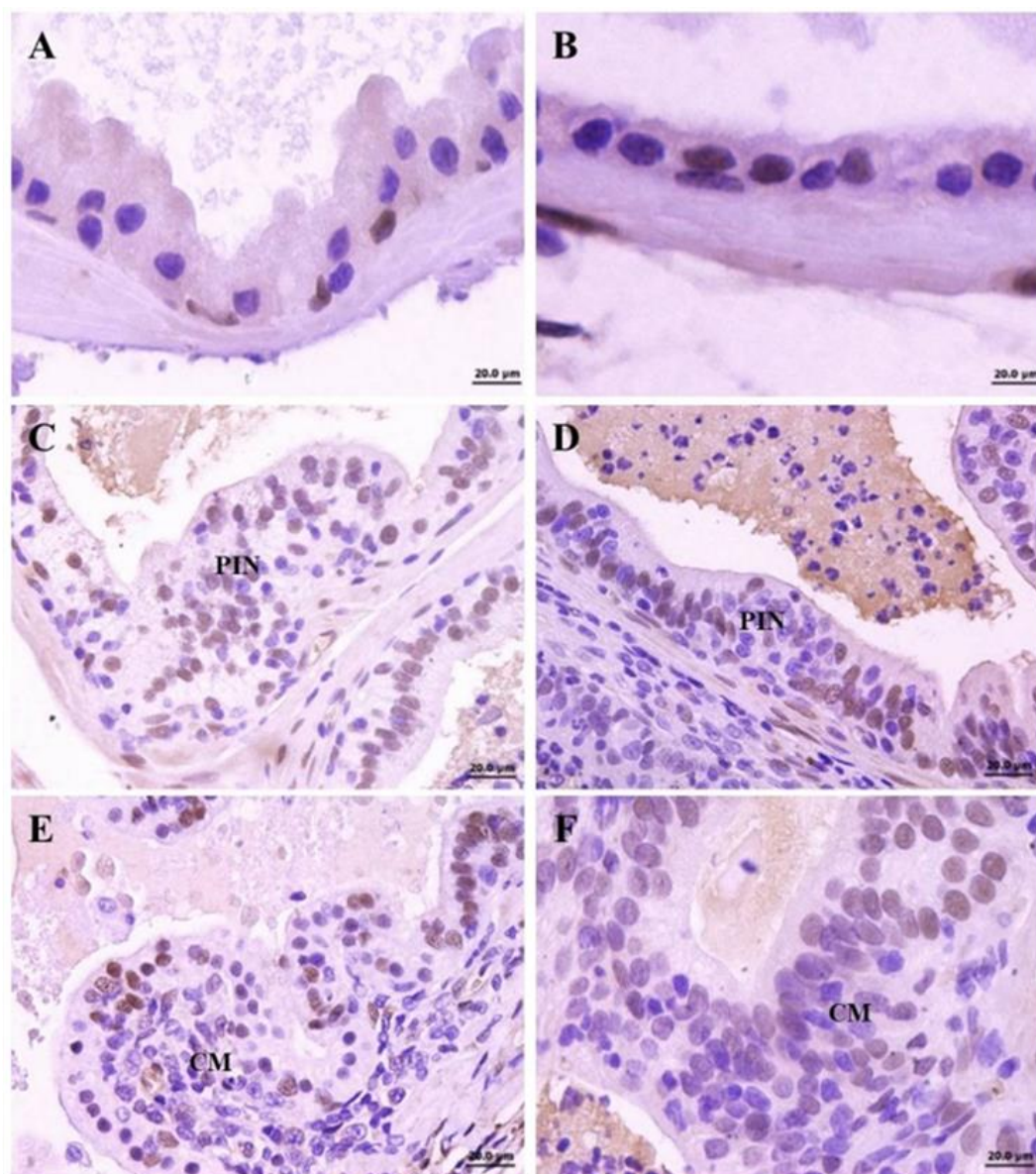


FIGURA 12

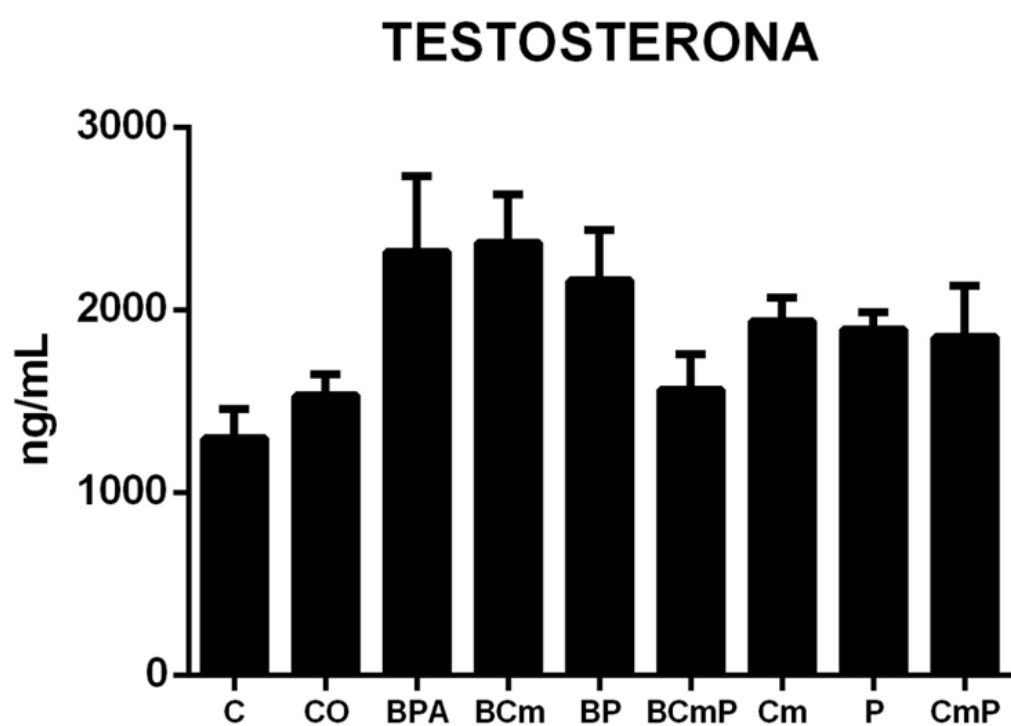


Tabela 1. Efeito dos diferentes tratamentos sobre o ganho de peso, gordura corporal e cintura de gerbilos adultos após 29 semanas.

Grupos	Ganho de Peso (g)*			Gordura Corporal (g)*			Cintura (cm)**	
C	25,29 ^a	±	2,030	3,243 ^a	±	0,370	9,214 ^a	± 0,1487
CO	26,29 ^a	±	4,500	3,25 ^a	±	0,540	9,333 ^a	± 0,211
BPA	40,29 ^b	±	2,909	6,592 ^b	±	0,440	11,500 ^b	± 0,327
BCm	26,71 ^{a,b}	±	3,006	5,156 ^{a,b}	±	0,782	9,333 ^a	± 0,167
BP	26,00 ^{a,b}	±	3,710	5,816 ^{a,b}	±	0,347	9,333 ^a	± 0,167
BCmP	24,86 ^a	±	2,492	5,311 ^{a,b}	±	1,063	9,667 ^a	± 0,211
Cm	25,43 ^a	±	2,967	3,442 ^a	±	0,432	9,357 ^a	± 0,143
P	26,29 ^a	±	1,629	3,611 ^a	±	0,559	9,214 ^a	± 0,149
CmP	18,14 ^a	±	4,367	3,561 ^a	±	0,574	9,357 ^a	± 0,143

Os valores representam média ± EP (n, 7 por grupo). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

*Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey.

**Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

Tabela 2 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo dos lobos e complexo prostático de gerbilos adultos após 29 semanas.

Grupos	Peso relativo LDL ($\times 10^4$)			Peso relativo LV ($\times 10^4$)			Peso relativo CP ($\times 10^3$)		
C	11,28 ^a	±	0,605	3,109	±	0,165	7,524	±	1,025
CO	13,31 ^a	±	1,119	3,598	±	0,398	8,856	±	0,632
BPA	8,95 ^{a,b}	±	0,364	2,881	±	0,162	8,029	±	0,469
BCm	13,54 ^{a,c}	±	0,722	4,133	±	0,453	9,110	±	0,547
BP	14,75 ^{a,c}	±	0,594	4,334	±	0,410	9,495	±	0,437
BCmP	15,19 ^{a,c}	±	0,718	4,166	±	0,204	9,966	±	0,227
Cm	13,57 ^{a,c}	±	1,153	4,479	±	0,158	9,752	±	0,368
P	14,91 ^{a,c}	±	1,399	3,635	±	0,579	9,707	±	0,621
CmP	13,36 ^{a,c}	±	1,338	3,492	±	0,393	9,064	±	0,359

Os valores representam média ± EP (n, 7 por grupo). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

**Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

4 ARTIGO 2: REMODELAÇÃO ESTROMAL NA PRÓSTATA DORSOLATERAL E VENTRAL DO GERBILO APÓS EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO BP-A E AOS FITOQUÍMICOS CURCUMINA E PIPERINA.

Camila Helena Facina¹; Rejane Maira Góes¹, Patrícia Simone Leite Vilamaior¹, Sebastião Roberto Taboga¹.

¹ *Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.*

Correspondência: Sebastião Roberto Taboga (taboga@ibilce.unesp.br) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP. Rua Cristovão Colombo 2265 – Jardim Nazareth. São José do Rio Preto – SP. CEP: 15054-000. Brasil - (17) 3221-2386.

INTRODUÇÃO

O compartimento estromal da glândula prostática é formado por um arranjo complexo de células musculares lisas e fibroblastos imersos em uma matriz extracelular ao redor dos ácinos e ductos. Além disso, neste compartimento encontram-se macrófagos teciduais, células endoteliais vasculares, células nervosas e células do sistema imune. Os fibroblastos e as células musculares lisas sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da matriz extracelular. Esta, por sua vez, é composta de fibras elásticas, colágenas, proteoglicanos, fatores de crescimento, enzimas remodeladoras e moléculas reguladoras. Estes componentes operam de maneira articulada para regular a função celular e manter a homeostase tecidual da glândula prostática [1-2].

O compartimento estromal reage de inúmeras formas as diferentes situações anormais, produzindo um microambiente dissemelhante do estroma encontrado nos tecidos saudáveis [3]. Diversos estudos constataram que o crescimento de células prostáticas neoplásicas pode ser estimulado ou inibido em ambientes estromais específicos [4]. Fibroblastos isolados de regiões de carcinoma são capazes de proliferar em grande proporção e secretar altas taxas de constituintes da matriz extracelular. Nestas condições, os fibroblastos sintetizam altas taxas de proteases degradadoras de matriz, como as metaloproteinases do tipo 2 e 9, expressam alfa actina de músculo liso e fatores de crescimento e moduladores de respostas imunes, como as interleucinas. Além disso, um estroma reativo também exibe elevada expressão de fatores de crescimento responsáveis pela regulação da angiogênese [1-2].

É sabido que alguns fatores ambientais conhecidos como desreguladores endócrinos, ocasionam significativas mudanças na síntese e metabolismo dos hormonais esteroides contribuindo para o desenvolvimento de diversas lesões prostáticas. Um exemplo é o bisfenol A. O crescente interesse em estudar as ações do BP-A é devido ao fato de que a exposição a essa substância pode estar associada ao aumento da incidência de tipos de cânceres hormônio-dependentes, como o câncer de próstata, mama e ovário [5-7]. Facina e colaboradores (2018) [8] reportaram que a exposição prolongada a doses baixas de bisfenol A aumentou a incidência e a multiplicidade de lesões prostáticas em gerbilos adultos. O impacto do bisfenol A na próstata tornou-se o centro de diversas pesquisas atuais com foco especial no entendimento de como o BP-A afeta a fisiopatologia prostática [7-10]. No entanto, pouco se sabe a respeito das alterações impostas pelo bisfenol A sobre o compartimento estromal prostático.

Estudos epidemiológicos indicam que compostos polifenólicos naturais reduzem o risco e incidência de vários tipos de cânceres, com potencial de beneficiar a saúde geral e aumentar a longevidade. Dentre muitos agentes naturais anti-câncer, a curcumina é um composto fitoquímico que tem demonstrado notável potencial terapêutico para diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de próstata [11]. A base molecular dos efeitos anti-cancer e quimiopreventivo da curcumina é atribuída a sua atuação sobre vários processos celulares, incluindo fatores de transcrição, reguladores de crescimento, moléculas de adesão, os genes reguladores de apoptose, angiogênese e moléculas de sinalização celular [12].

A curcumina mostrou potencial contra numerosos distúrbios humanos, no entanto este fitoquímico possui baixa biodisponibilidade devido à má absorção, metabolismo rápido e eliminação sistêmica. Estas condições demonstraram limitar sua eficácia terapêutica [13]. Estudos de Shoba e colaboradores (1998) [14] mostraram o efeito da combinação de piperina, um conhecido inibidor da glucuronidação hepática e intestinal, com a curcumina. O estudo revelou que, a piperina aumenta a concentração de curcumina no soro e o grau de absorção e biodisponibilidade deste fitoquímico, tanto em ratos quanto em seres humanos sem efeitos adversos. Além disso, a piperina possui inúmeras atividades anti-câncer e muitos mecanismos para sua atividade foram sugeridos, incluindo a apoptose, a inibição da angiogênese, a supressão metastática e o bloqueio da invasão pela regulação das metaloproteínas de matriz [15-17].

Atualmente há poucos estudos na literatura que abordam os efeitos da curcumina sobre as doenças prostáticas, em especial no que se diz respeito ao estroma glandular. Desta forma a administração da curcumina durante o tratamento com BP-A pode ter um efeito benéfico sobre o estroma prostático, revertendo ou retardando as alterações impostas pelo BP-A. Ademais, a associação da curcumina com a piperina poderá favorecer uma maior absorção daquela aumentando assim os benefícios do fitoterápico.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados gerbilos machos adultos (*Meriones unguiculatus*) com 100 dias de idade mantidos no biotério do grupo de pesquisa em *Biologia da Reprodução* do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto (SP) (Protocolo 122/2015 – CEUA-IBILCE/UNESP). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, alimentados com ração *ad libitum* e regime especial de hidratação. O experimento foi conduzido de acordo com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Compostos Químicos

Bisfenol A

BPA (Sigma-Aldrich >99 % purity), 50µg/kg/dia, foi dissolvido em 0,5 mL de álcool etílico 100% (Merck) e diluído em água filtrada.

Curcumina

Curcuma longa (Turmeric), power (Sigma-Aldrich - C1386-50G), 100mg/kg/dia, foi diluída em 0,1 mL de óleo de milho.

Piperina

Piperine (Sigma-Aldrich $\geq 97\%$ purity - P49007-5G), 20mg/kg/dia, foi diluída em 0,1 mL de óleo de milho.

Delineamento Experimental

Foram utilizados 63 (n=7/grupo) animais adultos machos, 100 dias, divididos de maneira aleatória em 9 grupos experimentais:

- **Grupo Controle (C):** animais que receberam água *ad libitum*.
- **Grupo Controle Óleo (CO):** animais que receberam óleo de milho, via gavagem, a cada dois dias.

- **Grupo Bisfenol A (BPA):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber.
- **Grupo Curcumina (Cm):** animais que receberam 100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Curcumina (BCm):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 100mg/kg/dia de curcumina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Curcumina + Piperina (BCmP):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 100mg/kg/dia de curcumina associada à 20mg/kg/dia de piperina (administradas conjuntamente), via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Bisfenol A + Piperina (BP):** animais que receberam BP-A na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber + 20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Curcumina + Piperina (CmP):** animais que receberam 100mg/kg/dia de curcumina associada à 20mg/kg/dia de piperina (administradas conjuntamente), via gavagem, a cada dois dias.
- **Grupo Piperina (P):** animais que receberam 20mg/kg/dia de piperina, via gavagem, a cada dois dias.

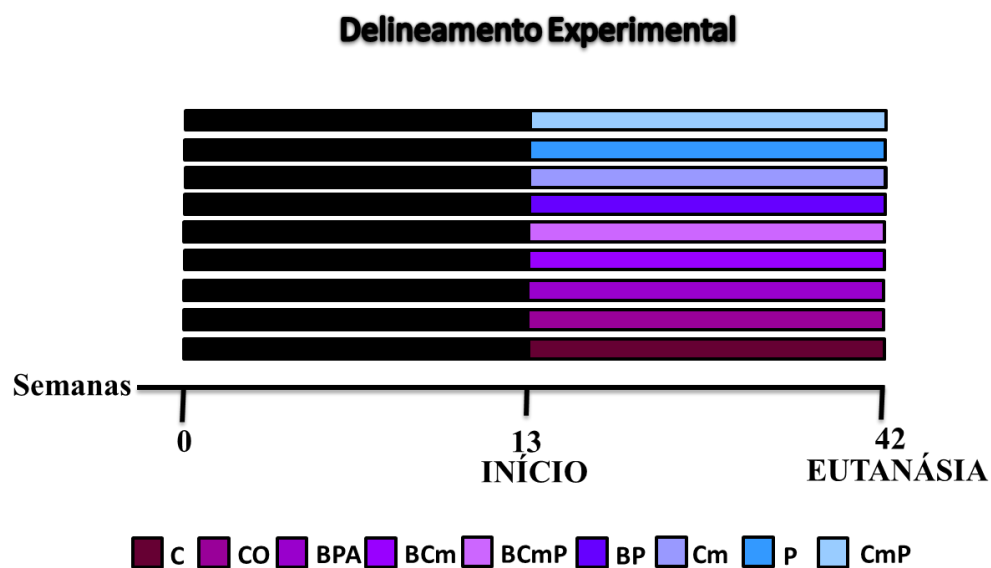


Figura 1. Delineamento Experimental do estudo.

O sacrifício dos animais aconteceu 29 semanas após o início do experimento. Os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico.

METODOLOGIA

Análise Morfológica – Microscopia de Luz

Os lobos Ventral e Dorsolateral prostáticos foram removidos e, posteriormente, foram fixados por imersão em Paraformaldeído tamponado a 4%, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast (Histosec, Merk). Os cortes de 4µm obtidos em micrótomo rotativo automático (Leica®) foram corados pelos seguintes métodos histoquímicos:

1. **Picrossírius-Hematoxilina** – Para estudo das fibras de colágeno no estroma prostático;
2. **Impregnação pela prata para reticulina** – Para estudo das fibras reticulares do estroma prostático.
3. **Resorcina-Fucsina de Weigert** – Para estudo das fibras do sistema elástico do estroma prostático.

Estereologia

Análises estereológicas foram realizadas para se obter o volume relativo de componentes estromais nos 9 grupos avaliados. Foram capturadas imagens de 42 campos de cada grupo a partir de lâminas coradas pela técnica Picrossírius-Hematoxilina, por meio do Sistema Analisador de Imagens Olympus BX60, com o programa Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M168 proposto por Weibel (1978) [18] e aplicado à próstata por Huttunen *et al.* (1981) [19]. Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência absoluta das porções dos seguintes componentes estromais individuais: músculo liso e colágeno.

Análise Imunohistoquímica

Os seguintes testes imunohistoquímicos foram aplicados nas próstatas dos gerbilos:

- α -actina de Músculo Liso: Anti- α -actina (Mouse Monoclonal, Clone IA4), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF): anti-VEGF, (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Metaloproteinases de Matriz tipo 2: anti-MMP-2 ((2C1): sc-13594 - Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Metaloproteinases de Matriz tipo 9: anti-MMP-9 ((C-20): sc-6840 - Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Interleucina tipo10: anti IL-10 ((E-10): sc-8438 - Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Interleucina tipo 6: anti IL-6 ((M-19): sc-1265 - Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

Procedimentos gerais para as avaliações imunohistoquímica:

Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6.0 a 97°C (45 minutos) em banho maria. Os cortes foram lavados em PBS (3x5minutos). O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com H₂O₂ (3% em metanol) durante 20 minutos. Os cortes foram lavados em PBS (3x5minutos). O bloqueio de proteínas foi feita em leite (2,5 gramas em 50mL de PBS) por 30 minutos. Anticorpos primários para os componentes acima mencionados foram utilizados em diluições variadas (entre 1:50 e 1:100), overnight a 4°C. Após serem lavados em PBS (3x5minutos) os cortes foram incubados com o Post Primary (Novolink, Novocastra) por 45 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (3x5minutos) e incubados com o Polímero (Novolink, Novocastra) por 45 minutos. Os cortes foram lavados em PBS (3x5minutos). Em seguida, os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB, Sigma). A contra coloração dos cortes foi feita hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

Contagem de marcações positivas para MMP-2, MMP-9 e VEGF.

Um total de 42 campos foram obtidos, em aumento de 20x, por grupo (n= 5 animais/grupo) e por lobo, por meio do Sistema Analisador de Imagens Olympus BX60, com o programa Image-Pro-Plus ©Media Cybernetics. O índice de regiões marcadas positivamente por campo foi determinado de acordo com o sistema de teste de multipontos M168 proposto por Weibel (1978) [18] e aplicado à próstata por Huttunen *et al.* (1981) [19].

