

GIOVANNA GALO QUINTINO OTTONICAR

INFLUÊNCIA DO PRAGUICIDA DICLORVÓS SOBRE OS MARCADORES
MOLECULARES DO METABOLISMO LIPÍDICO NA PRÓSTATA DE RATOS

Bauru

2020

GIOVANNA GALO QUINTINO OTTONICAR

INFLUÊNCIA DO PRAGUICIDA DICLORVÓS SOBRE OS MARCADORES
MOLECULARES DO METABOLISMO LIPÍDICO NA PRÓSTATA DE RATOS

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências e
Letras, Assis, para a obtenção do
título de mestra em Biociências (Área
de Conhecimento: Caracterização e
Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Utsunomia.

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio
Pereira.

Bauru

2020

O91i

Ottonicar, Giovanna Galo Quintino

Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico na próstata de ratos. /

Giovanna Galo Quintino Ottonicar. -- Bauru, 2020

76 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Ricardo Utsunomia

Coorientador: Sergio Pereira

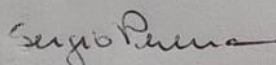
1. Próstata. 2. Diclorvós. 3. Câncer. 4. Metabolismo lipídico.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIOVANNA GALO QUINTINO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 12 dias do mês de março do ano de 2020, às 14:30 horas, no(a) Sala de Videoconferência - CENEPP - Bauru, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GIOVANNA GALO QUINTINO, intitulada **Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares de lipogênese na próstata de ratos..** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. SERGIO PEREIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Anatomia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. CRISTIANE FIGUEIREDO PINHO (Participação Virtual) do(a) UNINOVE. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. SÉRGIO PEREIRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e sobretudo a Deus, Aquele que me concedeu a dádiva da vida, Aquele que esteve e está ao meu lado em todos os meus dias, meu socorro bem presente, a Sua presença me faz feliz! Toda honra e toda a glória só a Deus pertence, desde sempre e para sempre!

Aos meus pais, Marister e Amauri, que são minha base, que sempre acreditaram em mim e não duvidaram da minha capacidade, eu jamais chegaria a qualquer lugar sem o auxílio deles. Minha mãe, minha rainha, minha melhor amiga, aquela que sempre me disse “vai dar tudo certo”, sempre me apoiou e disse que eu conseguiria. Meu pai, meu herói, aquele que nunca me deixou desistir e que sempre me ensinou a fazer boas escolhas.

Ao meu esposo, melhor amigo, companheiro Rafael, esteve comigo desde as iniciações científicas, sempre me apoiou, sempre segurou na minha mão e, quando eu não conseguia caminhar sozinha, caminhou junto comigo. Aquele que faz meu coração transbordar, com quem eu quero viver todos os dias da minha vida! Me ajudou muito a conseguir chegar até aqui, por conta disso, dedico a minha real gratidão.

Aos meus irmãos, Rodrigo e João Pedro, meus meninos, meus amigos, estiveram e estão em todas as minhas vitórias, pois fazem parte delas. São aqueles a quem eu recorria quando precisava de um ombro, quando precisava de um momento de tranquilidade.

A minha vó Maria Neusa, minha tia Elisa e minhas super amigas Hariane, Amanda e Drielle, que mesmo não estando presentes fisicamente todos os dias, sempre estiveram presentes com suas orações, pensamentos positivos e energias boas.

Agradeço ao meu orientador Ricardo Utsunomia, pela orientação, pelo apoio e por sempre me desejar o melhor.

Ao meu co-orientador Sergio Pereira, presente desde as minhas iniciações científicas, me acolheu em seu laboratório, mesmo antes de ter um, me ajudou inúmeras vezes, acreditou no meu potencial e investiu em mim. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos que me fizeram chegar até aqui.

Ao Laboratório de Análise de Desreguladores Endócrinos (LADE) por toda infraestrutura e auxílio oferecidos para que o projeto fosse desenvolvido.

A todos os meus colegas de laboratório Thalissa, Eleonora, Natália, Henrique, em especial as minhas amigas para todas as horas Letícia e Naíra, que me ajudaram imensamente, me acalmando quando achei que não ia conseguir, me ajudando com conhecimentos compartilhados, com conselhos, com uma amizade verdadeira e sincera.

Ao querido Aislan, do laboratório de Fisiologia do Pâncreas, que muito me ajudou com as técnicas laboratoriais, me auxiliou e contribuiu muito para que minha pesquisa fosse concluída.

As minhas amigas que ganhei com a graduação e com o laboratório e levarei para a minha vida Thamires, Lurian, Natália e Fernanda, que mesmo após a graduação terminar e não poder vê-las mais todos os dias, me apoiam e estão presentes comigo demonstrando uma irmandade de coração.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, Prof^a. Dr^a. Cristiane Figueiredo Pinho, Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti e Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa por aceitarem o convite.

Ao Departamento de Ciências Biológicas por toda infraestrutura oferecida para que o projeto fosse desenvolvido.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas por todo auxílio, sem eles nenhuma pesquisa poderia ser executada.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

OTTONICAR, Giovanna Galo Quintino. **Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico na próstata de ratos.** 2020. 76 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, 2020.

RESUMO

Pesticidas organofosforados são muito utilizados na agricultura, mas são tóxicos para muitos organismos incluindo os seres humanos, podendo atuar como desreguladores endócrinos e como agentes mutagênicos e carcinogênicos. Um dos efeitos desreguladores é a alteração do metabolismo lipídico, que está associado também ao desenvolvimento do câncer. Isso pode ser explicado pela necessidade das células tumorais em utilizar ácidos graxos para compor suas membranas em construção. Dentre os pesticidas organofosforados está o Diclorvós (DDVP), cujo alto consumo e utilização se baseia em sua grande eficácia e baixo custo. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do praguicida DDVP sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico (SREBP, SCAP, LIMP-II e CD36) na próstata de ratos após indução química pelo carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (MNU). Foram utilizados 32 ratos da linhagem *Fischer 344*, com idade de 90 dias. Os ratos foram separados em quatro grupos experimentais: Controle, DDVP, MNU, MNU+DDVP. Foram feitas análises histopatológicas, imuno-histoquímicas e *Western Blotting* na próstata ventral dos ratos. Na análise histopatológica, os grupos MNU e MNU+DDVP apresentaram 100% de incidência de hiperplasia. Para a avaliação morfo métrico-estereológica, o grupo MNU+DDVP apresentou aumento do volume relativo de epitélio quando comparado com o grupo controle. As proteínas SREBP e CD36 foram encontradas nas células epiteliais luminiais na região do Aparelho de Golgi, a SCAP principalmente na região apical, e a LIMP II dispersa no citoplasma como aglomerados. Quanto à quantificação das proteínas, o índice de densitometria óptica para a LIMP II no grupo MNU+DDVP foi maior que nas demais proteínas, indicando que a associação do DDVP ao MNU foi capaz de promover alterações no metabolismo lipídico. O maior índice de densitometria óptica para as proteínas SREBP e CD36 foi observado no grupo MNU+DDVP. O índice de densitometria óptica para a SCAP foi menor nos grupos DDVP e MNU+DDVP, ambos tratados com DDVP. Assim, podemos concluir que o pesticida DDVP, em baixas concentrações, associado à indução química por MNU, foi capaz de promover alterações na morfologia da próstata ventral de ratos, bem como, no seu metabolismo lipídico.

Palavras-chaves: Diclorvós. Metabolismo lipídico. SREBP. SCAP. LIMP-II. CD36. Câncer de próstata.

OTTONICAR, Giovanna Galo Quintino. **Influence of the pesticide dichlorvos on the molecular markers of lipid metabolism in the rat prostate.** 2020. 76 f. Dissertation (Academic Master in Biosciences). - São Paulo State University (UNESP), Faculty of Sciences, Bauru, 2020.

ABSTRACT

Organophosphate pesticides are widely used in agriculture, but are toxic to many organisms including humans, and can act as endocrine disrupters and as mutagenic and carcinogenic agents. One of the deregulatory effects is the alteration of lipid metabolism, which is also associated with cancer development. This may be explained by the need for tumor cells to use fatty acids to compose their building membranes. Among the organophosphate pesticides, Dichlorvos (DDVP) is one of the most effective and least expensive. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the influence of the DDVP pesticide on the molecular markers of lipid metabolism (SREBP, SCAP, LIMP-II and CD36) in rat prostate after chemical induction by the carcinogen N-methyl-N-nitrosourea (MNU). Thirty two rats from the *Fischer 344* lineage aged 90 days were used. The rats were separated into four experimental groups: Control, DDVP, MNU and MNU + DDVP. Histopathological, immunohistochemical and Western Blotting analyzes of the ventral prostate of rats were performed. In the histopathological analysis, the MNU and MNU + DDVP groups had a 100% incidence of hyperplasia. For the morphometric-stereological evaluation, the MNU + DDVP group showed an increase in the relative volume of epithelium when compared with the control group. The SREBP and CD36 proteins were found in luminal epithelial cells in the Golgi Apparatus region, SCAP mainly in the apical region, and LIMP II dispersed in the cytoplasm as clusters. As for protein quantification, the optical densitometry index for LIMP II in the MNU + DDVP group was higher than in the other proteins, indicating that the association of DDVP with MNU was able to promote changes in lipid metabolism. The highest optical densitometry index for the SREBP and CD36 proteins was observed in the MNU + DDVP group. The optical densitometry index for SCAP was lower in the DDVP and MNU + DDVP groups, both treated with DDVP. Thus, we can conclude that the pesticide DDVP, in low concentrations, associated with chemical induction by MNU, was able to promote changes in the morphology of the ventral prostate of rats, as well as in their lipid metabolism.

Keywords: Dichlorvos, lipid metabolism, SREBP, SCAP, LIMP-II and CD36, prostate cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Próstata de rato e seus três lobos: anterior, dorsolateral e ventral.

Figura 2 - Três regiões do sistema ductal da próstata ventral: Proximal, Intermediária e Distal.

Figura 3 - Classificação de toxicidade segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Figura 4 - Consolidação de dados fornecidos por empresas registradas de produtos técnicos, agrotóxicos e afins.

Figura 5 - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), ranking referente ao uso de defensivos agrícolas por hectare cultivado, 2016.

Figura 6 - Fórmula Bruta e Fórmula Estrutural do Diclorvós ou DDVP.

Figura 7 - Aquisição de ácidos graxos por células tumorais, via exógena e lipogênese.

Figura 8 - Principais passos da lipogênese.

Figura 9 - Lipogênese.

Figura 10 - Síntese de colesterol.

Figura 11 - Representação da ativação da proteína SREBP.

Figura 12 - Cascata de sinalização SCAP-SREBP contribuindo para o crescimento tumoral.

Figura 13 - Representação da ligação LIMP-II e GCCase.

Figura 14 - Diagrama dos Grupos Experimentais.

Figura 15 - Cortes histológicos da próstata ventral, corados com hematoxilina-eosina. a e b grupo Controle, c e d grupo MNU (as setas indicam inclusões citoplasmáticas, que são alterações no padrão normal do epitélio prostático), e e f grupo MNU (as setas indicam atrofia epitelial, que são alterações no padrão normal do epitélio prostático). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio), Af (atrofia).

Figura 16 – Cortes histológicos da próstata ventral, corados com hematoxilina-eosina. a Grupo MNU+DDVP e b Grupo MNU, c Grupo DDVP e d Grupo MNU, e e f Grupo MNU+DDVP, g e h do Grupo DDVP. Abreviaturas: Ep (epitélio), Lu (lúmen), Es (estroma), H (hiperplasia), Inf (inflamação periacinar), Met (metaplasia). Os asteriscos (*) representam hiperplasia estromal.

Figura 17 – Incidência de hiperplasia entre os quatro grupos experimentais. * $p=0,0150$ e ** $p=0,0070$.

Figura 18 - Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína SREBP. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína SREBP foi marcada predominantemente na região do Aparelho de Golgi (setas como indicação do local), mas também obtivemos marcações dispersas no citoplasma. Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

Figura 19 – Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína SCAP. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína SCAP apresentou marcação dispersa no citoplasma (setas como indicação do local) e algumas marcações na região apical, bem como na membrana apical (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

Figura 20 - Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína CD36. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína CD36 foi marcada predominantemente na região do Aparelho de Golgi (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

Figura 21 – Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína LIMP II. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína LIMP II foi marcada como aglomerados no citoplasma (setas como indicação do local), e na membrana apical (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

Figura 22 – Perfil representativo de *Western Blotting* para Beta-actina, SREBP, SCAP, CD36 e LIMP II.

Figura 23 - Análise densitométrica da SREBP (68kDa), SCAP (150kDa), CD36 (88kDa) e LIMP II (72kDa) nas amostras de próstata ventral (50µg de proteína). Análise estatística baseada no teste de Tukey (controle-MNU+DDVP, DDVP-MNU+DDVP o $p=0,0006$, MNU-MNU+DDVP o $p=0,0009$).

Quadro 1 - Solução tampão e diluição do anticorpo primário para SREBP, SCAP, LIMP II e CD36.

Quadro 2 - Proteínas, diluição do anticorpo primário, anticorpo secundário e diluição.

Tabela 1 - Média e desvio padrão do peso corpóreo final dos animais, peso da próstata ventral, peso relativo e consumo semanal de ração.

Tabela 2 - Incidência das lesões prostáticas por grupo.

Tabela 3 - Média e o desvio padrão do valor relativo do epitélio, lúmen e estroma para os quatro grupos experimentais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bHLH-Zip	basic-helix-loop-helix-leucine-zipper
C	Controle
CD36	Cluster de diferenciação 36
CL	Concentração letal
CMNU	Controle mais MNU
CN	controle negativo
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSC	Célula tronco cancerosa
CZ	Zona central
D	DDVP
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DBP	di (N-butil) ftalato
DDVP	Diclorvós
DDT	Dicloro-DifenilTricloroetano (seu metabólito DDE)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Lóbulo dorsal
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FASN	Ácido graxo sintase
GBM	Glioblastoma
GCase	Enzima Glicocerebrosidase
GCO	Observatório Global do Câncer
HPB	Hiperplasia benigna de próstata
IA	Tumores independentes de andrógenos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOD	Índice de Densitometria Óptica
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LIMP II	Proteína integral lisossomal de membrana tipo-2
LP	Lóbulo lateral
LPL	Enzima lipoproteína lipase
M	MNU
MAPA	Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento
MD	MNU+DDVP
MNU	N-metil-N-nitrosourea
NIP	Neoplasia intraepitelial prostática
NPCSSs	Locais Contaminados de Prioridade Nacional Italianos
PA	Próstata anterior
PC	Peso corpóreo
PDL	Próstata Dorso Lateral
PR	Peso relativo
PV	Próstata ventral
PV	Peso da próstata ventral
PZ	Zona periférica
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratórios
SCAP	Proteína ativadora da clivagem de SREBP
SREBP	Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol
S1P	Site-1 protease

S2P	Site-2 protease
TBS	Tris Buffer Solution
TDBP	Testosterona mais di (N-butil) ftalato (DBP)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Próstata	15
1.2. Câncer de próstata e carcinogênese prostática	19
1.3. Desreguladores endócrinos e agrotóxicos	20
1.4. Metabolismo lipídico	26
1.4.1. Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBPs)	31
1.4.2. Proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP)	33
1.4.3. Proteína integral lisossomal de membrana tipo-2 (LIMP-II)	34
1.4.4. Cluster de diferenciação 36 (CD36)	35
1.5. Metabolismo lipídico e câncer	36
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. REFERÊNCIAS	39
5. CAPÍTULO 1	47
5.1. INTRODUÇÃO	47
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	49
5.2.1. Modelo animal	49
5.2.2. Grupos experimentais	49
5.2.3. Coleta do material biológico	51
5.2.4. Avaliação dos dados biométricos	51
5.2.5. Análise histopatológica	52
5.2.6. Análise morfométrico-estereológica	52
5.2.7. Análise imuno-histoquímica	52
5.2.8. Análise de <i>Western Blotting</i>	53
5.2.9. Análise estatística	53
5.3. RESULTADOS	54
5.3.1. Dados biométricos	54
5.3.2. Análise histopatológica da próstata ventral	54
5.3.3. Análise Imuno-histoquímica e <i>Western Blotting</i> da Próstata Ventral	59
5.4. DISCUSSÃO	66
5.5. CONCLUSÃO	68
5.6. REFERÊNCIAS	68

6. ANEXOS	72
6.1. Análise Imuno-histoquímica	72
6.2. Análise de <i>Western Blotting</i>	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória do sistema genital masculino, responsável pela secreção e armazenamento de grande parte dos componentes do líquido seminal. Sua secreção tem como função garantir aos espermatozoides condições ideais de sobrevivência e viabilidade durante e após a ejaculação (PRICE, 1963).

Os estudos de Marker e colaboradores (2003) apontam que o desenvolvimento da próstata se inicia na vida fetal, a partir do seio urogenital, e se completa na maturidade sexual.

Fine & Reuter (2012) fizeram estudo baseado nos trabalhos pioneiros de McNeal (1983) sobre a anatomia da próstata e confirmaram que a próstata dos humanos é um órgão compacto, sendo formado por três zonas glandulares denominadas: zona central (CZ), zona periférica (PZ) e zona de transição (TZ) e uma região não glandular, denominada de estroma fibromuscular anterior. A cápsula é uma bainha comum de tecido fibromuscular que possui a função de unir as zonas da próstata. Nos humanos, a próstata madura apresenta o tamanho aproximado de uma noz (4 x 2,5cm e 20g) (ROY-BURMAN *et al.*, 2004).

A morfogênese ductal da próstata de roedores dá origem a três lobos prostáticos simétricos bilateralmente, denominados: próstata anterior (PA), próstata dorsolateral (PDL) e próstata ventral (PV). Quando os ratos atingem a maturidade sexual, a próstata é uma glândula multilobada e possui diferenças histológicas e fisiológicas dentro de cada lobo (Figura 1) (MARKER *et al.*, 2003).

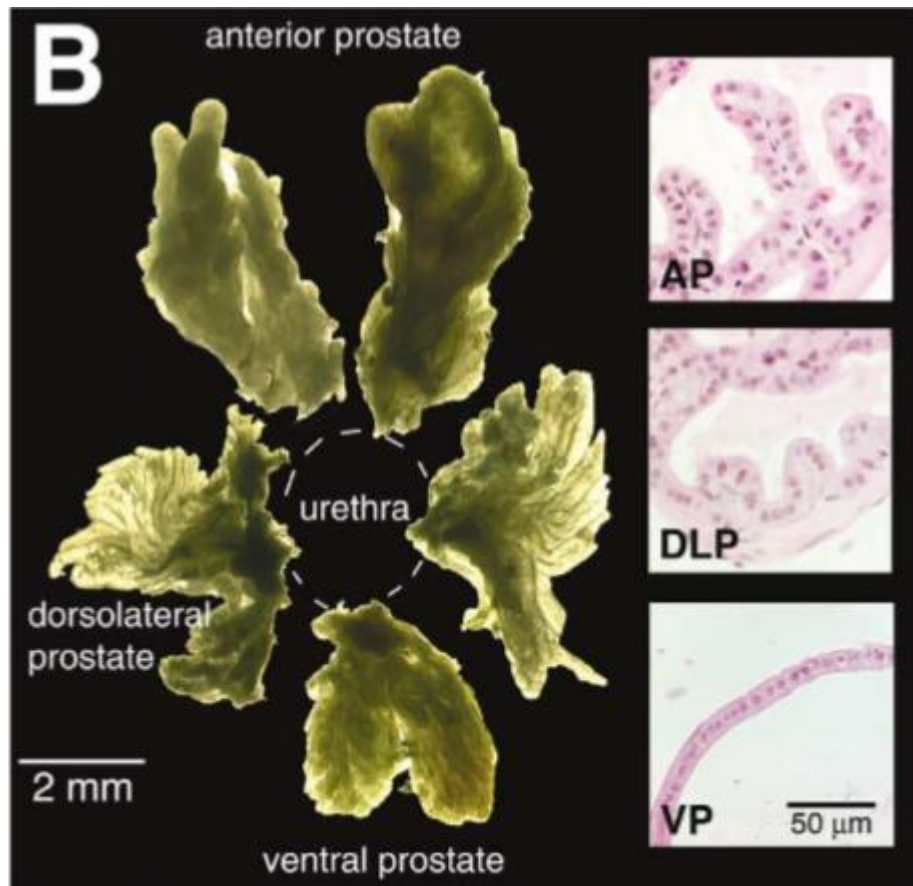


Figura 1. Próstata de rato e seus três lobos: PA, PDL e PV (MARKER *et al.*, 2003).

