



**unesp**

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



**Papel do Resveratrol sobre a modulação do Receptor Aril-  
hidrocarboneto (AhR) e o desenvolvimento da próstata de ratos  
expostos ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) durante a  
gestação**

**LÍVIA TERESA RIBEIRO DA SILVEIRA**

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

*Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano*

**BOTUCATU – SP  
2015**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil  
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



**unesp**

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Papel do Resveratrol sobre a modulação do Receptor Aril-  
hidrocarboneto (AhR) e o desenvolvimento da próstata de ratos  
expostos ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) durante a  
gestação**

**LÍVIA TERESA RIBEIRO DA SILVEIRA  
PROF. DR. WELLERSON RODRIGO SCARANO**

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

*Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano*

**BOTUCATU – SP  
2015**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silveira, Livia Teresa Ribeiro da.

Papel do resveratrol sobre a modulação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) e o desenvolvimento da próstata de ratos expostos a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) durante a gestação / Livia Teresa Ribeiro da Silveira. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20601000

1. Desreguladores endócrinos. 2. Próstata - Doenças - Tratamento. 3. Dioxinas. 4. Antioxidantes.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Próstata; Quimioproteção.

# *Dedicatória*

Independente de quantas conquistas eu tiver o privilégio de ter nesta vida, sempre irei dedicá-las ao meu pai, à minha mãe e ao meu irmão. Os grandes responsáveis por eu ser o que eu sou e por eu estar onde estou. Não sou absolutamente nada sem o apoio e o amor de vocês.

Ao meu fiel companheiro de todas as horas, Erick, por me ajudar, me apoiar, me ouvir e me incentivar a vencer as batalhas da grande luta chamada Vida.

## *Agradecimentos Especiais*

Antes de tudo e para todo o sempre, a Deus, pela oportunidade da vida, pelos ensinamentos, obstáculos e aprendizados que constantemente me fazem me tornar uma pessoa melhor.

Ao meu amado pai, Winston, por absolutamente tudo. Palavras não cabem nesse espaço para poder demonstrar o quanto sou grata. Pela preocupação, amor, carinho, cuidado, prontidão, e por ser meu eterno herói.

À minha amada mãe, Tânia, por simplesmente ser minha mãe, meu espelho, minha fortaleza, minha sustentação.

Ao meu irmão Arnaldo, pela companhia, preocupação, ajuda, e momentos de descontração.

Ao meu namorado Erick, por nunca ter desistido de mim, por me ouvir, me ajudar, me incentivar e me tornar uma pessoa melhor.

# *Agradecimentos*

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela oportunidade e disponibilidade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pelos esclarecimentos, prontidão e competência.

Aos animais experimentais, com todo o respeito e consideração por suas vidas, sem os quais nada seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (2013/04401-0).

Ao Departamento de Morfologia por proporcionar toda a infra-estrutura para realização de todo o meu trabalho.

Aos Professores Prof. Wellerson Rodrigo Scarano, Prof., Luis Fernando Barbisan, Prof. Luis Antônio Justulin Junior, Profa. Raquel Fantin Domeniconi por todo conhecimento, materiais compartilhados e incentivo.

Aos Professores que aceitaram prontamente meu convite para composição das Bancas de Qualificação e de Defesa de Dissertação.

Ao meu orientador Prof. Wellerson Rodrigo Scarano, que desde a Iniciação, me acolheu e me orientou com paciência e determinação.

Ao Laboratório de Desreguladores Endócrinos e Carcinogênese e a todos seus integrantes, André Teves, André Rebelo, Bianca, Cristiane, Joyce, Leonardo, Letícia, Lucas, Mariana, que de alguma forma me ajudaram a seguir em frente, a continuar, a ser forte e ultrapassar o grande obstáculo que essa etapa foi.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular e todos seus membros, um laboratório vizinho que nunca me negou ajuda e estavam sempre prontos no que precisasse: equipamentos, pedidos de socorro, reagentes, conselhos, cafés.

Ao técnico acadêmico José Eduardo Bozano, por ser essa pessoa sempre pronta, sempre sorrindo e indo alegrar meus dias de rotina. Obrigado por me ensinar a tratar dos animais e por me socorrer em diversos momentos.

À minha grande amiga Carina Leonelli, por toda ajuda profissional, intelectual, e por me estender a mão em um momento muito delicado que tive que ultrapassar. Com certeza, alguém que sempre terá um lugar no coração.

Aos meus amigos Diego e Leonardo, pela confiança, conselhos, ajuda emocional e amizade. Além das risadas.

À minha amiga e colega de trabalho Talita de Mello Santos, que me ajudou com os animais em dias que eu precisava voltar para casa, aos conselhos e ensinamentos durante todo o período de trabalho e à alegria e leveza de enxergar e lidar com a vida. Sem dúvida, isso que irei levar comigo.

Ao meu amigo e colega de trabalho Lucas Fredini Camora, por me socorrer e me tirar a grande culpa do erro da técnica, por me ouvir e me falar para nunca desistir e nunca deixar de acreditar em Deus.

Aos amigos e colegas de todos os dias nos almoços, Jaqueline, Carina, Sérgio, Brenda, Bruno, Ketlin, Lucas, Diego, Aduino, Warlen, por deixar meus almoços mais agradáveis, a rotina menos pesada e os dias mais divertidos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	i
Agradecimentos Especiais .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Epígrafe .....	5
Resumo .....	8
<i>Abstract</i> .....	10

### 1. INTRODUÇÃO

1.1. Morfogênese Prostática .....	12
1.2. Regulação Hormonal do Desenvolvimento Prostático .....	14
1.3. Estrutura e Fisiologia da Próstata .....	15
1.4. As Dioxinas e o Receptor Aril-hidrocarboneto .....	18
1.5. O Sistema Genital Masculino e o TCDD .....	21
1.6. O TCDD e o Desenvolvimento da Próstata .....	23
1.7. O Resveratrol .....	24
1.8. Justificativa .....	26

### 2. OBJETIVO .....

27

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Ambiente de Experimentação .....	28
3.2. Delineamento Experimental .....	28
3.3. Dosagem Hormonal Sérica .....	30
3.4. Microscopia de Luz .....	30
3.5. Análises Imuno-histoquímicas .....	31
3.6. Determinação do Índice de Células Mesenquimais AR Positivas .....	32
3.7. Determinação do índice de Proliferação Celular .....	32
3.8. Análise Estatística dos Dados .....	32

## **4. RESULTADOS**

4.1. Parâmetros Gestacionais e Lactacionais .....	33
4.2. Dia Pós-Natal 1 .....	34
4.2.1. Parâmetros Biométricos .....	34
4.2.2. Dosagem de Testosterona Sérica .....	35
4.2.3. Análise Histológica do Seio Urogenital .....	35
4.2.4. Análises Imuno-histoquímicas	
4.2.4.1. Células Basais Progenitoras – P63 .....	38
4.2.4.2. Receptor de Andrógeno Mesenquimal .....	39
4.2.4.3. Diferenciação em Células Musculares Lisas .....	40
4.2.4.4. Índice de Proliferação Mesenquimal e nos Brotos Prostáticos .....	41
4.2.4.5. Expressão do Receptor Aril-hidrocarboneto .....	43
4.3. <b>Dia Pós-Natal 90</b> .....	44
4.3.1. Parâmetros Biométricos e Hormonal .....	44
4.3.2. Análise Morfológica e Estereologia da Próstata Ventral .....	45
4.3.3. Análises Imuno-histoquímicas .....	47
4.3.3.1. Índice de Proliferação Epitelial .....	47
4.3.3.2. Imuno-histoquímica para AR .....	49
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55
<b>7. ANEXOS</b> .....	67