Análise Estatística

A análise exploratória dos dados coletados foi feita em planilhas e gráficos do *software* Excel 2013. Os testes estatísticos utilizados para averiguação da significância foram o teste ANOVA seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para dados não paramétricos, por meio do *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), significância com valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A análise histológica da próstata de gerbilos adultos permitiu determinar a multiplicidade e a distribuição das lesões histopatológicas que acometeram os lobos prostáticos nos diversos tratamentos estudados. Lesões de caráter pré-maligno (representadas por PIN) e maligno (representadas por Carcinoma Microinvasivo) foram observadas em ambos os lobos prostáticos, mas, principalmente e com maior frequência, nos grupos submetidos ao desregulador endócrino bisfenol A (Tabela 1). Os demais grupos também apresentaram lesões histopatológicas (Tabela 1), no entanto com fenótipos mais brandos e em menor extensão.

A análise estereológica mostrou diferenças nas proporções assumidas pelos diferentes elementos estromais (Colágeno, Músculo Liso) nos lobos prostáticos do gerbilo.

As fibras de colágeno apresentaram-se dispostas paralelamente à membrana basal circundando porções glandulares íntegras (Figura 2A, B e 3A, B) e, em sítios neoplásicos, sofreram remodelação (Figura 2C-I e 3C-I) apresentando-se bastante fragmentadas e dispersas. Em relação ao volume absoluto ocupado pelas fibras colagênicas no lobo Dorsolateral, o BP-A promoveu um aumento da deposição de colágeno I quando administrado sozinho ou com curcumina (BCm) (Figura 6). A associação de BPA com a piperina (BP) ou de BPA com a curcumina/piperina (BCmP), ao contrário, diminuiu a deposição de colágeno. A exposição da próstata dos animais aos fitoquímicos isoladamente não exerceu efeito sobre a modulação das fibras de colágeno. No lobo Ventral, a ação do BP-A e/ou dos fitoquímicos sobre as fibras de colágeno foram sutis (Figura 6).

As fibras reticulares (FR), representadas pelo colágeno tipo III, em regiões íntegras, formam uma fina rede interconectada disposta paralelamente à membrana basal (Figura 4A, B e 5A, B). Em ambos os lobos prostáticos, próximo a lesões proliferativas, foi possível notar que as FR apresentaram intensa remodelação com aumento na deposição e na espessura. Em lesões com fenótipos mais agressivos, as FR apareceram dispersas e fragmentadas, em associação com as células epiteliais do tumor (Figura 4C-I e 5C-I).

Outro componente do estroma prostático analisado foram as fibras elásticas (FE) (Figura 7 e 8). Estas foram observadas na região subepitelial acompanhando a deposição de fibras de colágeno e, como estruturas delgadas, entre as células musculares. No grupo BPA as FE apresentaram-se com orientação perpendicular à membrana basal, mais curtas e com ruptura em diversos pontos. Os grupos BCm, BP e BCmP, apesar da exposição ao bisfenol A,

apresentaram alterações mais sutis nas FE ao longo dos ácinos analisados. Os grupos Cm, P e CmP apresentaram FE com padrão de distribuição semelhante ao grupo C e CO.

As fibras musculares lisas, em regiões glandulares íntegras, encontraram-se dispostas paralelamente à membrana basal, circundando todo o epitélio glandular (Figura 9 e 10). Em regiões afetadas por algum tipo de lesão, este componente estromal sofreu remodelação, além de pontos de desestruturação e ruptura (Figura 9 e 10). Essa desestruturação permite a migração de células neoplásicas, favorecendo, assim, a invasão estromal. No lobo Dorsolateral, esses rearranjos não afetaram o volume de fibras musculares entre os grupos (Figura 11). No lobo Ventral, o grupo BPA apresentou o maior volume de fibras musculares lisas. Dentre os grupos que receberam bisfenol A, o grupo BCmP foi o que apresentou o menor volume de células musculares lisas, com valores próximos aos do grupo C (Figura 11).

Ao se tratar dos vasos sanguíneos, em ambos os lobos, foi constatado um aumento no número destes no grupo BPA quando comparado ao grupo C e CO (Figura 12, 13 e 14). Um aumento na formação destes vasos pode favorecer a metástase, já que permitem que as células cancerosas saiam do local de origem e espalhem-se para órgãos mais distantes. Os animais dos grupos BP e BCmP apresentaram diminuição significativa na quantidade de vasos sanguíneos quando comparados ao grupo BPA (Figura 12, 13, 14). Os grupos tratados apenas com os fitoquímicos permaneceram com quantidades de vasos sanguíneos semelhantes aos grupos C e CO (Figura 12, 13, 14).

O bisfenol A aumenta a quantidade de MMP-2 no lobo Dorsolateral e a associação deste desregulador endócrino com fitoquímicos não altera este parâmetro (Figura 15, 16, 17). No lobo Ventral ocorre um evento semelhante, porém a associação de BPA com a curcumina/piperina restabelece o padrão de MMP-2 próximo ao do controle (Figura 15, 16, 17). Nos grupos que receberam somente os fitoquímicos, em ambos os lobos, a expressão da MMP-2 foi bastante similar ao grupo C (Figura 15, 16, 17).

Em relação a expressão de metaloproteinase de matriz tipo 9, em ambos os lobos foi possível observar que o bisfenol aumenta a quantidade de MMP-9 sozinho ou em associação com a curcumina ou com a piperina e, não surte esse efeito quando é combinado com os dois fitoquímicos. Nos grupos que receberam somente os fitoquímicos, em ambos os lobos, a expressão da MMP-2 foi bastante similar ao grupo C (Figura 18, 19, 20).

É importante ressaltar que, a expressão das MMPs foi mais intensa em regiões próximas a lesões histopatológicas. Em regiões íntegras a expressão dessa enzima é baixa ou inexistente. Contudo, no grupo BPA e BCm foi constatado alta frequência das MMPs circunjacentes a regiões acinares íntegras.

A análise qualitativa da expressão de Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) foi realizada por meio da análise de diversos cortes histológicos de diferentes animais. Em relação a expressão da IL-6 foi possível constatar uma baixa expressão dessa citocina pró-inflamatória nos grupos C e CO (Figura 21, 22). De maneira oposta, houve uma grande expressão desta citocina nos grupos BPA e BCm. Nos grupos BP e BCmP houve uma redução considerável da expressão de IL-6 (Figura 21, 22). Os grupos Cm, P, CmP apresentaram expressão de IL-6 semelhante aos grupos C e CO (Figura 21, 22). Ao se tratar da expressão da Interleucina 10, foi observado resultado bastante semelhante aos dados obtidos anteriormente (Figura 23, 24).

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos que envolvem indução experimental de neoplasia prostática se concentra na descrição das lesões epiteliais e menor atenção tem sido dispendida com o microambiente estromal e suas alterações. No presente estudo, o desregulador endócrino bisfenol A foi utilizado em baixa dose para induzir lesões prostáticas em gerbilos por meio de um protocolo bem estabelecido em nosso laboratório [8]. Com o intuito de testar a ação benéfica de fitoquímicos sobre as lesões estabelecidas, curcumina, piperina e a associação entre ambas foram testadas e avaliadas nos lobos Dorsolateral e Ventral prostáticos. Sabe-se que o compartimento estromal reage de inúmeras formas as diferentes situações anormais, produzindo um microambiente dissemelhante do estroma encontrado nos tecidos saudáveis. Alguns autores afirmam que as células estromais influenciam o crescimento do câncer de próstata em graus variados em diferentes estágios de estabelecimento e progressão do tumor [20-21]. No presente trabalho vários componentes estromais foram avaliados, tanto fibrilares como celulares, com o intuito de descrever as principais alterações morfológicas associadas a sítios pré-neoplásicos e tumorais e seu papel na progressão da doença.

O colágeno do tipo I é o principal componente da matriz extracelular e é sintetizado pelos fibroblastos [22]. No estroma prostático dos gerbilos, a rede de fibras de colágeno está disposta em uma camada densa sob o epitélio do ácino [23]. Nos carcinomas microinvasivos prostáticos espontâneos ou induzidos por MNU, neste mesmo modelo, as fibras de colágeno se apresentaram intensamente fragmentadas e dispersas [3]. A progressão da malignidade tumoral é acompanhada pela formação de um andaime de fibras colagênicas finas e ramificadas [24]. Nas lesões causadas pelo BP-A esses fenótipos também foram observados e em uma análise estereológica foi observado aumento na deposição de colágeno nos grupos BPA e BCm no lobo Dorsolateral. A associação de BP-A com piperina ou piperina e curcumina resultou em redução no volume das fibras de colágeno tipo I. No lobo Ventral, a ação do BP-A e/ou dos fitoquímicos sobre as fibras de colágeno foram sutis. As fibras reticulares alteraram sua organização estrutural mediante os tratamentos e em áreas acometidas por lesões. Em lesões mais extensas e com fenótipos mais agressivos, as FR sofreram intensa fragmentação e apareceram dispersas no meio dos agregados tumorais em associação com as células epiteliais do tumor. Estudos de Costa e colaboradores (2004) [25] analisaram a densidade volumétrica de fibras reticulares na zona de transição prostática e, em pacientes com hiperplasia houve um aumento dessas fibras quando comparado ao grupo controle. Em lesões prostáticas pré-malignas (PIN), induzidas por carcinógeno, as fibras

reticulares sofreram fragmentação e degradação, demonstrando ser mais espessas e dispostas perpendicularmente à membrana basal [26].

A próstata de roedores apresenta poucas fibras elásticas que se localizam na parede de vasos, dispostas concentricamente ao redor dos ácinos e espalhadas no estroma da glândula [27]. A análise histológica das FE mostrou que regiões acinares íntegras do grupo C, são circundadas por células musculares lisas e por fibras elásticas dispostas em uma fina camada sob o epitélio. No grupo BPA, nas regiões com lesões histopatológicas, as FE apresentaram-se remodeladas, mais curtas e/ou fragmentadas e, em vários pontos dispostas perpendicularmente à membrana basal. Os grupos BCm, BP e BCmP, apesar da exposição ao bisfenol A, apresentaram alterações mais sutis nas FE nos diversos ácinos analisados, evidenciando a eficácia dos tratamentos com os fitoquímicos. Os grupos Cm, P e CmP apresentaram FE com padrão de distribuição semelhante ao grupo C e CO. Em regiões tumorais é possível observar diversas alterações estruturais nesses elementos [1]. John & Murthy (2016) [28] analisaram a morfologia das fibras elásticas em carcinoma epidermóide de boca e, constataram uma quantidade significativa de padrão fragmentado de fibras elásticas neste tipo de carcinoma com fenótipo pouco diferenciado. Segundo Gonçalves e colaboradores (2015) [3] lesões pré-malignas na próstata de gerbilos apresentaram um início da desorganização dos elementos elásticos que se acentuaram com a progressão da lesão. Atualmente pouco se sabe sobre a relação entre as fibras elásticas e o desenvolvimento e progressão dos tumores. Estudos mais detalhados com os fitoquímicos curcumina e piperina devem ser realizados, já que estes apresentaram uma boa eficácia em relação aos elementos elásticos próximos das lesões prostáticas decorrentes da exposição prolongada ao bisfenol A.

Ao se tratar das células musculares lisas, em regiões glandulares íntegras, estas se encontraram dispostas paralelamente à membrana basal, circundando todo o epitélio glandular. A análise da próstata de ratos mostrou maior concentração dessas células próximas as unidades secretoras dos alvéolos, sugerindo que as células musculares podem ser responsáveis pela menor proliferação e pela propensão a apoptose sob condições normais. De forma contrária, regiões ductais distais apresentam fibroblastos como maioria das células estromais e o comportamento epitelial é mais proliferativo [29]. Em regiões afetadas por algum tipo de lesão, este componente estromal sofreu remodelação e as fibras musculares apareceram dispersas e fragmentadas, em associação com as células epiteliais do tumor. Esse afastamento das células musculares lisas das unidades acinares secretoras pode estar envolvido com o aumento da proliferação epitelial. No lobo Dorsolateral, esses rearranjos não afetaram o volume de fibras musculares entre os grupos. No lobo Ventral, o grupo BPA

apresentou o maior volume de fibras musculares lisas. Dentre os grupos que receberam bisfenol A, o grupo BCmP foi o que apresentou o menor volume de células musculares lisas, com valores próximos aos do grupo C. Estudos de Pradhan e Chandra (1975) [30] constataram que o início do desenvolvimento de Hiperplasia Prostática Benigna pode estar relacionado com a proliferação do estroma fibromuscular.

Outra alteração constatada diz respeito ao número de vasos sanguíneos. Todos os tecidos requerem um suprimento contínuo de oxigênio e nutrientes, simultaneamente com a remoção de dióxido de carbono e de subprodutos celulares tóxicos. Essas necessidades são essenciais e ocorrem por dois processos: a vasculogênese e a angiogênese. A angiogênese é o processo no qual novos vasos sanguíneos surgem e crescem a partir de vasos pré-existentes [31]. O processo angiogênico envolve o ajuste do equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos. O início de novos vasos sanguíneos por meio da angiogênese promove o crescimento do tumor e a invasão. As células tumorais liberam fatores angiogênicos solúveis para possibilitar a formação de novos vasos e manter os vasos existentes, permitindo assim, que os tumores cresçam [32-34]. Dentre esses fatores, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) possui extrema importância na formação de vasos sanguíneos no câncer de próstata e pode ser utilizado como alvo terapêutico. Animais do grupo BPA apresentaram um maior número de vasos sanguíneos e maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular quando comparados aos demais grupos. O tratamento com os fitoquímicos, após a exposição prolongada ao bisfenol A diminuiu o número de vasos sanguíneos e a expressão de VEGF quando comparados ao grupo BPA. Deng e colaboradores (2008) [35] constataram que a curcumina reduz a expressão de mRNA e proteínas do fator de crescimento endotelial vascular em linhagem de células de câncer de próstata andrógeno independente. Em células de linhagem de câncer de ovário, a curcumina foi efetiva na supressão do fator de crescimento endotelial vascular [36]. Kim e colaboradores (2015) [37] analisaram o efeito inibitório da curcumina em modelo de rato com hiperplasia prostática benigna induzida por testosterona e concluíram que houve diminuição na expressão de VEGF, TGF- β 1 e IGF1 nos grupos tratados com curcumina. Estudos com tumorigênese mamária induzida por N-nitroso-N-metiluréia e em linhagens celulares de câncer de mama constataram que após o tratamento com a piperina, houve uma diminuição na expressão do receptor de estrogênio, das metaloproteinases de matriz 2 e 9, do c-Myc e do fator de crescimento vascular endotelial, sugerindo que a piperina pode suprimir a invasão, migração e angiogênese de células tumorais [38].

As metaloproteinases de matriz estão envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular e na remodelação tecidual [39-41]. Essas endopeptidases proteolíticas são capazes de degradar e processar outras proteinases, quimiocinas e citocinas e moléculas de adesão [42]. Muitos estudos demonstraram o papel desempenhado pelas MMPs na invasão de células tumorais e na metástase, em grande parte pela ruptura e remodelação da matriz extracelular [43-44]. O controle da expressão das MMPs é realizado pelos inibidores teciduais das MMPs (TIMP) [45]. Em humanos, os neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais são células que podem sintetizar e secretar MMP-2 e -9 [46]. Os principais substratos destas enzimas incluem a gelatina, o colágeno, a elastina e algumas proteínas da membrana plasmática, como a laminina [46-49]. A superexpressão de MMP-2 e -9 têm sido constantemente observada em diversos cânceres [49-51]. Durante a tumorigênese, a destruição da membrana basal é um passo importante que favorece a invasão tumoral e as metástases [49,52]. A MMP-2 e -9 podem degradar a membrana basal, já que esta possui na sua constituição colágeno tipo quatro e laminina [52-54].

No nosso estudo, o lobo Dorsolateral dos grupos BPA e BCm apresentaram maior frequência de células MMP-9 positivas. Associado a este dado, pudemos observar que estes dois grupos foram os que apresentaram a maior frequência de lesões prostáticas pré-malignas e malignas. O lobo Ventral apresentou resultados semelhantes aos do LDL. Ao se tratar da frequência de células MMP-2 positivas, no LDL, os grupos que foram expostos ao BP-A apresentaram maior volume absoluto de MMP-2 quando comparado aos demais grupos. No LV, os grupos BPA, BCm e BP apresentaram os maiores volumes absolutos quando comparados aos demais grupos experimentais. Entretanto, o grupo BCmP apresentou uma redução significativa no volume absoluto de MMP-2, evidenciando que a associação dos fitoquímicos curcumina/piperina, em animais expostos a baixas doses de BP-A, proporciona maiores efeitos benéficos que a exposição isolada. Após o tratamento com BP-A, a migração e invasão de células cancerosas são estimuladas por ativação aumentada de proteases como a metaloproteinase de matriz tipo 9 [55-57]. Lan e colaboradores (2017) [58] analisaram o efeito do bisfenol A na migração de trofoblastos humanos e placentação de camundongos. Foi constatado que o bisfenol A aumentou os níveis de proteína integrina beta1 e da MMP-9 e MMP-2. Estudos envolvendo a exposição de células epiteliais normais do cólon - NCM460 - à dose ambiental do BP-A mostrou um aumento na expressão e na atividade da MMP-9, favorecendo a migração celular e aumentando o risco de câncer de cólon [59]. Dominguez e colaboradores (2008) [60] estudaram o efeito de doses crescentes de bisfenol A sobre células da granulosa-luteína em relação à produção e a atividade de MMP-2 e -9. Em suma, os

pesquisadores concluíram que em concentrações compatíveis com os níveis de exposição humana, o BP-A estimula a produção de MMP-9 pelas células da granulosa, sugerindo que o tratamento com BP-A pode afetar a estabilidade da MEC ovariana. Em nossos estudos, a curcumina e a piperina isoladamente, não foram capazes de reduzir significativamente a expressão de MMP-9. No entanto, ao associarmos a curcumina com a piperina, houve uma diminuição na expressão dessa enzima. Estudos de Cao e colaboradores (2015) [61] analisaram a eficácia da curcumina na proliferação e apoptose em células de osteoclastoma humano e seus mecanismos relacionados. Dentre os resultados obtidos, pode-se observar que a curcumina reduziu a viabilidade celular, induziu a apoptose, aumentou a atividade da caspase-3 das células do osteoclastoma, inibiu a quantidade de expressão do gene MMP-9 e a atividade do NF- κ B. Estudos com células de câncer de próstata DU145 constatou que a piperina diminuiu a progressão da migração dessas células, por meio da regulação negativa da via de sinalização Akt/mTOR/MMP-9. Além disso, observou-se que a piperina diminuiu a expressão de MMP-9, p-Akt e p-mTOR [62].

A interleucina 6 é uma citocina pró-inflamatória que é expressa em tumores prostáticos e no microambiente estromal do tumor [63]. Essa citocina media diversas funções fisiológicas, tais como a regulação da diferenciação e ativação de células B e T, o crescimento e sobrevivência celular e o controle da resposta da inflamação aguda [64]. Ademais, células LNCaP em cultura, tratadas com interleucina 6, superexpressaram fator de crescimento endotelial vascular, sugerindo que a IL-6 pode estar envolvida na angiogênese de tumores prostáticos [65]. Fibroblastos associados ao tumor, após sofrerem estimulação por interleucina 6, secretam MMPs, aumentando a invasidade das células tumorais prostáticas e favorecendo a transição epitélio-mesenquimal [66]. Dentre os grupos que foram expostos ao bisfenol A, a expressão de IL-6 foi maior nos grupos BPA e BCm. Li e colaboradores (2017) [67] estudaram o efeito do bisfenol A sobre o carcinoma de células escamosas da laringe e constataram que a expressão de IL-6 foi significativamente aumentada nas células deste carcinoma quando expostas ao desregulador endócrino durante 24 horas. Além disso, os pesquisadores concluíram que, o bisfenol A desencadeia a proliferação e a migração das células tumorais por meio da regulação positiva de IL-6 mediada pelo receptor de estrogênio acoplado à proteína G. Estudos recentes com concentrações nanomolares de bisfenol A concluíram, por meio de ensaios moleculares que, houve um aumento da expressão de interleucina-6 em células de neuroblastoma. Além disso, as baixas doses de bisfenol A são capazes de ativar sinais de NF- κ B/IL-6, aumentando assim a malignidade das células tumorais [68]. Foi constatado que a curcumina regula negativamente biomarcadores de

invasão e angiogênese (exemplo - metaloproteinase de matriz tipo 9 e VEGF) e biomarcadores inflamatórios (exemplo – fator de necrose tumoral e IL-6) [69]. Os potenciais benefícios da curcumina são limitados devido a sua baixa solubilidade, baixa absorção, metabolismo rápido e rápida eliminação sistêmica. A baixa biodisponibilidade da curcumina no sangue pode ter sido a responsável pela não redução da expressão de IL-6 após exposição ao BP-A. Vários estudos melhoraram a biodisponibilidade da curcumina adicionando compostos como a piperina [70-71]. No grupo BCmP, houve uma redução significativa da expressão dessa citocina quando comparado aos grupos BPA e BCm.