A próstata anterior (PA) é também conhecida como glândula de coagulação, apresenta formato tubular e seus tecidos são adjacentes à vesícula seminal. Por conta disso, em lâminas histológicas, podem ser representadas juntas, porém, com diferenças notáveis, a PA possui mais projeções papilares no lúmen e menos secreções eosinofílicas em comparação à vesícula seminal. Com relação ao epitélio, a PA contém dobras com padrão cribiforme e células colunares com núcleos localizados centralmente. (ROY-BURMAN *et al.*, 2004).

A próstata lateral está localizada inferiormente à PA e à vesícula seminal. Ela está relacionada à próstata dorsal na região dorsal, por esse motivo podem ser estudadas em conjunto, recebendo o nome de próstata dorsolateral (PDL). Ventralmente, a próstata lateral se sobrepõe, parcialmente, à próstata ventral (HAYASHI *et al.*, 1991, ROY-BURMAN *et al.*, 2004).

A próstata lateral é dividida em dois tipos de sistemas ductais: a próstata lateral do tipo 1 e a próstata lateral do tipo 2. A primeira (próstata lateral tipo 1) apresenta de 5 a 7 ductos principais longos e 20 a 30 extremidades distais; os

ductos são revestidos por epitélio colunar simples com poucas dobras epiteliais e as extremidades apresentam estruturas acinares preenchidas com secreção. A próstata lateral do tipo 2 apresenta de 5 a 6 ductos principais curtos e 40 a 60 extremidades distais. Assim como na próstata lateral do tipo 1, o epitélio dos ductos é colunar simples, porém com número moderado de dobras epiteliais. Os ductos de ambas as próstatas laterais (tipo 1 e 2) surgem da mesma região da uretra e são circundados por estroma denso (HAYASHI *et al.*, 1991).

A próstata dorsal está localizada inferior e posteriormente à vesícula seminal e à PA, e, posteriormente, à bexiga urinária e à próstata lateral. Apresenta de 5 a 6 ductos principais que terminam em estrutura acinar, com arborização ductal complexa. Comparando com a próstata lateral do tipo 2, as dobras epiteliais na próstata dorsal são relativamente menores. Análises da próstata dorsal ao microscópio de luz mostraram a presença de secreção e detritos celulares no lúmen (HAYASHI *et al.*, 1991).

Morfologicamente, a próstata ventral de roedores é uma glândula túbulo acinar composta por sistema ductal, envolto por estroma rico em células musculares lisas. Este sistema ductal pode ser dividido em três regiões – proximal, intermediária e distal - cada uma delas com características histológicas e funcionais diferentes. Na região distal, as células epiteliais são colunares altas com alta atividade proliferativa, enquanto, na região proximal, as células epiteliais são cúbicas com alta taxa de morte celular. O estroma da região distal é rico em fibroblastos e apresenta esparsas fibras musculares lisas, enquanto na região proximal, ocorre o contrário, ou seja, o estroma é rico em fibras musculares lisas e apresenta esparsos fibroblastos. A região intermediária apresenta características intermediárias entre a região proximal e a distal e é a região responsável pela produção da secreção prostática (Figura 2) (NEMETH & LEE, 1996).

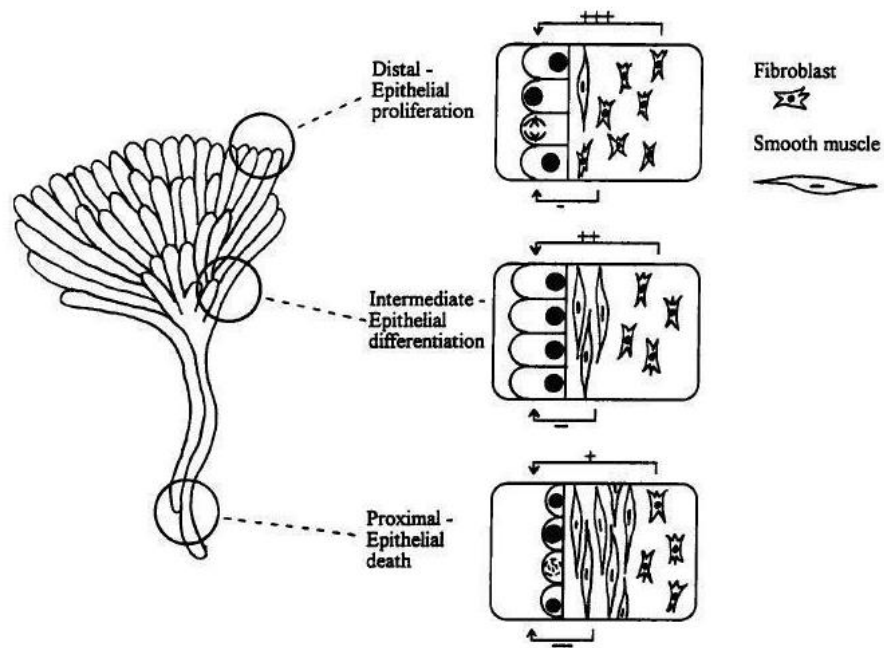


Figura 2. Três regiões do sistema ductal da próstata ventral: Proximal, Intermediária e Distal (NEMETH & LEE, 1996).

Estudos realizados por Roy-Burman e colaboradores (2004) relatam que tanto a próstata humana como a próstata de ratos apresentam semelhanças quanto a suas células epiteliais, apresentando células luminais secretoras, basais e neuroendócrinas.

A função que elas desempenham é a mesma em ambas, o que varia é a concentração e a distribuição dessas células entre as espécies. Em ambas espécies, as células epiteliais luminais secretam proteínas e fluídos para o lúmen. Os ratos apresentam uma camada menor e descontínua de células basais ao redor dos ductos prostáticos, enquanto, nos humanos, há uma camada contínua de células basais entre as células secretoras e a lâmina basal (MARKER *et al.*, 2003).

Há muitas semelhanças entre os tecidos da próstata humana e de ratos quanto à embriogênese, anatomia e histologia, mas existem diferenças significativas que devem ser levadas em consideração. O lóbulo anterior nos ratos (PA) é considerado análogo à zona central (CZ) nos humanos, e o lóbulo dorsolateral (PDL) nos ratos, análogo à zona periférica (PZ) nos humanos. A próstata ventral é o lóbulo mais responsivo a andrógeno, enquanto a próstata dorsolateral apresenta maior potencial de desenvolvimento de lesões (ROY-BURMAN *et al.*, 2004; SLAYTER *et al.*, 1994).

1.2. Câncer de próstata e carcinogênese prostática

A próstata pode apresentar diversas patologias, como a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), que é um crescimento não neoplásico dessa glândula após os 50 anos de idade, e o Câncer de Próstata ou Adenocarcinoma Prostático, que é um tumor maligno, provocado pela proliferação anormal das células epiteliais (ELLEM & RISBRIDGER *et al.*, 2009).

De acordo com os dados do Observatório Global do Câncer (GCO), mundialmente, o câncer de próstata é o segundo câncer mais prevalente em homens. A estimativa de 2018 foi de 1.276.106 casos, ficando atrás apenas do câncer de pulmão. O câncer de próstata tornou-se nestes últimos anos um grande problema de saúde pública, assumindo a primeira posição em mortes por câncer (21%) em homens nos Estados Unidos em 2020 (SIEGEL *et al.*, 2020).

No Brasil, de acordo com os dados estatísticos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência do câncer de próstata também tem aumentado nos últimos anos. Os dados mostram 65.840 novos casos, sendo o segundo câncer mais comum entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma. O câncer de próstata é um tipo de câncer considerado da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem em homens a partir dos 65 anos de idade (INCA, 2020).

A relação da idade com o câncer de próstata é clara, à medida que os homens vão envelhecendo, há um aumento considerável do tecido adiposo (POLARI *et al.*, 2015). Gong e colaboradores (2014) relatam que há fatores em comum entre a oncogênese e a lipogênese, mostrando que a obesidade pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres como de próstata, fígado, rim, esôfago e mama.

O processo de carcinogênese ocorre em distintas etapas: iniciação, promoção e progressão. A primeira é caracterizada pela alteração genética irreversível, a segunda pelo aumento da população de células tumorais e a última pela transformação em tumor capaz de invadir outros tecidos (HICKS, 1980).

Em modelos experimentais de carcinogênese química, utiliza-se, geralmente, um agente alquilante que causa metilação persistente do DNA. Um dos agentes mais utilizados é o N-metil-N-nitrosourea (MNU), que pode atuar como

iniciador ou como promotor (HICKS, 1980) e induzir inúmeros cânceres em roedores, entre eles o

câncer de próstata (OHSHIMA; WARD, 1984; STEINBERG, 1990; HICK; WAKEFIELD, 1972; ZARBL *et al.*, 1985).

Bosland (2014) realizou um estudo com ratos *Wistar* para verificar qual o mecanismo de ação do hormônio testosterona no desenvolvimento do câncer de próstata e a sua associação com o MNU (uma única dose). Os resultados obtidos mostraram que a testosterona, sem associação com o MNU, induziu câncer de próstata em 10-18% nos ratos, já no grupo em que houve associação (testosterona e MNU) a porcentagem foi de 50-71%. Os ratos que receberam apenas a dose de MNU não tiveram câncer de próstata. Com esses resultados, Bosland inferiu que a testosterona é um forte promotor de tumor de próstata em ratos (BOSLAND, 2014).

Estudo realizado por Peixoto e colaboradores (2015) também utilizou a associação MNU e testosterona para verificar a ação do di (N-butil) ftalato (DBP), um plastificante comumente utilizado, no desenvolvimento da próstata de ratos. Os resultados mostraram que, o grupo que recebeu testosterona mais DBP tiveram um aumento no compartimento epitelial, e, os grupos tratados com DBP apresentaram aumento de metaplasia/displasia quando comparados ao grupo controle mais MNU. Esse estudo mostra a eficiência do tratamento com a associação MNU mais testosterona no estudo de lesões prostáticas, além de mostrar as alterações que podem ocorrer no desenvolvimento da próstata quando em contato com um desregulador endócrino (DBP) (PEIXOTO *et al.*, 2015).

1.3. Desreguladores endócrinos e agrotóxicos

Muitos poluentes ambientais derivados de fontes industriais e agrícolas, incluindo praguicidas, pesticidas, fungicidas, inseticidas, herbicidas e outros compostos químicos usados na indústria de plástico e em produtos de consumo doméstico são desreguladores endócrinos (KUO *et al.*, 2012).

Essas são substâncias químicas naturais ou sintéticas presentes no ambiente são capazes de alterar a homeostase mantida pelos hormônios, agindo nos receptores hormonais de forma a mimetizar a ação dos hormônios, e, podendo causar lesões prostáticas (KUO *et al.*, 2012).

Por isso, as substâncias tóxicas podem interferir no sistema endócrino por influenciar a síntese de hormônios, liberação, transporte, metabolismo e excreção (KUO *et al.*, 2012), além de causar disfunção da resposta imunológica e inflamação (CHALUBINSKI & KOWASLKI, 2006; HUANG *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2011).

Os desreguladores endócrinos podem perturbar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo, causar redução da fertilidade e disfunção erétil, alteração nas funções da glândula tireoide, além de poderem causar câncer de testículo e de próstata (SCHUG *et al.*, 2011; SIKKA & WANG, 2008).

Segundo Prins (2006), há fortes evidências em modelos animais de que desreguladores endócrinos, como cádmio, arsênio e bisfenol A, podem influenciar o desenvolvimento e a progressão de câncer de próstata, porque podem interferir na sinalização ou influenciar o metabolismo de estrógeno. O DDT (Dicloro-DifenilTricloroetano), bem como seu metabólito (DDE), tem efeito antiandrogênico em machos, bloqueando os receptores de andrógeno (KELCE *et al.*, 1995; MATTISON *et al.*, 1983; SIKKA & WANG, 2008; WHORTON *et al.*, 1977).

Benedetti e colaboradores (2017) realizaram um estudo investigando quatorze Locais Contaminados de Prioridade Nacional Italianos (NPCSs), são locais que possuem alguma contaminação com desreguladores endócrinos e esses estavam associados ao surgimento de tumores na mama, próstata, testículo e tireoide. Para investigar o potencial carcinogênico dos desreguladores, os pesquisadores se basearam na avaliação de comitês científicos internacionais. O resultado foi que, dos quatorze NPCSs investigados, doze estavam associados a uma taxa significativa de cânceres.

Valores significativamente aumentados foram encontrados em oito NPCSs para câncer de mama, seis para câncer de próstata, quatro para câncer de tireoide (ambos os sexos) e dois para câncer testicular. Embora esse estudo tenha mostrado alta incidência de câncer em vários NPCSs, o desenho deste estudo não permitiu concluir uma ligação causal com contaminação ambiental desses desreguladores, mas sugeriram uma contínua vigilância epidemiológica para os locais onde houve alta taxa de tumores (BENEDETTI *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Bedia e colaboradores (2015) analisou três desreguladores endócrinos, aldrin, aroclor 1254 e clorpirifós e sua influência no desenvolvimento de tumores prostáticos. Os resultados obtidos foram que, a

exposição aos três desreguladores causou uma transição celular, de células epiteliais para mesenquimais. Os lipídios nas células foram analisados e o resultado mostrou que a exposição aos três desreguladores causou uma modificação na quantidade lipídica, o aldrin causou diminuição de fosfolipídios e esfingolípídios, enquanto que o aroclor e o clorpirifós causaram aumento de certos fosfolipídios, glicoesfingolípídios e aumento de algumas espécies de cardiolipina. A exposição a esses desreguladores causou aumento considerável de triglicerídeos. Os pesquisadores concluíram que essa mudança no padrão lipídico e via metabólica dos lipídios está relacionada a aquisição do fenótipo maligno do tumor em células prostáticas quando expostas a esses desreguladores endócrinos.

Segundo a lei LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989 em seu 2º artigo, os agrotóxicos e afins são “a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a praga a ser destruída/controlada, podendo ser dos tipos: herbicidas, inseticidas, raticidas e fungicidas. Essas classes de agrotóxicos podem se dividir de acordo com seu mecanismo de ação, sendo os organofosforados e carbamatos, piretrinas e piretroides e organoclorados (OGA, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), órgão de controle do Ministério da Saúde, classifica os agrotóxicos no Brasil em quatro classes, de acordo com sua toxicidade (Figura 3) (ANVISA, 2011).

Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul
Classe IV	Pouco Tóxico	Verde

Figura 3. Classificação de toxicidade segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA, 2011).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) desde 2000 publica boletins anuais de comercialização de agrotóxicos no Brasil, o gráfico abaixo mostra o consumo de agrotóxicos e afins do ano 2000 a 2017 (Figura 4). No ano de 2017 o Brasil consumiu 539.944,95 toneladas de agrotóxicos, esse valor inclui o consumo das seguintes regiões somadas: Norte, Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul (IBAMA, 2019).

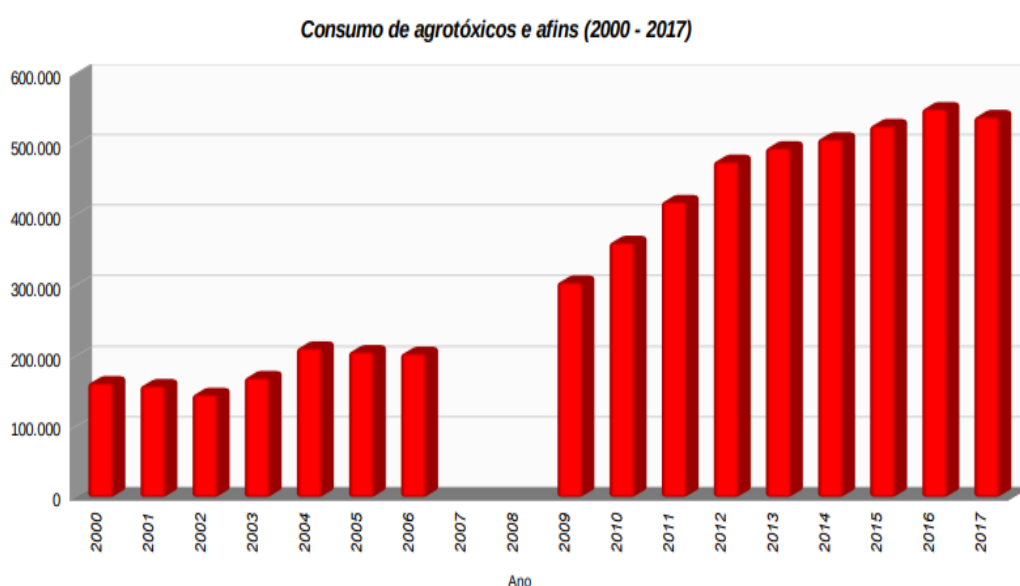


Figura 4. Consolidação de dados fornecidos por empresas registradas de produtos técnicos, agrotóxicos e afins. Conforme art 41 do decreto 4.074/2002 (IBAMA, 2019).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) publicou um Ranking referente ao uso de defensivos agrícolas por hectare cultivado de diversos países, o Brasil aparece em 44º posição, ficando atrás dos países baixos, Bélgica, Itália, Montenegro, Irlanda, Portugal, Suíça e Eslovênia. Em 2016 o

consumo relativo de defensivos por hectare do Brasil foi de 4,31 quilos (Figura 5). Com relação ao consumo de defensivos em função da produção agrícola de grãos, fibras, frutas, pulses, raízes e nozes, o Brasil aparece em 58º lugar, com uso de 0,28 quilos de defensivo por tonelada de produtos agrícolas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), 2019).

Ranking da FAO sobre uso de defensivos por hectare cultivado

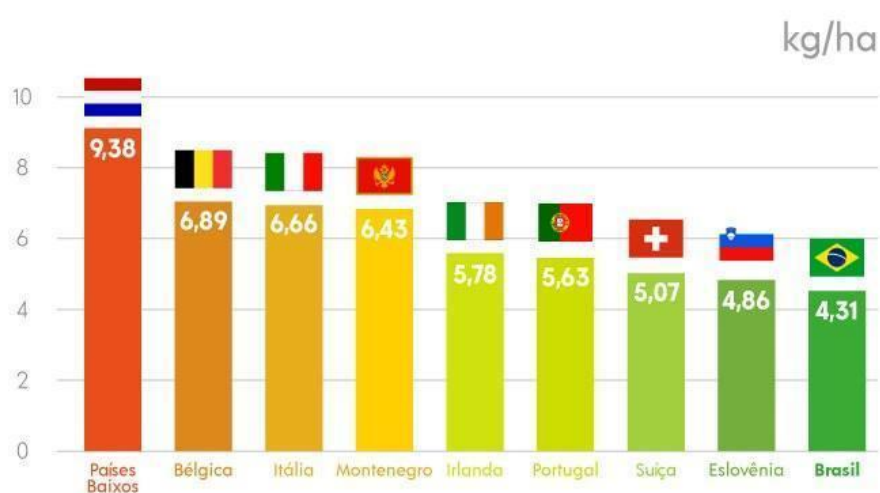
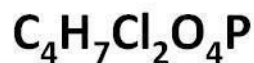


Figura 5. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), ranking referente ao uso de defensivos agrícolas por hectare cultivado, 2016 (MAPA, 2019).