## RESUMO

O TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), é considerado o contaminante ambiental com maior toxicidade na atualidade e sua ação está associada à interação com o receptor aril-hidrocarboneto (do termo inglês, AhR), responsável pela resposta biológica do TCDD sobre as células. Na próstata, o TCDD age diretamente no UGS inibindo o brotamento prostático através da ativação das vias dependentes de AhR. O Resveratrol destaca-se por suas propriedades anticâncer, antiagregação de plaquetas, anti-inflamatória e antialérgica, atuando inclusive como antagonista do AhR. O estudo teve por objetivo avaliar o potencial quimioprotetor do Resveratrol sobre o desenvolvimento da próstata de ratos expostos ao TCDD durante a fase inicial da morfogênese prostática. Para isso, ratas prenhes da linhagem *Wistar* foram divididas em 4 grupos experimentais: Controle, TCDD, TCDD+Resveratrol e Resveratrol. O TCDD foi administrado em dose única no 15º. dia gestacional (DG15) na dose de 1µg/kg (diluído em óleo de milho) e o Resveratrol foi administrado entre o DG10 e o dia pós-natal 21 (DPN21) na dose de 20mg/kg (diluído em etanol 8%), ambos por via oral. Machos recém-nascidos (DPN1) foram eutanasiados para avaliação dos efeitos imediatos do TCDD (com ou sem a adição do Resveratrol) sobre a morfogênese prostática inicial, através de técnicas morfológicas e imunohistoquímicas, enquanto que, machos adultos (DPN90) foram eutanasiados para avaliação dos efeitos tardios. . No DPN1, os aspectos histológicos e morfométricos apontaram para a redução no número de brotos prostáticos no grupo TCDD quando comparado aos demais grupos. Nesse mesmo grupo, as células epiteliais periféricas foram menos imunorreativas para p63 comparado com o Controle e TCDD+Resveratrol. O índice de proliferação celular nos brotos epiteliais e no mesênquima no grupo TCDD foi inferior ao observado nos grupos Controle e TCDD + Resveratrol, bem como o índice de células mesenquimais AR imunorreativas. A marcação para receptor de andrógeno (AR) foi fraca nos brotos epiteliais e intensa no mesênquima circundante, em todos os grupos. Da mesma forma, a marcação para a  $\alpha$ -actina foi menos intensa nas células mesenquimais em diferenciação que circundam os brotos epiteliais no grupo TCDD. Com relação aos animais adultos, as análises histológicas revelaram que o grupo TCDD mostrou uma estrutura glandular composta por ácinos com várias pregas em seu epitélio ao lado de ácinos sem pregas, caracterizando a hiperplasia glandular fisiológica, porém essa glândula se apresentou funcionalmente normal. Já o grupo TCDD+Resveratrol

apresentou uma morfologia semelhante ao grupo Controle. Observou-se no grupo exposto ao TCDD um índice de proliferação epitelial superior aos demais grupos, evidenciando um processo de recuperação da inibição do desenvolvimento. Além disso, o grupo TCDD+Res apresentou índice de proliferação semelhante ao grupo Controle. Com relação à imunomarcação do AR, não houve diferença entre os grupos experimentais. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o Resveratrol foi capaz de reduzir os efeitos inibitórios do TCDD sobre a morfogênese da próstata de ratos expostos por via materna. Além disso, a próstata se mostrou capaz de recuperar os danos causados por este tóxico durante a idade.

**Palavras-chave:** TCDD, Resveratrol, desenvolvimento, próstata, morfogênese

## **ABSTRACT**

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) is the most toxic environmental contaminant which mechanism of action is through the interaction with the aryl hydrocarbon receptor (AhR). In the prostate, TCDD works inhibiting the prostatic budding and activating the AhR-dependent pathways. Resveratrol is known by your anticancer, antiplatelet, anti-inflammatory and anti-allergic properties, besides acting as AhR antagonist. Therefore, the current research aimed to assess the protective effect of Resveratrol on prostate development in rats exposed to TCDD during early prostate morphogenesis. Pregnant *Wistar* rats were divided in four experimental groups: Control, TCDD, TCDD+Resveratrol and Resveratrol. TCDD (1µg/kg body weight) diluted in corn oil was administered by gavage as a single dose on 15<sup>th</sup> gestational day (GD15) while Resveratrol (20mg/kg body weight) was given by gavage (diluted in 8% of ethanol) between GD10 and postnatal day 21 (PND21). Newborn males (PND1) were euthanized to evaluate immediate effects of TCDD and Resveratrol on the initial prostatic morphogenesis, through morphological and immunohistochemical assays, while male rats (PND90) were euthanized for evaluation the late effects. There was decreasing of prostatic buds number in TCDD group. In the same group, basal cells showed weak immunoreactivity for p63 when compared to Control and TCDD+Resveratrol. TCDD reduced the cell proliferation index in the epithelial buds and mesenchyme as well as the number of androgen receptor (AR)-positive mesenchyme cells compared to Control and TCDD+Resveratrol groups. It is worth mentioning that the AR immunostaining was weak in the epithelial buds and intense in the surrounding mesenchyme in all experimental groups. On the other hand,  $\alpha$ -actin staining was less intense in the differentiated mesenchymal cell that surrounded the epithelial buds in the TCDD group. Regarding to adult animals (PND90), the histological analysis revealed in the TCDD group a glandular structure with acini exhibiting several foldings beside acini without this alteration, featuring as a physiological glandular hyperplasia, despite the normal function of the gland. TCDD+Resveratrol group showed similar morphology to Control group. TCDD group showed a higher proliferation index of epithelial cell than Control group, implying in the recovery of the growth inhibition. In addition, the TCDD+Resveratrol group showed proliferation index similar to the Control group. Similar AR immunostaining was verified in all experimental groups. Therefore, according to the results, Resveratrol was

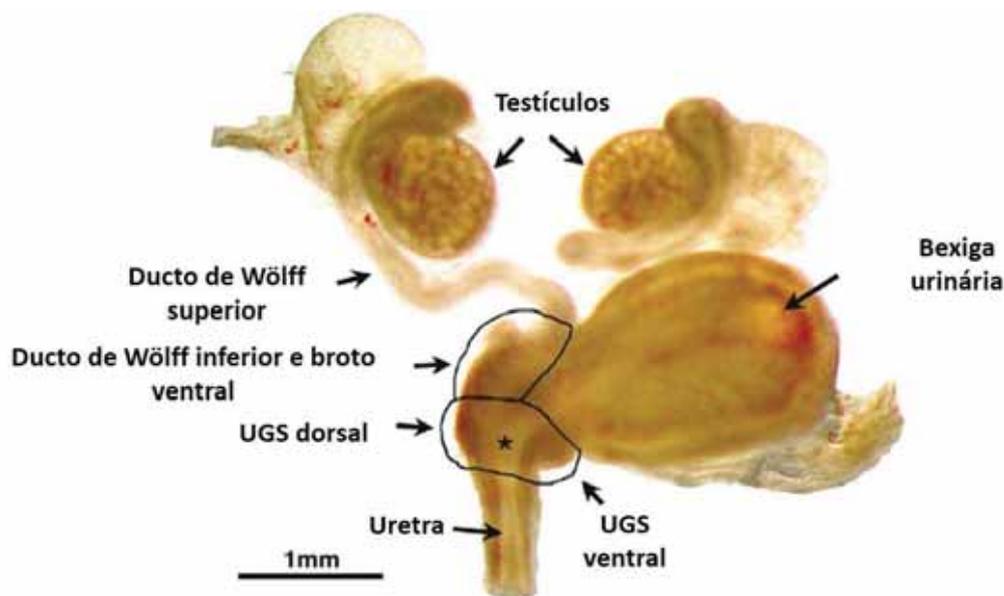
able to reduce the inhibitory effects of TCDD on rat prostate morphogenesis of rats exposed to a single maternal dose. Moreover, the prostate recovered the damage caused by TCDD on PND90.

**Keywords:** TCDD, Resveratrol, development, prostate, morphogenesis.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A Morfogênese da Próstata

O crescimento e o desenvolvimento da próstata têm início durante a vida fetal e é completado durante a maturidade sexual. A próstata se desenvolve a partir da parte pélvica do seio urogenital (do termo em inglês UGS), uma subdivisão da cloaca, encontrado na base da bexiga urinária em desenvolvimento (Marker *et al.*, 2003). O UGS é composto por uma camada epitelial, o epitélio urogenital (do termo inglês UGE), derivada da endoderme, a qual é circundada por uma camada mesenquimal, o mesênquima urogenital (do termo inglês UGM), originada do mesoderme. Nos roedores, esta estrutura surge nos machos e nas fêmeas após 13 dias de concepção, e após 7 semanas de gestação em humanos (Hamilton *et al.*, 1959) (Figura 1). O UGS é morfologicamente indistinguível em machos e fêmeas até o 17<sup>o</sup>-18<sup>o</sup> dia de gestação em ratos e camundongos, e até a 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> semana em humanos. A partir desse período inicia-se a morfogênese prostática, um processo que é iniciado e dependente de andrógenos produzidos pelos testículos (Marker *et al.*, 2003).