A interleucina-10 é uma citocina altamente pleiotrópica secretada por uma variedade de tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos, células B e subconjuntos de células T [72-73]. Estudos comprovam sua influência na patogênese, desenvolvimento de doenças autoimunes e no câncer [74]. Entretanto, seu papel na tumorigênese e desenvolvimento ainda é bastante controverso. Alguns autores afirmam que a IL-10 atua na progressão tumoral enquanto outros autores acreditam que essa citocina possui papel ativo na inibição tumoral [74]. Em nosso estudo, os grupos BPA e BCm apresentaram maior expressão desta citocina. Estes grupos, como visto anteriormente, apresentaram extensas lesões histopatológicas com fenótipos mais agressivos, e diversas alterações estromais. Contrariamente, os grupos BP e BCmP, apresentaram menor expressão de IL-10 como os demais grupos. É sabido que a IL-10 atua como uma citocina imunossupressora e que sua expressão é um mecanismo de fuga da vigilância imunológica, diminuindo a resposta imune antitumoral no microambiente tumoral, favorecendo a promoção do tumor [74-76]. Macrófagos ativados, associados ao tumor, produzem quantidades significativas de IL-10 promovendo o crescimento tumoral em células de melanoma [77].

CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho demonstrou que o microambiente estromal prostático, em especial as células musculares lisas, as fibras de colágeno e as fibras do sistema elástico, a expressão de MMPs, ILs e VEGF, sofreram modificações após o tratamento prolongado com doses ambientais de bisfenol A. Mudanças na composição do estroma prostático podem alterar a homeostase epitelial, levando à disfunção glandular, com possível desenvolvimento de doenças. A administração de curcumina isoladamente não foi capaz de amenizar essas alterações. Por outro lado, a associação da curcumina com a piperina, trouxe resultados mais benéficos para a glândula prostática que apresentou os elementos estromais estudados bem próximos aos do grupo Controle. O entendimento dos fatores capazes de modular o microambiente estromal torna possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na prevenção ou na redução da evolução dos distúrbios prostáticos.

REFERÊNCIAS

- [1] Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001; 166:2472–83.
- [2] Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype an extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research.* 2002; 8:2912-2923.
- [3] Gonçalves BF, Campos SG, Costa CF, Scarano WR, Góes RM, Taboga SR. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. *Acta Histochem.* 2015; 117(1):4-13.
- [4] Condon MS. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 2005; 15:132-137.
- [5] Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(8):1007-19, 2003.
- [6] Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 254–255: 179–86.
- [7] Gao H, Yang BJ, Li N, Feng LM, Shi XY, Zhao WH, Liu SJ. Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94(1):e211.
- [8] Facina CH, Campos SGP, Gonçalves BF, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. *Prostate.* 2018; 78(2):152-163.
- [9] Di Donato M, Cernera G, Giovannelli P, Galasso G, Bilancio A, Migliaccio A, Castoria G. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2017; 457:35-42.
- [10] Prins GS, Ye SH, Birch L, Zhang X, Cheong A, Lin H, Calderon-Gierszal E, Groen J, Hu WY, Ho SM, van Breemen RB. Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose-Response Analysis. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(7):077007.
- [11] Kanai M. Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology.* 2014; 20(28): 9384-9391.
- [12] Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014; 116(1):1-7.
- [13] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman, RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 2007; 4:807–818.
- [14] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998; 64(4):353-356.

- [15] Hwang YP, Yun HJ, Kim HG, Han EH, Choi JH, Chung YC, et al. Suppression of phorbol-12- myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α / ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicol Lett.* 2011; 203:9–19.
- [16] Lai LH, Fu QH, Liu Y, Jiang K, Guo QM, Chen QY. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33:523–30.
- [17] Doucette CD, Hilchie AL, Liwski R, Hoskin DW. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. *J Nutr Biochem.* 2013; 24:231–9.
- [18] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1978; 12:131-155.
- [19] Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat.* 1981; 132: 357-370.
- [20] Condon MS, Bosland MC. The role of stromal cells in prostate cancer development and progression. *In Vivo.* 1999; 13(1):61-5.
- [21] Kalluri R & Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Can.* 2006; 6(5):392-401.
- [22] Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1):247-57.
- [23] Campos SG, Zanetoni C, Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *Int J Exp Pathol.* 2008; 89(1):13-24.
- [24] Taboga SR, Vidal Bde C. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2003; 35(1):11-6.
- [25] Costa WS, de Carvalho AM, Babinski MA, Chagas MA, Sampaio FJ. Volumetric density of elastic and reticular fibers in transition zone of controls and patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2004; 64(4):693-7.
- [26] Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Campos SG. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(1):96-106.
- [27] Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR. Elastic system of the ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate.* 1997; 32:27–34.
- [28] John RE, Murthy S. Morphological analysis of collagen and elastic fibers in oral squamous cell carcinoma using special stains and comparison with Broder's and Bryne's grading systems. *Indian J Dent Res.* 2016; 27(3):242-8.
- [29] Nemeth H, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate.* 1996; 28:124–128.
- [30] Pradhan BK & Chandra K. Morphogenesis of nodular hyperplasia--prostate. *J Urol.* 1975; 113(2):210-3.

- [31] Nieves BJ, D'Amore PA, Bryan BA. The function of vascular endothelial growth factor. *Biofactors*. 2009; 35(4):332-7.
- [32] Delongchamps NB, Peyromaure M, Dinh-Xuan AT. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology*. 2006; 68:244–8.
- [33] Kluetz PG, Figg WD, Dahut WL. Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2010; 11: 233–47.
- [34] Antonarakis ES, Carducci MA. Targeting angiogenesis for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16:365–76.
- [35] Deng G, Yu JH, Ye ZQ, Hu ZQ. Curcumin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2008; 14(2):116-21.
- [36] Mohebbati R, Anaeigoudari A, Khazdair MR. The effects of *Curcuma longa* and curcumin on reproductive systems. *Endocr Regul*. 2017; 51(4):220-228.
- [37] Kim SK, Seok H, Park HJ, Jeon HS, Kang SW, Lee BC, Yi J, Song SY, Lee SH, Kim YO, Chung JH. Inhibitory effect of curcumin on testosterone induced benign prostatic hyperplasia rat model. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:380.
- [38] Deng Y, Sriwiriyan S, Tedasen A, Hiransai P, Graidist P. Anti-cancer effects of *Piper nigrum* via inducing multiple molecular signaling in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2016; 188:87-95.
- [39] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17:463-516.
- [40] Li WP, Anderson CJ. Imaging matrix metalloproteinase expression in tumors. *Q J Nucl Med*. 2003; 47(3):201-8.
- [41] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8):827-39.
- [42] Goetzel E, Banda M, Leppert D. Commentary: matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol*. 1996; 156:1–4.
- [43] Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJ. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp*. 1998; 63:295-313.
- [44] Panth KM, van den Beucken T, Biemans R, Lieuwes NG, Weber M, Losen M, Yaromina A, Dubois LJ, Lambin P. In vivo optical imaging of MMP2 immuno protein antibody: tumor uptake is associated with MMP2 activity. *Sci Rep*. 2016; 6:22198.
- [45] Maskos K, Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol*. 2003; 25(3):241-66.
- [46] Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2013; 48:222–272.

- [47] McCawley L. J. & Matrisian L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13:534–540.
- [48] Farina AR, Mackay AR. Gelatinase b/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancers.* 2014; 6:240–296.
- [49] Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel).* 2018; 18(10). doi: 10.3390/s18103249.
- [50] Schmalfeldt B, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(8):2396-404.
- [51] Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2009; 21, 1323–1333.
- [52] Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002; 52(4):255-64.
- [53] Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J. Urol.* 1999; 161:1359-1363.
- [54] Misko A, Ferguson T, Notterpek L. Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in trembler j neuropathy nerves. *J. Neurochem.* 2002; 83:885-894.
- [55] Zhang KS, Chen HQ, Chen YS, Qiu KF, Zheng XB, Li GC, Yang HD, Wen CJ. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomed Pharmacother.* 2014; 68(8):1037-43.
- [56] Kim YS, Choi KC, Hwang KA. Genistein suppressed epithelial mesenchymal transition and migration efficacies of BG-1 ovarian cancer cells activated by estrogenic chemicals via estrogen receptor pathway and downregulation of TGF- β signaling pathway. *Phytomedicine.* 2015; 22:993–999.
- [57] Ma XF, Zhang J, Shuai HL, Guan BZ, Luo X, Yan RL. IKK β /NF- κ B mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015; 573:52–58.
- [58] Lan X, Fu LJ, Zhang J, Liu XQ, Zhang HJ, Zhang X¹, Ma MF, Chen XM, He JL, Li LB, Wang YX, Ding YB. Bisphenol A exposure promotes HTR-8/SVneo cell migration and impairs mouse placentation involving upregulation of integrin- β 1 and MMP-9 and stimulation of MAPK and PI3K signaling pathways. *Oncotarget.* 2017; 8(31):51507-51521.
- [59] Shi T, Zhao C, Li Z, Zhang Q, Jin X. Bisphenol a exposure promotes the migration of NCM460 cells via estrogen receptor-mediated integrin β 1/MMP-9 pathway. *Environ Toxicol.* 2016; 31(7):799-807.

- [60] Dominguez MA, Petre MA, Neal MS, Foster WG. Bisphenol A concentration-dependently increases human granulosa-lutein cell matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) enzyme output. *Reprod Toxicol*. 2008; 25(4):420-5.
- [61] Cao F, Liu T, Xu Y, Xu D, Feng S. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell through MMP-9, NF- κ B and JNK signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(6):6037-6045.
- [62] Zeng Y, Yang Y. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. *Mol Med Rep*. 2018; 17(5):6363-6370.
- [63] Culig Z & Pühr M. Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. *Mol Cell Endocrinol*. 2018; 462(Pt A):25-30.
- [64] Neurath MF & Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22: 83–9.
- [65] Shariat SF, Chromecki TF, Hoefer J, Barbieri CE, Scherr DS, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Montorsi F, Culig Z, Cavarretta IT. Soluble gp130 regulates prostate cancer invasion and progression in an interleukin-6 dependent and independent manner. *J Urol*. 2011; 186(5):2107-2114.
- [66] Giannoni E, Bianchini F, Masieri L et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*. 2010; 70: 6945–6956
- [67] Li S, Wang B, Tang Q, Liu J, Yang X. Bisphenol A triggers proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via GPER mediated upregulation of IL-6. *Cell Biochem Funct*. 2017; 35(4):209-216.
- [68] Xiong S, Wang Y, Li H, Zhang X. Low Dose of Bisphenol A Activates NF- κ B/IL-6 Signals to Increase Malignancy of Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2017; 37(6):1095-1103.
- [69] Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2009; 30(2):85-94.
- [70] Jäger R, Lowery RP, Calvanese AV, Joy JM, Purpura M, Wilson JM. Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutr J*. 2014;13:11. doi: 10.1186/1475-2891-13-11.
- [71] Klickovic U, Doberer D, Gouya G, Aschauer S, Weisshaar S, Storka A, Bilban M, Wolzt M. Human pharmacokinetics of high dose oral curcumin and its effect on heme oxygenase-1 expression in healthy male subjects. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:458592.
- [72] Hedrich CM & Bream JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol Res*. 2010; 47(1-3):185-206.
- [73] Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4⁺ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol*. 2010; 3: 239–246.
- [74] Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015; 367(2):103-107.

- [75] Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer*. 1994; 56(5):755-60.
- [76] Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*. 2011; (2-3):170-182.
- [77] Wang T, Ge Y, Xiao M, Lopez-Coral A, Azuma R, Somasundaram R, Zhang G, Wei Z, Xu X, Rauscher FJ 3rd, Herlyn M, Kaufman RE. Melanoma derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012; 25(4):493-505.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental do estudo.

Figura 2. Elementos Colagênicos do lobo Dorsolateral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por uma espessa camada de colágeno subepitelial (setas). **C.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). **D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). **E, F, G, H e I.** Ácinos com PIN. Observa-se a distribuição menos ordenada dos elementos colagênicos em meio ao epitélio proliferativo (asteriscos e setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Picrossírius-Hematoxilina.

Figura 3. Elementos Colagênicos do lobo Ventral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por uma camada de colágeno subepitelial (setas). **C, D.** Ácinos acometidos Carcinoma Microinvasivo (CM). Os asteriscos indicam rompimento dos elementos colagênicos da matriz extracelular no sítio neoplásico. **E, F, G, H e I.** Ácinos acometidos por PIN. Observa-se a distribuição menos ordenada dos elementos colagênicos em meio ao epitélio proliferativo (asteriscos e setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Picrossírius-Hematoxilina.

Figura 4. Fibras Reticulares do lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A e B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por finas camadas de colágeno subepitelial do tipo I (setas) e do tipo III (cabeça de setas) dispostas paralelamente a membrana basal. **C.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. Os elementos colagênicos (setas) sofreram intensa fragmentação dispondo-se perpendicularmente a membrana basal. **D, E.** Carcinoma Microinvasivo. Notar intensa remodelação dos elementos colagênicos (setas). **F, G, H.** Ácino acometido por PIN. As setas indicam remodelação das fibras reticulares. **I.** Ácino acometido PIN. É possível observar o espessamento das fibras reticulares neste sítio neoplásico (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Reticulina de Gömori.

Figura 5. Fibras Reticulares do lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A e B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por finas camadas de colágeno subepitelial do tipo I (setas) e do tipo III (cabeça de setas) dispostas paralelamente a membrana basal. **C.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. Os elementos colagênicos (setas) sofreram intensa fragmentação dispondo-se perpendicularmente a membrana basal. Além disso, é possível notar o espessamento de algumas fibras reticulares. **D.** Carcinoma Microinvasivo. Notar intensa remodelação dos elementos colagênicos (setas). **E, F, G, H.** Ácinos acometidos com PIN. Notar início de desestruturação dos elementos de matriz extracelular (setas) associados a esses sítios neoplásicos. **I.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática. É possível observar o espessamento (*) e a fragmentação (setas) das fibras reticulares neste sítio neoplásico. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Reticulina de Gömori.

Figura 6. Volume absoluto (mm^3) de colágeno na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 7. Elementos elásticos do lobo Dorsolateral prostático de gerbilos adultos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por fibras elásticas. **C.** Ácino apresentando fibras elásticas remodeladas, curtas e com ruptura em diversos pontos (setas). **D, F, G, H, I.** Ácinos apresentando disposição típica das fibras elásticas. **E.** Aparente aumento das fibras elásticas subepiteliais. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Resorcina-Fucsina de Weigert. Escala das figuras: 10 μm .

Figura 8. Elementos elásticos do lobo Ventral prostático de gerbilos adultos. **A, B.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por fibras elásticas. **C.** Ácino apresentando fibras elásticas com orientação perpendicular à membrana basal, curtas e com ruptura em diversos pontos (setas) em regiões íntegras ou com lesão histopatológica. **D, G, H, I.** Ácinos apresentando disposição típica das fibras elásticas. **E, F.** Maior deposição de fibras elásticas entre as camadas de células musculares lisas (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP. **A-I.** Resorcina-Fucsina de Weigert. Escala das figuras: 10 μm .

Figura 9. Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso no lobo Dorsolateral. **A, B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada de células musculares lisas (ML). **C, D.** Ácinos acometidos por Carcinoma Microinvasivo. É possível notar o rompimento da camada de células musculares lisas favorecendo a invasão estromal (setas). **E, F.** Ácinos acometidos por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Observar o início da desestruturação da camada de células musculares lisas nestes sítios neoplásicos. **G-I.** Ácinos com a presença e PIN. Apesar do ácino apresentar diversas atipias, a camada de células musculares lisas está íntegra e circundando todo o ácino. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 10. Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso no lobo Ventral. **A, B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada de células musculares lisas (ML). **C.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Notar o início da ruptura da camada de células musculares lisas (seta). **D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. É possível notar o rompimento da camada de células musculares lisas favorecendo a invasão estromal (setas). **E.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Observar o início da desestruturação da camada de células musculares lisas neste sítio neoplásico (seta). **F.** Ácino com PIN. Apesar das atipias celulares, a camada de células musculares lisas apresenta-se íntegra. **G-I.** Ácinos com a presença e PIN. Nota-se que a camada de células musculares lisas está íntegra e circundando todo o ácino. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 11. Volume absoluto (mm^3) de músculo liso na próstata dorsolateral e ventral de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 12. Imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no lobo Dorsolateral de gerbilos adultos. **A, B.** Baixa expressão de VEGF em tecido prostático íntegro (setas). **C-E.** Alta expressão de VEGF (asteriscos). **F-I.** Baixa expressão de VEGF (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 13. Imunoexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) no lobo Ventral de gerbilos adultos. **A, B.** Baixa expressão de VEGF em tecido prostático íntegro (setas). **C.** Forte expressão de VEGF em animais tratados com BP-A, inclusive em áreas livres de lesões. **D, E.** Alta expressão de VEGF (setas e asteriscos). **F-I.** Baixa expressão de VEGF (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 14. Volume absoluto (mm^3) de vasos sanguíneos na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 15. Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 2 (MMP-2) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 16. Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 2 (MMP-2) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 17. Volume absoluto (mm^3) de Metaloproteinase de Matriz tipo 2 (MMP-2) nos lobos Dorsolateral e Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 18. Imunoexpressão de Metaloproteinase de Matriz tipo 9 (MMP-9) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 19. Imunoexpressão de Metaloproteinases de Matriz tipo 9 (MMP-9) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 20. Volume absoluto (mm^3) de Metaloproteinases de Matriz tipo 9 (MMP-9) nos lobos Dorsolateral e Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 7 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey. Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 21. Imunoexpressão de Interleucina tipo 6 (IL-6) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 22. Imunoexpressão de Interleucina tipo 6 (IL-6) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 23. Imunoexpressão de Interleucina tipo 10 (IL-10) no lobo Dorsolateral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

Figura 24. Imunoexpressão de Interleucina tipo 10 (IL-10) no lobo Ventral prostático de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos (setas). **A.** Grupo C. **B.** Grupo CO. **C.** Grupo BPA. **D.** Grupo BCm. **E.** Grupo BP. **F.** Grupo BCmP. **G.** Grupo Cm. **H.** Grupo P. **I.** Grupo CmP.