Os pesticidas organofosforados são compostos orgânicos muito eficazes e, por isso, muito utilizados, porém trazem prejuízos grandes ao meio ambiente, e à saúde de diversos organismos, incluindo os seres humanos. Um desses pesticidas organofosforados é o diclorovós, 2,2 diclorovinil dimetilfosfato ou DDVP (Figura 6), extensamente utilizado em muitos países no controle agrícola, doméstico, comercial e industrial de insetos (GAN *et al.*, 2006). Comparado com outros praguicidas, geralmente ele é escolhido devido a sua relação custo eficácia e ampla gama de bioatividade (ZHANG *et al.*, 2007).

Fórmula Bruta:



Formula Estrutural:



Figura 6. Fórmula Bruta e Fórmula Estrutural do Diclorvós ou DDVP
(<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/d13.pdf/729ad702-af41-467f-a365-713a37cacf72>).

O Diclorvós é um agente mutagênico e carcinogênico para seres humanos. O valor da concentração letal (CL50) mostra que o diclorvós tem toxicidade aguda elevada (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006). Embora tóxico, o DDVP é notável pelo seu rápido metabolismo e excreção por mamíferos. É altamente tóxico por inalação, absorção cutânea e ingestão (US PUBLIC HEALTH SERVICE, 1995; SOMIA *et al.*, 2012).

A exposição crônica ao praguicida DDVP pode causar disfunções hepáticas (BINUKUMAR *et al.*, 2010). Pletsa e colaboradores (1999) observaram a indução de mutações somáticas em camundongos, após tratamento por via intraperitoneal e por via oral com dose elevada de diclorvós. Chan e colaboradores (1991), em trabalho experimental com ratos *Fisher 344* e camundongos B6C3F1, verificaram que o DDVP tem potencial carcinogênico, podendo induzir lesões neoplásicas no pâncreas, estômago e glândulas mamárias, além de causar leucemia.

Tavassoli e colaboradores (2007) realizaram um estudo de rastreamento celular para verificar a influência do desregulador endócrino DDVP no desenvolvimento do câncer de próstata e na atividade de receptores de andrógenos. O resultado obtido mostrou que o DDVP é capaz de aumentar a atividade dos receptores de andrógenos quando há um nível baixo desse hormônio, promovendo, portanto, uma desregulação.

Mills e Yang (2003) conduziram um estudo de caso com trabalhadores rurais da Califórnia que tinham contato com os pesticidas lindano e heptaclor (organoclorados), diclorvós (organofosforado), brometo de metila (fumigantes) e simazina (herbicida), para avaliar qual a influência desses compostos no desenvolvimento de cânceres. A conclusão obtida foi que os trabalhadores que tiveram uma alta exposição a essas substâncias desreguladoras apresentaram um risco elevado para câncer de próstata, diferentemente dos trabalhadores que tiveram uma exposição menor.

Os pesticidas organofosforados podem atuar como desreguladores endócrinos, interferindo inclusive no processo de lipogênese e, conseqüentemente, no desenvolvimento de lesões prostáticas (BEDIA *et al.*, 2015).

1.4. Metabolismo lipídico

Lipogênese é o processo realizado pelas células para formação de ácidos graxos, lipídios constituídos por uma cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxila terminal, podendo ser saturados ou insaturados, que apresentam, geralmente, um número par de carbonos. Os ácidos graxos possuem funções de suma importância para o organismo, tendo o papel de armazenamento de energia, utilizado para formação de moléculas de sinalização e na formação de membranas plasmáticas, processo denominado membranogênese (CURRIE *et al.*, 2013).

As células podem realizar o processo de lipogênese para formar ácidos graxos, como também podem adquiri-los por meio exógeno, através da alimentação. A maioria das células normais, mesmo aquelas que possuem alta taxa de proliferação, utilizam ácidos graxos exógenos para a formação de novos lipídios, enquanto as células tumorais mostram um aumento na frequência da lipogênese, via endógena, independentemente da quantidade de lipídios disponíveis através da via exógena. Isso ocorre devido à alta expressão de proteínas e enzimas relacionadas à lipogênese em células tumorais (ZAIDI *et al.*, 2013).

A figura 7 ilustra as duas vias para formação de um novo lipídio, a lipogênese (via endógena) e a via exógena, sendo essa última adquirida por lipólise de triacilgliceróis pela enzima lipoproteína lipase (LPL), e transportada para o interior da célula tumoral pelo receptor *Cluster de Diferenciação* CD36 (ZAIDI *et al.*, 2013).

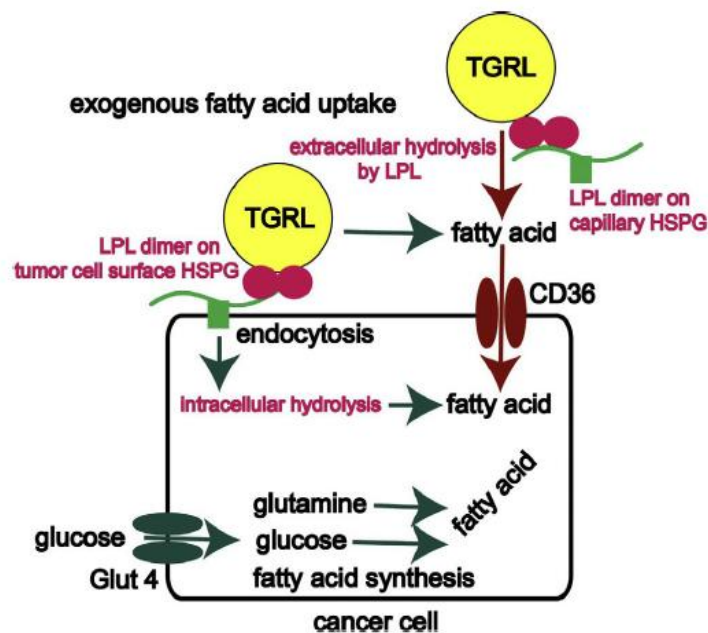


Figura 7. Aquisição de ácidos graxos por células tumorais, via exógena e lipogênese. A enzima LPL realiza a hidrólise do triacilglicerol no meio extracelular, como também pode mediar a entrada dessa molécula por endocitose na célula tumoral (ZAIDI *et al.*, 2013).

Nas células tumorais, a lipogênese tem sido a via mais utilizada para a formação de lipídios, porém foi detectado que essas células também utilizam ácidos graxos da via exógena. Um estudo com câncer de mama, sarcoma e câncer de próstata mostrou que as células tumorais expressam proteínas relacionadas com a captação de ácido graxo circulante (*Cluster de Diferenciação CD36*) e a enzima lipoproteína lipase (LPL), para a formação de novos lipídios, ou seja, pela via exógena (KUEMMERLE *et al.*, 2011).

Para que a lipogênese ocorra, são necessárias diversas enzimas, em destaque temos a Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FASN), consideradas essenciais para que o processo seja realizado. Na lipogênese, o piruvato, que é um produto da glicólise, é convertido dentro da mitocôndria a Acetil-CoA pelo complexo Piruvato Desidrogenase. Após a formação do Acetil-CoA, no citosol, esse é carboxilado pela Acetil-CoA Carboxilase (ACC), formando o Malonil-CoA que será transformado em ácido palmítico e vários outros ácidos graxos, catalisado pela enzima ácido graxo sintase (FASN). Esses, por sua vez, ficam armazenados e podem servir como fonte de combustível para as células cancerosas em proliferação. A proteína-1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-

1) é um fator de transcrição que regula os genes associados a lipogênese, FASN e outras enzimas (Figura 8 e 9) (GUPTA *et al.*, 2016; LOUBIÈRE *et al.*, 2015).

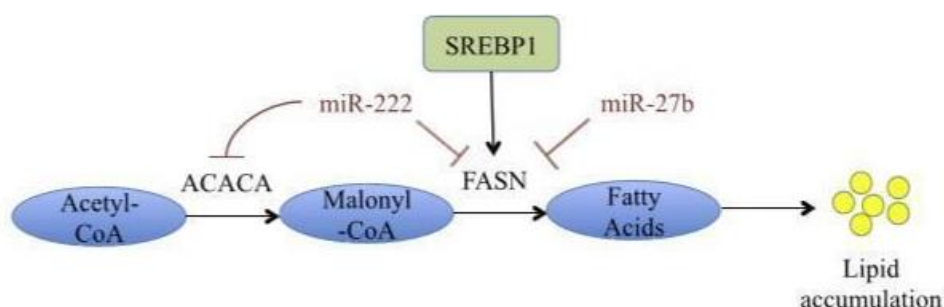


Figura 8. Principais passos da lipogênese. Acetil-CoA carboxilase (ACC) carboxila Acetil-CoA formando o Malonil-CoA, a enzima Ácido Graxo Sintase (FASN) sintetiza ácido palmítico e vários outros ácidos graxos a partir do Malonil-CoA. Os ácidos graxos sintetizados são armazenados como gotas lipídicas para poderem ser usados pelas células tumorais (O'MALLEY *et al.*, 2017).

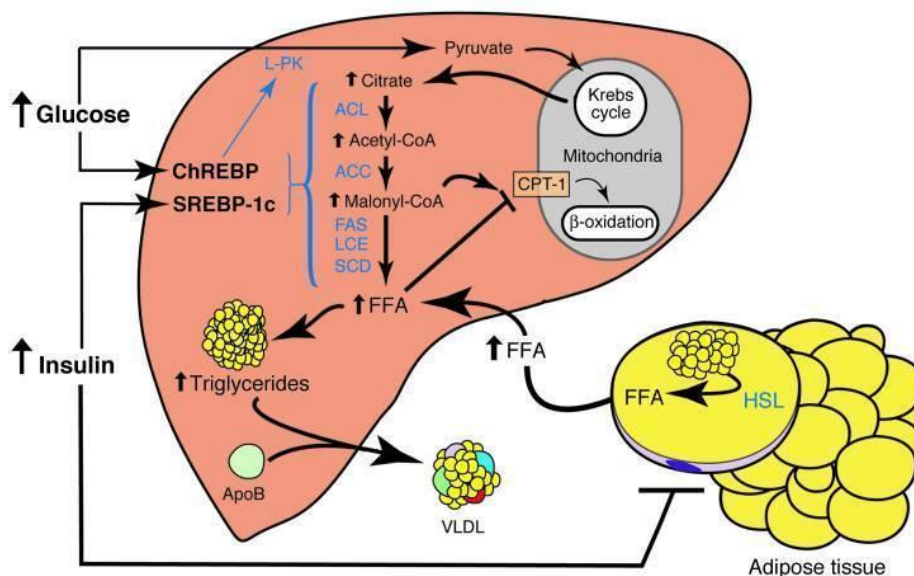


Figura 9. Lipogênese. A lipogênese ocorre principalmente no citosol das células do fígado. O piruvato é convertido em Acetil-CoA e entra na mitocôndria, porém não consegue entrar para o ciclo de Krebs, uma vez que esse está inibido. O Acetil-CoA então combinará com o Oxaloacetato se transformando em Citrato, este sairá da mitocôndria e irá para o citosol, no citosol a enzima Citrato Liase quebra o citrato e o converte novamente em Acetil-CoA, então a enzima Ácido Graxo Carboxilase carboxila o Acetil-CoA em Malonil-CoA, posteriormente, a enzima Ácido Graxo Sintase transforma o Malonil-CoA em Ácidos Graxos. O Ácido Palmítico é o principal ácido graxo produzido na lipogênese. A alta concentração de glicose no sangue estimula o pâncreas a liberar insulina e isso ativa dois fatores de transcrição, o SREBP-1c e o ChREBP que estimulam ainda mais as enzimas: Ácido Graxo Carboxilase e Ácido Graxo Sintase no processo de lipogênese (BROWNING & HORTON, 2004).

Outra forma de aquisição celular de lipídios é através da síntese (via endógena) ou captação do colesterol circulante (via exógena) proveniente da nossa alimentação. O colesterol é um tipo de lipídio composto por 27 átomos de carbono, todos provenientes da acetil-coenzima A, bastante solúvel em compostos não

polares, presentes nos mamíferos na composição das membranas plasmáticas e como precursores para a produção de hormônios esteroides, como também para a formação de sais biliares e vitamina D (BERG *et al.*, 2004; VOET & VOET, 2011).

A síntese de colesterol pode ocorrer em todas as células nucleadas e é dividida em quatro etapas, sendo que na primeira há conversão da acetilcoenzima A (acetil-coA) em mevalonato, um composto com seis carbonos (C-6), na segunda há adição de três grupos fosfato ao mevalonato, provenientes de moléculas de ATP, formando unidades isoprenoides ativadas, na terceira etapa seis unidades isoprenoides (C-5) se condensam, formando o esqualeno (C-30), por fim, a quarta etapa ocorre ao nível do retículo endoplasmático, onde o esqualeno sofre ciclização para poder formar os quatro anéis do núcleo esteroide do colesterol, nesse momento forma-se o lanosterol, que posteriormente, sofre mais 20 reações sucessivas para formar o colesterol (figura 10) (BERG *et al.*, 2004; BOTHAM & MAYES, 2006; MEDEIROS, 2011; NELSON & COX, 2008; VOET & VOET, 2011).

1.4.1. Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBPs)

Segundo Horton e colaboradores (2002), as proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBPs) são uma família de fatores de transcrição capazes de ativar genes responsáveis pela síntese e apreensão de ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolípidios e colesterol.

As proteínas precursoras SREBPs possuem três domínios, contendo aproximadamente 1150 aminoácidos. O primeiro domínio dessa proteína contém cerca de 480 aminoácidos, sendo o domínio responsável pela dimerização da proteína e pela ligação do DNA devido à região basic-helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLH-Zip). O segundo domínio é transmembranar, possuindo duas regiões hidrofóbicas separadas por aproximadamente 30 aminoácidos formando uma alça projetada no lúmen do Retículo Endoplasmático (RE). O terceiro domínio apresenta cerca de 590 aminoácidos, denominado carboxi-terminal, terá sua função reguladora ativada quando a proteína ativadora da clivagem (SCAP) se ligar a ele (HORTON *et al.*, 2002).

Para as SREBPs poderem chegar ao núcleo celular e ativarem o DNA para o início da transcrição, três proteínas são envolvidas no processo, proteína ativadora da clivagem SCAP, Site-1 protease (S1P) e Site-2 protease (S2P). A proteína SCAP realiza a função de detectar quando a célula necessita de esteróis, nesse momento seu domínio carboxiterminal se liga ao domínio carboxiterminal da proteína SREBP (inserida no RE) recrutando-a do RE para o aparelho de Golgi, onde estarão as demais proteínas que farão parte da ativação (S1P e S2P). No aparelho de Golgi a S1P divide a alça luminal da SREBP, em seguida, a S2P cliva o domínio amino-terminal, liberando o domínio bHLH-Zip que conseguirá se deslocar até o núcleo e para se conectar ao DNA, ativando genes alvos para transcrição (Figura 11) (HORTON *et al.*, 2002).

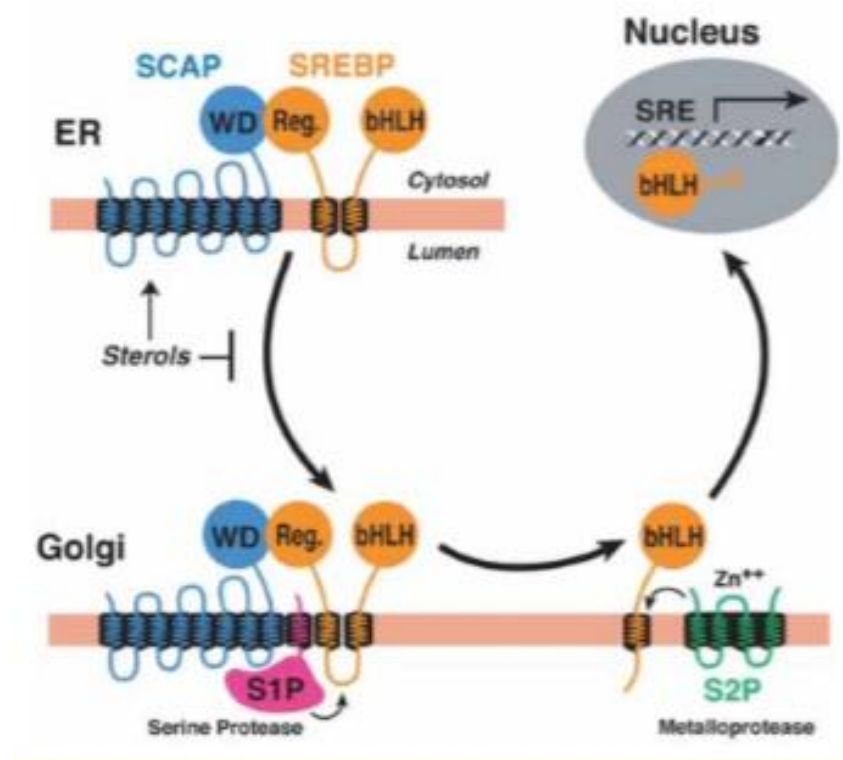


Figura 11. Representação da ativação da proteína SREBP. Quando a célula necessita de esteróis, a proteína SCAP se desloca para o RE se ligando ao SREBP, levando-o até o aparelho de golgi onde as demais proteínas S1P e S2P realizarão clivagens na SREBP até liberarem o domínio bHLH-Zip, esse migrará até o núcleo e se conectará ao DNA, ativando genes para transcrição. Quando há um aumento de colesterol, a proteína SCAP não transporta mais SREBP para o aparelho de golgi, cessando a ativação dos genes para transcrição de esteróis. (GOLDSTEIN *et al.*, 2002).

A proteína SREBP possui três isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2, sendo que todas estão presentes em células de mamíferos (BROWN & GOLDSTEIN, 1997). Segundo Horton e colaboradores (2002), a isoforma SREBP-1c ativa preferencialmente os genes para transcrição da síntese de ácidos graxos (via lipogênese) e não colesterol.

Ettinger e colaboradores (2004) realizaram um estudo com tumores que desenvolvem resistência ao tratamento com andrógenos, formando tumores independentes de andrógeno (IA). A hipótese foi que as células cancerosas desenvolvem um meio de sobrevivência ao tratamento, ativando a expressão de genes relacionados aos mecanismos de sobrevivência celular. Após as análises de tumores IA chegaram ao resultado de que as proteínas SREBP estavam super expressadas quando comparadas com tecidos normais, uma vez que sua função está diretamente relacionada a lipogênese, puderam concluir que a lipogênese

contribui para a sobrevivência das células tumorais, já que essas expressam proteínas importante para esse mecanismo metabólico.

1.4.2. Proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP)

A Proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP) possui papel importante na regulação do colesterol (OUYANG *et al.*, 2018). Brown e colaboradores (2017) intitularam a proteína SCAP como sendo uma proteína primordial em um esquema de *feedback* denominado o caminho da SREBP.