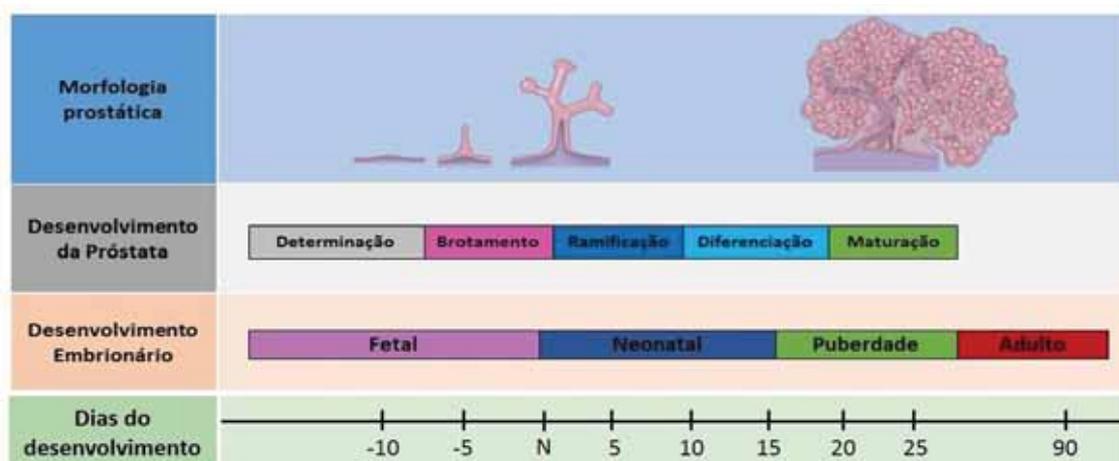
**Figura 1.** Parte do trato urogenital de um embrião macho de camundongo com 16,5 dias de gestação. A próstata se desenvolve a partir do UGS, o qual se localiza na base da bexiga em desenvolvimento. Neste estágio embrionário, o epitélio do UGS é visível como uma dilatação da uretra (área clara com \*), circundado por um mesênquima condensado nos lados dorsal e ventral (área escura). Adaptado de Marker *et al.*, 2003.

Embora o processo de desenvolvimento seja contínuo, ele pode ser dividido em cinco estágios: determinação, iniciação ou brotamento, ramificação, diferenciação e maturação (Prins & Putz, 2008) (Figura 2). A morfogênese da próstata é resultante das interações entre mesênquima e epitélio, e modulada por fatores de crescimento (Cunha *et al.*, 1995). Acredita-se que esses fatores de crescimento sejam os mediadores parácrinos nessa interação UGM-UGE (Cooke *et al.*, 1991).

A fase de determinação ocorre antes de qualquer evidência de uma estrutura em desenvolvimento e envolve a expressão de sinais moleculares que comprometem um grupo específico de células do UGS para o destino de células prostáticas. O desenvolvimento fenotípico da próstata começa com as células epiteliais formando brotos que penetram dentro do mesênquima circundante nas direções ventral, dorsal, e lateral. (Lowsley *et al.*, 1912; Prins *et al.*, 1993). Antes da diferenciação sexual do UGS, o UGM expressa receptores de andrógeno (AR) e, assim, adquire a capacidade de induzir a diferenciação e brotamento dos lobos prostáticos (Cooke *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 2013). Em resposta aos andrógenos produzidos pelo testículo fetal, brotos epiteliais emergem da parede do UGS, crescendo dentro do UGM circundante em um preciso padrão espacial, e assim, estabelecendo em roedores as subdivisões lobares da próstata em dorsolateral, ventral e anterior, onde cada uma delas possui um padrão de brotamento ductal característico (Price, 1963; Sugimura *et al.*, 1986; Kinbara *et al.*, 1995; Marker *et al.*, 2003).

Ao nascimento, os lobos ventral, dorsal e lateral dos roedores consistem, principalmente, de brotos, ou ductos, não-ramificados e sólidos e, posteriormente, uma padronização desses brotos ocorre após o nascimento (Prins *et al.*, 1992). Inicialmente, os brotos e ductos prostáticos são maciços, começando no período neonatal a se canalizar. A canalização ductal começa na uretra e progride distalmente em direção à extremidade dos ductos e é durante esse fenômeno que ocorre a diferenciação das células epiteliais basais e secretoras (Lopes *et al.*, 1996; Marker *et al.*, 2003). A ramificação começa quando os brotos epiteliais alongados entram em contato com o mesênquima, que se encontra na região periférica ao músculo liso periuretral. Nesse momento, pontos secundários e terciários de ramificação são estabelecidos com o crescimento próximo-distal (Timms *et al.*, 1994). O padrão de ramificação é lobo-específico, com a ramificação ventral antecedendo 3-4 dias o lobo dorsolateral (Hayashi *et al.*, 1991). A morfogênese de todo o complexo completa-se entre os dias pós-natal 15 e 30. O crescimento final e a maturação

ocorrem durante a puberdade (25-40 dias), quando os níveis de andrógeno circulante sobem (Prins & Putz, 2008).



**Figura 2.** Estágios do desenvolvimento da próstata do rato (adaptado Prins & Putz, 2008).

A diferenciação epitelial e mesenquimal é coordenada com o processo de ramificação e ocorre da direção proximal à distal (Prins & Birch, 1995; Hayward *et al.*, 1996a, 1996b). A diferenciação epitelial das células progenitoras em células diferenciadas basais e luminais na próstata de ratos ocorre com uma mudança no padrão das citoqueratinas somado a alterações na expressão do receptor de andrógeno (AR), um marcador inicial da diferenciação epitelial (Prins & Birch, 1995; Hayward *et al.*, 1996b). A canalização dos ductos é concomitante com a diferenciação das camadas basal e luminal em torno do 5º dia pós-natal, estendendo-se às extremidades aproximadamente no 12º dia pós-natal. Junto com a diferenciação epitelial, o mesênquima prostático sofre diferenciação pós-natal. Entre os dias 3 e 5, células adjacentes aos ductos formam uma camada periductal de células musculares lisas, enquanto as células interductais se diferenciam em fibroblastos (Prins & Birch, 1995; Hayward *et al.*, 1996a).

Por fim, ao final do desenvolvimento, os ductos prostáticos são compostos por uma parte epitelial e por outra estromal, sendo a interação entre esses dois compartimentos a responsável pelo crescimento e atividade funcional da glândula (Nemeth *et al.*, 1996).

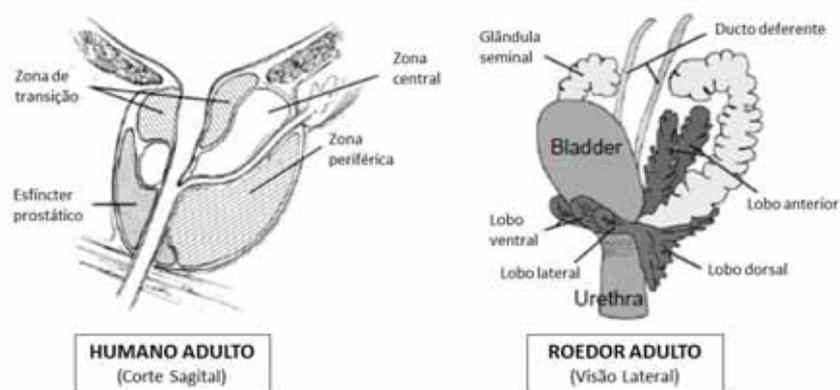
## 1.2. Regulação Hormonal do Desenvolvimento Prostático

As fases de determinação e brotamento prostáticos no feto humano e no roedor são inteiramente dependentes da ação dos andrógenos produzidos pelo testículo fetal (Price,



juntamente com a glândula seminal, promovendo a manutenção do gradiente iônico e pH adequados nessa secreção (Marker *et al.*, 2002; Untergasser *et al.*, 2005).

Em humanos, a próstata tem uma morfologia compacta e sem lobos distintos, pesa entre 30g e 50g e situa-se inferiormente à bexiga urinária, envolvendo a parte prostática da uretra. Apresenta-se geralmente diferenciada em três zonas: central, de transição e periférica (McNeal, 1983, Roy-Burman *et al.*, 2004, De Marzo *et al.*, 2007). Em ratos e camundongos, a glândula é composta por quatro lobos distintos: anterior ou glândula coaguladora, dorsal, lateral e ventral (Shirai *et al.*, 2000). Os lobos dispõem-se ao redor da bexiga, exibindo particularidades quanto à ramificação de ductos e produção de secreções proteicas (Sugimura *et al.*, 1986) (Figura 4).

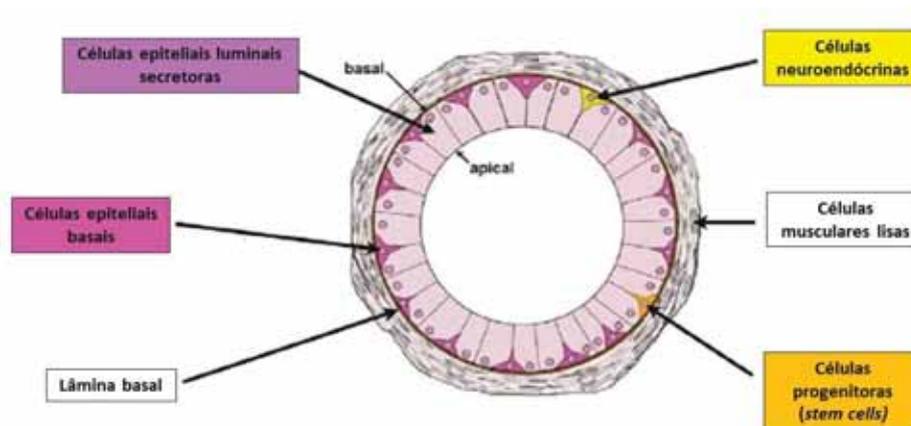


**Figura 4.** Comparação esquemática da anatomia da próstata humana com a próstata do roedor (adaptado de Abate-Shen & Shen, 2002).