FIGURA 2

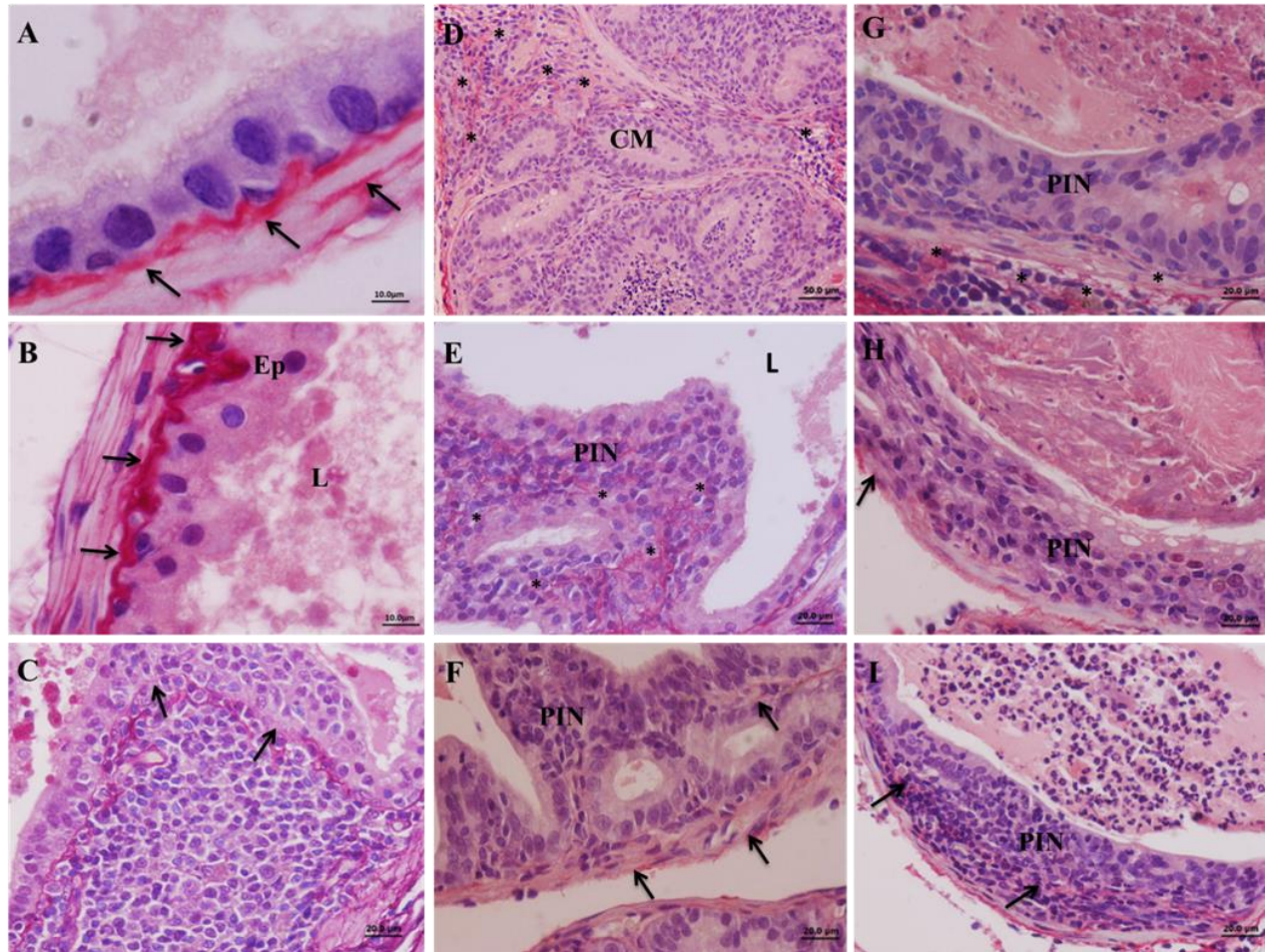
Lobo Dorsolateral

FIGURA 3

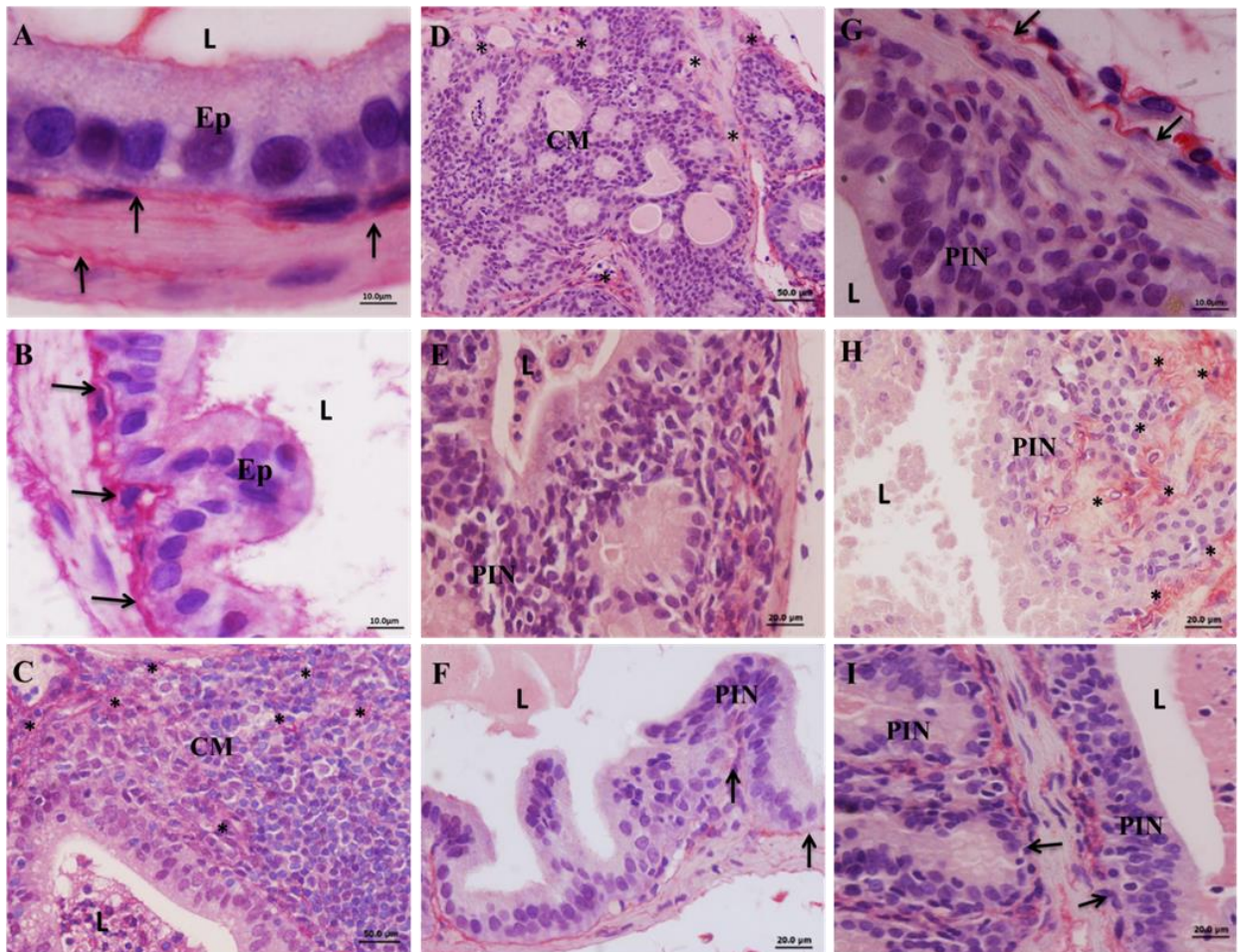
Lobo Ventral

FIGURA 4

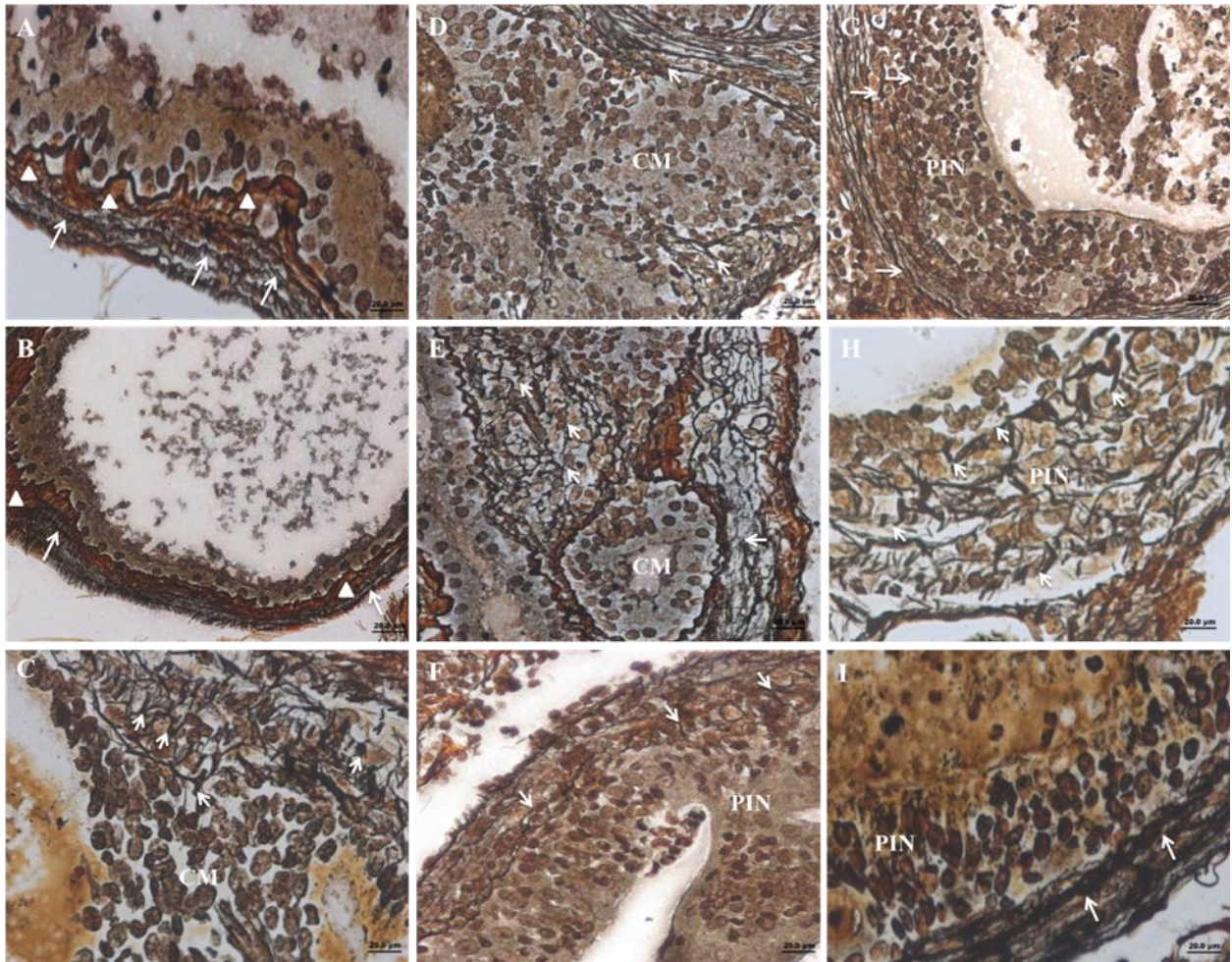
Lobo Dorsolateral

FIGURA 5

Lobo Ventral

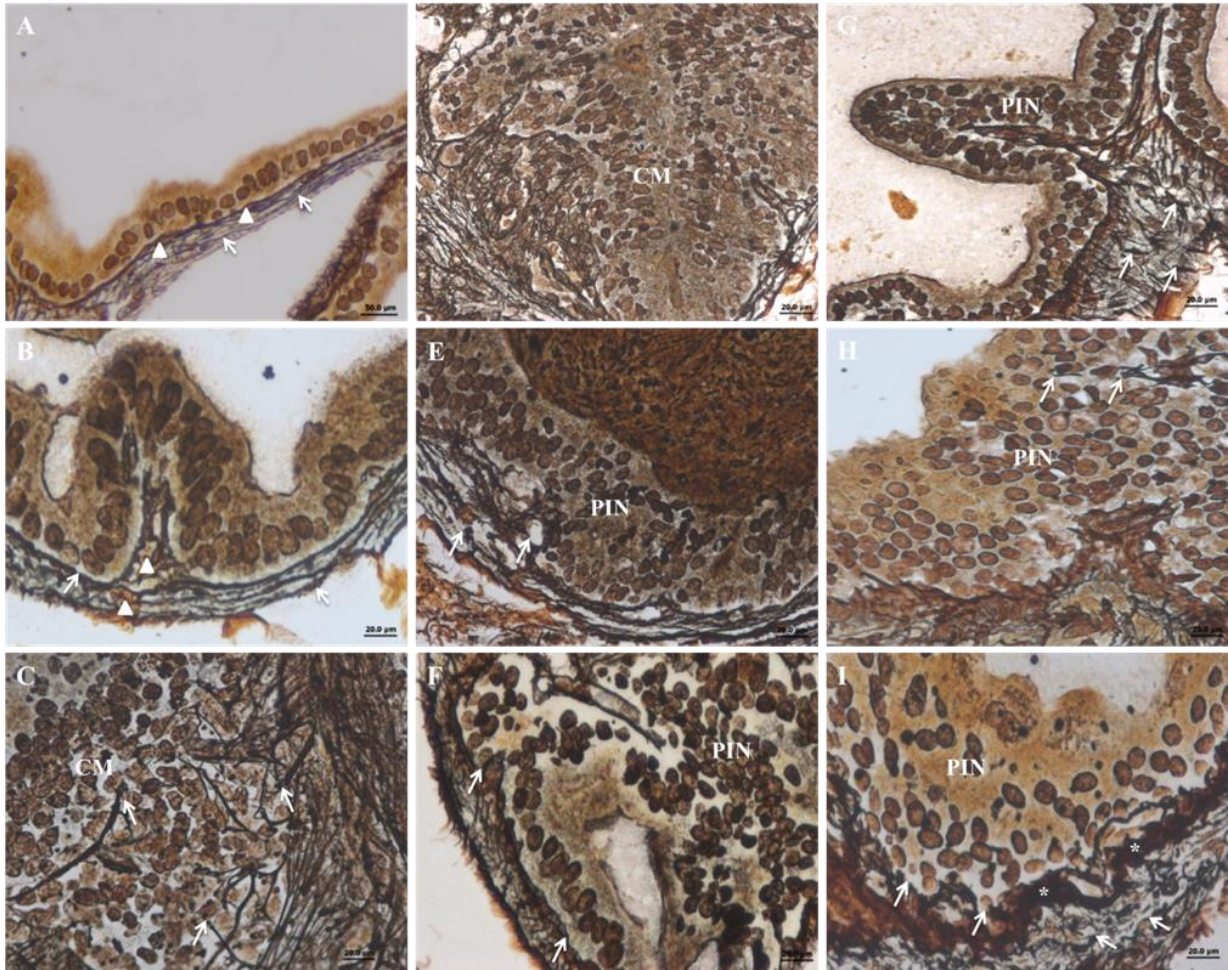


FIGURA 6

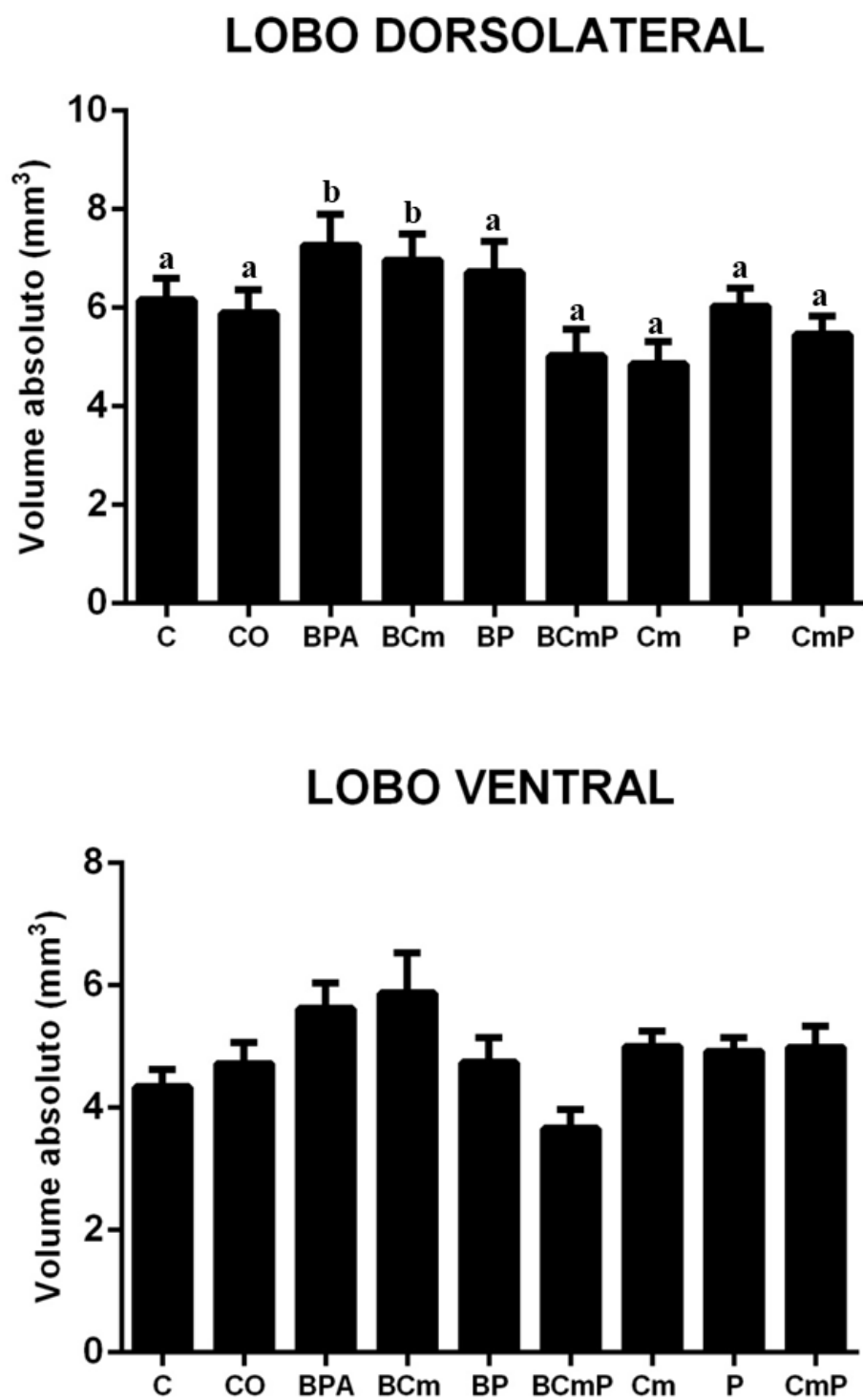


FIGURA 7

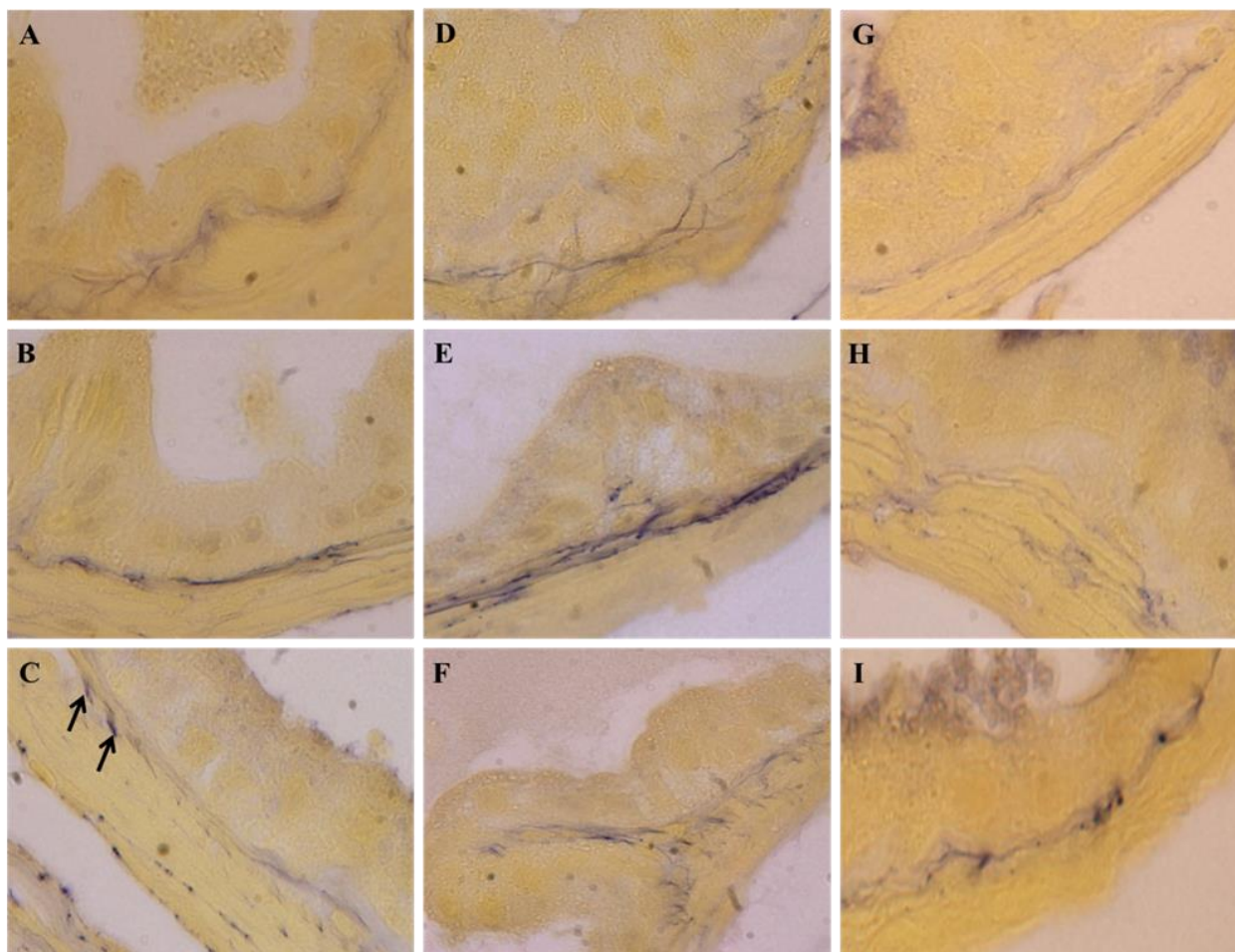
Lobo Dorsolateral

FIGURA 8