A SCAP, localizada na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) possui 8 domínios transmembranares e regula a ativação da SREBP (BROWN; GOLDSTEIN, 2009). Quando os níveis de colesterol estão baixos, a proteína SCAP escolta o SREBP para o complexo de Golgi, onde este é clivado em sua porção N-terminal e se ativa. A SREBP ativa migra para o núcleo promovendo a síntese de colesterol ao se ligar aos genes reguladores da mesma (KRYCER *et al.*, 2012). A SCAP pode ser definida como um sensor de esteróis, acompanhando a proteína SREBP para a realização da sua função quando há uma queda nos níveis de esteróis (HORTON *et al.*, 2002).

Um dos domínios da SCAP é responsável por detectar quando há um acúmulo de colesterol nas células, nessa situação esse domínio tem sua conformação alterada e o complexo SCAP/SREBP não mais migra para o complexo de Golgi a partir do RER. Por consequência disso, a SREBP não tem mais contato com as proteínas S1P ou S2P e o domínio bHLH-Zip não chega ao núcleo, diminuindo a ativação dos genes alvo, reduzindo a formação dos ácidos graxos e colesterol. (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; GOLDSTEIN *et al.*, 2002).

É possível observar a relação da proteína SCAP com o câncer através do estudo realizado por Cheng e colaboradores (2015), por meio de análises de *Western Blotting* constatou que a diminuição da expressão de SCAP reduziu a ação da SREBP, minimizando consideravelmente tumores em camundongos quando comparados com o grupo controle, a imagem abaixo mostra um esquema do processo de crescimento tumoral quando há a expressão da SCAP e, conseqüentemente SREBP (Figura 12).

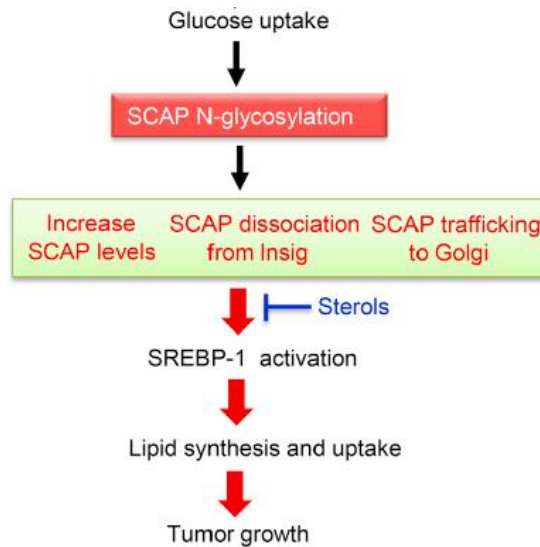


Figura 12. Cascata de sinalização SCAP-SREBP contribuindo para o crescimento tumoral (CHENG *et al.*, 2015).

1.4.3. Proteína integral lisossomal de membrana tipo-2 (LIMP-II)

A LIMP-II é uma glicoproteína transmembrana, codificada pelo gene SCARB2 (FUJITA *et al.*, 1999), composta por quatro domínios, sendo dois domínios transmembranares, um domínio luminal de 400 aminoácidos e um domínio citoplasmático de 20 aminoácidos (FEBBRAIO *et al.*, 2001), que tem função de receptor para a enzima glucocerebrosidase (GCCase), cuja função é metabolizar determinados lipídios, auxiliando sua passagem do retículo endoplasmático para os lisossomos (RECZEK *et al.*, 2007).

Para melhor compreensão da ligação da LIMP-II com a enzima GCCase, Zachos e colaboradores (2012) demonstraram que a estabilidade das proteínas LIMP-II e GCCase depende do pH dos compartimentos intracelulares. No retículo endoplasmático, cujo pH é neutro (7,2) a LIMP-II fica desprotonada, permitindo a conexão da GCCase. Uma vez que o complexo LIMP-II e GCCase chegam ao lisossomo (organela de pH ácido 4,7) a LIMP-II sofre protonação, causando a dissociação da GCCase para o lúmen do lisossomo (Figura 13) (ZACHOS *et al.*, 2012), para que possa realizar sua função metabolizando determinados lipídios (RECZEK *et al.*, 2007).

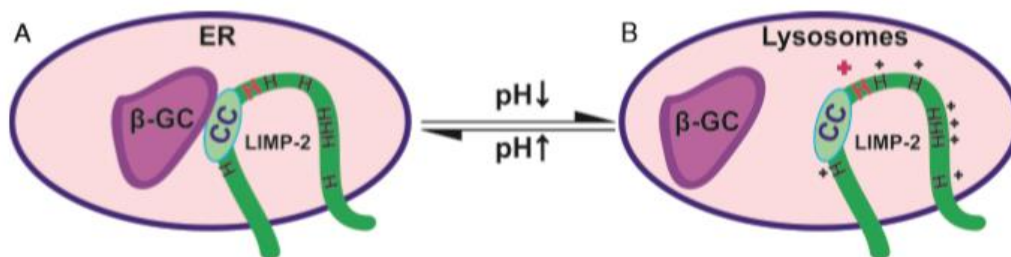


Figura 13. Representação da ligação LIMP-II e GCCase, no retículo endoplasmático, cujo pH é neutro a LIMP-II fica desprotonada e a GCCase consegue se ligar. No lisossomo a LIMP-II sofre protonação e a GCCase se dissocia, ficando no lúmen lisossomal (ZACHOS *et al.*, 2012).

Pussinen e colaboradores (2000) analisaram a relação do colesterol com a progressão do câncer e estabeleceram uma correlação positiva entre a LIMP-II e a progressão do câncer, uma vez que a LIMP-II é um receptor e contribui para a captação do colesterol exógeno.

1.4.4. Cluster de diferenciação 36 (CD36)

A CD36 é uma glicoproteína transmembrana, podendo ser chamada de glicoproteína IV, possui um grande domínio extracelular (GREENWALT *et al.*, 1992). Pode apresentar diversas localizações, como células endoteliais, células dendríticas, adipócitos, células musculares estriadas, células hematopoiéticas, superfície de plaquetas e macrófagos (KNOWLES *et al.*, 1984; OQUENDO *et al.*, 1989). A CD36 é um receptor para trombospondinas, que são moléculas encontradas em vertebrados com a função de inibir a angiogênese (ADAMS; LAWLER, 2011; BOUCK *et al.*, 1996), além de atuar como receptor de colágeno e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidado (RAC *et al.*, 2007).

Outra função importante da CD36 é que ela pode funcionar como reguladora do processo de transporte de ácidos graxos, uma vez que faz parte de uma família de proteínas que se ligam a eles, servindo como uma molécula de adesão (ABUMRAD *et al.*, 1993).

A CD36 foi imunolocalizada em amostras de tecido de 73 pacientes, destes, 32 tinham hiperplasia prostática benigna (HPB), 7 tinham neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) e 34 câncer, não houve diferenças significativas na expressão da CD36 tanto em HPB, NIP ou nos tecidos cancerosos, ou seja, essa proteína foi

expressa em todas as lesões prostáticas analisadas nesse estudo (VALLBO *et al.*, 2004).

Um estudo realizado por Hale e colaboradores (2014) demonstrou que a proteína CD36 pode ser utilizada como biomarcador para a malignidade de glioblastoma (GBM), analisando as células-tronco cancerosas (CSC) presentes no glioblastoma, foi identificado que a CD36 estava expressa nas CSC, indicando que essas células utilizam essa proteína para sua manutenção e, conseqüentemente, crescimento do tumor. Nesse estudo eles verificaram que a redução da CD36 levava a uma perda da capacidade de iniciação tumoral e da auto-renovação. As CSCs aumentaram quando expostas a lipoproteína de baixa densidade oxidada e foi verificado a presença de fosfolípidios oxidados ligantes de CD36 em GBM. Os autores concluíram com esse estudo que a CD36 se relaciona diretamente com o diagnóstico do paciente, servindo como um biomarcador.

1.5. Metabolismo lipídico e câncer

A relação da obesidade e o câncer vem sendo estudada há muitos anos. O Grupo de Trabalho sobre Avaliação de Estratégias Preventivas de Câncer, da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 2002, publicou um estudo considerando dados experimentais, epidemiológicos e clínicos com indivíduos com o índice de massa corporal (IMC) normal (magros), comparados com indivíduos sobrepesos e obesos, mostrando que a prevenção contra o ganho de peso reduz o risco do desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama (em mulheres na pós-menopausa), esôfago, rim e cólon (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, LYON, 2002).

O'Malley e colaboradores (2017) sugeriram que há um acúmulo considerável de lipídios em tecidos tumorais, quando comparados a tecidos saudáveis. Além disso, afirmaram que, no câncer de próstata, esses lipídios são de suma importância, uma vez que participam como fonte de energia para o crescimento celular, como fonte para a formação das membranas celulares (internas e externas) e, também, servem como precursores para a formação de esteroides.

Calle e colaboradores (2003) constataram um risco de morte elevado por câncer de próstata e estômago em homens cujo índice de massa corporal era elevado, e em mulheres também, sendo as mortes por câncer de ovário, colo do

útero e mama. Nos Estados Unidos, o sobrepeso tem sido associado à morte por câncer de 20% em mulheres e 14% em homens. O estudo conclui uma forte associação entre o peso elevado e as taxas de morte por cânceres.

Um estudo realizado por Fritz e colaboradores (2013), consistiu em desenvolver uma terapia para o câncer, essa terapia funciona bloqueando a síntese lipídica e, por consequência, fazendo com que as células acumulem intermediários considerados tóxicos, como malonil-coenzima A (malonil-CoA). Uma vez que as células cancerosas começaram a ter sua síntese de lipídios comprometida, desencadeia estresse oxidativo, levando essas células à morte.

Kobayashi e colaboradores (2008) estudaram os efeitos da gordura na dieta de camundongos Hi-Myc relacionando com o desenvolvimento de câncer de próstata. O grupo que recebeu a dieta com baixo teor de gordura teve 27% a menos de camundongos que apresentaram adenocarcinoma invasivo em comparação com grupo que recebeu uma dieta com alto teor de gordura. Houve também uma diferença significativa quanto às células epiteliais das lesões nos dois grupos, sendo que o grupo que recebeu a dieta com baixo teor de gordura apresentou menor quantidade de células proliferativas (21,7% versus 28,9%, $P < 0,05$).

Há diversos estudos que realizam a conexão entre o metabolismo lipídico e o câncer de próstata, mas ainda há muito a se entender desses processos, por conta disso despertou-se o interesse de estudar a correlação do câncer com o metabolismo lipídico e a influência de um pesticida nesse processo.

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo que os pesticidas organofosforados podem atuar como desreguladores endócrinos, interferindo inclusive no processo de metabolismo lipídico, e, conhecendo a correlação já estabelecida entre a carcinogênese e a lipogênese e, ainda, entre a desregulação endócrina e a carcinogênese, despertou-se o interesse em estudar a influência do pesticida DDVP sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico (SREBP, SCAP, LIMP-II e CD36) para melhor compreender o processo de carcinogênese prostática neste modelo experimental de indução química por MNU.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do praguicida DDVP sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico na próstata de ratos, após indução química por MNU.

3.2. Objetivos específicos

Classificar as lesões prostáticas, imunolocalizar e quantificar os marcadores moleculares envolvidos no metabolismo lipídico (SREBP, SCAP, LIMP-II e CD36) na próstata ventral de ratos.

4. REFERÊNCIAS

- ABUMRAD, N. A.; EL-MAGHRABIS, M. R.; AMRILL, E. *et al.* Cloning of a Rat Adipocyte Membrane Protein Implicated in Binding or Transport of Long-chain Fatty Acids That Is Induced during Preadipocyte Differentiation. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 17665-17668, 1993.
- ADAMS, J. C.; LAWLER, J. The Thrombospondins. **Cold. Spring Harb. Perspect Biol.** p. 1-29, 2011.
- ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre agrotóxicos.** Série trilha de campo. 2011.
- BEDIA, C.; DALMAU, N.; JAUMOT, J. Phenotypic malignant changes and untargeted lipidomic analysis of long-term exposed prostate cancer cells to endocrine disruptors. **Environ Res.** v. 140, p. 18–31, 2015.
- BENEDETTI, M.; ZONA, A.; BECCALONI, E. Incidence of Breast, Prostate, Testicular, and Thyroid Cancer in Italian Contaminated Sites with Presence of Substances with Endocrine Disrupting Properties. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v. 14, p. 355, 2017.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. Bioquímica (5ª Ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; p. 333-360, p. 739-767, 2004.
- BINUKUMAR, B. K.; BAL, A.; KANDIMALLA, R. *et al.* Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos. **Toxicology.** v. 270, p. 77-84, 2010.
- BOUCK, N.; STELLMACH V.; HSU, S. How tumors become angiogenic. **Adv. Cancer Res.** v. 69, p. 135–174, 1996.
- BOSLAND, M. C. Testosterone Treatment Is a Potent Tumor Promoter for the Rat Prostate. **Endocrinology.** v. 155(12), p. 4629-4633, 2014.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell.** v. 89, p. 331, 1997.
- BOTHAM, K. M. & MAYES, P. A. Cholesterol synthesis, transport & excretion. In: Murray, R. K., Granner, D. K. & Rodwell, V. W., **Harper's illustrated biochemistry.** USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; p. 230-240, 2006.
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. **J. Lipid. Res.** v. 50, p. 15–27, 2009.

BROWN, M. S., RADHAKRISHNAN, A., GOLDSTEIN, J. L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. **Annu. Rev. Biochem.** v. 87:1, p. 1–1.25, 2017.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J. Clin. Invest.** v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C. M. D.; WALKER-THURMOND, K. *et al.* Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **N. Engl. J. Med.** v. 348(17), p. 1625-1638, 2003.

CHALUBINSKI, M.; KOWALSKI, M. L. Endocrine disrupters–potential modulators of the immune system and allergic response. **Allergy.** v. 61, n. 11, p. 1326-1335, 2006.

CHAN, C. P.; HUFF, J.; HASEMAN, K. J. *et al.* Carcinogenesis Studies of Dichlorvos in Fisher Rats and B6C3F1 Mice. **Jpn. J. Cancer Res.** v. 82, p. 157-164, 1991.

CHENG, C.; RU, P.; GENG, F. *et al.* Glucose-Mediated N-glycosylation of SCAP Is Essential for SREBP-1 Activation and Tumor Growth. **Cancer Cell.** v. 28, p. 569–581, 2015.

CURRIE, E.; SCHULZE, A.; ZECHNER, R. *et al.* Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell. Metab.** v. 18(2), p.153–161, 2013.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 118, p. 246–251, 2009.

ETTINGER, S. L., SOBEL, R. WHITMORE, T. G., *et al.* Dysregulation of Sterol Response Element-Binding Proteins and Downstream Effectors in Prostate Cancer during Progression to Androgen Independence. **Cancer Res.** v. 64, p. 2212–2221, 2004.

FEBBRAIO, M.; HAJJAR, D. P.; SILVERSTEIN, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. **J. Clin. Invest.** v. 108(6), p. 785-791, 2001.

FINE S. W.; REUTER, V. E. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. **Histopathology.** v. 60, p. 142–152, 2012.

FRITZ, V.; BENFODDA, Z.; HENRIQUET, C. *et al.* Metabolic intervention on lipid synthesis converging pathways abrogates prostate cancer growth. **Oncogene.** v. 32, p. 5101–5110, 2013.

FUJITA, H.; SAEKI, M.; YASUNAGA, K. *et al.* In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-Motif). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 255, p. 54-58, 1999.

GAN, Q.; SINGH, R. M.; WU, T. *et al.* Kinetics and mechanism of degradation of dichlorvos in aqueous solutions containing reduced sulfur species. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 5717-5723, 2006.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GCO). **Prostate**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home/> Acesso em: 16 de setembro de 2019.

GOLDSTEIN, J. L., RAWSON, R. B., BROWN, M. S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. **Arch. Biochem. Biophys.** p. 397-139, 2002.

GONG, Y.; DOU, L. J.; LIANG, J. Link between obesity and cancer: role of triglyceride/free fatty acid cycling. **Eur. Rev. Med. Pharmacol.** v. 18, p. 2808-2820, 2014.

GREENWALT, D. E.; LIPSKY, R. H.; OCKENHOUSE, C. F. *et al.* Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood.** v. 80, p. 1105– 1115, 1992.

GUPTA, S.; LI, J.; KEMENY, G. *et al.* Whole genomic copy number alterations in circulating tumor cells from men with abiraterone or enzalutamide resistant metastatic castration-resistant prostate cancer, Clin. **Cancer Res.** 2016.

HALE, J. S.; OTVOS, B.; SINYUK, M. *et al.* Cancer Stem Cell-Specific Scavenger Receptor CD36 Drives Glioblastoma Progression. **Stem Cells.** v. 00, p. 000–000, 2014.

HAYASHI, N.; SUGIMURA, Y.; KAWAMURA, J. *et al.* Morphological and Functional Heterogeneity in the Rat Prostatic Gland. **Biol. Reprod.** v. 45, p. 308321, 1991.

HICKS, R. M.; WAKEFIELD, J. St J. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea I. Histology. **Chem. Biol. Interact.** v. 5(2), p. 139-152, 1972.

HICKS, R. M. Multistage carcinogenesis in the urinary bladder. **Brit. Med. Bull.** v. 36(1), p. 39-46, 1980.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M, S. SREBPs: Transcriptional Mediators of Lipid Homeostasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** v.67, p. 491-498, 2002.

HUANG, H.; ZHAOA, C.; JI, A. Y. *et al.* Preparation, characterization and application of p-tert-butyl-calix[4]arene-SBA-15 mesoporous silica molecular sieves. **J. Hazard. Mater.** v. 178, p. 680-685, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/> Acesso em: 07 de outubro de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Próstata.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata/> Acesso em: 17 de fevereiro de 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Handbooks of Cancer Prevention. Weight Control and Physical Activity.** Disponível em <https://www.iarc.fr/media-centre/> Acesso em 18 de setembro de 2019.

KELCE, W. R.; STONE, C. R.; LAWS, S. C. *et al.* Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. **Nature.** v. 375, p. 581-5, 1995.

KNOWLES, D. M.; TOLIDJIAN, B.; MARBOE, C. *et al.* Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKMI and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. **J. Immunol.** v. 732, p. 2170-2173, 1984.

KOBAYASHI, N.; BARNARD, R. J.; SAID, J. *et al.* Effect of Low-Fat Diet on Development of Prostate Cancer and Akt Phosphorylation in the Hi-Myc Transgenic Mouse Model. **Cancer Res.** v. 68, p. 3066-3073, 2008.

KRYCER, J. R.; PHAN, L. BROWN, A. J. A key regulator of cholesterol homeostasis, SREBP-2, can be targeted in prostate cancer cells with natural products. **Biochem. J.** v. 446, p. 191-201, 2012.

KUEMMERLE, N. B., RYSMAN, E., LOMBARDO, P. S. *et al.* Lipoprotein Lipase Links Dietary Fat to Solid Tumor Cell Proliferation. **Mol Cancer Ther.** v. 10(3), p. 427-436, 2011.

KUO, H. C.; YANG, N. S.; KUO, L. P. *et al.* Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. **Kaohsiung J. Med. Sci.** v. 28, p. s37s42, 2012.

LIN, Y.; WEI, J.; LI, Y. *et al.* Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 301, p. 527-538, 2011.

LOUBIÈRE, C.; GOIRAN, T; LAURENT, K. *et al.* Metformin-induced energy deficiency leads to the inhibition of lipogenesis in prostate cancer cells. **Oncotarget.** v. 6(17), p. 15652- 15661, 2015.