Ductos prostáticos de um mesmo lobo mostram heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, síntese e secreção proteica e resposta a andrógenos (Banerjee *et al.*, 1998). Devido às diferenças morfogenéticas lobo-específicas, a morfologia final de cada lobo é distinta. Histologicamente, a próstata anterior apresenta inúmeras dobras epiteliais, os lobos dorsal e lateral exibem dobras no epitélio e a próstata ventral apresenta epitélio contínuo, contendo o mínimo de dobras (Marker *et al.*, 2003). Estudos comparativos do desenvolvimento da próstata em roedores e humanos demonstraram que a morfogênese ocorre de maneira análoga em ambos os modelos (Timms *et al.*, 1994). Os componentes glandulares de natureza epitelial e os não-glandulares, de natureza estromal, apresentam características comuns nos diferentes animais, independente do aspecto macroscópico da glândula, o que favorece estudos referentes à homologia morfofuncional entre as diferentes espécies (Price, 1963; Karr *et al.*, 1995). Os tipos de populações celulares são

similares e, provavelmente, desempenham as mesmas funções fisiológicas, porém a distribuição relativa dessas populações varia entre as espécies (Imamov *et al.*, 2004).

De acordo com Peehl e colaboradores (2005) o epitélio prostático é composto por cinco tipos celulares com suas respectivas funções (Figura 5). Células epiteliais secretoras, que revestem o lúmen dos ácinos prostáticos, expressam altos níveis de ARs e são responsáveis pela produção e secreção do líquido prostático; células epiteliais basais, as quais formam uma monocamada sobre a membrana basal, envolvendo o epitélio prostático e constituem a principal população de células proliferativas do epitélio da próstata; células neuroendócrinas, que aparecem em menor quantidade e secretam uma variedade de fatores de crescimento que, possivelmente, afetam o desenvolvimento e a manutenção do tecido prostático; *stem cells* que mesmo raras parecem localizar-se na camada de células basais; e, por último, células transitórias, as quais expressam características entre as células basais e secretoras e podem ser células progenitoras ainda não diferenciadas.



**Figura 5.** Diagrama de um corte transversal de um ducto prostático, indicando os tipos celulares que estão presentes nos ductos prostáticos (adaptado Marker *et al.*, 2003).

Entremeando as porções glandulares há um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com células musculares lisas dispostas concentricamente aos ácinos e entremeadas às camadas de colágeno, bem como poucas fibras elásticas (Carvalho & Line, 1996). As células musculares lisas exercem papel contrátil durante a ejaculação e, juntamente com os fibroblastos, são responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular. Entre os elementos estruturais que integram a matriz destacam-se as fibras colágenas, reticulares e elásticas, as quais conferem resistência mecânica e flexibilidade

ao tecido, servindo como substrato para a ancoragem e migração celular (Tuxhorn *et al.*, 2001; Vilamaior *et al.*, 2005). As células estromais são responsáveis por direcionar os processos de desenvolvimento, manutenção e diferenciação do epitélio, fornecendo nutrientes e fatores de crescimento (Berry *et al.*, 2008).

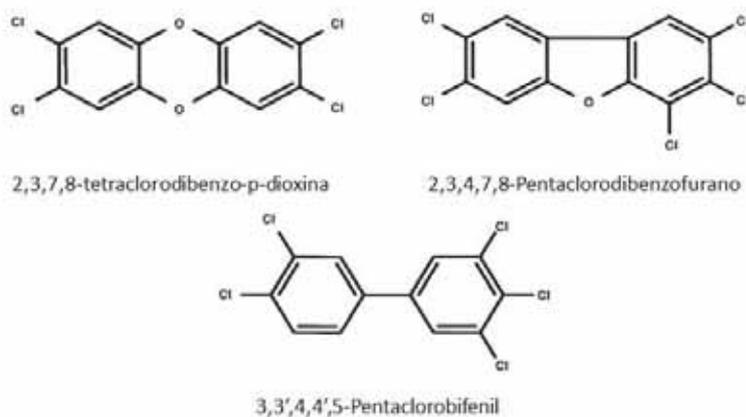
Os andrógenos são necessários para o crescimento e as atividades normais da próstata humana. A produção dos andrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Debes & Tindall, 2002), com mais de 95% da testosterona produzida pelas células de Leydig nos testículos, e 5% pelas glândulas adrenais (Hsing *et al.*, 2002). Na próstata, a testosterona livre é convertida em um andrógeno mais potente (cerca de 3 a 10 vezes), a diidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase do tipo II, a qual é mais específica para células epiteliais da próstata (Taplin & Ho, 2001). Tanto a testosterona, quanto a DHT podem se ligar ao AR e migrar para o núcleo das células epiteliais. A principal função do AR é induzir o crescimento das estruturas urogenitais (Debes & Tindall, 2002). A privação de andrógeno leva a perda da função secretora e redução do tamanho da próstata em adultos. Essa regressão é causada pela ocorrência de apoptose na próstata, e é mais extensa em regiões distais dos ductos prostáticos, os quais podem ser completamente eliminados em roedores (Sugimura *et al.*, 1986).

#### **1.4. As Dioxinas e o Receptor Aril-hidrocarboneto**

Dioxinas são contaminantes exclusivamente produzidos por processos industriais, incluindo a incineração (Olie, 1980), branqueamento de papel e celulose, e produção de alguns pesticidas, herbicidas e fungicidas (Gilpin *et al.*, 2003). Dioxinas e compostos semelhantes formam um grande grupo de substâncias que são estruturalmente relacionadas e biologicamente persistentes, capazes de induzir um grande espectro de respostas e possuem um mecanismo de ação em comum (Van den Berg *et al.*, 1998). Esse grupo inclui os dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs), bifenilos policlorados (PCBs) e compostos relacionados (Czuczwa *et al.*, 1984; Schecter *et al.*, 1988; Ferrario & Byrne, 2000).

Sua estrutura química consiste em dois anéis de benzeno conectados por dois átomos de oxigênio e contém de quatro a oito cloros. As dioxinas tóxicas e os PCDFs possuem cloros nas posições 2, 3, 7 e 8. PCDDs, PCDFs, e alguns PCBs foram atribuídos a dioxinas com fatores tóxicos de equivalência (TEFs) baseados na sua potência relativa em relação

à dioxina mais tóxica, o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), a qual é atribuída um TEF de 1 (Van den Berg *et al.*, 1998) (Figura 6).



**Figura 6.** Estrutura química de algumas dioxinas (Schechter *et al.*, 2006).

As dioxinas são substâncias lipofílicas e são capazes de resistirem à degradação ambiental. Um total de 75 congêneres de dioxinas e 135 congêneres de furano compõem a complexa mistura de dioxinas, dos quais 7 e 10 congêneres são, respectivamente, capazes de se ligar e ativar o receptor aril-hidrocarboneto (AhR) (Van den Berg *et al.* 2006). Dos 209 congêneres de bifenilos policlorados (PCB), doze têm o potencial de ativar o AhR (Van den Berg *et al.* 2006).

A exposição humana às dioxinas ocorre através do consumo de alimentos contaminados, especialmente os ricos em gordura, como leite, queijo, carne, peixes e o leite materno (Foster *et al.* 2010).

A meia-vida desses compostos em roedores é em torno de 2-4 semanas (Rose *et al.*, 1976; Olie, 1980), mas em humanos é estimada em 7-11 anos, embora haja uma ampla variação individual (Pirkle *et al.*, 1989). Estudos sobre a farmacocinética das dioxinas demonstraram que a sua meia-vida é dose-dependente, sendo a eliminação mais rápida a altas concentrações, e também varia com a composição corporal, em que a grande quantidade de gordura corpórea leva ao aumento da persistência (Emond *et al.*, 2005; Aylward *et al.*, 2005).

As dioxinas exercem seus efeitos através da ligação de alta afinidade com o AhR. Esse receptor é um fator de transcrição, pertencente à família *basic helix-loop-helix*

(*bHLH*) *PER-ARNT-SIM* (*PAS*) de proteínas dependentes de ligante envolvido na regulação da expressão de um grande número de genes. Membros da família *PAS* são conhecidos por serem “sensores biológicos”, onde a ligação do AhR com substâncias tóxicas a ele, induz ou reprime a transcrição de vários genes e resultam em uma cascata de respostas tóxicas (Carlson *et al.*, 2002). A ativação do AhR também interage com outras proteínas regulatórias como quinases específicas, proteínas de controle do ciclo celular, e outras proteínas envolvidas no processo de apoptose (Puga *et al.*, 2005). Estudos recentes com células e camundongos transgênicos com AhR ativos ou camundongos nos quais a atividade do AhR foi bloqueada, sugerem que esse receptor é uma proteína-chave na regulação do desenvolvimento e da homeostase (Andersson *et al.*, 2002, 2003).