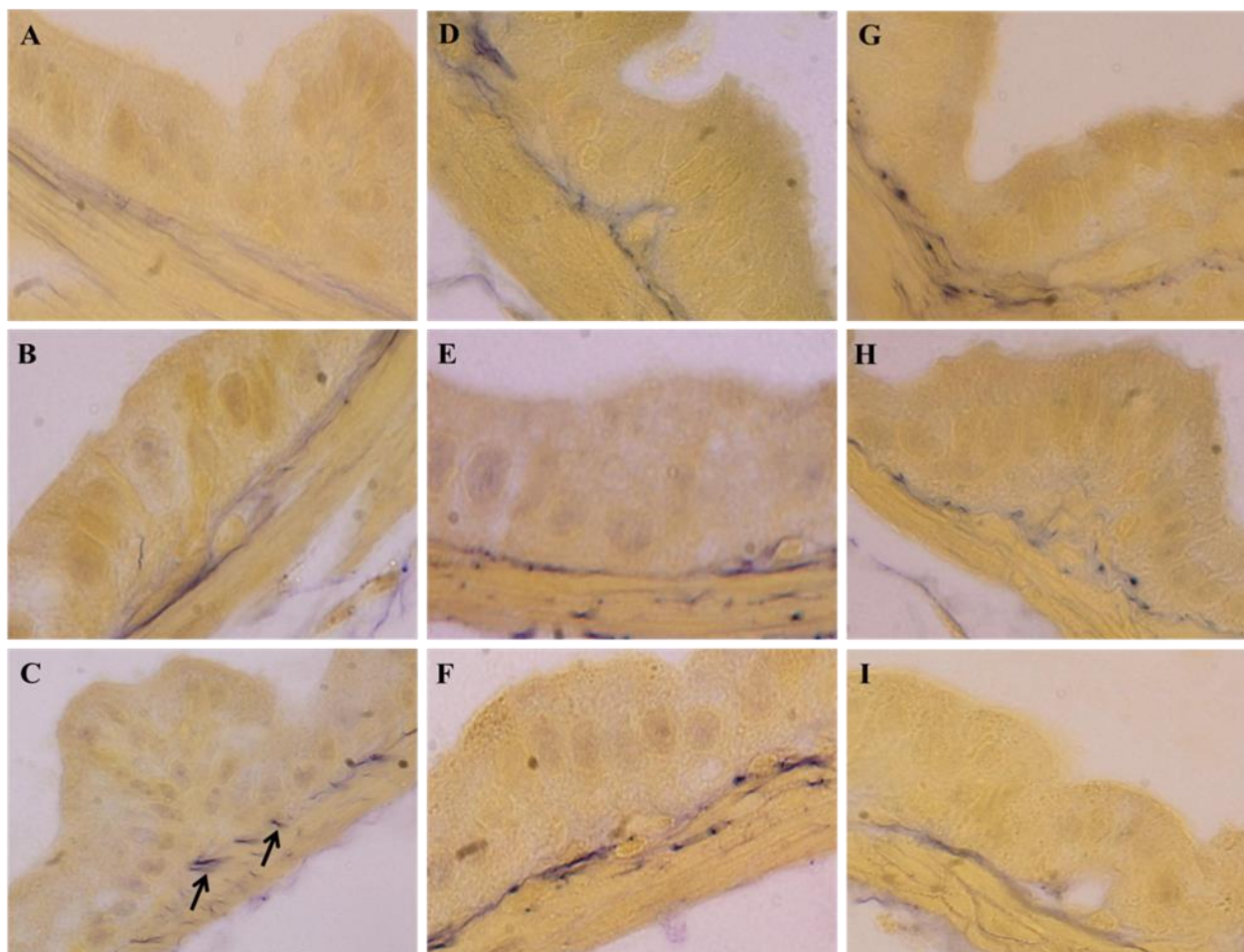
Lobo Ventral

FIGURA 9

Lobo Dorsolateral

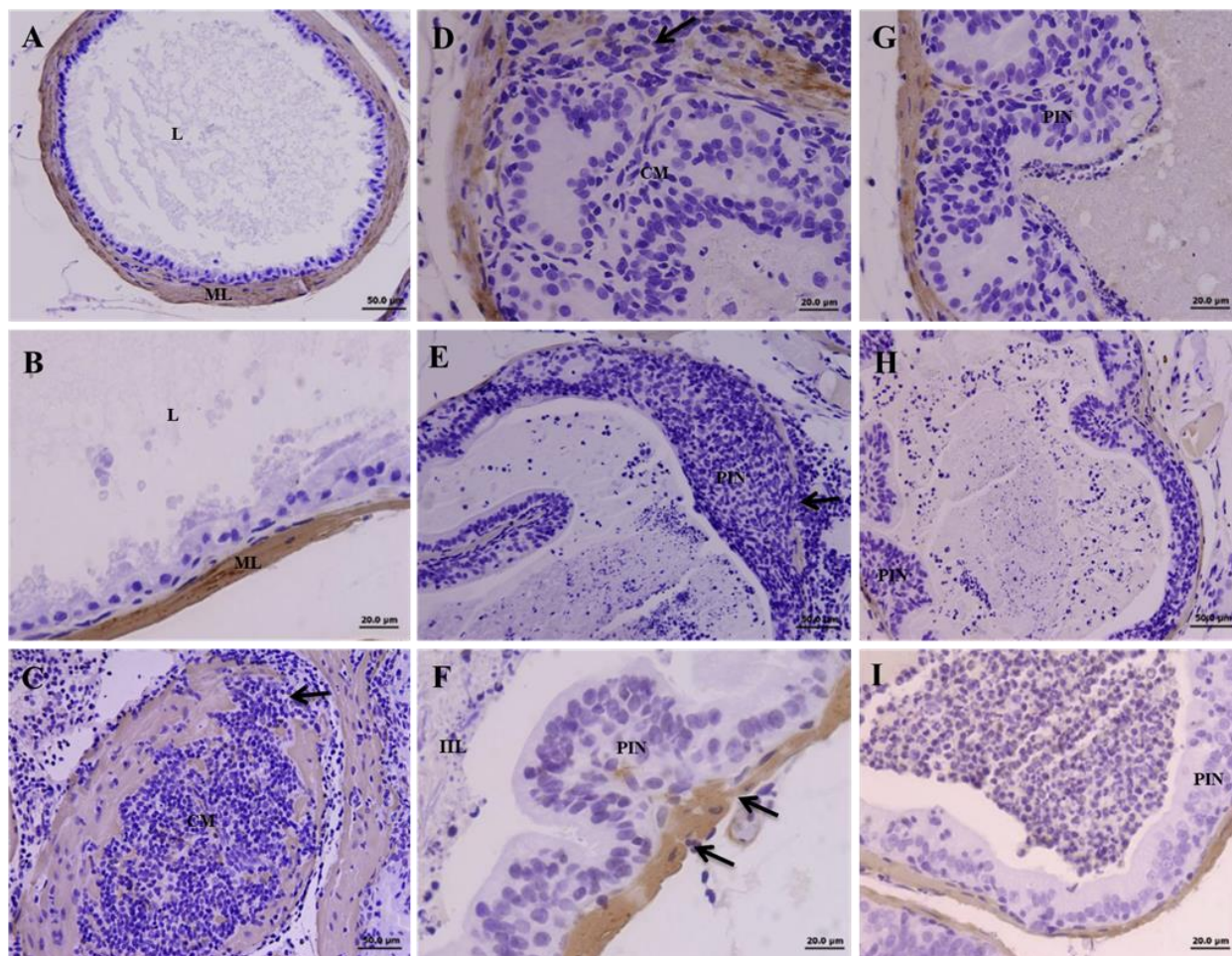


FIGURA 10

Lobo Ventral

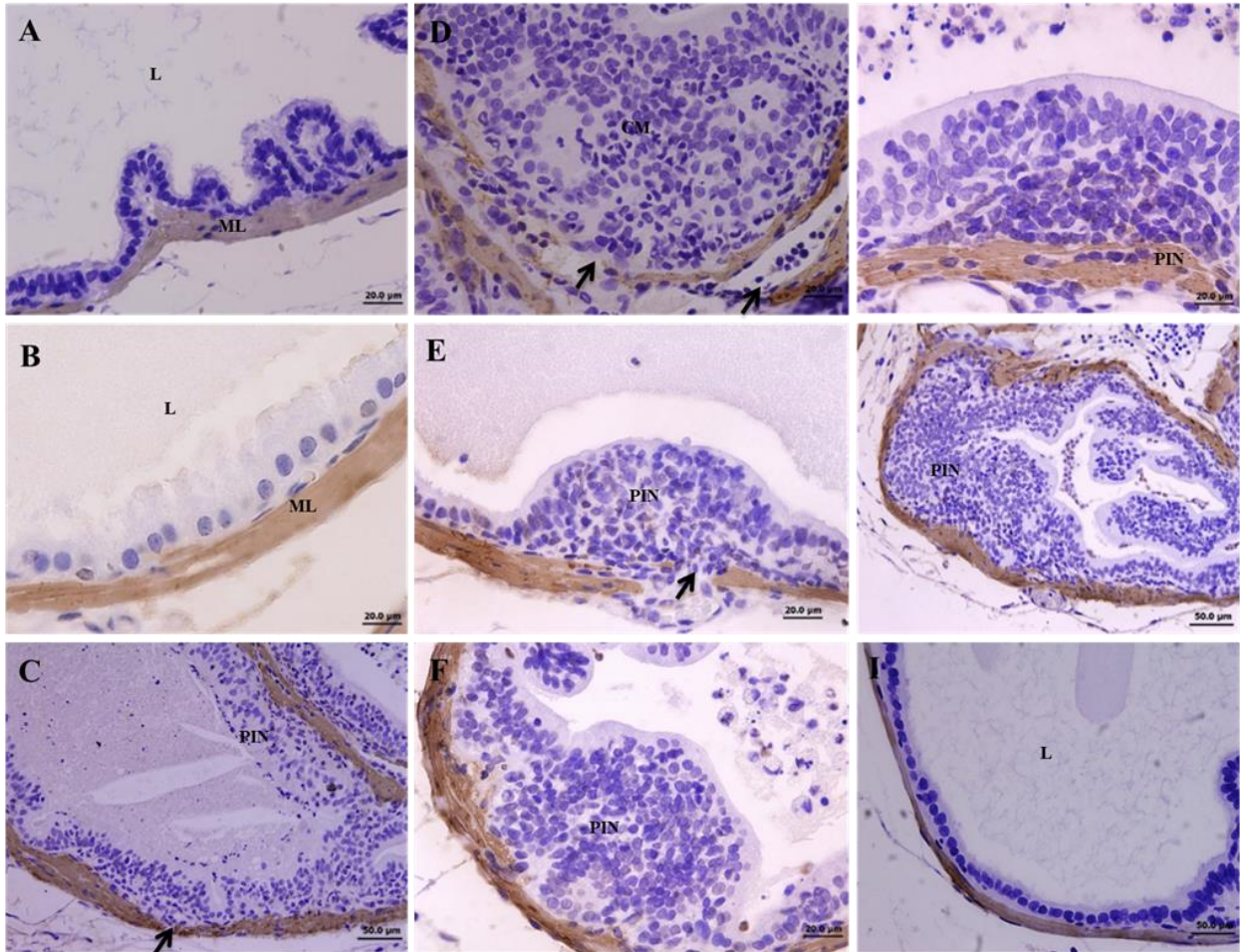


FIGURA 11

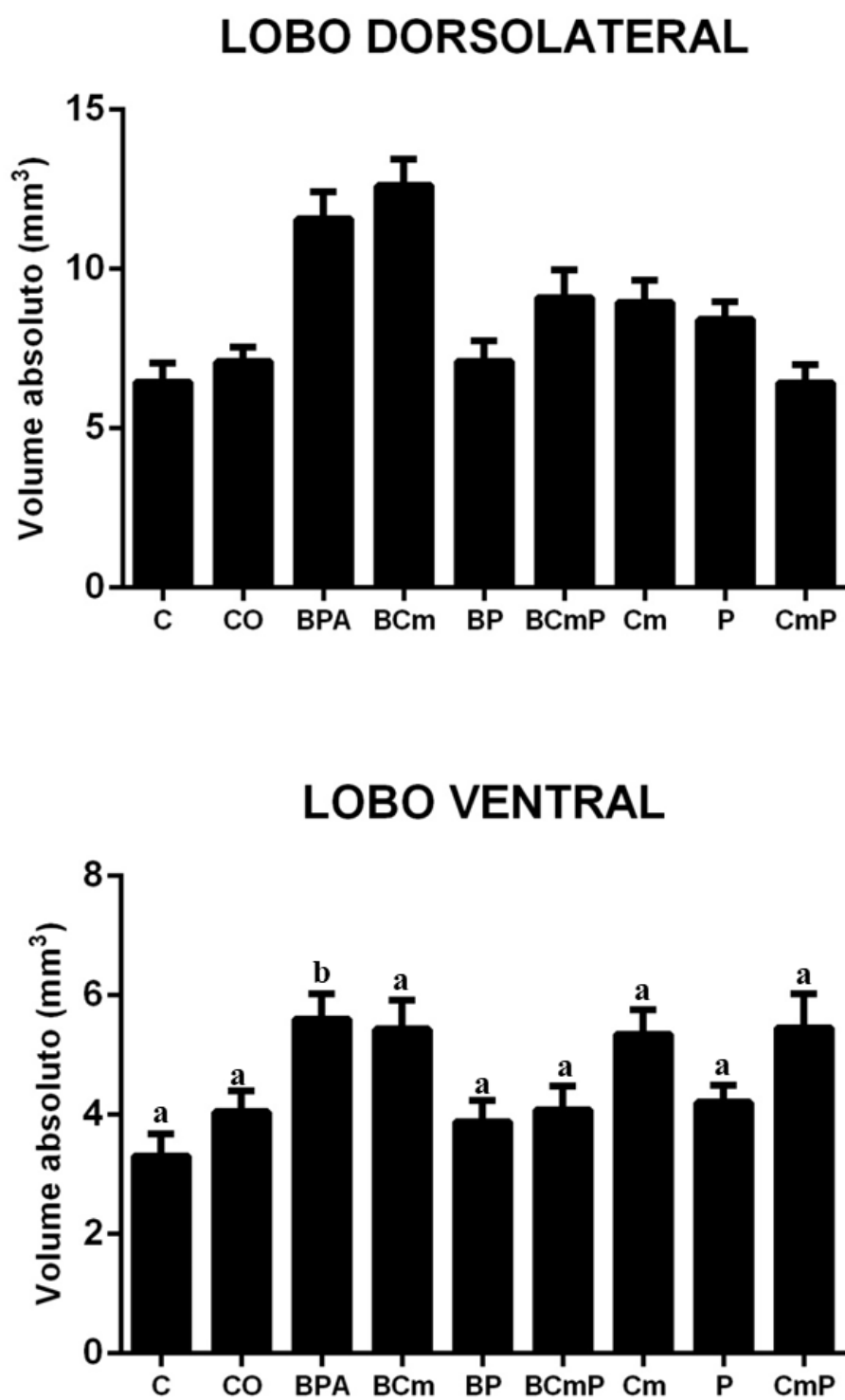


FIGURA 12

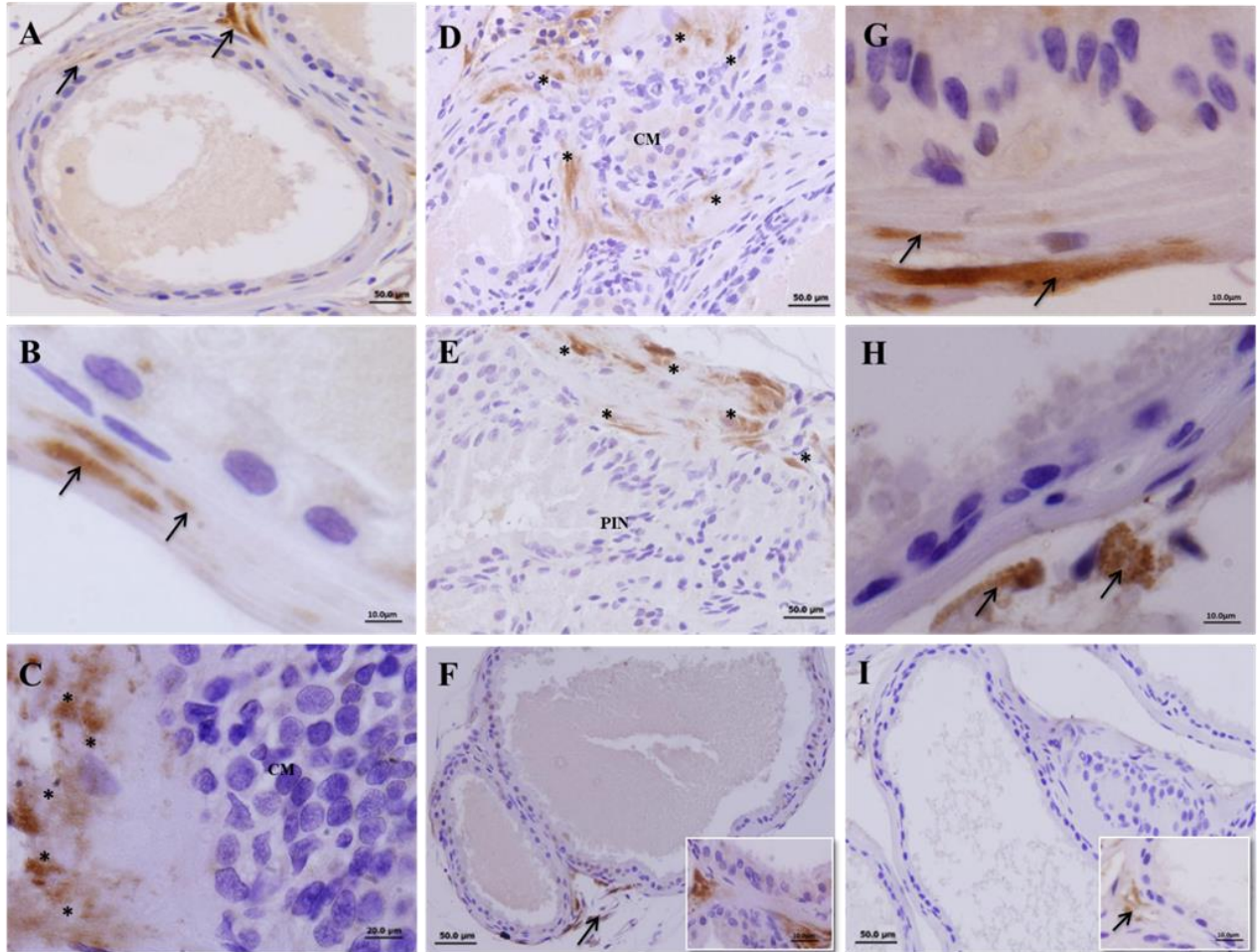
Lobo Dorsolateral

FIGURA 13

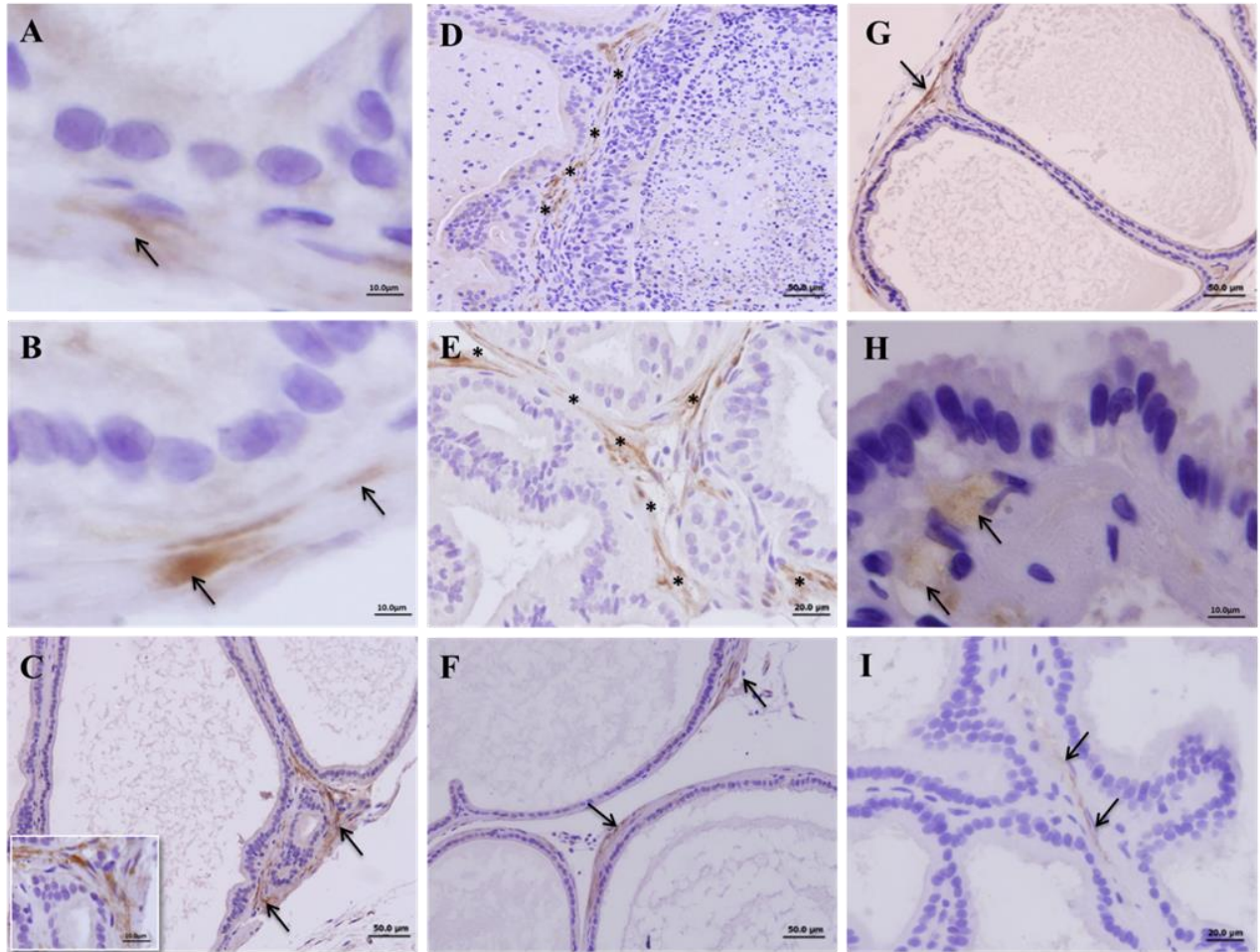
Lobo Ventral

FIGURA 14

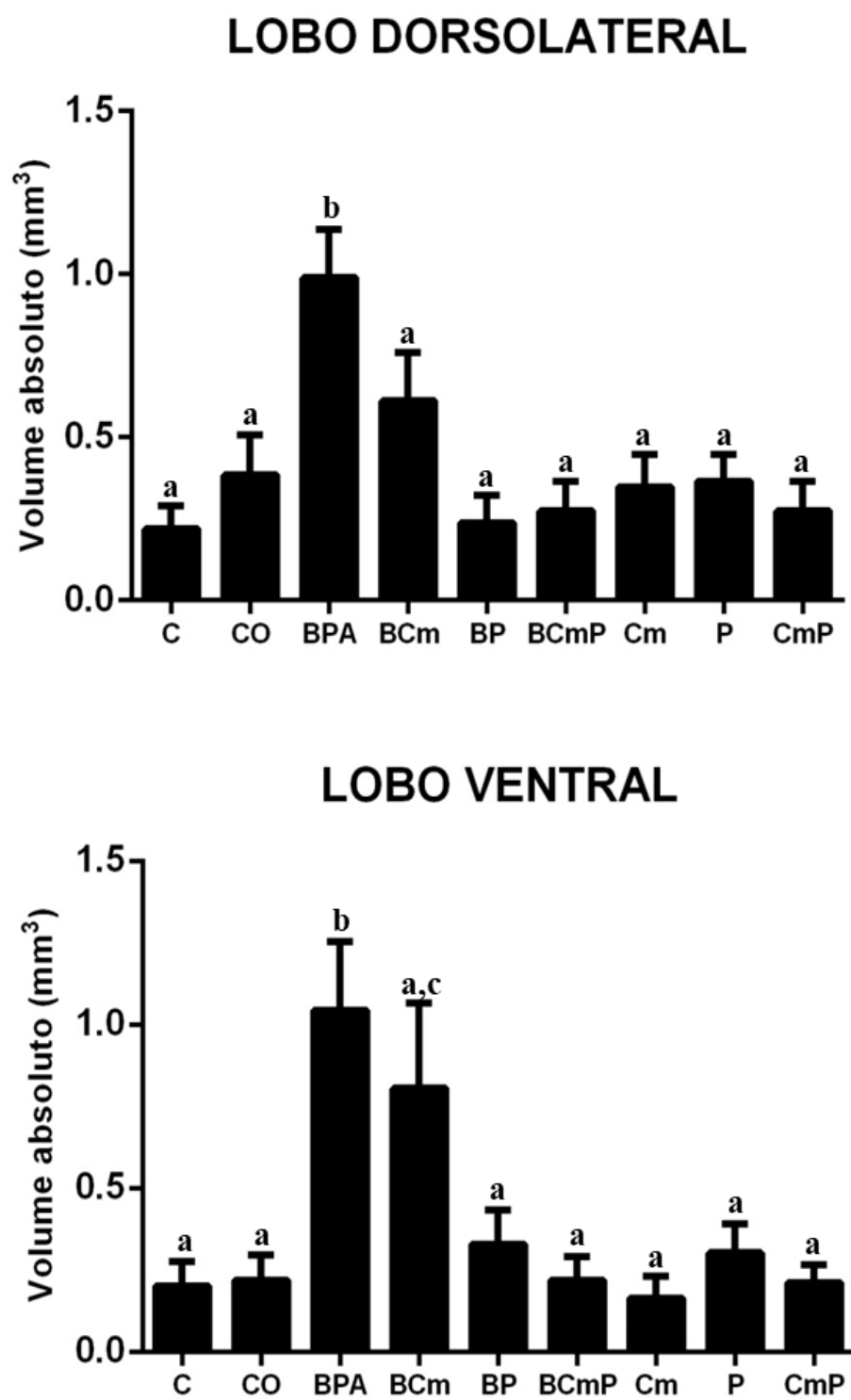