MARKER, P. C.; DONJACOUR, A. A.; DAHIYA, R. *et al.* Hormonal, cellular and molecular control of prostate developmental. **Develop. Biol.** v. 253, p. 165-74, 2003.

MATTISON, D. R. The mechanisms of action of reproductive toxins. **Am J Ind Med.** v. 4, p. 65-79, 1983.

MCNEAL, J. E. The prostate gland: morphology and pathobiology. **Monogr. Urol.** v. 4, p. 3–37, 1983.

MEDEIROS, R. M. P. **Caracterização preliminar dos níveis de colesterol plasmático em canídeos em função do sexo, raça, idade e condição corporal.** Dissertação de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

MILLS, P. K.; YANG, R. Prostate Cancer Risk in California Farm Workers. **JOEM.** v. 45, p. 249-258, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Ranking da FAO mostra que uso de defensivos no Brasil é menor que em diversos países da Europa.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ranking-da-fao-mostra-que-uso-de-defensivos-no-brasil-e-menor-que-em-diversos-paises-da-europa?fbclid=IwAR3p5e9f9HyvJOZEqK4apeFb5wQYOEvtAcGyw6b0grHqZJ4aC8uthCl4o/> Acesso em: 07 de outubro de 2019.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, (5th Ed.). New York: W. H. Freeman and Company; p. 343-389, p. 831-850, 2008.

NEMETH, J. A.; LEE, C. Prostatic Ductal System in Rats: Regional Variation in Stromal Organization. **The Prostate.** v. 28, p. 124-128, 1996.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, 474.

OHSHIMA, M.; WARD, J. M. Promotion of N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Thyroid Tumors by Iodine Deficiency in F344/NCr Rats. **JNCI.** v. 73(1), p. 289-296, 1984.

O'MALLEY, J.; KUMAR, R.; KUZMIN, A. N. *et al.* Lipid quantification by Raman microspectroscopy as a potential biomarker in prostate cancer. **Cancer Lett.** v. 397, p. 52-60, 2017.

OQUENDO, P.; HUNDT, E.; LAWLER, J. *et al.* CD36 Directly Mediates Cytoadherence of Plasmodium falciparum Parasitized Erythrocytes. **Cell.** v. 58, p. 95-101, 1989.

OUYANGA, N.; GANA, H.; HEB, Q. *et al.* Dysfunction of cholesterol sensor SCAP promotes inflammation activation in THP-1 macrophages. **Exp. Cell Res.** p. 1-8, 2018.

PEIXOTO, A. R.; SANTOS, T. M.; BRANDT, J. Z. Gestational and Lactational Exposition to Di-Nbutyl-phthalate (DBP) Increases Inflammation and Preneoplastic Lesions in Prostate of Wistar Rats After Carcinogenic N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) Plus Testosterone Protocol. **Environ Toxicol.** p. 1185-1195, 2015.

PLETSA, V.; STEENWINKEL, M. J.; DELFT, J. H. *et al.* Induction of somatic mutations but not methylated DNA adducts in lambda_{lacZ} transgenic mice by dichlorvos. **Cancer Letter.** v. 146(2), p. 155-160, 1999.

POLARI, L.; YATKIN, E.; CHACON, M. G. M. *et al.* Weight gain and inflammation regulate aromatase expression in male adipose tissue, as evidenced by reporter gene activity. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 412, p. 123-130, 2015.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr.** v. 12, p. 1-27, 1963.

PRINS, S. G.; HUANG, L.; BIRCH, L. *et al.* The Role of Estrogens in Normal and Abnormal Development of the Prostate Gland. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1089, p. 1–13, 2006.

PUSSINEN, P. J., KARTEN, B., WINTERSPERGER, A. *et al.* The human breast carcinoma cell line HBL-100 acquires exogenous cholesterol from high-density lipoprotein via CLA-1 (CD-36 and LIMP-II analogous 1)-mediated selective cholesteryl ester uptake. **Biochem. J.** v. 349, p. 559-566, 2000.

RAC, M. E.; SAFRANOW, K.; PONCYLJUSZ, W. Molecular Basis of Human CD36 Gene Mutations. **Mol. Med.** v. 13(5-6), p. 288-296, 2007.

RECZEK, D.; SCHWAKE, M.; SCHRÖDER, J. *et al.* LIMP-2 Is a Receptor for a Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. **Cell.** v. 131, p. 770-783, 2007.

ROY-BURMAN, P.; WU, H; POWELL W. C. *et al.* Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocr-Relat Cancer**. v. 11, p. 225-254, 2004.

SCHUG, T. T.; JANESICKB, A.; BLUMBERGB, B. *et al.* Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J. Steroid Biochem**. v. 127, p. 204-215, 2011.

SCHWENK, R. W.; HOLLOWAY, G. P.; LUIKEN, J. J. F. P. *et al.* Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transportes. **Prostag. Leukotr. ess**. v. 82, p. 149–154, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2020. **Ca. Cancer J. Clin**. v. 70, p. 7–30, 2020.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian. J. Androl**. v. 10(1), p. 134–145, 2008.

SLAYTER, M. V.; ANZANO, M. A.; KADOMATSU, K. *et al.* Histogenesis of Induced Prostate and Seminal Vesicle Carcinoma in Lobund-Wistar Rats: A System for Histological Scoring and Grading. **Cancer Res**. v. 54, p. 1440-1445, 1994.

SOMIA, E. M.; MADIHA, F. Pathological effects of dichlorvos and fenitrothion in mice. **Pathol Res Pract**. v. 208, p. 286-291, 2012.

STEINBERG, G. D.; BRENDLER, C. B.; ICHIKAWA, T. *et al.* Characterization of an N-Methyl-N-nitrosourea-induced Autochthonous Rat Bladder Cancer Model. **Cancer Res**. v. 50, p. 6668-6674, 1990.

TAVASSOLI, P.; SNOEK, R.; RAY, M. *et al.* Rapid, Non-Destructive, Cell-Based Screening Assays for Agents That Modulate Growth, Death, and Androgen Receptor Activation in Prostate Cancer Cells. **The Prostate**. v. 67, p. 416-426, 2007.

U.S. Environmental Protection Agency. Interim Reregistration Eligibility Decision for Dichlorvos (DDVP). Washington D.C., p. 136-137, 2006.

U.S. Public Health Service, Hazardous Substance Data Bank, Washington DC, 5, 1995.

VALLBO, C.; WANG, W.; DAMBER, J. E. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate câncer. **Bju international**. v. 9 3, p. 1339–1343, 2004.

VOET, D. & VOET, J. G. **Biochemistry** (4th Ed.). USA: John Wiley & Sons, Inc, p. 336-459, p. 975-993, 2011.

WHORTON, D.; KRAUSS, R. M.; MARSHALL, S. *et al.* Infertility in male pesticide workers. **Lancet**. v. 2, p. 1259–61, 1977.

ZACHOS, C.; BLANZ, J.; SAFTIG, P. *et al.* A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand β -Glucocerebrosidase. **Traffic**. v. 13, p. 1113–1123, 2012.

ZAIDI, N., LUPIEN, L., KUEMMERLE, N. B. *et al.* Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. **Progress in lipid research**. v. 52, n. 4, p. 585-589, 2013.

ZARBL, H.; SUKUMAR, S.; ARTHUR, A. V. *et al.* Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by *N-nitroso-N-methylurea* during initiation of mammary carcinogenesis in rats. **Nature**. v. 315, p. 382-385, 1985.

ZHANG, Q.; QU, X.; WANG, W. Mechanism of OH-initiated atmospheric photooxidation of dichlorvos: a quantum mechanical study. **Environ. Sci. Technol.** v. 41, p. 6109-6116, 2007.

5. CAPÍTULO 1

DICLORVÓS ASSOCIADO À INDUÇÃO QUÍMICA POR MNU PROMOVE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO LIPÍDICO NA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS

RESUMO

Objetivo: Este estudo buscou avaliar a influência do praguicida DDVP sobre os marcadores moleculares do metabolismo lipídico na próstata de ratos, após indução química por MNU.

Material e métodos: Foram utilizados 32 ratos da linhagem *Fischer 344*, com idade de 90 dias. Os ratos foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Controle, Grupo DDVP, Grupo MNU e Grupo MNU+DDVP. Para indução química, os grupos MNU e MNU+DDVP foram inoculados com MNU a 15 mg/kg, seguido de injeções subcutâneas diárias de 2,5 mg/kg de cipionato de testosterona durante 20 dias. Os animais dos grupos DDVP e MNU+DDVP, de 120 a 240 dias de idade receberam a dieta basal suplementada com 10 mg/kg de DDVP. Foram feitas análises histopatológica, imuno-histoquímica e *Western Blotting* da próstata ventral dos ratos.

Resultados: Na análise histopatológica, os grupos MNU e MNU+DDVP apresentaram 100% de incidência de hiperplasia epitelial. Para a avaliação morfo métrico-estereológica, o grupo MNU+DDVP apresentou aumento do volume relativo de epitélio quando comparado com o grupo controle. As proteínas SREBP e CD36 foram encontradas nas células epiteliais luminais na região do Aparelho de Golgi, a SCAP principalmente na região apical, e, a LIMP II dispersa no citoplasma como aglomerados. Quanto a quantificação das proteínas, a LIMP II apresentou maior índice de densitometria óptica no grupo MNU+DDVP, indicando que a associação do DDVP ao MNU é capaz de promover alterações no metabolismo lipídico. As proteínas SREBP e CD36 tiveram maior índice de densitometria óptica no grupo MNU+DDVP, porém, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A SCAP apresentou uma diminuição no índice de densitometria óptica no grupo MNU+DDVP, mas, também sem diferenças estatisticamente significativas.

Conclusão: Assim, observamos que o pesticida DDVP em baixas concentrações associado a indução química com MNU foi capaz de promover alterações morfológicas, bem como, no metabolismo lipídico na próstata ventral de ratos.

Palavras-chaves: Diclorvós. Metabolismo lipídico. SREBP. SCAP. LIMP-II. CD36. Câncer de próstata.

5.1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula sexual acessória do sistema genital masculino, responsável pela secreção e armazenamento de grande parte dos componentes do líquido seminal (PRICE, 1963). Essa glândula pode apresentar algumas patologias,

como a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e o Câncer de Próstata (ELLEM & RISBRIDGER *et al.*, 2009). No Brasil, de acordo com os dados estatísticos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência do câncer de próstata tem aumentado nos últimos anos. Os dados mostram 65.840 novos casos em 2020, sendo o segundo câncer mais comum entre os homens.

Atualmente, uma das principais causas de câncer, incluindo o câncer de próstata, é a exposição à contaminantes ambientais derivados de fontes industriais e agrícolas, como os pesticidas organofosforados, que podem atuar como desreguladores endócrinos alterando a homeostase mantida pelos hormônios (KUO *et al.*, 2012), bem como interferindo no metabolismo lipídico e, conseqüentemente, no desenvolvimento de lesões prostáticas (BEDIA *et al.*, 2015).

Esses pesticidas organofosforados, apesar de trazerem grandes prejuízos ao meio ambiente e à saúde dos seres humanos, são extensamente utilizados, principalmente no controle de insetos, devido ao baixo custo e alta eficácia (GAN *et al.*, 2006). Dentre os organofosforados, destaca-se o Diclorvós (DDVP), agente mutagênico e carcinogênico para seres humanos, altamente tóxico por inalação, absorção cutânea e ingestão (US PUBLIC HEALTH SERVICE, 1995; SOMIA *et al.*, 2012) que já teve sua ação como desregulador endócrino descrita por Tavassoli e colaboradores (2007).

Além da correlação já estabelecida entre o papel como desregulador endócrino dos organofosforados e o câncer de próstata (MILLS & YANG, 2003), Gong e colaboradores (2014) correlacionam a oncogênese e a lipogênese, demonstrando que a obesidade pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres como o de próstata.

Há diversas proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, muitas delas com função de receptores, como a proteína integral lisossomal de membrana tipo-2 (LIMP-II) e cluster de diferenciação 36 (CD36), que pertencem a família de receptores denominada receptores “*scavenger*” de classe B (FEBBRAIO *et al.*, 2001). Os receptores de lipídios são essenciais para que a célula capte e distribua o colesterol (SCHWENK, 2010).

Outras proteínas que participam da lipogênese é a SCAP (proteína ativadora da clivagem de SREBP), que possui papel importante na regulação do colesterol (OUYANG *et al.*, 2018), e, as proteínas de ligação a elementos reguladores de

esterol (SREBPs) que são uma família de fatores de transcrição capazes de ativar genes responsáveis pela síntese e apreensão de ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol (HORTON *et al.*, 2002).

O'Malley e colaboradores (2017) sugeriram que há um acúmulo considerável de lipídios em tecidos tumorais. Além disso, no câncer de próstata, esses lipídios são de suma importância, pois participam como fonte de energia para o crescimento celular, para a formação das membranas celulares e servem como precursores para a formação de esteroides.

Portanto, o objetivo desse estudo foi classificar as lesões prostáticas, imunolocalizar e quantificar os marcadores moleculares do metabolismo lipídico como LIMP II, CD36, SCAP e SREBP na próstata ventral de ratos em situação controle e após exposição ao DDVP associado ou não a indução química por MNU.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Modelo animal

Foram utilizados 32 ratos da linhagem *Fischer 344* com 90 dias de idade, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências, UNESP Câmpus de Bauru-SP, em condições ambientais controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e circulação contínua de ar.

5.2.2. Grupos experimentais

Foram formados, aleatoriamente, 4 grupos experimentais com 8 animais em cada: Grupo Controle (Sham); Grupo DDVP; Grupo MNU e Grupo MNU+DDVP. Os animais de todos os grupos foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/kg intra-peritonal) e Cloridrato de cetamina 10% (50mg/kg, intra-peritonal) antes da realização do procedimento cirúrgico.

Aos 90 dias de idade, foi realizada uma incisão suprapúbica para a inoculação de MNU ou de citrato de sódio na cápsula da próstata ventral dos ratos. Nos animais dos grupos Controle e DDVP, a inoculação foi de citrato de sódio 1M, pH 6,8 (dilúente do MNU) para a simulação da indução com o MNU. Nos animais

dos grupos MNU e MNU+DDVP, a inoculação foi de MNU na dose de 15 mg/Kg dissolvida em citrato de sódio (1M pH 6,8) para indução química. Após o procedimento cirúrgico os animais de todos os grupos experimentais receberam Paracetamol (200mg/kg) diluídos na água do bebedouro durante 5 dias para analgesia (80µg/mL).

Após a administração do MNU, os animais dos grupos MNU e MNU+DDVP receberam injeções subcutâneas diárias de 2,5mg/Kg de Cipionato de Testosterona (Deposteron-Novaquímica, São Paulo, Brasil) por 20 dias (Adaptado de FAVARO, 2014).

Os animais dos grupos DDVP e MNU+DDVP receberam ração basal até os 120 dias de idade, período em que foi realizada a indução de lesões (inoculação de MNU e administração de Cipionato de testosterona). A partir 120 dias de idade até o momento da eutanásia, os animais destes grupos passaram a receber ração basal enriquecida com 10 mg/Kg de DDVP, concentração correspondente ao LOAEL (*lowest observed adverse effect level*), de acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1998).

Todos os protocolos seguiram os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a regulamentação estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

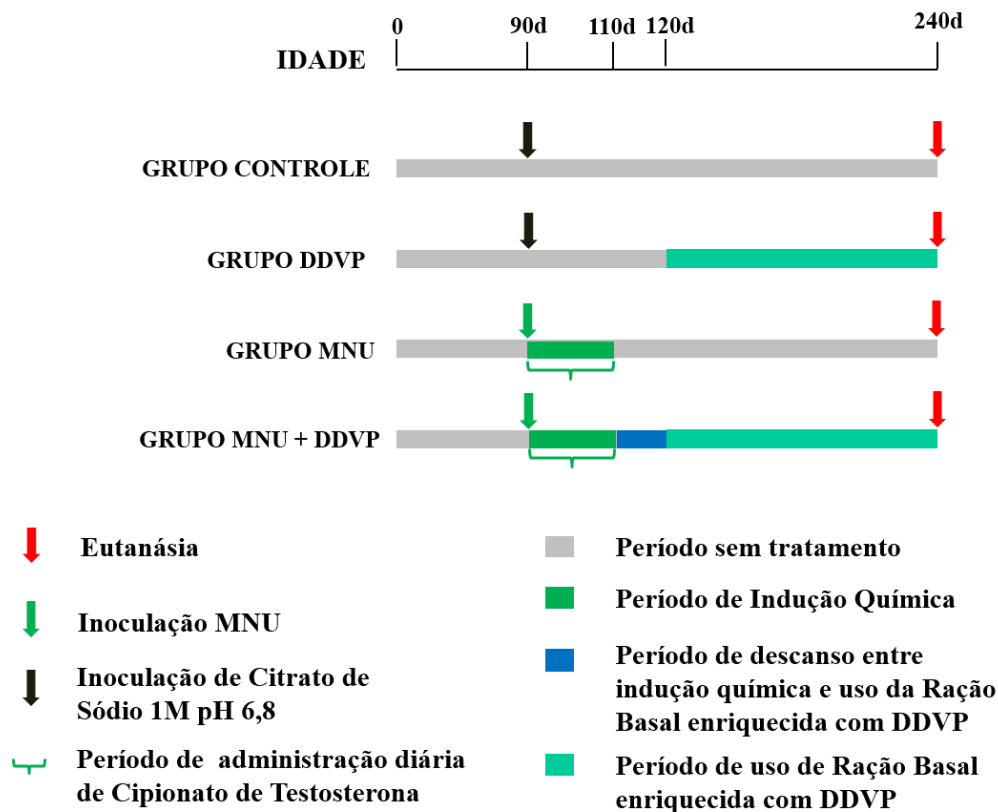


Figura 14. Diagrama dos Grupos Experimentais.

5.2.3. Coleta do material biológico

Quando os animais atingiram 240 dias de idade, a indução da morte foi feita com aplicação de solução-anestésica com Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/kg intra-peritonal) e Cloridrato de Cetamina 10% (50mg/kg, intra-peritonal), seguida por decapitação. Após a indução de morte, através de laparotomia abdomino-pélvica, amostras da próstata ventral de todos animais foram coletadas.

O lobo direito da próstata ventral foi utilizado para a realização de cortes histológicos e o lobo esquerdo da próstata ventral foi colocado em criotubo e mantido em biofreezer a -80°C , para posterior análise de *Western Blotting*.

5.2.4. Avaliação dos dados biométricos

Ao longo do experimento, os animais foram pesados semanalmente e foi feita uma avaliação da quantidade de ração consumida por semana para cálculo de peso médio e consumo médio de ração por grupo. No dia da coleta, a próstata ventral de cada animal também foi pesada, para o cálculo do peso médio do órgão por grupo e peso relativo (PR) entre peso da próstata e peso do animal.

5.2.5. Análise histopatológica

Os cortes histológicos desparafinizados foram corados por hematoxilina e eosina. Foi feita análise histopatológica para classificação das lesões encontradas nos grupos experimentais com metodologia segundo Shappel *et al.* (2004) e adaptação de Pinho (2019) para Bosland *et al.* (1990), Shappel *et al.* (2004) e Gonçalves *et al.* (2013). Foram consideradas as seguintes lesões:

- a) hiperplasia epitelial (aumento da população celular com estratificação, sem atipia);
- b) atrofia (retração do epitélio com redução do citoplasma secretório);
- c) inflamação focal periacinar (presença de infiltrado de células inflamatórias);
- d) atipia celular com presença de inclusões citoplasmáticas;
- e) metaplasia com hiperplasia estromal (alteração do padrão do epitélio original sem alteração proliferativa, com aumento do estroma adjacente).