Estudos em animais mostram que o TCDD é considerado o contaminante ambiental com maior toxicidade e, dessa forma, também apresenta efeitos consideráveis para a saúde humana (Denison *et al.*, 2003; Schecter *et al.*, 2006). De acordo com Schrenk (2006), o TCDD não se comporta como um carcinógeno completo, pois ele altera a sinalização celular envolvendo mudanças pronunciadas no padrão de fosforilação, regulando o crescimento e apoptose. Dessa forma, o TCDD se liga ao fator de transcrição AhR, o qual está ligado no citoplasma através de duas proteínas “*Heat Shock*” (HSP) de 90kDa, uma co-chaperona p23 e uma proteína de interação (XAP2). O complexo ligante-AhR é transportado para o núcleo, onde o complexo se dissocia e o AhR se dimeriza com translocador nuclear de AhR (ARNT) junto com um co-regulador para melhorar a transcrição gênica de elementos de resposta a dioxina (DRE) (Roman *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 2002; Gasiewicz *et al.*, 2003) (Figura 7).

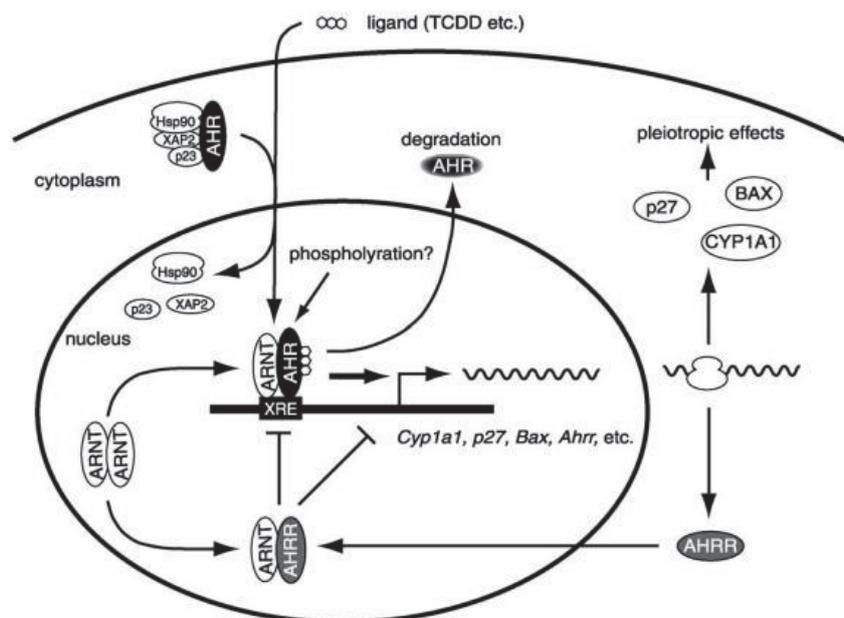


Figura 7. Via de sinalização do AhR (Mimura *et al.*, 2003).

O TCDD é considerado um agonista do AhR suspeito de ser responsável por numerosas doenças em humanos, como cânceres, imunossupressão, aterosclerose, osteoporose, doenças na pele e problemas no sistema genital (Mimura *et al.*, 2003).

Vários mecanismos são propostos para explicar a toxicidade do TCDD e seus congêneres (Safe *et al.*, 1990). O maior efeito bioquímico do TCDD mostrou ser a indução do citocromo P-450, associados com monooxigenases e proteínas relacionadas (Poland & Kimbrough, 1984). Recentemente, o AhR mediou os sistemas da xantina oxidase e da xantina desidrogenase, relacionando-se com estresse oxidativo em ratos tratados com TCDD (Sugihara *et al.*, 2001). Estudos anteriores mostraram que a administração aguda de doses únicas de TCDD para animais de laboratório induz a produção de espécies reativas de oxigênio (Bagchi *et al.*, 1993; Alsharif *et al.*, 1994), peroxidação lipídica (Stohs *et al.*, 1990) e danos ao DNA (Wahba *et al.*, 1988). Além disso, há pronunciadas diferenças na sensibilidade que as espécies animais possuem em relação ao TCDD, sendo que as DL<sub>50</sub> variam de 1µg/kg na cobaia, >5000µg/kg em hamster, 200µg/kg em camundongos e 30µg/kg nos ratos (McConnell, 1985).

## 1.5. O Sistema Genital Masculino e o TCDD

A exposição *in útero* a uma única dose de TCDD resultou em feminilização da prole masculina incluindo diminuição da distância anogenital, retardo da descida dos testículos,

diminuição do peso do parênquima testicular, redução na espermatogênese e das reservas de espermatozoides no epidídimo, diminuição da resposta à estimulação androgênica na próstata de adultos e diminuição do peso das glândulas acessórias (Mably *et al.*, 1992a, b, c; Peterson *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1995). Além disso, o estudo de Ikeda e colaboradores (2005) relataram uma redução no peso da próstata ventral de ratos *Holtzman* expostos ao TCDD no período uterino e durante a amamentação (ratas receberam uma dose antes do acasalamento – 400ng/kg - e posteriormente doses semanais durante o acasalamento, gestação e a lactação – 80ng/kg). No trabalho de Wilker e colaboradores (1996), três doses de TCDD foram administradas uma única vez em ratas *Sprague-Dawley* prenhes (0.5, 1.0 ou 2.0µg/kg corporal, no DG15), no qual foi constatado que houve uma redução no peso da próstata além de diminuição no peso da vesícula seminal, do epidídimo e do parênquima testicular, principalmente nas maiores doses de TCDD.

Com relação à próstata, o AhR media efeitos inibitórios do TCDD no crescimento dessa glândula e também modula o seu desenvolvimento normal. Evidências em camundongos “*knockout*” para AhR mostraram que esses animais tiveram um lobo dorsolateral menor, apesar de histologicamente normal (Fritz *et al.*, 2007). O desenvolvimento dos lobos ventral e dorsolateral da próstata de camundongos é inibido de maneira lobo-dependente pelas exposições ao TCDD nos períodos uterino e na amamentação. Esta resposta resulta da inibição lobo-específica da formação de brotos epiteliais no período pré-natal dos primórdios da próstata e morfogênese de ramificação ductal no período pós-natal (Ko *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003).

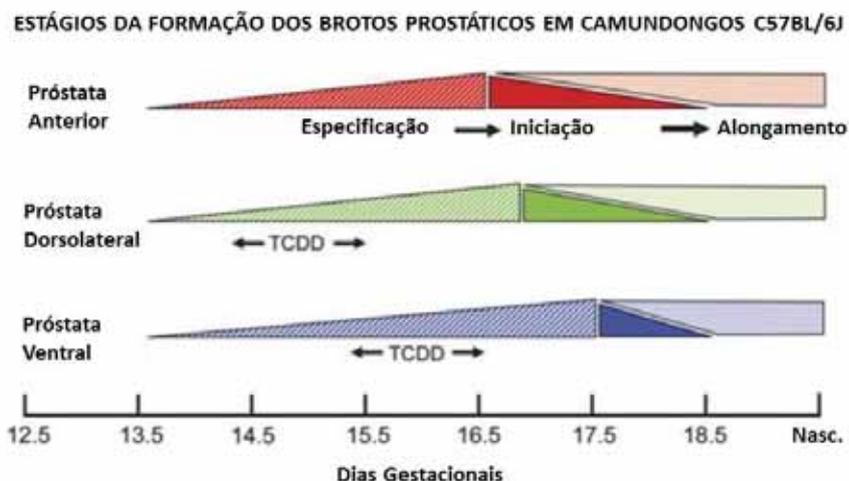
De acordo com Roman *et al.* (1998), embora o TCDD não seja capaz de interferir na manutenção da atividade secretória da próstata, induzida por andrógenos, nos adultos, é possível que ele seja capaz de interferir no início dessa atividade (citodiferenciação funcional das células epiteliais) no desenvolvimento da próstata. Atrasos na diferenciação celular, induzido pelo TCDD, provavelmente não são resultados da competição com andrógenos para ligação ao receptor de andrógeno (AR) prostático, pois nem a testosterona e nem a diidrotestosterona (DHT) são capazes de deslocar o TCDD do AhR (Poland *et al.*, 1976; Okey *et al.*, 1979; Furuhashi *et al.*, 1986). Além disso, o TCDD não é capaz de deslocar glicocorticóides, estradiol, ou progesterona de seus respectivos receptores (Neal *et al.*, 1979; Furuhashi *et al.*, 1986; Romkes *et al.*, 1987; Romkes & Safe, 1988).