FIGURA 15

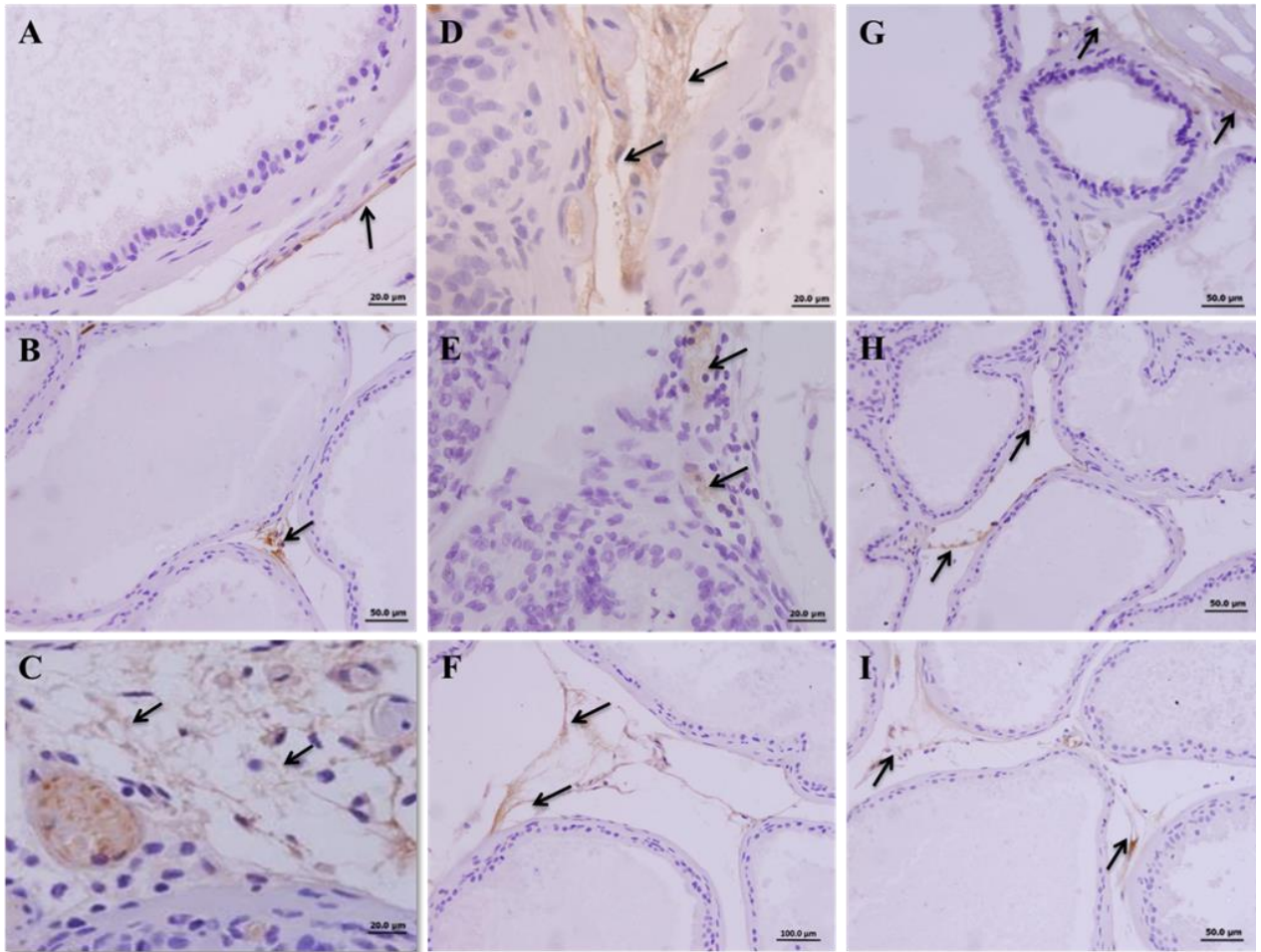
Lobo Dorsolateral – MMP-2

FIGURA 16

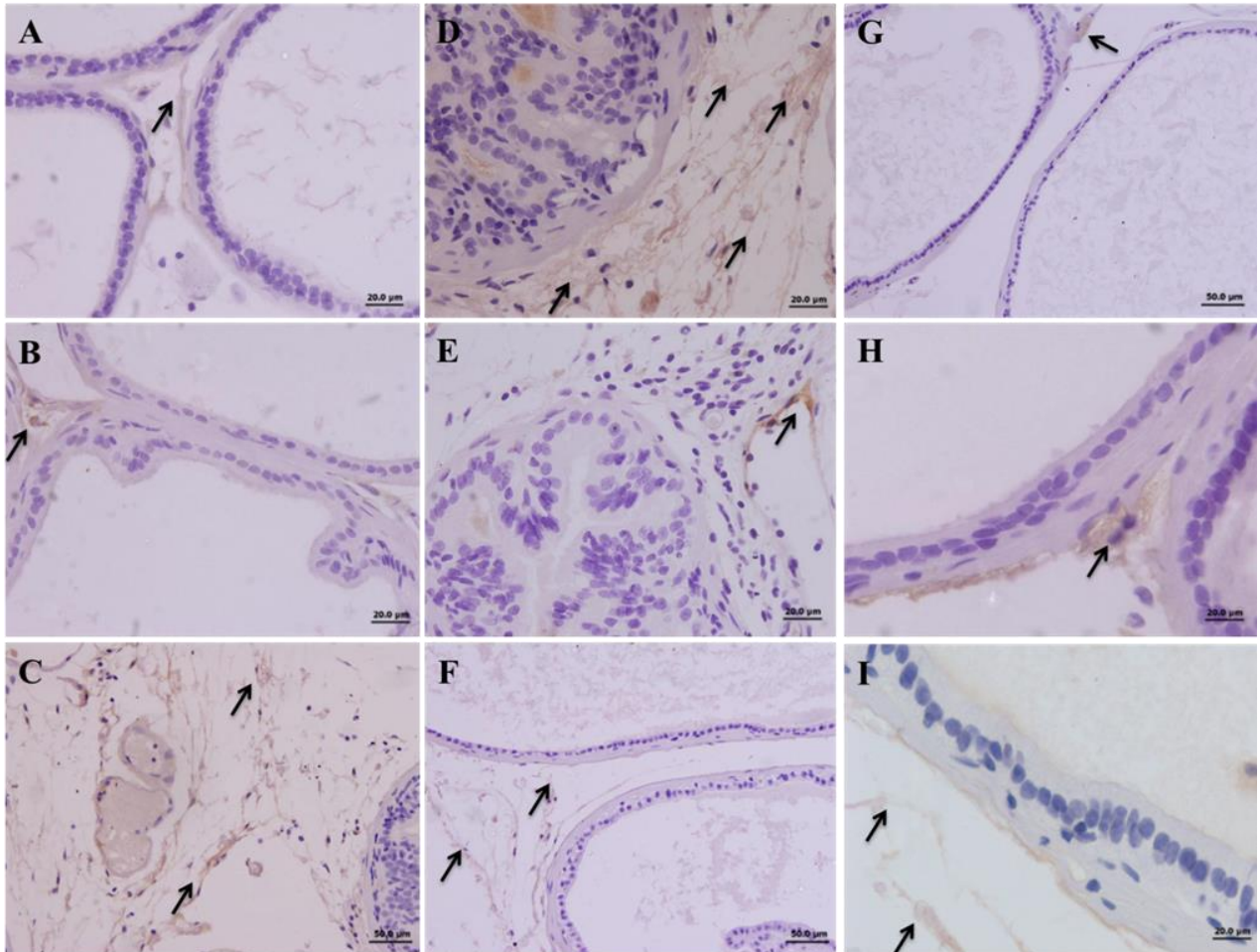
Lobo Ventral – MMP-2

FIGURA 17

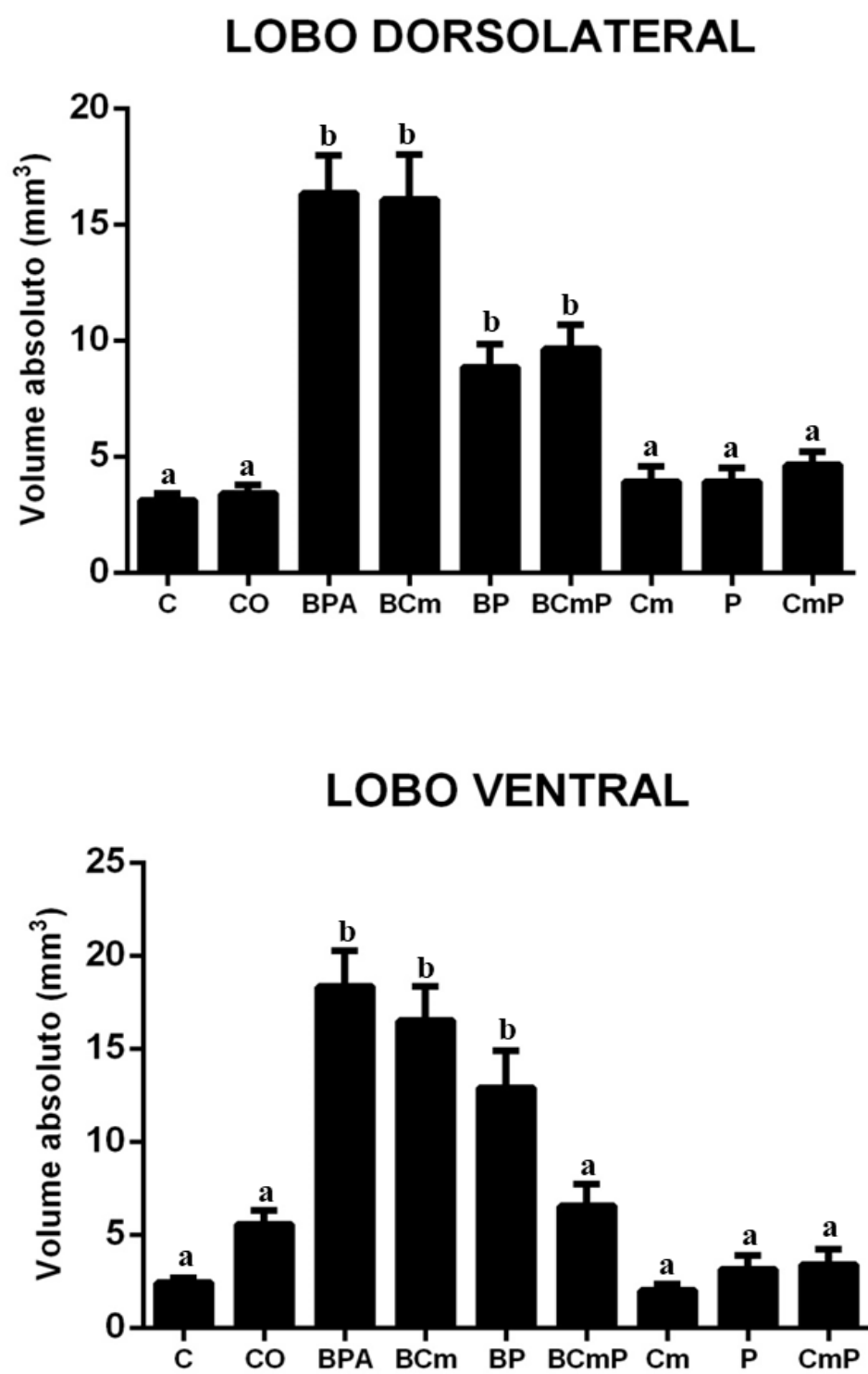


FIGURA 18

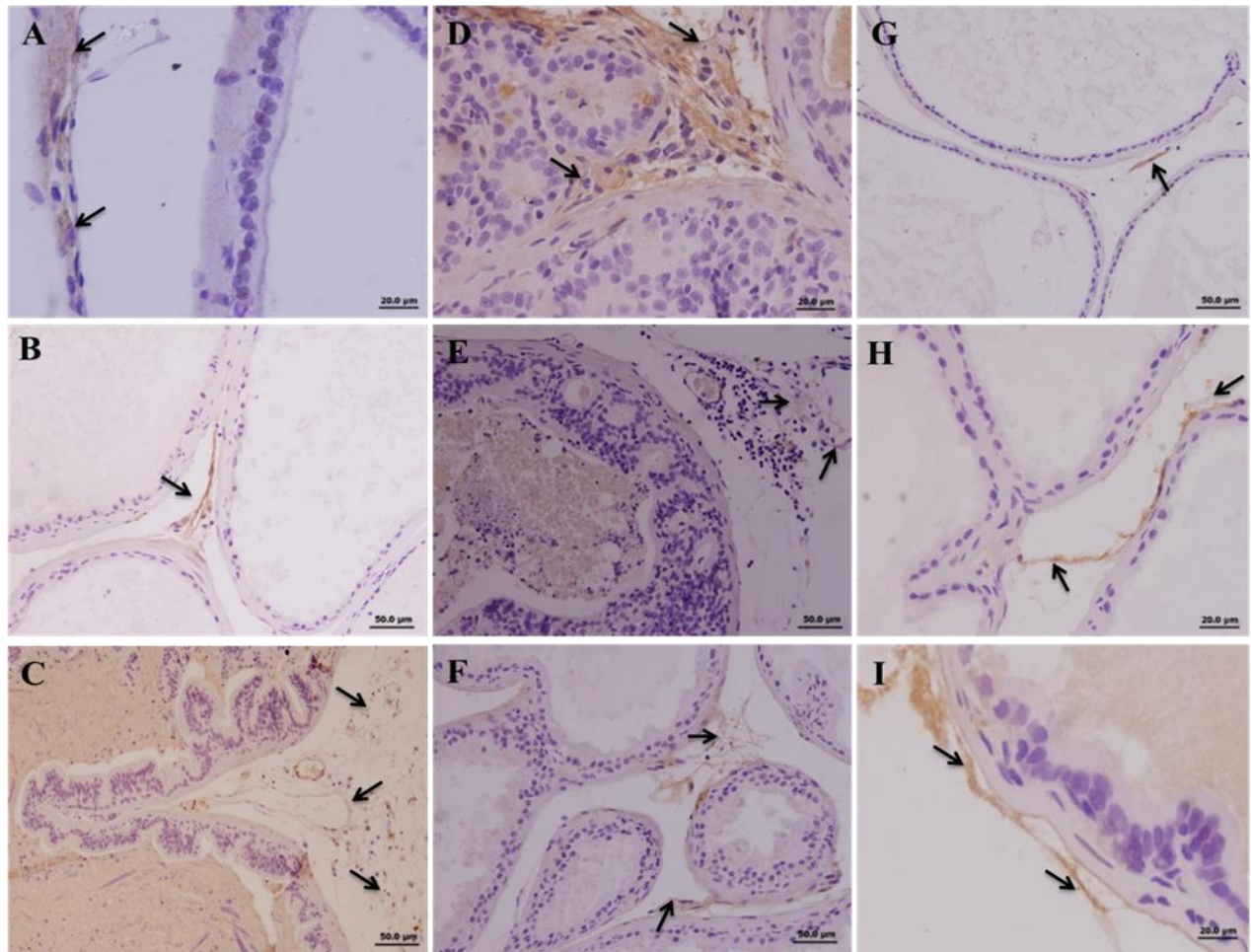
Lobo Dorsolateral – MMP-9

FIGURA 19

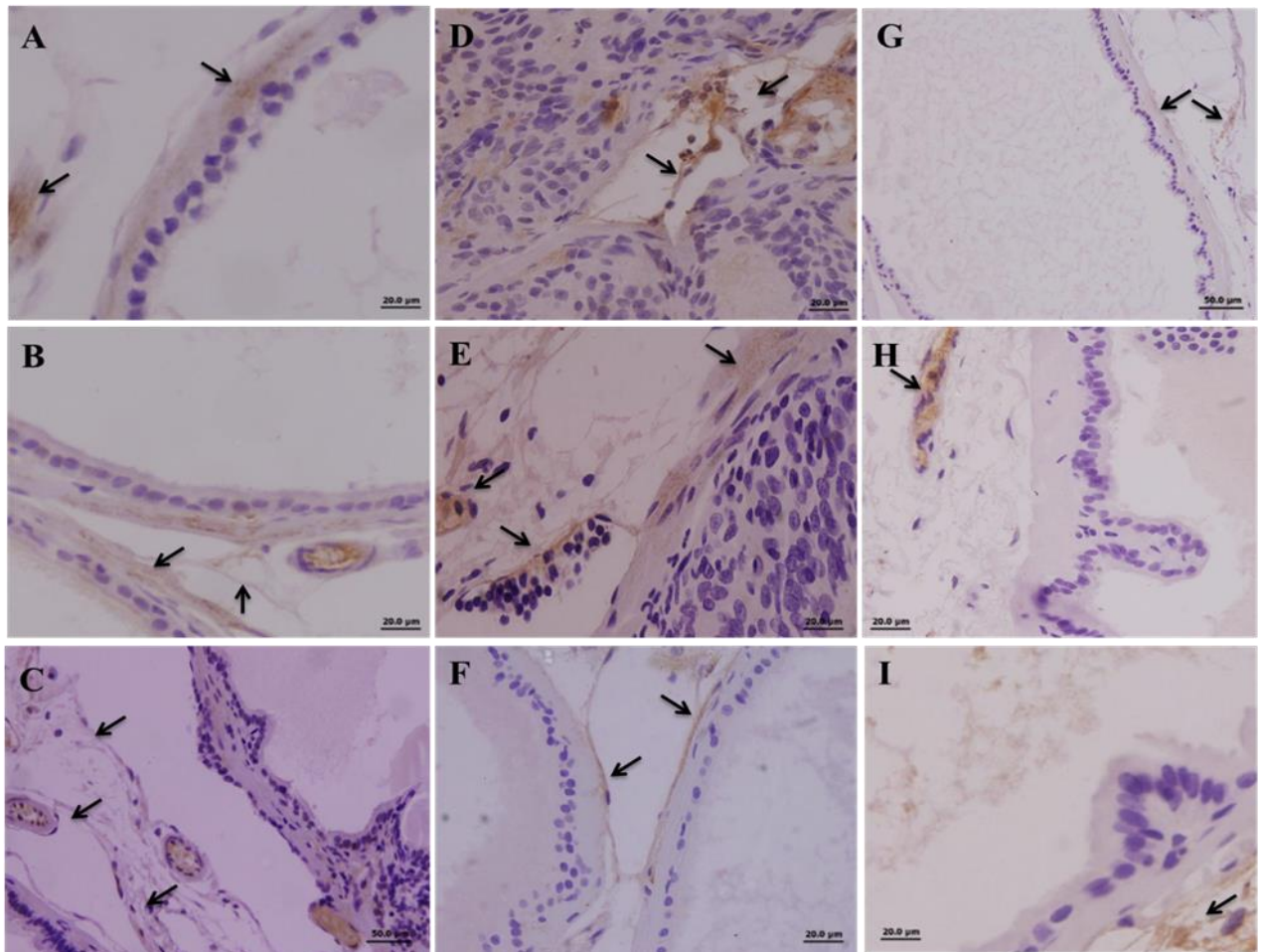
Lobo Ventral – MMP-9

FIGURA 20

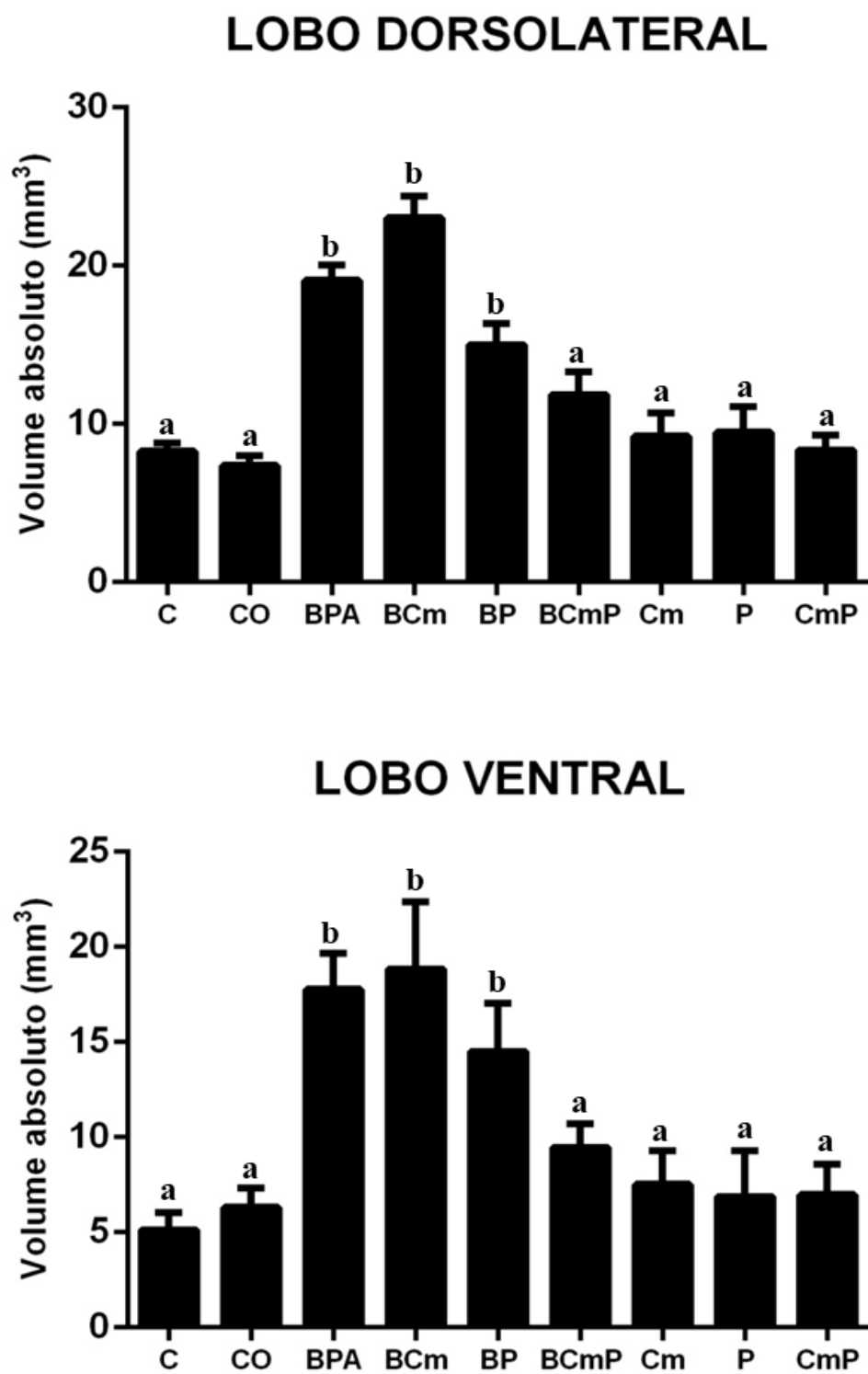