Foi avaliada a incidência das lesões, isto é, a porcentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão histopatológica para cada grupo experimental. Para isso, foi considerada a presença ou ausência de lesão após análise de cortes histológicos de duas diferentes profundidades de tecido prostático por animal.

5.2.6. Análise morfométrico-estereológica

Imagens das lâminas coradas com Hematoxilina-eosina também foram utilizadas para avaliação morfométrico-estereológica descrita por Weibel (1978) utilizando uma grade de 168 pontos. Foram utilizados 10 campos por animal obtidos aleatoriamente com objetiva de 20x em microscópio óptico para essa análise. Desta forma, obteve-se o volume relativo dos compartimentos da próstata: epitélio, estroma e lúmen.

5.2.7. Análise imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, os cortes histológicos também foram desparafinizados e a técnica foi padronizada de acordo com o protocolo do fabricante para cada anticorpo (protocolo completo em anexo 6.1).

5.2.8. Análise de Western Blotting

Para as análises de *Western Blotting*, foi feita a extração de proteínas a partir das amostras do lobo esquerdo da próstata ventral, seguindo o protocolo do kit *Illustra TriplePrep* (GE Healthcare). Em seguida, foi feita a quantificação de proteínas pelo micrométodo de Bradford.

Para eletroforese, foram aplicados 50µg de proteínas de cada amostra em Amersham ECL Gel e realizada corrida eletroforética a 120V por 2h para separação das proteínas de acordo com o peso molecular.

Após a realização da eletroforese, os “spots” correspondentes às proteínas foram eletrotransferidos para uma membrana imobilizadora de PVDF. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora e 30 minutos ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent a 5% e incubada overnight a 4°C com os anticorpos primários (SREBP, SCAP, LIMP II, CD36 e β-actina). Em seguida, a membrana foi lavada em tampão TBST (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) 5 vezes por 5 minutos com agitação e incubada com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase durante 1h30 a temperatura ambiente, conforme o antígeno pesquisado. Após a lavagem em tampão TBST (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) 5 vezes por 5 minutos com agitação, as membranas foram lavadas e inseridas no fotodocumentador (G:BOX, Syngene) e a reação foi revelada utilizando substrato quimioluminescente para Amersham ECL Prime (RPN2232 – GE Healthcare Life Sciences).

A análise dos resultados foi feita através da verificação da reação positiva ou ausência das bandas, seguido de fotodocumentação da membrana. A intensidade da banda foi quantificada através do índice de densitometria óptica (IDO) relativo à intensidade de β-actina (marcador celular endógeno) realizado no software *GeneSys* (GeneTool, Syngene) (protocolo completo em anexo 6.2).

5.2.9. Análise estatística

Os dados de avaliação biométrica e os valores de densitometria óptica relativa, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey com 5% de significância.

Os valores de incidência de lesões foram submetidos a teste exato de Fisher com 5% de significância e a análise morfométrico-estereológica foi submetida a teste t com 5% de significância.

Todos os testes foram realizados através do software *Prism 8.0* (GraphPad).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Dados biométricos

Nas análises dos dados biométricos não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais para os parâmetros peso corpóreo dos animais, peso da próstata ventral, peso relativo e consumo semanal de ração (tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão do peso corpóreo final dos animais, peso da próstata ventral, peso relativo e consumo semanal de ração.

	CONTROLE	DDVP	MNU	MNU+DDVP
Peso corpóreo final dos animais	364 ± 24,74	366,5 ± 23,81	363,62 ± 31,35	363,75 ± 12,96
Peso da próstata ventral	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,04
Peso relativo	5,78 ± 0,83	6,27 ± 1,44	7,48 ± 1,34	7,28 ± 1,40
Consumo semanal de ração	124 ± 10,15	119,94 ± 10,01	129,91 ± 10,53	127,34 ± 6,44

5.3.2. Análise histopatológica da próstata ventral

Na análise histopatológica da próstata ventral, verificamos ácinos prostáticos normais com lúmen amplo, com epitélio simples colunar baixo, cujos núcleos apresentaram polaridade basal, apoiado sobre estroma fibromuscular vascularizado periacinar/interacinar nos quatro grupos experimentais (figura 15 a e b).

Os quatro grupos experimentais apresentaram as seguintes lesões: atipia celular (algumas regiões do epitélio apresentaram inclusões citoplasmáticas) (figura 15 c e d), atrofia (figura 15 e e f), hiperplasia epitelial (figura 16 a e b), presença de

infiltrados inflamatórios (figura 16 c e d) e metaplasia com hiperplasia estromal (figura 16 e, f, g e h).

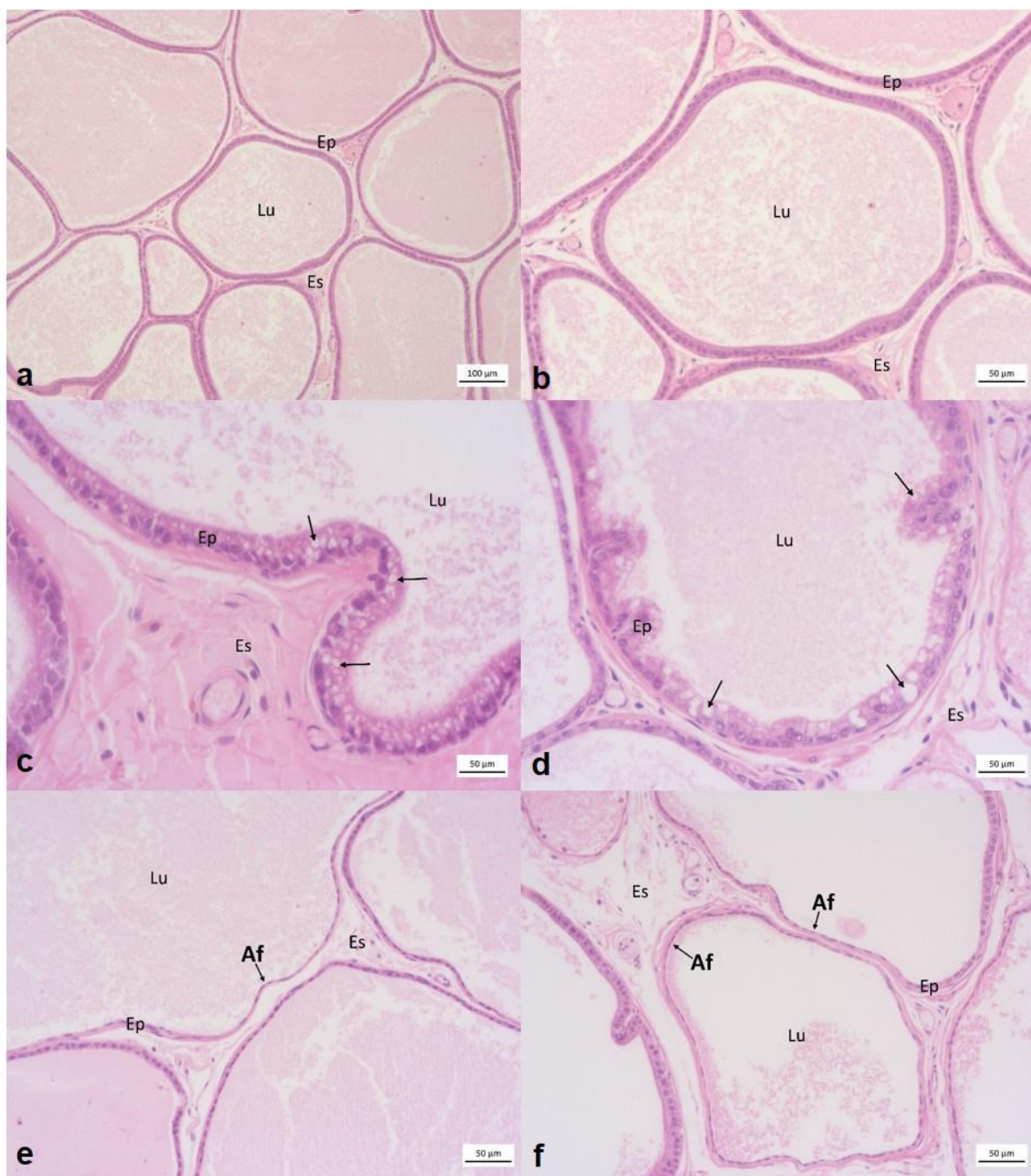


Figura 15. Cortes histológicos da próstata ventral, corados com hematoxilina-eosina. a e b grupo Controle, c e d grupo MNU (as setas indicam inclusões citoplasmáticas, que são alterações no padrão normal do epitélio prostático), e e f grupo MNU (as setas indicam atrofia epitelial, que são alterações no padrão normal do epitélio prostático). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio), Af (atrofia).

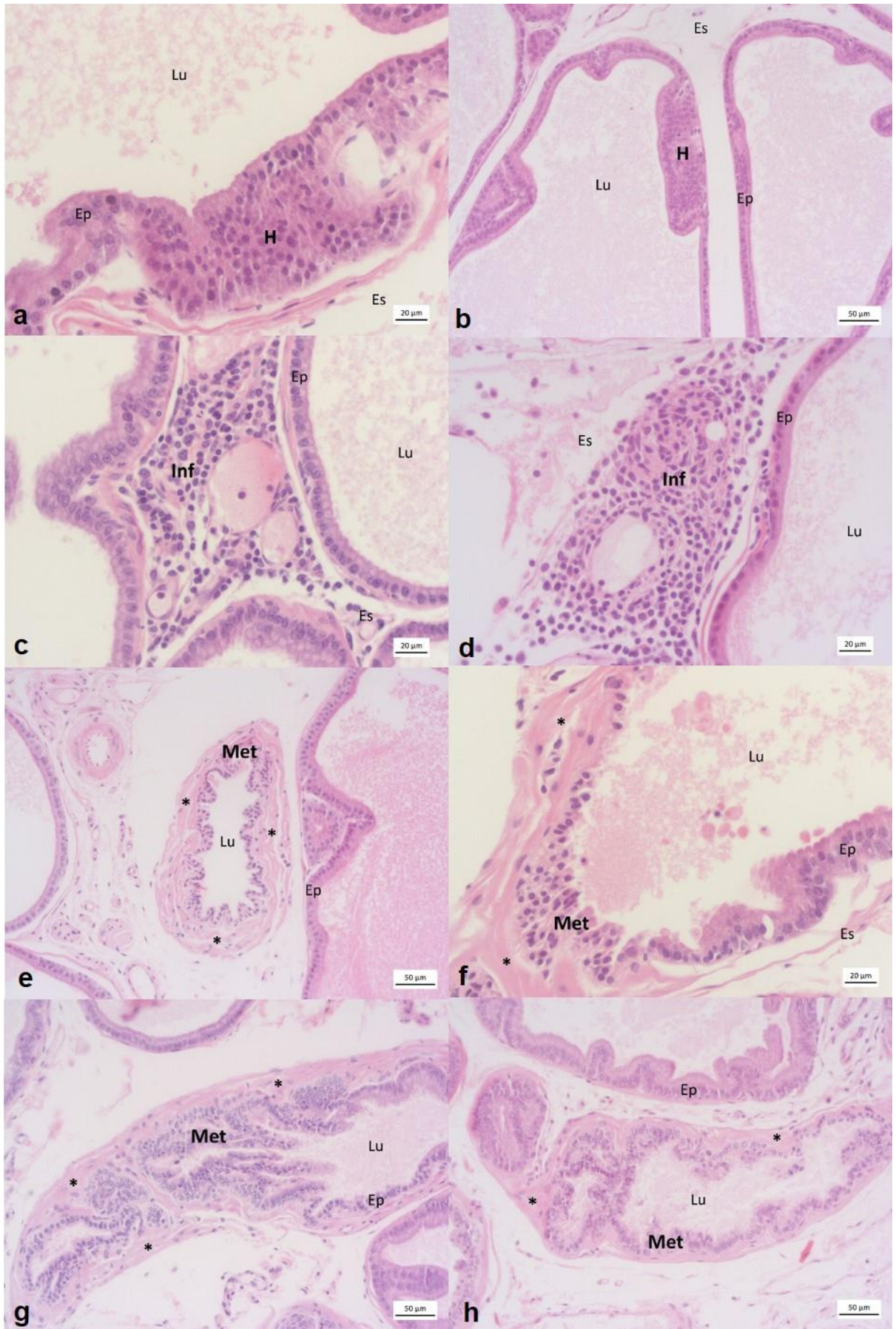


Figura 16. Cortes histológicos da próstata ventral, corados com hematoxilina-eosina. a Grupo MNU+DDVP e b Grupo MNU, c Grupo DDVP e d Grupo MNU, e e f Grupo MNU+DDVP, g e h do Grupo DDVP. Abreviaturas: Ep (epitélio), Lu (lúmen), Es (estroma), H (hiperplasia), Inf (inflamação periacinar), Met (metaplasia). Os asteriscos (*) representam hiperplasia estromal.

Com a análise histopatológica, foi possível avaliar a incidência das lesões prostáticas nos grupos (tabela 2).

Tabela 2. Incidência das lesões prostáticas por grupo.

Lesões	Controle	DDVP	MNU	MNU+DDVP
Hiperplasia epitelial	33,3%	25,0%	100,0%	100,0%
Inflamação	33,3%	12,5%	12,5%	0,0%
Atrofia	50,0%	87,5%	87,5%	50,0%
Inclusões citoplasmáticas	16,7%	12,5%	12,5%	25,0%
Metaplasia com hiperplasia estromal	66,7%	62,5%	50,0%	62,5%

É possível observar que os grupos MNU e MNU+DDVP tiveram 100% da lesão do tipo hiperplasia epitelial, sendo que o grupo que menos apresentou essa lesão foi o grupo DDVP.

Quanto a inflamação, o grupo que mais apresentou essa lesão foi o controle, e no grupo MNU+DDVP não foi observado focos inflamatórios. Em relação a atrofia, os grupos controle e MNU+DDVP mostraram uma incidência de 50% e os grupos DDVP e MNU 87,5%.

Com relação a atipia celular (inclusões citoplasmáticas), o grupo que mais apresentou foi o grupo MNU+DDVP (25%), em seguida o grupo controle (16,7%) e os grupos DDVP e MNU obtiveram a mesma porcentagem com relação a essa lesão (12,5%).

A lesão Metaplasia com hiperplasia estromal foi mais frequente no grupo controle (66,7%), os grupos DDVP e MNU+DDVP tiveram a mesma incidência (62,5%), e, o grupo que menos teve esse tipo de lesão foi o grupo MNU (50%).

O gráfico abaixo (figura 17) mostra a incidência de hiperplasia epitelial, houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e MNU, controle e MNU+DDVP e entre os grupos DDVP e MNU, DDVP e MNU+DDVP.

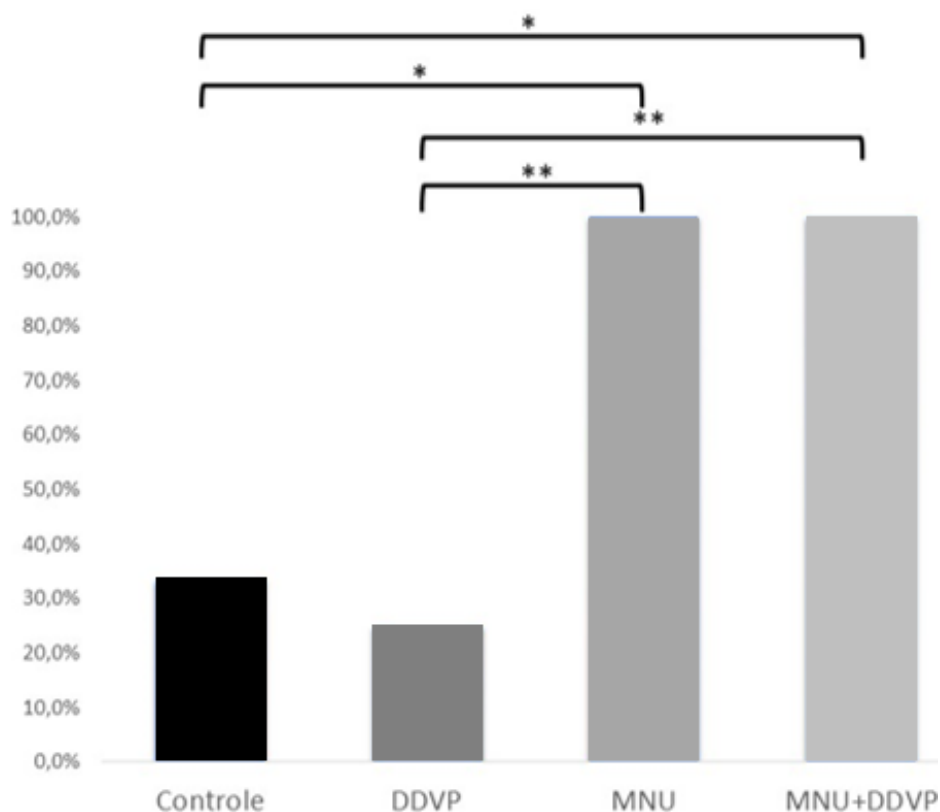


Figura 17. Incidência de hiperplasia entre os quatro grupos experimentais. * $p=0,0150$ e ** $p=0,0070$.

Para a avaliação morfométrico-estereológica, foi possível observar aumento do volume relativo de epitélio no grupo MNU+DDVP quando comparado com o grupo controle. A tabela 3 contém a média e o desvio padrão do volume relativo do epitélio, lúmen e estroma para os quatro grupos experimentais.

Tabela 3. Média e o desvio padrão do valor relativo do epitélio, lúmen e estroma para os quatro grupos experimentais.

	Controle	DDVP	MNU	MNU+DDVP
VR do epitélio (%)	20,67±2,70 ^a	25,54±5,03 ^{ab}	21,99±6,05 ^{ab}	29,16±8,82 ^b
VR do lúmen (%)	63,32±5,05	58,30±7,87	64,01±9,44	58,39±8,98
VR do estroma (%)	16,00±4,50	16,16±4,03	14,00±5,62	12,45±3,32

*Diferentes letras significam diferença significativa entre os grupos. $P \leq 0,05$.

5.3.3. Análise Imuno-histoquímica e *Western Blotting* da Próstata

Ventral

SREBP

A proteína SREBP foi evidenciada dispersa no citoplasma das células epiteliais luminais, com predominância na região do Aparelho de Golgi, em todos os grupos experimentais. As imagens abaixo representam sua localização (figura 18).