Exposições uterina e lactacional ao TCDD resultaram em lesões pré-neoplásicas na próstata de camundongos senescentes da linhagem C57BL/6J, os quais não são naturalmente suscetíveis ao câncer de próstata (Fritz *et al.*, 2005). Dessa maneira, a possibilidade da ativação do AhR pelo TCDD pode aumentar o risco de câncer de próstata, particularmente em humanos e animais modelos suscetíveis à carcinogênese prostática (Fritz *et al.*, 2007).

## 1.6. O TCDD e o Desenvolvimento da Próstata

O desenvolvimento da próstata começa no período pré-natal quando andrógenos fetais se ligam a seus receptores (AR) no mesênquima do seio urogenital (UGM) para estimular a formação de ductos prostáticos, ou brotos, no epitélio do seio urogenital (UGE). Brotos prostáticos são formados em estágios sequenciais (Thomsen *et al.*, 2008). O primeiro estágio é o estágio de especificação, em que sinais moleculares especificam onde os brotos se formarão na superfície do UGS. Brotos são direcionados ao longo de três eixos assimétricos: dorsoventral, crânio-caudal e médio-lateral. O segundo estágio da formação dos brotos é o estágio de início, onde os primeiros brotos se projetam sobre a superfície do UGE (Vezina *et al.*, 2008). O estágio de início dos brotos é seguido por um estágio final do desenvolvimento dos brotos, o alongamento, em que os brotos se estendem distalmente para o UGM. Muitos brotos alongados ramificam-se, canalizam-se, e, finalmente, se desenvolvem em uma rede ductal na próstata madura, que consiste em lobos: ventral, dorsal, lateral e anterior (Shirai *et al.*, 2000) (Figura 4).

Em camundongos da linhagem C57BL/6J, o TCDD (5µg/kg em uma dose materna no DG13,5) alterou o início do brotamento prostático por todo o UGS, evitando a formação de brotos ventrais e, diminuindo o número de brotos dorsolaterais (Lin *et al.*, 2003). Além disso, o TCDD agiu diretamente no UGS inibindo o brotamento prostático (Lin *et al.*, 2004) ativando vias dependentes de AhR (Lin *et al.*, 2003). Embora o brotamento prostático necessite de ARs funcionais no UGM (Cunha & Lung, 1978), o dano ao brotamento ventral e dorsolateral devido ao TCDD não foi causado pela redução da testosterona fetal ou pelo prejuízo da atividade transcricional do AR (Ko *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003). Na figura 8, observam-se os estágios de desenvolvimento dos brotos para os diferentes lobos prostáticos, e mostra ainda o período no qual o TCDD tem um efeito mais sensível em cada lobo.



**Figura 8.** Momento de três estágios da formação dos brotos prostáticos: especificação, início e alongamento para cada lobo da próstata. Períodos aproximados do desenvolvimento embrionário quando os brotos prostáticos são especificados, iniciados e alongados em fetos machos de camundongos C57BL/6J são ilustrados para o lobo anterior, lobo dorsolateral, e lobo ventral. A “janela de maior sensibilidade” na inibição da especificação dorsolateral e ventral pelo TCDD é denotada por flechas (adaptado de Vezina *et al.*, 2008).

As superfícies ventral e lateral do UGS de fetos de camundongos expostos ao TCDD são desprovidas de saliências epiteliais, mostrando que o TCDD interfere com o brotamento prostático por agir principalmente no estágio de alongamento (Lin *et al.*, 2003). No entanto não se sabe se o TCDD inibe o brotamento por bloquear a especificação dos brotos, o início da formação dos brotos, ou ambos os estágios. O efeito inibitório mais drástico do TCDD na formação de brotos é no UGS ventral, onde nenhum broto foi observado após exposição gestacional ao TCDD (Lin *et al.*, 2003). A formação de brotos prostáticos ventrais é mais suscetível ao TCDD devido a sinalização do AhR ser mais abundante na região ventral do UGS (Vezina *et al.*, 2008).

## 1.7. O Resveratrol

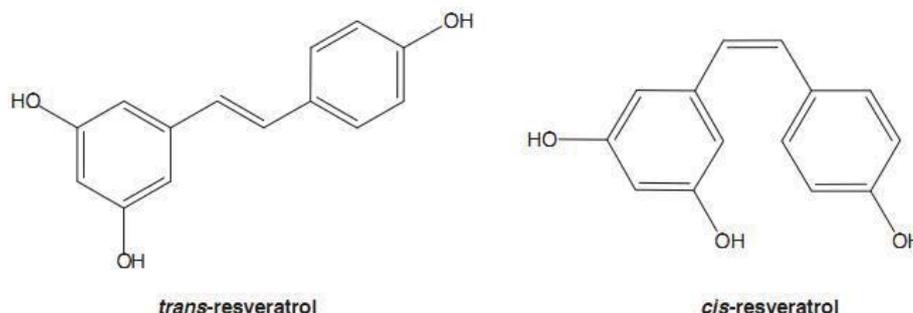
O Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural que pode ser encontrado em ao menos 72 espécies de plantas (distribuídos em 32 gêneros e 12 famílias) (Dercks *et al.*, 1989), como amendoins, *cranberries*, mirtilos, e sobretudo nas uvas e no vinho tinto. Sua quantidade é relativamente mais alta na uva, onde sua concentração na casca atinge de 50 a 100mg por grama de uva fresca, e sua concentração no vinho tinto é de 1,5 a 3mg/litro (Jeandet *et al.*, 1991). Quantidades consideráveis também são

encontradas nos vinhos *rosè* e branco (Romero-Perez *et al.*, 1996). Sua síntese é regulada pela presença de fatores estressores, como a contaminação por fungos e a radiação ultravioleta. Nas plantas, ele atua como fitoalexinas, mostrando uma capacidade de inibir o desenvolvimento de certas infecções por fungos.

Resveratrol foi primeiramente isolado em 1940, como um ingrediente das raízes do heléboro-branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) e, desde então, foi identificado em extratos de mais de 70 espécies de plantas (Takaoka, 1940; Aggarwal *et al.*, 2004 e 2006; Baur *et al.*, 2006).

Antes de 1992, não houve nenhum interesse no Resveratrol sobre a perspectiva da bioquímica dos mamíferos ou na ciência clínica, mas naquele ano, Siemann & Creasy relataram a presença de *trans*-Resveratrol no vinho. Sua estrutura química consiste na união de dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla de estireno, formando o 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. Essa ligação dupla é a responsável pelas formas isoméricas *cis* e *trans* do Resveratrol (Aggarwal *et al.*, 2004) (Figura 9). O estudo de Cal et al (2003) deu atenção ao fato de que o Resveratrol também é um constituinte da medicina oriental, por beneficiar pessoas com uma variedade de doenças, incluindo aquelas que afetam o fígado, a pele, o coração, a circulação e o metabolismo de lipídeos. (Nonomura *et al.*, 1963; Kubo *et al.*, 1981).

Suas propriedades estão sendo estudadas *in vitro*, valendo destacar propriedades antitumoral, antiagregação de plaquetas, anti-inflamatória e antialérgica (Gambini *et al.*, 2013). Além disso, destaca-se sua potente atividade antioxidante, estrogênica e com atividade antagonista ao AhR (Casper *et al.*, 1999), visto que sua estrutura química é semelhante ao TCDD, um agonista desse receptor (Figura 9).



**Figura 9.** Estruturas *cis* e *trans* do Resveratrol (Gambini *et al.*, 2013).

Apesar dos seus efeitos terapêuticos, o Resveratrol possui propriedades farmacocinéticas que não são favoráveis, uma vez que este composto apresenta baixa biodisponibilidade, sendo extensivamente e rapidamente metabolizado e excretado (Wenzel *et al.*, 2005).

Além disso, o Resveratrol está mostrando efeitos benéficos em modelos experimentais de câncer, tais como células HL-60, Hepa 1c1c7, BP<sup>+</sup>C1 (Jang *et al.*, 1997), onde suas atividades antitumorais são mediadas através da modulação de várias moléculas de sinalização celular, que regulam a progressão do ciclo celular, inflamação, proliferação, apoptose, invasão, metástase, e angiogênese das células tumorais (Aggarwal *et al.*, 2004 e 2006; Harikumar *et al.*, 2008; Shakibaei *et al.*, 2009). Foi destacado que o Resveratrol pode sensibilizar células resistentes aos agentes quimioterápicos através da superação de um ou mais mecanismos de quimioresistência. Em algumas células tumorais, entretanto, o Resveratrol mostrou agir como um quimioprotetor (Gupta *et al.*, 2011).