FIGURA 21

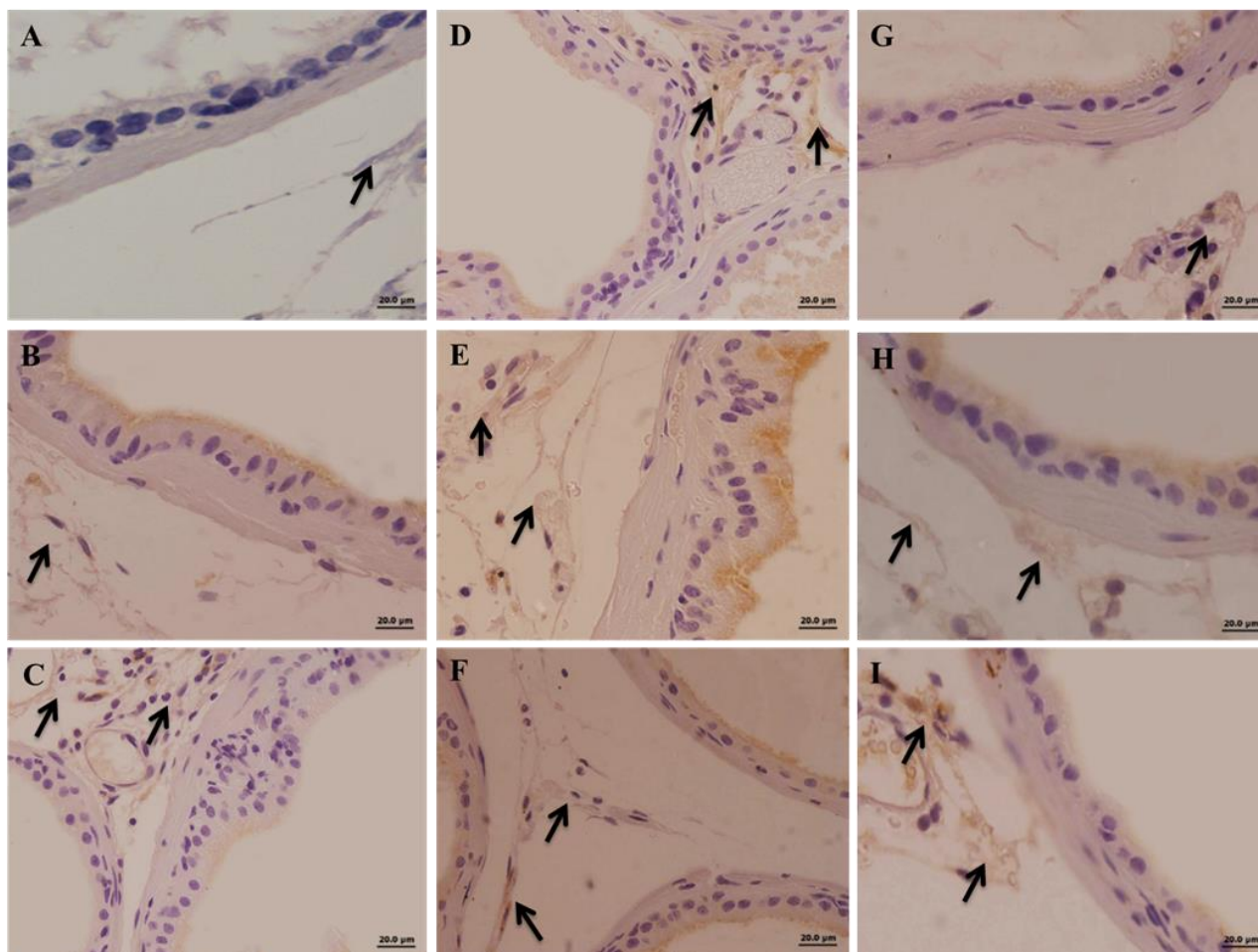
Lobo Dorsolateral – IL-6

FIGURA 22

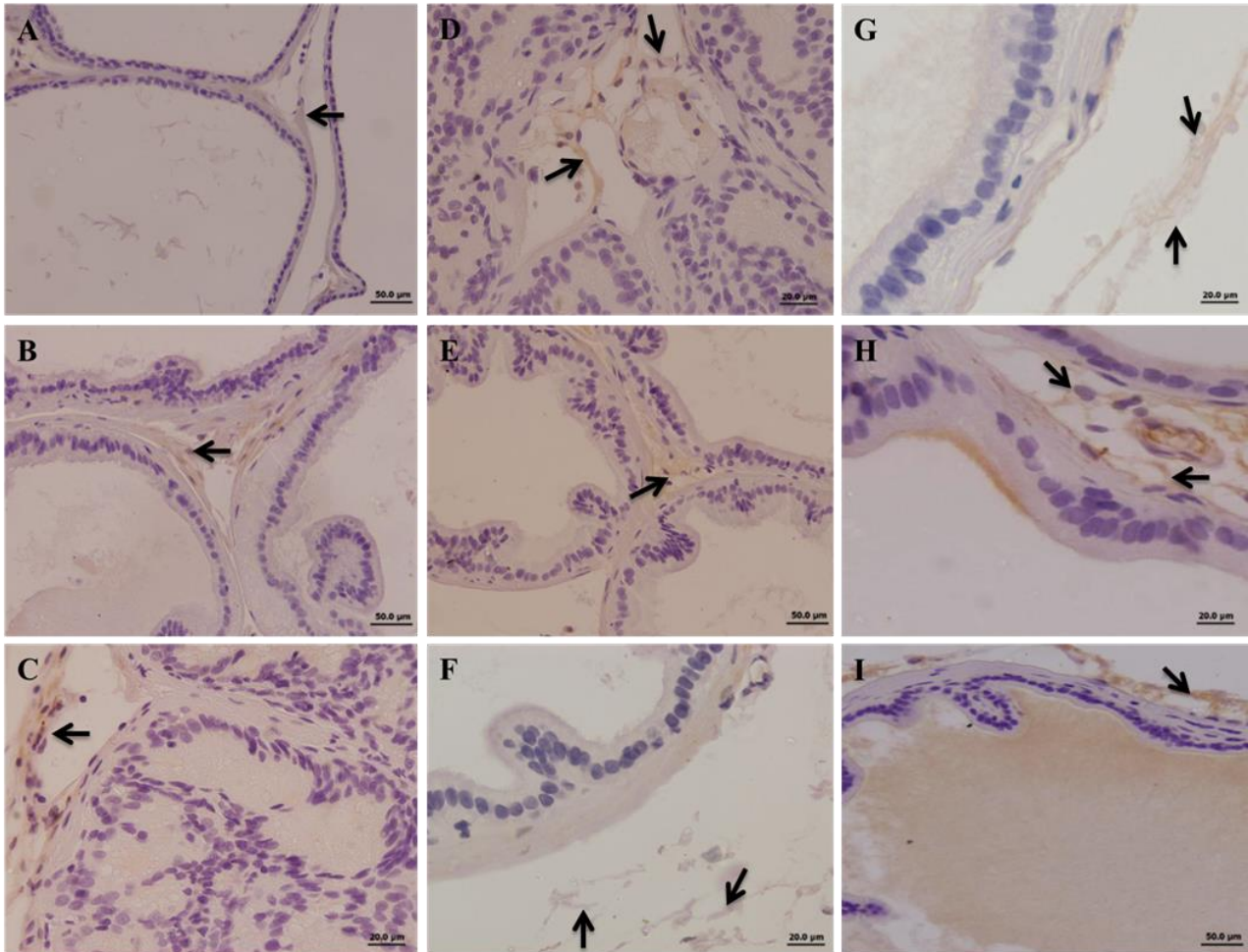
Lobo Ventral – IL-6

FIGURA 23

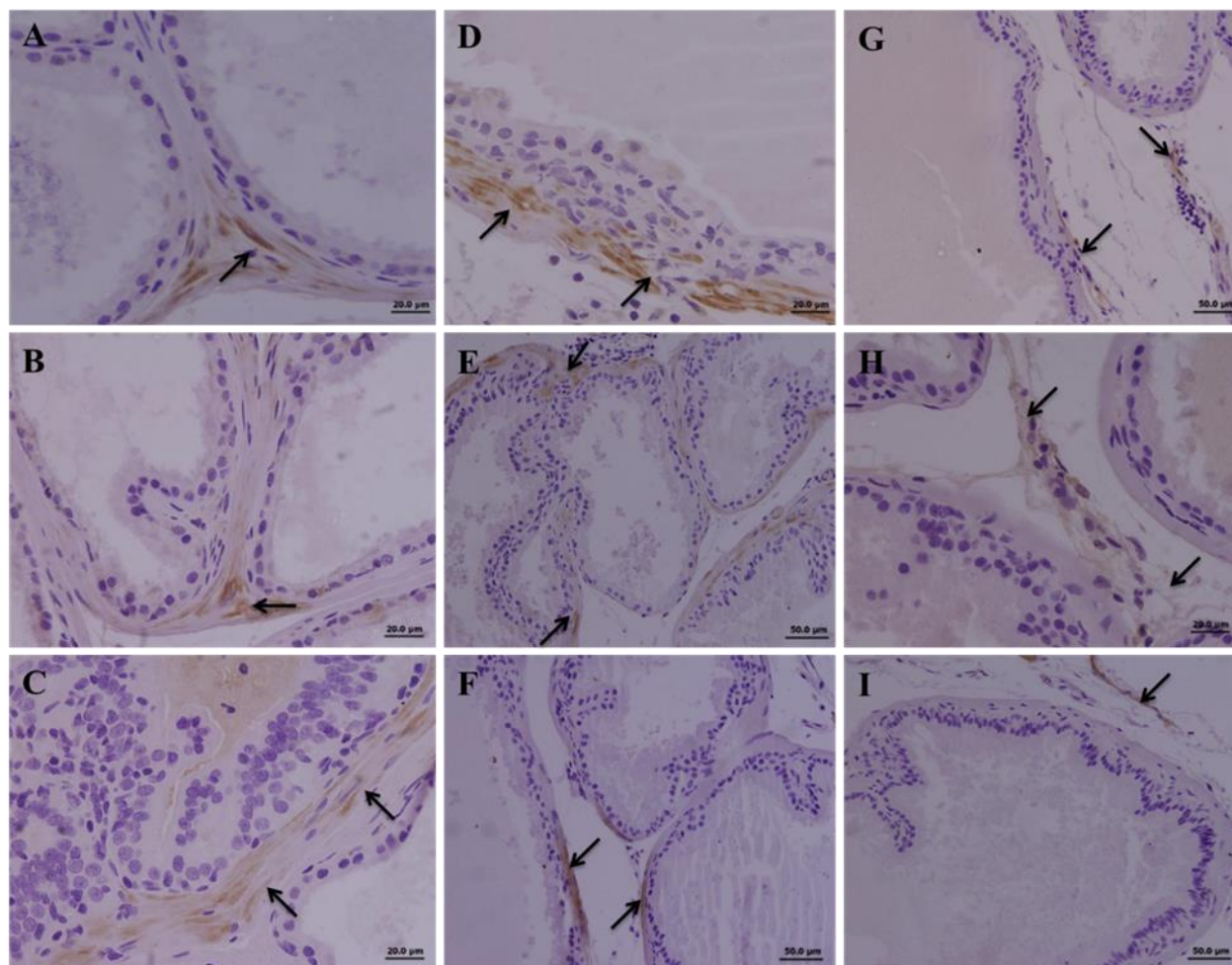
Lobo Dorsolateral – IL-10

FIGURA 24

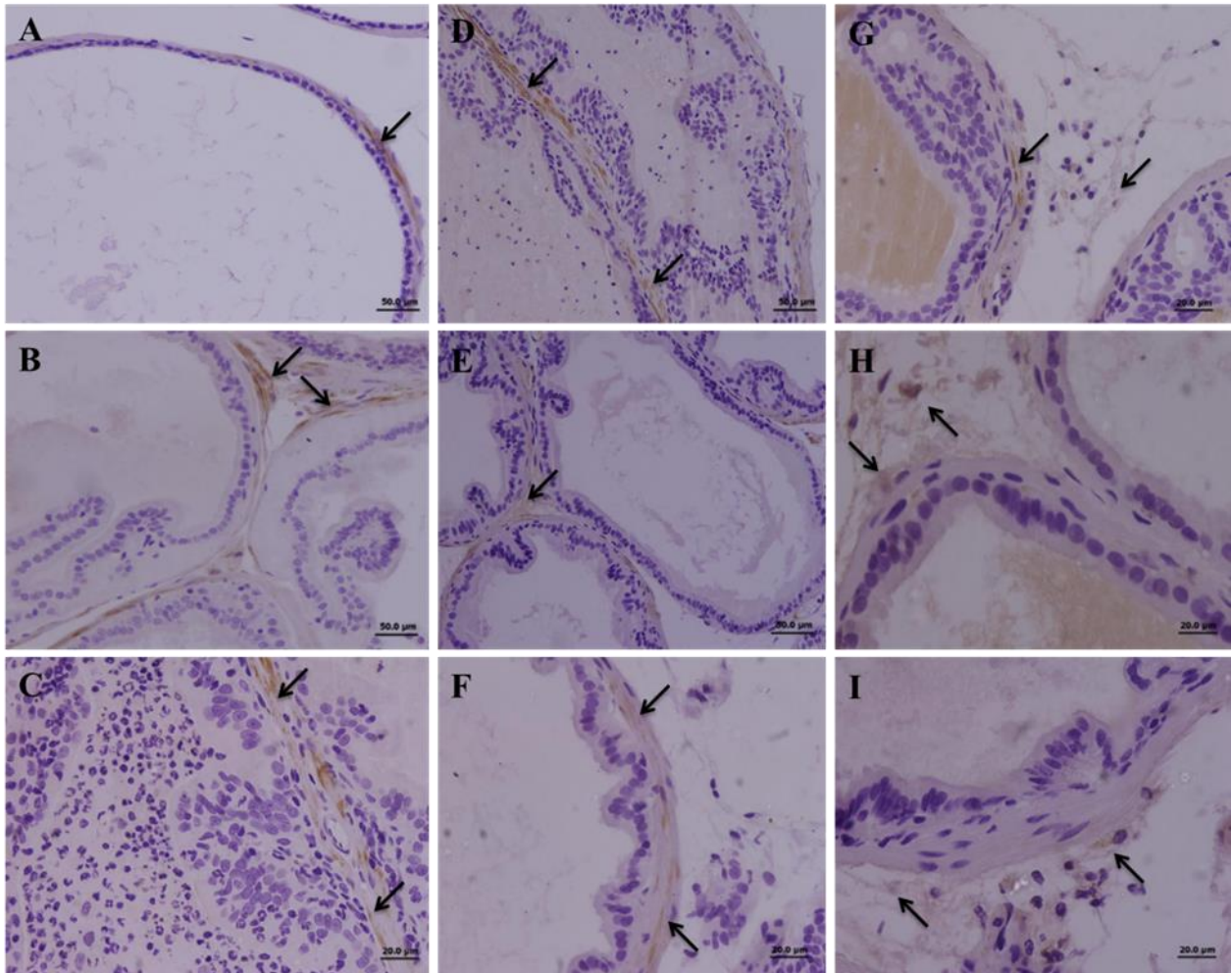
Lobo Ventral – IL-10

Tabela 1. Multiplicidade de lesões prostáticas em gerbilos adultos após 29 semanas de tratamento.