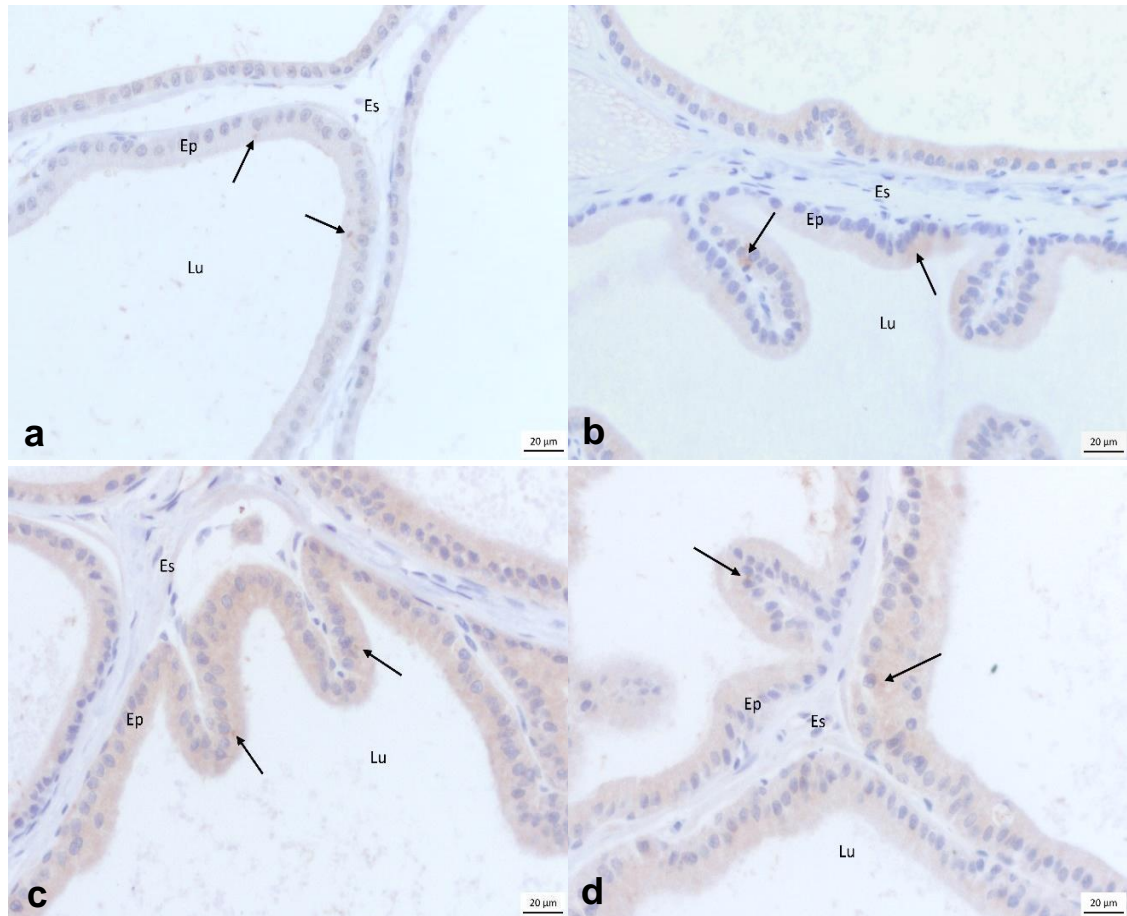


Figura 18. Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína SREBP. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína SREBP foi marcada predominantemente na região do Aparelho de Golgi (setas como indicação do local), mas também obtivemos marcações dispersas no citoplasma. Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

SCAP

Em todos os grupos experimentais, as células epiteliais luminiais apresentaram a proteína SCAP dispersa no citoplasma, com destaque para a região apical, bem como na membrana apical (figura 19).

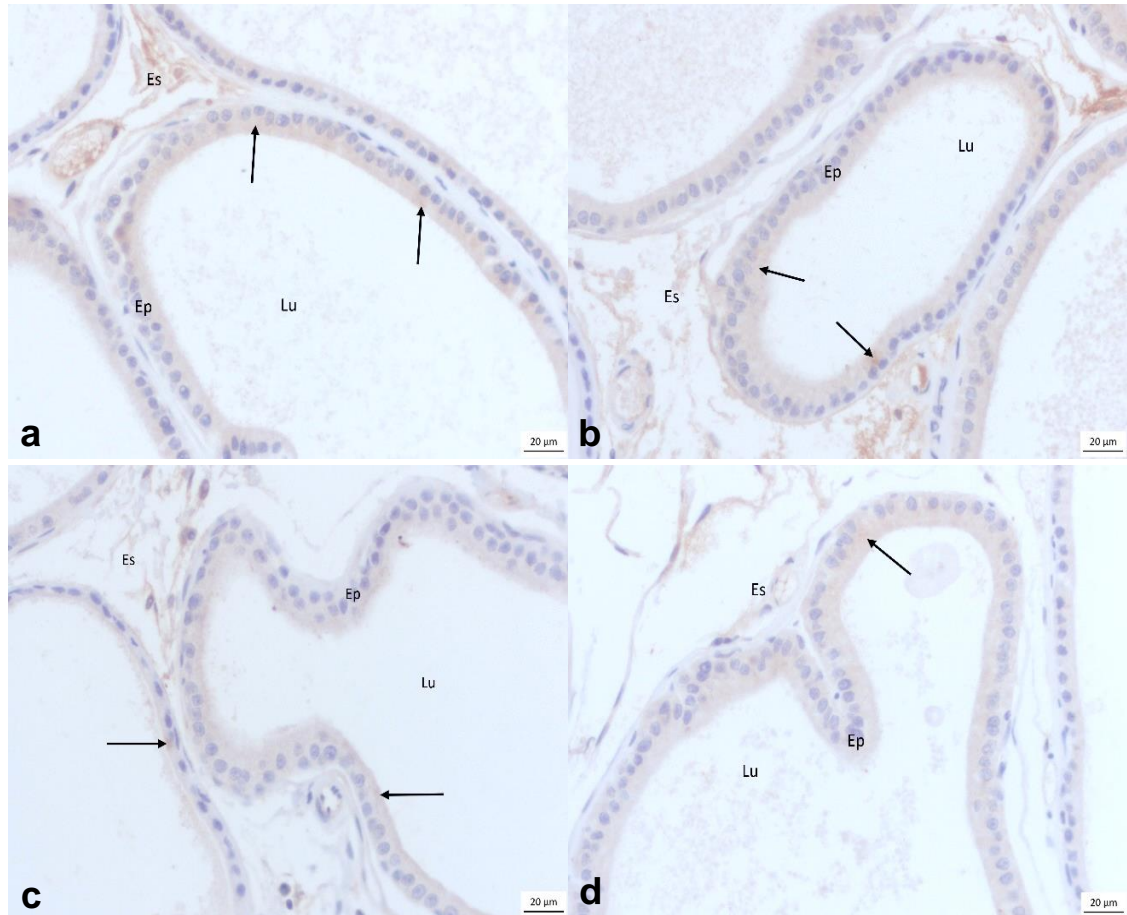


Figura 19. Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína SCAP. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína SCAP apresentou marcação dispersa no citoplasma (setas como indicação do local) e algumas marcações na região apical, bem como na membrana apical (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

CD36

A proteína CD36 foi detectada predominantemente na região do Aparelho de Golgi das células epiteliais luminiais em todos os grupos experimentais (figura 20).

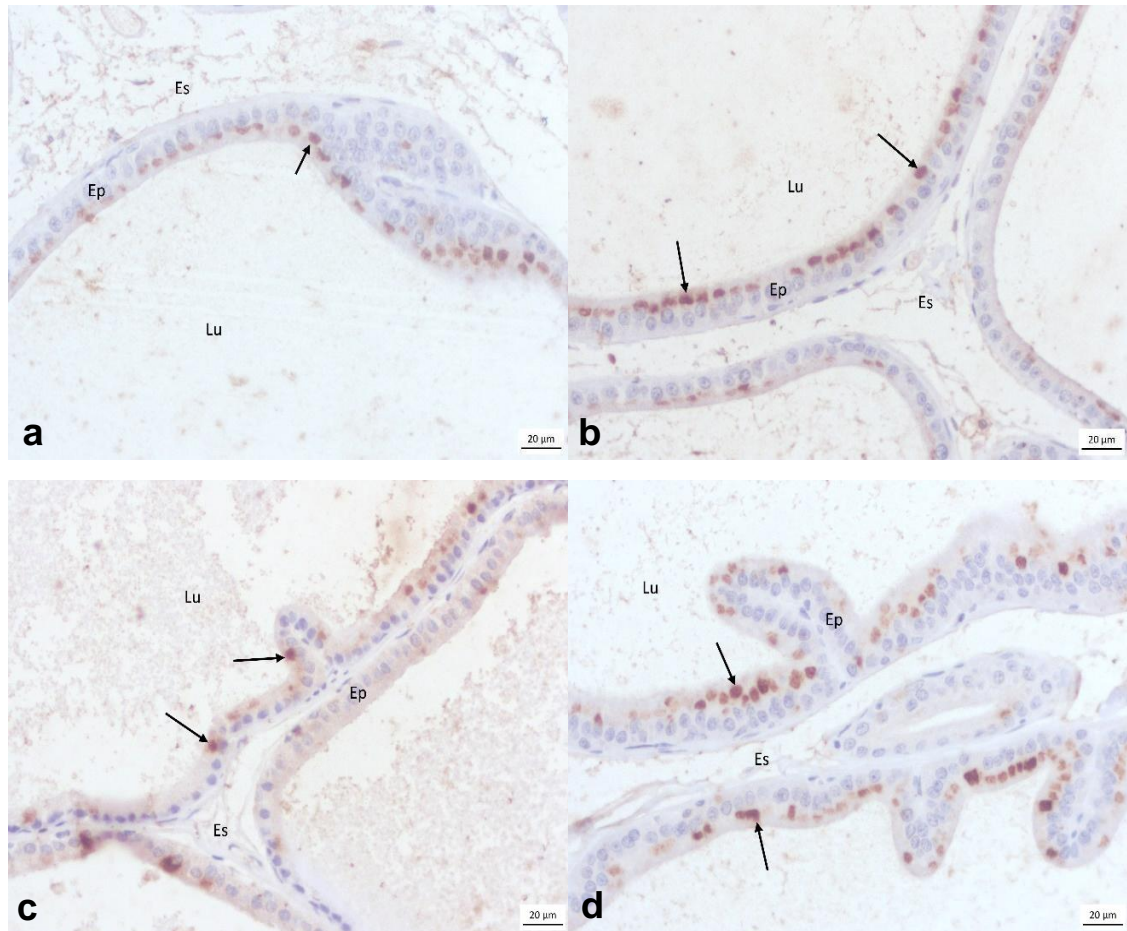


Figura 20. Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína CD36. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína CD36 foi marcada predominantemente na região do Aparelho de Golgi (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

LIMP II

A proteína LIMP II foi expressa no citoplasma, que poderiam ser lisossomos, também na membrana apical das células epiteliais luminais em todos os grupos experimentais (figura 21).

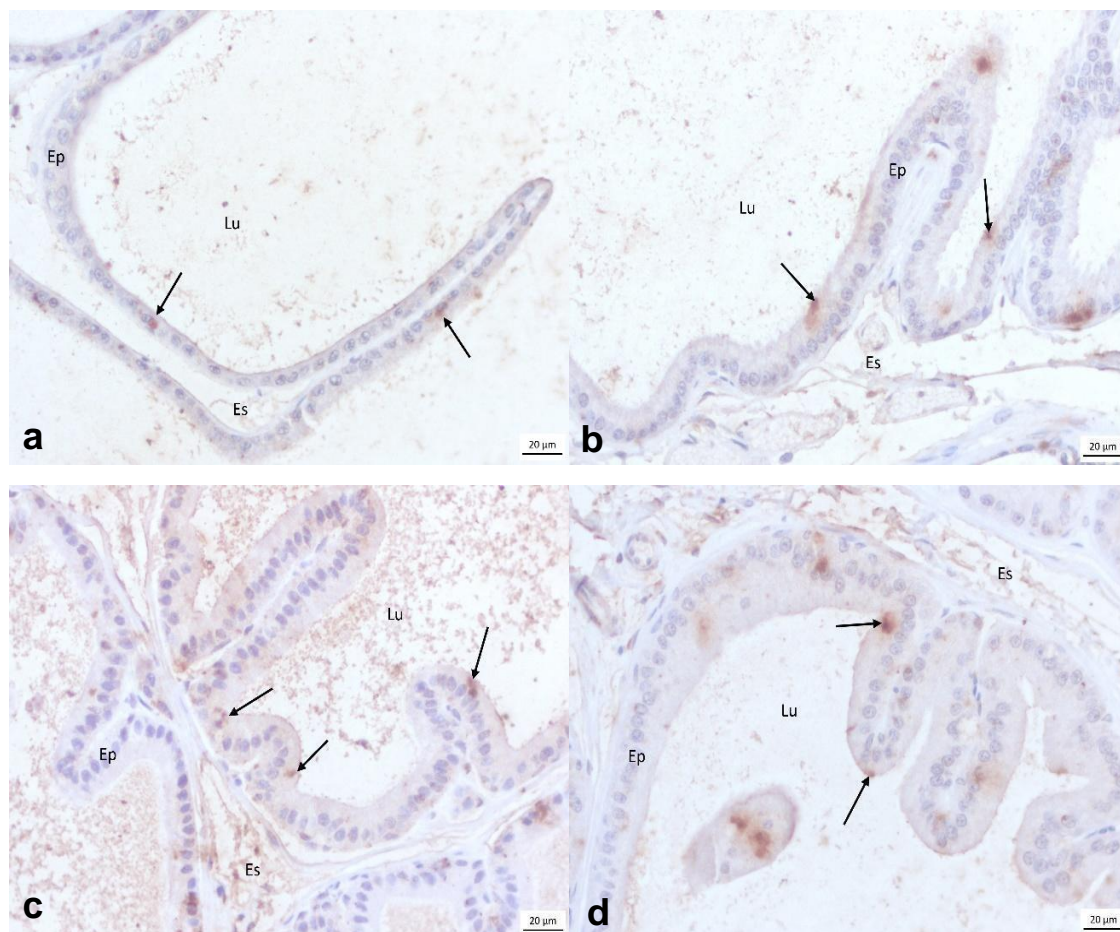


Figura 21. Cortes histológicos da próstata ventral marcados com a proteína LIMP II. a representa o Grupo Controle, b o Grupo DDVP, c o Grupo MNU e d o Grupo MNU+DDVP. A proteína LIMP II foi marcada como aglomerados no citoplasma (setas como indicação do local), e na membrana apical (setas como indicação do local). Abreviaturas: Lu (lúmen), Es (estroma), Ep (epitélio).

Para as análises de *Western Blotting* foi estabelecido o índice de densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de β -actina para todas as proteínas em estudo.

Nos dados referentes aos perfis representativos de *Western Blotting* nas amostras de próstata ventral observou-se uma banda de 42kDa para Beta-actina, uma banda de 68kDa para SREBP, uma banda de 150kDa para SCAP, uma banda de 88kDa para CD36 e uma banda de 72kDa para LIMP II (figura 22).

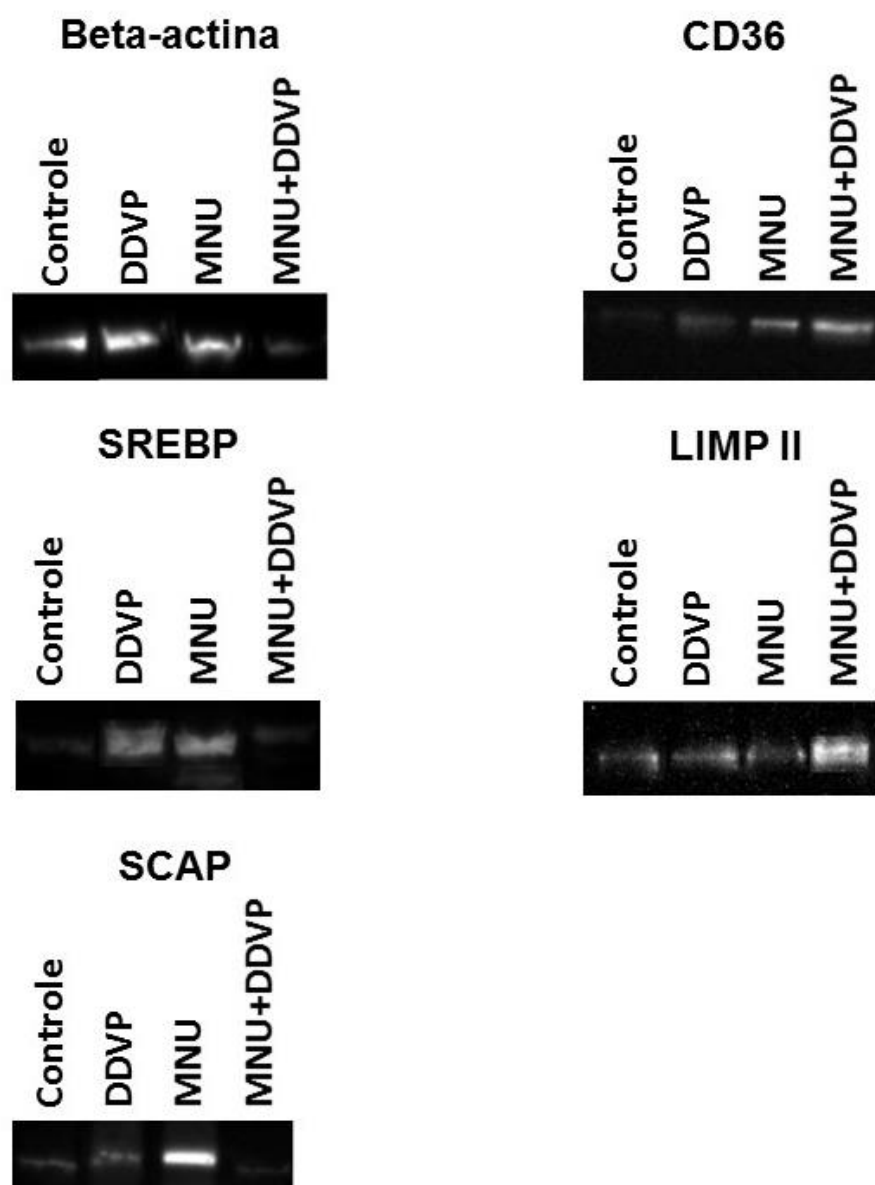


Figura 22. Perfil representativo de *Western Blotting* para Beta-actina, SREBP, SCAP, CD36 e LIMP II.

Foi realizada análise densitométrica para cada uma das bandas das proteínas, SREBP (68kDa), SCAP (150kDa), CD36 (88kDa) e LIMP II (72kDa) identificadas, a quantificação referente às bandas de cada proteína está apresentada na figura 23.

Nessa análise, verificou-se que o índice de densitometria óptica para a SREBP aumentou gradativamente nos grupos experimentais, sendo menor no grupo controle, aumentando no DDVP e MNU e o grupo que teve o maior índice de densitometria óptica para essa proteína foi o grupo MNU+DDVP. Entretanto não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

A SCAP apresentou maior índice de densitometria óptica no grupo controle em comparação com os demais grupos. O grupo MNU teve o segundo maior índice e os grupos DDVP e MNU+DDVP tiveram índices parecidos da proteína em análise. Entretanto não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Assim como a proteína SREBP, a CD36 apresentou aumento gradual no índice de densitometria óptica nos grupos, grupo controle com o menor índice, seguido do grupo DDVP com um aumento, depois o grupo MNU com índice maior e por fim, o grupo que teve o maior índice de densitometria óptica foi o grupo MNU+DDVP. Entretanto não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

A LIMP II apresentou maior índice de densitometria óptica no grupo MNU+DDVP, tendo diferença estatisticamente significativa com todos os outros grupos.