O estudo de Clifford e colaboradores mostrou que a suplementação com vinho tinto inibiu a formação de tumor em camundongos. Vários relatos sugerem que o Resveratrol pode mediar esse efeito protetor do consumo moderado de vinho. De fato, ele mostrou inibir eventos celulares associados com iniciação, promoção e progressão tumoral (Jang *et al.*, 1997). Resveratrol inibe a formação de radicais livres e possui atividade antimutagênica (Jang *et al.*, 1997; Uenobe *et al.*, 1997). Ele também possui um efeito anti-inflamatório devido, principalmente, a sua habilidade de inibir funções da ciclooxigenase e hidroxidroxidase (Jang *et al.*, 1997; Subbaramaiah *et al.*, 1998).

## 1.8. Justificativa

Diante desse cenário, o presente estudo se justifica no sentido de ampliar os conhecimentos sobre os efeitos quimioprotetores do Resveratrol em um modelo de exposição gestacional ao TCDD, tendo em vista que ambos competem pelo mesmo receptor e teriam efeitos antagônicos, o que teoricamente poderia diminuir os efeitos nocivos do TCDD para a diferenciação e o desenvolvimento da próstata

## 2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a atividade quimioprotetora do Resveratrol sobre o desenvolvimento da próstata de ratos expostos ao TCDD durante a fase inicial da morfogênese prostática.

1. Avaliar se o resveratrol foi capaz de alterar o efeito da exposição gestacional ao TCDD pela via do receptor Aril-hidrocarboneto;
2. Avaliar os efeitos imediatos e tardios da exposição gestacional ao TCDD e ao Resveratrol através de parâmetros morfológicos;
3. Analisar o processo de proliferação celular, e diferenciação epitelial através da frequência das células epiteliais basais;
4. Examinar a expressão dos receptores hormonais envolvidos com o desenvolvimento e manutenção da próstata.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e Ambiente de Experimentação

Ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* foram adquiridos do Biotério Central (Botucatu-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Morfologia – UNESP. Os animais foram distribuídos em quatro fêmeas por caixa e dois machos por caixa até atingirem a idade reprodutiva. As caixas utilizadas em todo o experimento são de polipropileno com as medidas de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana.

Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10\%$ ), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração comercial (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico, com capacidade para 500 ml. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e sacrifício dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (protocolo número 477-CEUA).

#### 3.2. Delineamento Experimental

Após o período de aclimação duas fêmeas sexualmente virgens foram colocadas com um macho por gaiola durante 12 horas (período de escuro). A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e da citologia vaginal positiva da fase de estro foram considerados como indicadores do dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas caixas.

Em seguida, foram constituídos 4 grupos experimentais: **Controle** (Veículos: óleo de milho e etanol 8%); **TCDD**; **TCDD+Res**: TCDD + Resveratrol; **Res**: Resveratrol. As ratas prenhes foram expostas ao TCDD por via oral na dose de  $1,0\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corpóreo diluído em óleo de milho, ou volume equivalente do veículo (óleo de milho) no dia gestacional 15 (DG15) (Bjerke & Peterson, 1994; Roman *et al.*, 1995 e 1998; Wilker *et al.*, 1996; Simaneinen *et al.*, 2004; Vezina *et al.*, 2008). Adicionalmente, o Resveratrol

foi diluído em etanol 8%, (datasheet Sigma-Aldrich Co. LLC; Chan *et al.*, 2000) e administrado do DG10 ao dia pós-natal 21 (DPN21), através de gavagem na dose de 20mg/kg de peso corpóreo (Juan *et al.*, 2005), enquanto que os grupos Controle e Res receberam o mesmo volume do veículo (Figura 10). Durante todo o período experimental os animais receberam ração basal e água *ad libitum*. O TCDD e o Resveratrol foram adquiridos em altos graus de pureza da Sigma-Aldrich Co. LLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

No dia do nascimento a prole foi pesada e a distância anogenital foi verificada para a separação de machos e fêmeas. As ninhadas foram reduzidas privilegiando-se a proporção de 4 machos e 4 fêmeas/ninhada. Foram selecionados 2 machos/ninhada de cada grupo experimental, os quais foram avaliados em dois momentos: no DPN1 para a avaliação dos efeitos imediatos, e no DPN90 para a avaliação dos efeitos tardios.

Os machos recém-nascidos (DPN1) foram decapitados (n=2/ninhada) e o broto prostático (região pélvica da uretra) de cada um foi coletado e destinado às rotinas histotécnicas para a avaliação morfológica e imuno-histoquímica dos efeitos imediatos do TCDD (com ou sem a adição do Resveratrol) sobre o desenvolvimento e morfogênese prostática pré-natal. No DPN90, machos provenientes das mesmas ninhadas (n=2/ninhada) tiveram a privação de consciência em câmara de CO<sub>2</sub> e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado pelo rompimento dos vasos cervicais para dosagens hormonais de testosterona. O complexo prostático foi removido, a próstata ventral foi pesada e os hemilobos ventrais direitos fixados e destinados às rotinas morfológicas e imunohistoquímicas. Já os hemilobos ventrais esquerdos foram congelados a -80° C para as análises moleculares.

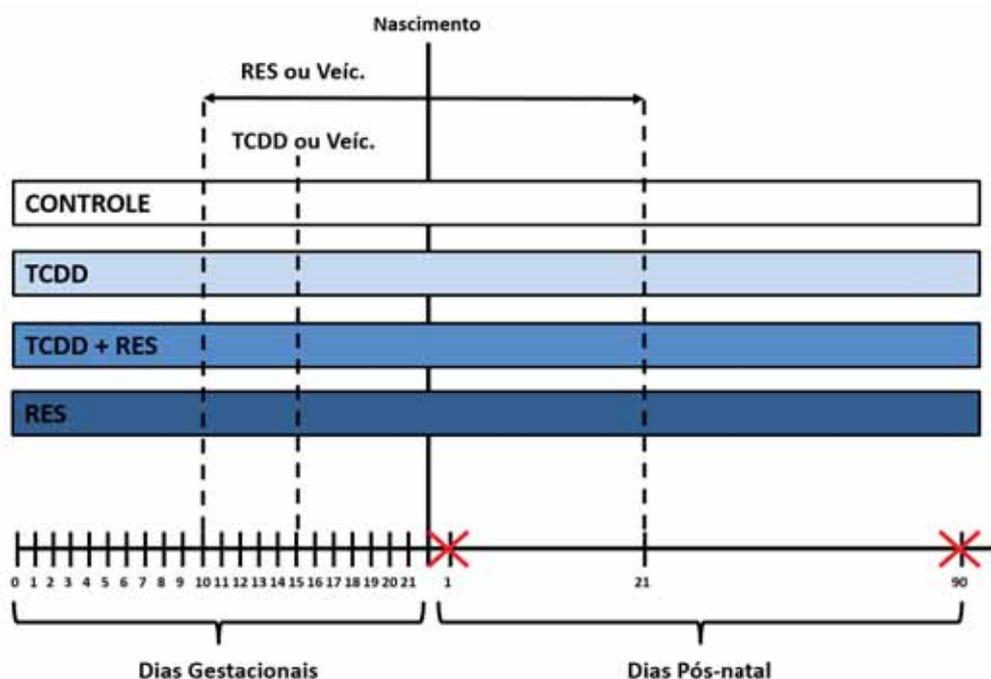


Figura 10. Esquema do delineamento experimental.

### 3.3. Dosagem Hormonal Sérica

No DPN1 e no DPN90, após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos *ependorf* de 1,5 mL sem aditivo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, a 4°C por 20 minutos, para obtenção do soro.

O soro foi separado e congelado para posterior análise. A dosagem de testosterona foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/SP - USP, por radioimunoensaio de duplo-anticorpo utilizando o kit Coat-A-Count® (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). As variações intra e inter-ensaio foram de 1,75% e 20%, respectivamente.

### 3.4. Microscopia de Luz

Os fragmentos do seio urogenital e da próstata ventral removidos foram fixados por imersão em *methacarn* (Putchler et al, 1970) por 3 horas e incluídas em Paraplast®. Cortes de 5 µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Após microtomia, os cortes do material incluído em Paraplast<sup>®</sup>, foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) para estudo morfológico.

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando um sistema analisador de imagens (Axio-Vision) acoplado a fotomicroscópio Zeiss AxioLabA1.

### 3.5. Análise Imuno-histoquímica

Fragmentos do seio urogenital (DPN1) e da próstata ventral (DPN90) foram incluídos em Paraplast<sup>®</sup> conforme descrito anteriormente. Os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica em ambiente úmido a 100°C em tampão Tris-EDTA (pH9,0) por 30-45 minutos. Após a lavagem em água destilada os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em peróxido de hidrogênio e metanol e ao bloqueio de proteínas inespecíficas (BSA 3% + 1% de soro de cabra não imunogênico). Após o bloqueio, os anticorpos primários foram diluídos em BSA a 1% na concentração recomendada pelo fabricante para os seguintes anticorpos:

Anticorpo Primário	Código	Fabricante	Deteccção	Padrão de Marcação
<b>AR</b>	sc-816	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Receptor de Andrógeno	Nuclear
<b>Ki-67</b>	ab16667	<i>Abcam Inc.</i>	Célula em Proliferação	Nuclear
<b>P63</b>	Clone 4A4	<i>Millipore Corporation</i>	Célula Basal	Nuclear
<b><math>\alpha</math>-actina</b>	ab6594	<i>Abcam Inc</i>	Célula Muscular Lisa	Citoplasmático
<b>AhR</b>	Ab84833	<i>Abcam Inc</i>	Receptor Aril-hidrocarboneto	Citoplasmático

Em seguida, após a incubação com os anticorpos primários durante período *overnight*, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário diluído em BSA a 1% na concentração recomendada pelo fabricante, por duas horas, em estufa a 36°C.