Grupos	Lesões Pré Malignas LDL			Lesões Pré Malignas LV			Lesões Malignas LDL			Lesões Malignas LV		
C	0,3407 ^a	±	0,0670	0,3333 ^a	±	0,0821	0	±	0	0	±	0
CO	0,3000 ^a	±	0,0813	0,3111 ^a	±	0,0664	0	±	0	0	±	0
BPA	1,0330 ^b	±	0,1198	1,6330 ^b	±	0,2378	0,06667	±	0,02644	0,04444	±	0,02184
BCm	0,9111 ^{b,c}	±	0,1593	0,5889 ^a	±	0,1367	0,02222	±	0,01562	0,03333	±	0,01903
BP	0,5444 ^{a,c}	±	0,0989	0,6111 ^{a,c}	±	0,1281	0,03333	±	0,01903	0	±	0
BCmP	0,4333 ^{a,c}	±	0,1084	0,1889 ^a	±	0,0545	0	±	0	0	±	0
Cm	0,3889 ^{a,c}	±	0,1008	0,1889 ^a	±	0,0649	0	±	0	0	±	0
P	0,4556 ^{a,c}	±	0,1152	0,1556 ^a	±	0,0444	0	±	0	0	±	0
CmP	0,2111 ^a	±	0,058	0,0889 ^{a,d}	±	0,034	0	±	0	0	±	0

Os valores representam média ± EP (n, 7 por grupo). Diferentes superíndices indicam diferenças significativas entre os grupos.

Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A ingestão prolongada a baixas doses de bisfenol A alterou morfofisiologicamente a glândula prostática de gerbilos adultos.
- Foi constatado um aumento na incidência e na multiplicidade de lesões prostáticas no grupo BPA. Este dado enfatiza que, a dose de 50 µg/kg/dia não é segura para a homeostase prostática.
- A curcumina isoladamente apresentou efeitos benéficos para a glândula prostática. Contudo, os potenciais benefícios da curcumina foram limitados possivelmente pela sua baixa absorção e metabolismo rápido.
- A adição do fitoquímico piperina trouxe efeitos mais significativos para a glândula prostática, como a redução das lesões pré-malignas e a ausência das lesões malignas em ambos os lobos
- O microambiente estromal prostático, em especial as células musculares lisas, as fibras de colágeno e as fibras do sistema elástico, a expressão de MMPs, ILs e VEGF, sofreram modificações após o tratamento prolongado com doses ambientais de bisfenol A.
- A administração de curcumina isoladamente não foi capaz de amenizar as alterações estromais impostas pelo bisfenol A. Por outro lado, a associação da curcumina com a piperina, trouxe resultados mais benéficos para a glândula prostática que apresentou os elementos estromais estudados semelhantes ao grupo controle.
- A administração dos fitoquímicos isoladamente ou associados não promoveu alterações nos parâmetros estudados.
- Entender os fatores capazes de modular o microambiente estromal torna possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na prevenção ou na redução da evolução dos distúrbios prostáticos.

REFERÊNCIAS

- AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2014.
- ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, v. 7, p. 346–353, 2011.
- AMIN, M. M. et al. Association of exposure to Bisphenol A with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 29, n. 1, p. 94-106, 2019.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**. 2007; v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- ANTONIASSI, J. Q. et al. Corticosterone influences gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostatic morphophysiology and alters its proliferation and apoptosis rates. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 3, p. 134-146, 2017.
- AOKI-KOMORI, S. et al. Lectin histochemical studies on the scent gland in the Syrian hamster and Mongolian gerbil. **Jikken Dobutsu Journal**, v. 43, p. 181-90, 1994.
- ARKIN, A. et al. Age-related changes on marking, marking-like behavior and the scent gland in adult Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Experimental Animals**, v. 52, n. 1, p. 17-24, 2003.
- BANERJEE, P. P. et al. Age dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1163-1170, 1998.
- BARDIA, A. et al. Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 419-26, 2009.
- BARRY, M. J.; SIMMONS, L. H. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 4, p. 787-806, 2017.
- BECKETT, A. C. et al. Helicobacter pylori genetic diversification in the Mongolian gerbil model. **PeerJ**, 6:e4803. doi: 10.7717/peerj.4803, 2018.
- BIANCARDI, M. F. et al. Prenatal testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil prostate. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 237, n. 11, p. 1298-309, 2012.
- BIANCARDI, M. F. et al. Prenatal and pubertal testosterone exposure imprint permanent modifications in the prostate that predispose to the development of lesions in old Mongolian gerbils. **Asian Journal of Andrology**, v. 19, n. 2, p. 160-167, 2017.
- BIGSBY, R. et al. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 613-618, 1999.
- BLEICH, E. M. et al. Hygienic monitoring of Mongolian gerbils: which mouse viruses should be included? **Laboratory Animals**, v. 46, n. 2, p. 173-175, 2012.

BODIN, J. et al. Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-prone NOD mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, p. 349–358, 2013.

BODIN, J. et al. Transmaternal bisphenol A exposure accelerates diabetes type 1 development in NOD mice. **Toxicological Sciences**, v. 137, p. 311–323, 2014.

BONKHOFF, H.; FIXEMER, T.; REMBERGER, K. Relation between Bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. **The Prostate**, v. 34, p. 251–258, 1998.

BOSLAND, M. C. et al. A Perspective on Prostate Carcinogenesis and Chemoprevention. **Current Pharmacology Reports**, v. 1, n. 4, p. 258–265, 2015.

BRODY, J. G.; RUDEL, R. A. Environmental pollutants and breast cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1007–19, 2003.

CALAFAT, A. M. et al. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 1, p. 39–44, 2008.

CAO, X. et al. Earlier Helicobacter pylori infection increases the risk for the N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 93, n. 12, p. 1293–1298, 2002.

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

CAMPOS, S. G. et al. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 5, p. 394–407, 2010.

CAMPOS, S. G. et al. Phenotypic and metabolic aspects of prostatic epithelial cells in aged gerbils after antisteroidal therapy: turnover in the state of chromatin condensation and androgen-independent cell replacement. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 204–13, 2014.

CAMPOS, M. S. et al. Anabolic effects of chrysin on the ventral male prostate and female prostate of adult gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 9, p. 1180–1191, 2018.

CAMPOS, M. S. et al. Prepubertal exposure to bisphenol-A induces ER α upregulation and hyperplasia in adult gerbil female prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 3, p. 188–95, 2015.

CASTRO, B. et al. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55905, 2013.

CASTRO, B. et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the intraprostatic levels of aromatase and 5 α -reductase isozymes in juvenile rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 20–25, 2018.

CARIATI, F. et al. "Bisphenol a: an emerging threat to male fertility". *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 17, n. 1, p. 6, 2019.

CHRISTANTE, C. M. et al. Effects of gestational exposure to di-n-butyl phthalate and mineral oil on testis development of the Mongolian gerbil. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 12, p. 1604-1615, 2018.

COONEY, K. A. Inherited Predisposition to Prostate Cancer: From Gene Discovery to Clinical Impact. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 128, p. 14-23, 2017.

CORRADI, L. S.; GOES, R. M.; TABOGA, S. R. Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. **Differentiation**, v. 72, p. 198-208, 2004.

CORRADI, L.S. et al. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the cellular and extracellular compartments in gerbil ventral prostate at different postnatal ages. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 1, p. 79-94, 2009.

COSTA, J. R. et al. Endocrine-disrupting effects of methylparaben on the adult gerbil prostate. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 1801-1812, 2017.

CORRALES, J. et al. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. **Dose Response**, v. 13, n. 3, doi: 10.1177/1559325815598308, 2015.

CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; SUGIMURA, Y. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 64, p. 608-614, 1986.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, p. 417-34, 2004a.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostate development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221-236, 2004b.

CUSTODIO, A. M. et al. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. **The Anatomical Record (Hoboken)**, v. 291, p. 463-74, 2008.

D'ANGELO, S.; SCAFURO, M.; MECCARIELLO, R. BPA and nutraceuticals, simultaneous effects on endocrine functions. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, doi: 10.2174/1871530319666190101120119, 2019.

DE ALENCAR, J. M. "O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." Disponível em: <<https://www.jrmcoaching.com.br/blog/15-frases-de-lideranca-e-motivacao/>>. Acesso em 05/2019.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-69, 2007.

DOBBS, R. W. et al. Estrogens and prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 22, n. 2, p. 185-194, 2018.

DOUCETTE, C. D. et al. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 231–239, 2013.

DUVOIX A. et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, n. 2, p. 181-90, 2005.

FACINA, C. H. et al. Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. **The Prostate**, v. 78, n. 2, p. 152-163, 2018.

FALLEIROS-JÚNIOR, L. R. et al. Neonatal exposure to ethinylestradiol increases ventral prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 5, p. 380-388, 2016.

FENTEM, J. H.; HAMMOND, A.H.; FRY, J. R. Maintenance of monooxygenase activities and detection of cytochrome P-450-mediated cytotoxicity in Mongolian gerbil hepatocyte cultures. **Xenobiotica**, v. 21, n. 10, p. 1363-70, 1991.

FERNANDEZ, M. F. et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 259-64, 2007.

FUJII, Y. et al. Effect of hypoxia on proliferation of microvascular endothelial cells derived from Mongolian gerbil brain. **Neurologia Medico- Chirurgica (Tokyo)**, v. 34, n. 12, p. 799-802, 1994.

GAO, H. et al. Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 1, p. e211, 2015.

GIUFFRIDA, R. et al. Ischemia-induced changes in the immunoreactivity for endothelin and other vasoactive peptides in the brain of the Mongolian gerbil. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 20, n.12, p. S41-4, 1992.

GÓES, R. M. et al. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. **Micron**, v. 38, p.231–236, 2007.

GOMES, L. S. et al. Aluminum disrupts the prenatal development of the male and female gerbil prostate (*Meriones unguiculatus*). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 107, p. 32-42, 2019.

GONÇALVES, BF. et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n.1, p. 96-106, 2010.

GONÇALVES, B. F. et al. A new proposed rodent modelo f chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate câncer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **The Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202-13, 2013.

GONÇALVES, B. F. et al. Dual action of high estradiol doses on MNU-induced prostate neoplasms in a rodent model with high serum testosterone: Protective effect and emergence of unstable epithelial microenvironment. **The Prostate**, v. 77, n. 9, p. 970-983, 2017.

GOULD, J. C. et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 142, n. 1-2, p. 203-14, 1998.

GRAMEC SKLEDAR, D.; PETERLIN MAŠIČ, L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p. 182-199, 2016.

HASHIMOTO, O. et al. Characterization of cultured cells derived from Mongolian gerbil's (Meriones unguiculatus) ascitic malignant melanoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 2, p. 227-232, 1993.

HASHIMOTO, O. et al. Effect of extracellular matrix on two cell lines established from Mongolian Gerbil's (Meriones unguiculatus) malignant melanoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 4, p. 635-40, 1995.

HAYASHI, N. et al. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 308-321, 1991.

HERMAN, P. et al. Ion transport by primary cultures of Mongolian gerbil middle ear epithelium. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 3 Pt 2, p. 373-380, 1992.

HERMANN, M. et al. Aging of the male reproductive system. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 1267-1279, 2000.

HORII, Y.; ISHIKAWA, N.; NAWA, Y. Heparin-containing mast cells in the jejunal mucosa of normal and parasitized Mongolian gerbils, Meriones unguiculatus. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 98, n. 4, p. 415-419, 1992.

HUYNH, H. et al. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **Journal of Endocrinology**, v. 171, p. 109-118, 2001.

HWANG, YP. et al. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicology Letters**, v. 203, p. 9-19, 2011.

IBRAHIM, M. A. A.; ELBAKRY, R. H.; BAYOMY, N. A. Effect of bisphenol A on morphology, apoptosis and proliferation in the resting mammary gland of the adult albino rat. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, p. 27-36, 2016.

JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **The Prostate**, v. 3, n. 1, p. 81-97, 1982.

JIN, P. et al. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. **The Journal of Biomedical Research**, v. 27, n. 2, p. 135-144, 2013.

KANAI, M. Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9384-9391, 2014.

KAWAZOE, T. et al. Role of bacterial strain diversity of Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea in Mongolian gerbils. **Helicobacter**, v. 12, n. 3, p. 213-223, 2007.

KHAN, A. I.; HORII, Y.; NAWA, Y. Defective mucosal immunity and normal systemic immunity of Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, to reinfection with *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, v. 15, n. 10, p. 565-571, 1993.

KHAN, A. I. et al. Effects of adoptive transfer of immune spleen cells on worm growth and microfilaraemia in *Brugia pahangi* infection in Mongolian gerbils. **Journal of Helminthology**, v. 69, n. 4, p. 331-335, 1995.

KIM, J. H.; KIM, J. Index-Based Dietary Patterns and the Risk of Prostate Cancer. **Clinical Nutrition Research**, v. 6, n. 4, p. 229-246, 2017.

KINBARA, H.; CUNHA, G. R. Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. **The Prostate**, v. 28, p. 58-64, 1996.

KUIPER, G. G. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-63, 1998.

KUROKAWA, M. et al. Reappraisal of the expression of mast cell proteases of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **APMIS**, v. 106, n. 7, p. 727-735, 1998.

LAI, L.H. et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 523-30, 2012.

LI, J. et al. Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 3, p.180-188, 2016.

LEE, C. H.; OLUGBADE, A. O.; KISCHEBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, p. 565-575, 2011.

MAFFINI, M. V. et al. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 254-255, p. 179-86, 2006.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, p. 165-174, 2003.

MCNEAL, J. E. The prostate gland: morphology and pathobiology. **Monographs in Urology**, v. 4, p. 3-33, 1983.

MILOBEDZKA, J.; KOSTANECKI, S.; LAMPE, V. Zur Kenntnis des Curcumins. **Ber Deut Chem Ges**, v. 43, p. 2163-2170, 1910.

MINAKAWA, T. Long-term culture of microvascular endothelial cells derived from Mongolian gerbil brain. **Stroke**, v. 20, n. 7, p. 947-951, 1989.

MORIYAMA, K. et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5185-5190, 2002.

MURRAY, T. J. et al. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 383-390, 2007.

NASCIMENTO-GONÇALVES, E. et al. Modelling human prostate cancer: Rat models. **Life Sciences**, v. 203, n. 210-224, 2018.

NAWA, Y. et al. Histochemical and cytological characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 104, p. 249-254, 1994.

NOLAN, C. C.; BROWN, A. W.; CAVANAGH, J. B. Regional variations in nerve cell responses to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbils and rats; further evidence for involvement of the Golgi apparatus. **Acta Neuropathology**, v. 81, p. 204-212, 1990.

OKADA, M. et al. Development of basophils in Mongolian gerbils: formation of basophilic cell clusters in the bone marrow after Nippostrongylus brasiliensis infection. **Laboratory Investigation**, v. 76, n. 1, p. 89-97, 1997.

OLIVEIRA, S. M. et al. Microscopic evaluation of proliferative disorders in the gerbil female prostate: evidence of aging and the influence of multiple pregnancies. **Micron**, v. 42, n.7, p. 712-717, 2011.

PASCUAL-GELER, M. The influence of nutritional factors on prostate cancer incidence and aggressiveness. **Aging Male**, v. 21, n. 1, p. 31-39, 2018.

PATERNI, I.; GRANCHI, C.; MINUTOLO, F. Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3384–3404, 2016.

PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Prostate Cancer, Nutrition, and Dietary Supplements (PDQ®): Patient Version. 2019 Jan 18. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83984/>>.

PEGORIN DE CAMPOS, S. G. et al. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, p. 723-33, 2006.

PEREZ, A. P. et al. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 8, p. 1084-1092, 2012.

PEREZ, A. P. et al. Prenatal exposure to ethinylestradiol alters the morphologic patterns and increases the predisposition for prostatic lesions in male and female gerbils during ageing. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 1, p. 5-17, 2016.

PEREZ, A. P. et al. Pubertal exposure to ethinylestradiol promotes different effects on the morphology of the prostate of the male and female gerbil during aging. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 477-489, 2017.

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

PINTO, EG. et al. Combined oral contraceptives promote androgen receptor and oestrogen receptor alpha upregulation in the female prostate (Skene's paraurethral glands) of adult

gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 10, p. 1286-1297, 2018.

PIYACHATURAWAT, P.; GLINSUKON, T.; TOSKULKAO, C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. **Toxicology Letters**, v. 16, p. 351–359, 1983.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. National Cancer Institute Monographs, v. 12, p. 1-27, 1963.

PRINS, G. S. et al. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 374-382, 2007.

PRINS, G. S. et al. Perinatal exposure to estradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 134-138, 2008.

PRINS, G. S. et al. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2011.

PRINS, G. S. et al. CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose Bisphenol A effects on multiple organ systems. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, doi: 10.1111/bcpt.13125, 2018.

PRINS, G. S.; KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids**, v. 73, p. 233-244, 2008.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, p. 641-659, 2008.

PURSHOUSE, K.; PROTHEROE, A. S. Abiraterone acetate in combination with prednisone in the treatment of metastatic hormone-sensitive prostate cancer: clinical evidence and experience. **Therapeutic Advances in Urology**, doi: 10.1177/1756287218820804, 2019.

QUINTAR, A. A. et al. The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a model for inflammation-promoted prostate carcinogenesis. *Cell Biology International*, v. 41, n. 11, p. 1234-1238, 2017.

RIBEIRO, N. C. S. et al. Prepubertal chrysin exposure upregulates either AR in male ventral prostate or AR and ER α in Skene's paraurethral gland of pubertal and adult gerbils. **Fitoterapia**, v. 124, p. 137-144, 2018.

ROCHEL, S. S. et al. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **The Anatomical Record (Hoboken)**, v. 290, p. 1233-1247, 2007.

ROCHEL-MAIA, S. S. et al. MMP-2 and TIMP-2 in the prostates of male and female mongolian gerbils: effects of hormonal manipulation. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 11, p. 1423-1434, 2011.

SANCHES, B. D. et al. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in Mongolian gerbil. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 6, p. 458-466, 2014.

SANCHES, B. D. et al. Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 12, p. 3309-3321, 2017a.

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

SANTOS, F. C. A. et al. Aspectos morfológicos da próstata residual em fêmeas do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). Brazilian Journal of Morphological Sciences, v. 17, p. 56, 2000.

SFANOS, K. S. et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 1, p. 11-24, 2018.

SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 353-356, 1998.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68: p. 7–30, 2018.

SOHONI, P.; SUMPTER, J. P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. **Journal of Endocrinology**, 158(3):327-39, 1998.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339–346, 2004.

SURESH, D.; SRINIVASAN K. Studies on the in vitro absorption of spice principles—curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1437–1442, 2007.

TABOGA, S. R. et al. Nuclear phenotypes and morphometry in human secretory prostatic cells: a comparative study of benign and malignant lesions in Brazilian patients. **Cariologia**, v. 56, p.313-320, 2003.

TABOGA, S. R. et al. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, p. 946-955, 2009.

TATEMATSU, M.; TSUKAMOTO, T.; MIZOSHITA, T. Role of Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis: the origin of gastric cancers and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. **Helicobacter**, v. 10, n. 2, p. 97-106, 2005.

TOPPARI, J. Environmental endocrine disrupters. **Sexual Development**, v. 2, p. 260-267, 2008.

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

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental Gerontology**, v. 40, p. 121-128, 2005.

VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 139–177, 2007.

VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. **Cell Biology International**, v. 29, p. 809-816, 2005.

VÖLKEL, W. et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 10, p. 1281–1287, 2002.

WADIA, P. R. et al. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63902, 2013.

WALKER, C. L.; HO, S. M. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 7, p. 479-486, 2012.

WALSH, T. J. et al. Testosterone treatment and the risk of aggressive prostate cancer in men with low testosterone levels. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0199194, 2018.

WANG, C. et al. Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. **Toxicology**, v. 341-343, p. 56-64, 2016.

WILLIAMS, W. M. The anatomy of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Tumblebrook Farm**, West Brookfield, MA, 107 p, Inc. 1974.

WHO/UNEP. **State of the science of endocrine disrupting chemicals** - 2012. 2013; ISBN: 978 92 4 150503 1. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78102/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf;jsessionid=BD4FCD590A3A9E4A173A12527C38AA12?sequence=1>.

WOZNIAK, A. L.; BULAYEVA, N. N.; WATSON, C. S. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca^{++} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. **Environmental Health and Perspectives**, v. 113, p. 431–439, 2005.

ZHANG, Q. et al. Exposure to bisphenol-A affects fear memory and histone acetylation of the hippocampus in adult mice. **Hormones and Behavior**, v. 65, n. 2, p.106-113, 2014a.

ZHANG, T. et al. Di-(2ethylhexyl) phthalate and bisphenol A exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 343-353, 2014b.

ZHENG, J. et al. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. pii: E495, 2016.