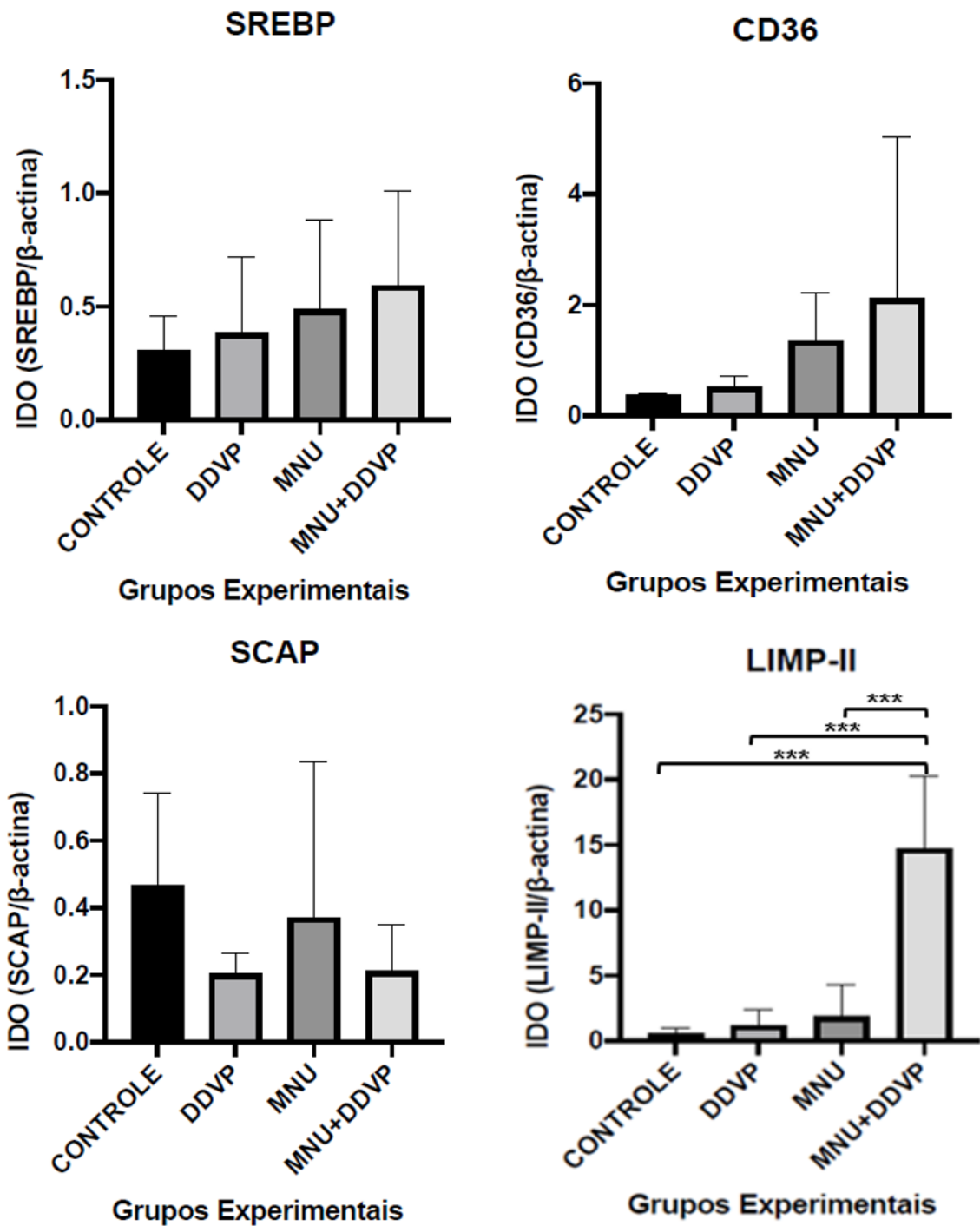


Figura 23. Análise densitométrica da SREBP (68kDa), SCAP (150kDa), CD36 (88kDa) e LIMP II (72kDa) nas amostras de próstata ventral (50 μ g de proteína). Análise estatística baseada no teste de Tukey (controle-MNU+DDVP, DDVP-MNU+DDVP o p=0,0006, MNU-MNU+DDVP o p=0,0009).

5.4. DISCUSSÃO

Nos Estados Unidos, dentre os cânceres, o de próstata é o segundo mais letal (10%), tornando-se um grande problema de saúde pública (SIEGEL *et al.*, 2020). De acordo com o INCA, no Brasil, os dados mostram 65.840 novos casos de câncer de próstata em 2020, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma.

Nas análises histopatológicas, os grupos MNU e MNU+DDVP apresentaram incidência de 100% para a lesão hiperplasia epitelial. Nesses grupos foram encontradas muitas dobras epiteliais, caracterizando aumento na proliferação celular, o que corrobora com os estudos de Gonçalves e colaboradores (2017) que também encontraram maior número de células proliferativas no grupo MNU em comparação com o grupo controle em seu estudo.

Para a avaliação morfométrico-estereológica, foi observado maior volume relativo de epitélio para o grupo MNU+DDVP em comparação com o controle, mostrando que a associação MNU e DDVP podem ter contribuído para o aumento do compartimento epitelial.

Diversos estudos têm sido realizados com câncer de próstata e a relação do mesmo com o acúmulo de lipídios, O'Malley e colaboradores (2017) sugeriram que há um acúmulo considerável de lipídios em tecidos tumorais, quando comparados a tecidos saudáveis. Calle e colaboradores (2003) desenvolveram um estudo nos Estados Unidos e verificaram que homens com índice de massa corporal (IMC) elevado apresentavam maior risco de morte por câncer de próstata e estômago, quando comparados com homens com IMC menor.

Além da relação com o acúmulo de gordura, o câncer de próstata também está diretamente relacionado aos desreguladores endócrinos, que são substâncias que podem perturbar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo afetando o sistema endócrino e as funções reprodutivas, podendo causar câncer de testículo e de próstata (SCHUG *et al.*, 2011; SIKKA & WANG, 2008).

Quanto à localização das proteínas na próstata ventral, a SREBP apresentou marcação na região do Aparelho de Golgi, corroborando com os achados de Horton e colaboradores (2002), ao dizerem que, quando a proteína está nessa localização é porque já foi clivada pela SCAP para posterior migração para o núcleo celular.

Nas análises de *Western Blotting* para SREBP, o grupo MNU+DDVP foi o grupo que apresentou o maior índice de densitometria óptica. Willians e colaboradores (2013) relataram a dependência de SREBP para o crescimento celular e a viabilidade de células cancerígenas, assim como nos achados de Ettinger e colaboradores (2004) que verificaram uma maior expressão de SREBP em tecidos tumorais do que em tecidos normais.

Em ambos os trabalhos, os tecidos tumorais mostraram alta expressão de SREBP, uma vez que essa proteína faz parte da lipogênese, e, esse é um processo que contribui para a sobrevivência das células tumorais. Entretanto, nos nossos achados não houve diferenças significativas entre os grupos para as análises de *Western Blotting*, esse resultado pode ser explicado pelo fato de os animais não terem apresentado nenhuma lesão grave ou câncer propriamente dito.

A SCAP apresentou marcação dispersa no citoplasma, com maior evidência nas regiões apicais da célula (região apical e membrana apical), divergindo dos achados de Brown e Goldstein (2009) que descreveram a localização da SCAP como sendo no retículo endoplasmático.

Nos resultados de *Western Blotting*, para a SCAP, o grupo controle foi o que teve o maior índice de densitometria óptica para essa proteína, e os grupos DDVP e MNU+DDVP foram os que tiveram índice menor. Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, podemos inferir que a SCAP pode ter diminuído no grupo MNU+DDVP uma vez que seu papel já pode ter sido realizado, que, segundo Horton e colaboradores (2002) é clivar a SREBP para que essa possa migrar para o núcleo celular e ativar os genes responsáveis pela síntese de ácidos graxos e colesterol, corroborando com os achados de *Western Blotting* para a SREBP que o maior índice de densitometria óptica foi no grupo MNU+DDVP.

A CD36 foi encontrada na região do Aparelho de Golgi, segundo Greenwalt e colaboradores (1992) ela é uma proteína transmembrana, responsável pela captação de colesterol e lipídios circulantes, a localização dessa proteína nos nossos achados pode indicar seu processo de maturação no Aparelho de Golgi, para posterior migração para a membrana.

Nas análises de *Western Blotting* para CD36 também foi notado o maior índice de densitometria óptica no grupo MNU+DDVP. Esse resultado corrobora com Vallbo e colaboradores (2004), uma vez que em seu trabalho, a CD36 foi expressa

sem diferenças estatisticamente significativas em pacientes com hiperplasia prostática benigna, neoplasia intra-epitelial prostática e câncer de próstata propriamente dito. O aumento de CD36 no grupo MNU+DDVP pode estar relacionado com nossos achados histopatológicos, uma vez que esse grupo foi o que teve 100% de hiperplasia epitelial.

Quanto a LIMP II, foi localizada em aglomerados no citoplasma, que poderiam ser lisossomos, compactuando com Zachos e colaboradores (2012) que descreveram a localização desta proteína no retículo endoplasmático e lisossomos.

Os resultados de *Western Blotting* para LIMP II apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o grupo MNU+DDVP foi o grupo que apresentou o maior índice de densitometria óptica para essa proteína. A LIMP II foi relacionada com a progressão do câncer através dos achados de Pussinen e colaboradores (2000) que estabeleceram uma correlação positiva entre a LIMP-II e a progressão do câncer, uma vez que a LIMP-II age como receptor e contribui para a captação do colesterol exógeno.

Os achados do grupo MNU+DDVP para a LIMP II confirmam que o pesticida DDVP, em associação à indução química, agiu como desregulador endócrino, aumentando a expressão da LIMP II, cuja função é de suma importância para o metabolismo lipídico e para a progressão tumoral. Esses achados compactuam com o resultado de incidência de lesões, uma vez que o grupo MNU+DDVP apresentou 100% de hiperplasia epitelial. Dessa forma, o DDVP mais a indução química acentuou as alterações nas células epiteliais prostáticas.

5.5. CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que o pesticida DDVP, em baixas concentrações, associado à indução química por MNU, foi capaz de promover alterações morfológicas, bem como, no metabolismo lipídico na próstata ventral de ratos.

5.6. REFERÊNCIAS

BEDIA, C.; DALMAU, N.; JAUMOT, J. Phenotypic malignant changes and untargeted lipidomic analysis of long-term exposed prostate cancer cells to endocrine disruptors. *Environ Res.* v. 140, p. 18–31, 2015.

BOSLAND, M. C., PRINSEN, M. K., DIRKSEN, T. J. *et al.* Characterization of adenocarcinomas of the dorsolateral prostate induced in Wistar rats by Nmethyl-N-nitrosourea, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, following sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. **Cancer Res.** v. 50, p. 700-709, 1990.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. **J. Lipid. Res.** v. 50, p. 15–27, 2009.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C. M. D.; WALKER-THURMOND, K. *et al.* Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **N. Engl. J. Med.** v. 348(17), p. 1625-1638, 2003.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 118, p. 246–251, 2009.

ETTINGER, S. L., SOBEL, R. WHITMORE, T. G., *et al.* Dysregulation of Sterol Response Element-Binding Proteins and Downstream Effectors in Prostate Cancer during Progression to Androgen Independence. **Cancer Res.** v. 64, p. 2212–2221, 2004.

FAVARO, W. J. Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia – Instituto de Biologia – UNICAMP. Comunicação pessoal. 2014.

FEBBRAIO, M.; HAJJAR, D. P.; SILVERSTEIN, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. **J. Clin. Invest.** v. 108(6), p. 785-791, 2001.

GAN, Q.; SINGH, R. M.; WU, T. *et al.* Kinetics and mechanism of degradation of dichlorvos in aqueous solutions containing reduced sulfur species. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 5717-5723, 2006.

GONÇALVES, B. F.; CAMPOS, S. G. P.; GÓES, R. M. *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. 77p. 970–983, 2017.

GONÇALVES, B. F., CAMPOS, S. G. P., ZANETONI, C. *et al.* A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. **Prostate.** v. 73, p. 1202-1213, 2013.

GONG, Y.; DOU, L. J.; LIANG, J. Link between obesity and cancer: role of triglyceride/free fatty acid cycling. **Eur. Rev. Med. Pharmacol.** v. 18, p. 2808-2820, 2014.

GREENWALT, D. E.; LIPSKY, R. H.; OCKENHOUSE, C. F. *et al.* Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood.** v. 80, p. 1105– 1115, 1992.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. SREBPs: Transcriptional Mediators of Lipid Homeostasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** v.67, p. 491-498, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Próstata**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata/> Acesso em: 17 de fevereiro de 2020.

KUO, H. C.; YANG, N. S.; KUO, L. P. *et al.* Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. **Kaohsiung J. Med. Sci.** v. 28, p. s37s42, 2012.

MILLS, P. K.; YANG, R. Prostate Cancer Risk in California Farm Workers. **JOEM.** v. 45, p. 249-258, 2003.

O'MALLEY, J.; KUMAR, R.; KUZMIN, A. N. *et al.* Lipid quantification by Raman microspectroscopy as a potential biomarker in prostate cancer. **Cancer Lett.** v. 397, p. 52-60, 2017.

OUYANGA, N.; GANA, H.; HEB, Q. *et al.* Dysfunction of cholesterol sensor SCAP promotes inflammation activation in THP-1 macrophages. **Exp. Cell Res.** p. 1-8, 2018.

PINHO, C. F. Papel modulador do Raloxifeno durante a carcinogênese prostática em ratos. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2019.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr.** v. 12, p. 1-27, 1963.

PUSSINEN, P. J., KARTEN, B., WINTERSPERGER, A. *et al.* The human breast carcinoma cell line HBL-100 acquires exogenous cholesterol from high-density lipoprotein via CLA-1 (CD-36 and LIMPII analogous 1)-mediated selective cholesteryl ester uptake. **Biochem. J.** v. 349, p. 559-566, 2000.

SCHUG, T. T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B. *et al.* Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J. Steroid Biochem.** v. 127, p. 204-215, 2011.

SCHWENK, R. W.; HOLLOWAY, G. P.; LUIKEN, J. J. F. P. *et al.* Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. **Prostag. Leukotr. ess.** v. 82, p. 149–154, 2010.

SHAPPELL, S. B., THOMAS, G. V., ROBERTS, R. L. *et al.* Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Res.** v. 64, p. 2270–2305, 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2020. **Ca. Cancer J. Clin.** v. 70, p. 7–30, 2020.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian. J. Androl.** v. 10(1), p. 134–145, 2008.

SOMIA, E. M.; MADIHA, F. Pathological effects of dichlorvos and fenitrothion in mice. **Pathol Res Pract.** v. 208, p. 286-291, 2012.

TAVASSOLI, P.; SNOEK, R.; RAY, M. *et al.* Rapid, Non-Destructive, Cell-Based Screening Assays for Agents That Modulate Growth, Death, and Androgen Receptor Activation in Prostate Cancer Cells. **The Prostate.** v. 67, p. 416-426, 2007.

U.S. Environmental Protection Agency. Interim Reregistration Eligibility Decision for Dichlorvos (DDVP). Washington D.C., p. 136-137, 2006.

U.S. Public Health Service, Hazardous Substance Data Bank, Washington DC, 5, 1995.

VALLBO, C.; WANG, W.; DAMBER, J. E. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. **Bju international.** v. 93, p. 1339–1343, 2004.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, v. 12, p. 131-155, 1978.

WILLIAMS, K. J.; ARGUS, J. P.; ZHU, Y.; *et al.* An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from lipotoxicity. **Cancer Res.** v. 73, p. 2850-2862, 2013.

ZACHOS, C.; BLANZ, J.; SAFTIG, P. *et al.* A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand β -Glucocerebrosidase. **Traffic.** v. 13, p. 1113–1123, 2012.

6. ANEXOS

6.1. Análise Imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, os cortes histológicos foram colocados sobre lâminas silanizadas. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em uma série de álcoois com concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%). A técnica de imuno-histoquímica foi padronizada de acordo com o protocolo do fabricante para cada anticorpo.

1. Recuperação do antígeno: as lâminas foram imersas em solução tampão Citrato 10mM pH 6,0 e aquecidas em microondas de acordo com a proteína de interesse.

2. Bloqueio da atividade da peroxidase endógena: foram adicionadas gotas suficientes de *Hydrogen Peroxide Block* (abcam®) para cobrir os cortes, que foram incubados por 30 minutos. Em seguida, lavou 2 vezes em TBS (Tris Buffer Solution – Tris 50mM NaCl 150mM Tween 0,01% pH 7,4) por 5 minutos com agitação.

3. Bloqueio de reação inespecífica: as lâminas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente em *Protein Block* (abcam®) para bloquear a coloração de fundo não específico. Em seguida, foram lavadas uma vez em TBS por 5 minutos com agitação.

4. Incubação com anticorpo primário: as lâminas foram incubadas com anticorpo primário *overnight* à temperatura ambiente de acordo com a proteína de interesse (quadro 2).

5. As lâminas que continham as proteínas SCAP e SREBP foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação e, depois, incubadas em Biotinylated Goat Anti-polyvalent (abcam®) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação. Já as lâminas que continham as proteínas LIMP II e CD36 foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação e, depois, incubadas em Anti-goat por uma hora à

temperatura ambiente. Após a incubação foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação.

6. As lâminas foram incubadas em Streptavidin Peroxidase (abcam®) durante 10 minutos à temperatura ambiente.

7. As lâminas foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação. Em seguida, foram incubadas em DAB Solution (abcam®) por 1 minuto. Foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação.

8. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina por 2 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos.

9. As lâminas foram desidratadas para colocação de lamínula.

Quadro 1. Solução tampão e diluição do anticorpo primário para SREBP, SCAP, LIMP II e CD36.

Proteína	Tempo de micro-ondas	Diluição anticorpo primário	Hospedeiro
SREBP (sc-8984)	5 minutos	1:2000	Camundongo
SCAP (bs-3862R)	5 minutos	1:500	Camundongo
LIMP II (sc-25869)	5 minutos	1:300	Cabra
CD36 (sc-5523)	5 minutos	1:800	Cabra

6.2. Análise de *Western Blotting*

Para as análises de *Western Blotting*, as amostras da próstata ventral mantidas em Biofreezer a -80°C, foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (proporção de 30 mg de tecido/100ml de tampão de extração).

Para eletroforese, foram aplicados 50µg de proteínas de cada amostra em *Amersham ECL Gel* e realizada corrida eletroforética a 120V por 2h para separação das proteínas de acordo com o peso molecular.

Após a realização da eletroforese, os “spots” correspondentes às proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana imobilizadora de PVDF. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora e 30 minutos *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* a 5% e incubada overnight a 4°C com os anticorpos primários (SREBP, SCAP, LIMP II, CD36 e β-actina (quadro 2)). Em seguida, a membrana foi lavada em tampão TBST (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) 5 vezes por 5 minutos com agitação e incubada com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase durante 1h30 a temperatura ambiente, conforme o antígeno pesquisado.

Após a lavagem em tampão TBST (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) 5 vezes por 5 minutos com agitação, as membranas foram lavadas e inseridas no fotodocumentador (G:BOX, Syngene) e a reação foi revelada utilizando substrato quimioluminescente para *Amersham ECL Prime* (RPN2232 – GE *Healthcare Life Sciences*).

A análise dos resultados foi feita através da verificação da reação positiva ou ausência das bandas, seguido de fotodocumentação da membrana. A intensidade da banda foi quantificada através do índice de densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de β -actina (marcador celular endógeno) realizado no software *GeneSys* (*GeneTool, Syngene*).

Quadro 2. Proteínas, diluição do anticorpo primário, anticorpo secundário e diluição.

Proteínas	Diluição anticorpo primário	Anticorpo secundário e diluição
β-actina Rabbit policonal antibody – orb10033	1:200	Anti-Rabbit HRP 1:5000
SREBP (sc-8984)	1:1000	Anti-Rabbit 1:10000
SCAP (bs-3862R)	1:500	Anti-Rabbit HRP 1:5000
LIMP II (sc-55570)	1:500	Anti-Mouse 1:5000
CD36 (sc-7309)	1:1000	Anti-mouse 1:10000