Posteriormente, os cortes foram revelados com solução de diaminobezidina (DAB), e contra-corados com hematoxilina.

### **3.6. Determinação do Índice de Células Mesenquimais AR Positivas**

O índice de células mesenquimais AR-positivas no DPN1 foi determinado dividindo-se o número de células AR-positivas pelo número total de células analisadas e, em seguida, esse valor foi multiplicado por 100 para cada animal nos diferentes tratamentos. O n utilizado para análise deste parâmetro foi de 5 campos histológicos por animal em 5 animais/grupo experimental provenientes de diferentes ninhadas.

### **3.7. Determinação do índice de proliferação celular**

O índice de células epiteliais dos brotos prostáticos, do mesênquima prostático e das células epiteliais prostáticas dos animais de DPN90 Ki-67 positivas (em proliferação celular) foi determinado dividindo-se o número de células Ki-67 positivas pelo número de células analisadas e, finalmente, o valor multiplicado por 100 para cada animal nos diferentes tratamentos. O n utilizado para análise deste parâmetro foi de 5 campos histológicos por animal em 5 animais/grupo experimental provenientes de diferentes ninhadas.

### **3.8. Análise estatística dos dados**

Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância segundo ANOVA, e posteriormente, submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. A diferença estatística entre os parâmetros será considerada para valores onde  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Parâmetros Gestacionais e Lactacionais

O ganho de peso das mães durante a gestação foi similar entre os grupos experimentais, assim como o seu peso no 20º dia de gestação. Além disso, não houve diferença significativa nos consumos de água e ração oferecidos às mães (Tabela 1).

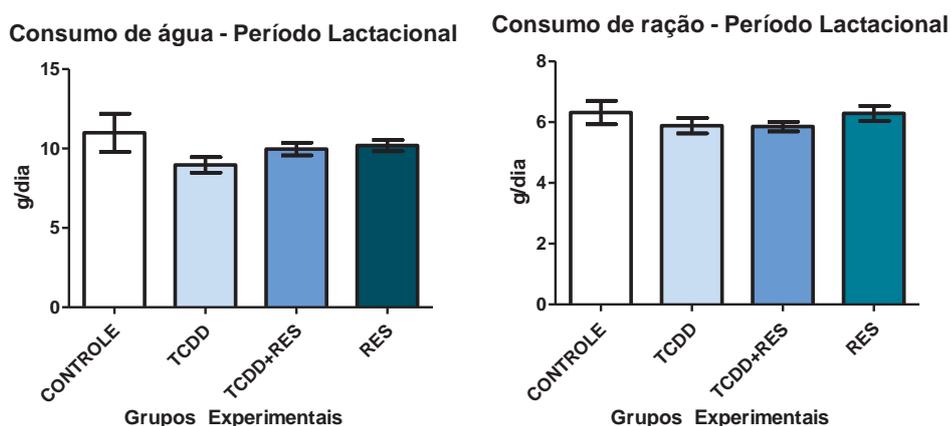
Após o nascimento, a média de filhotes por ninhada e a relação macho/fêmea foi examinada. No entanto, ambos os parâmetros não foram afetados nos grupos experimentais (Tabela 1).

**Tabela 1** – Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no período gestacional.

Parâmetros	Grupo/Tratamento			
	G1 Controle (n=6)	G2 TCDD (n=10)	G3 TCDD+Res (n=10)	G4 Res (n=7)
Ganho de peso (g)	99,99±1,66	116,01±1,07	113,87±1,07	111,82±1,52
Peso no 20º DG (g)	335,86±1,83	362,86±1,90	363,53±1,90	365,10±1,91
Animais por ninhada (n)	11,3±0,34	11,43±0,48	11,17±0,56	11,7±0,34
Relação macho/fêmea (n)	1,79±0,22	0,85±0,09	1,0±0,10	0,89±0,13
Consumo de água/dia (mL)	88,82±1,57	88,26±0,94	101,25±1,01	97,99±1,41
Consumo de ração/dia (g)	47,57±1,50	51,76±0,72	51,79±0,72	51,80±1,03

Dados expressos pela Média ± Erro Padrão da Média. DG: Dia Gestacional

Durante o período de lactação, o consumo de água e ração pelas mães também foi avaliado. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nesses dois parâmetros (Figura 11).



**Figura 11.** Consumo de água e ração no período lactacional. Dados expressos pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

## 4.2. Dia Pós-Natal 1 (DPN1)

### 4.2.1. Parâmetros Biométricos

Parâmetros biométricos de toda a ninhada foram avaliados no DPN1. Em relação ao peso corpóreo dos machos e fêmeas no DPN1, houve semelhança entre os grupos experimentais (Tabela 2). Além disso, não houve diferença significativa na distância anogenital entre os grupos experimentais (Tabela 2).

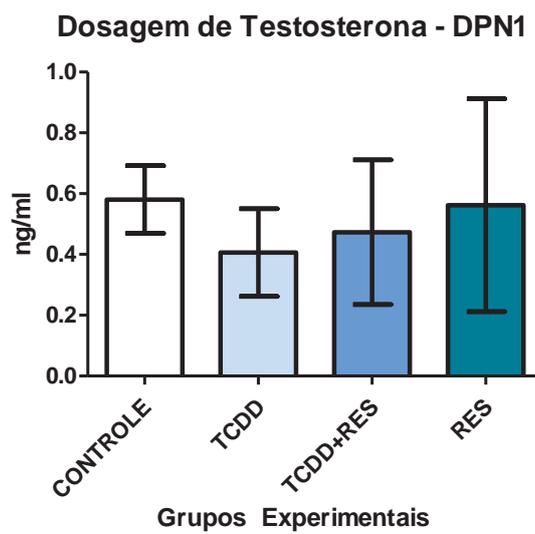
**Tabela 2**– Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no DPN1.

Parâmetros	Grupo/Tratamento			
	G1 Controle	G2 TCDD	G3 TCDD + Res	G4 Res
Peso dos machos (g)	6,90 $\pm$ 0,37	6,73 $\pm$ 0,21	6,87 $\pm$ 0,13	7,46 $\pm$ 0,24
Peso das fêmeas (g)	6,486 $\pm$ 0,32	6,30 $\pm$ 0,20	6,00 $\pm$ 0,00	6,83 $\pm$ 0,21
DAG dos machos (mm)	4,34 $\pm$ 0,04	4,23 $\pm$ 0,06	4,27 $\pm$ 0,13	4,28 $\pm$ 0,08
DAG das fêmeas (mm)	2,35 $\pm$ 0,05	2,28 $\pm$ 0,06	2,30 $\pm$ 0,30	2,33 $\pm$ 0,11

Dados expressos pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média. DPN: dia pós-natal. DAG: distância anogenital.

#### 4.2.2. Dosagem de Testosterona Sérica

Com relação à dosagem hormonal de testosterona sérica realizada nos animais de DPN1, a estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 12).

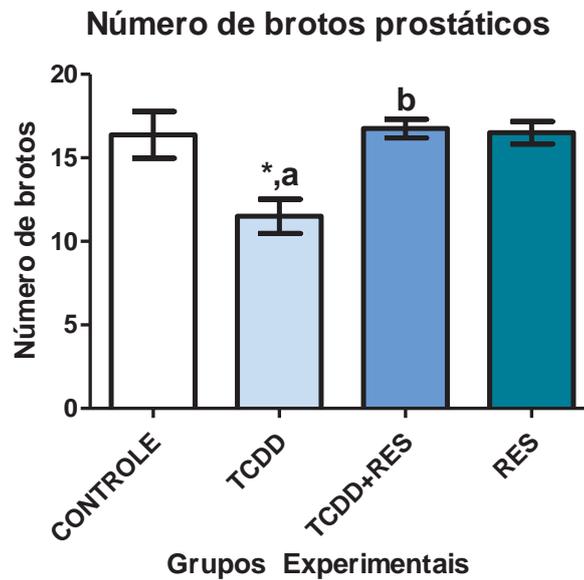


**Figura 12.** Dosagem hormonal de testosterona sérica nos animais de DPN1. Dados expressos em Média± Erro Padrão da Média.

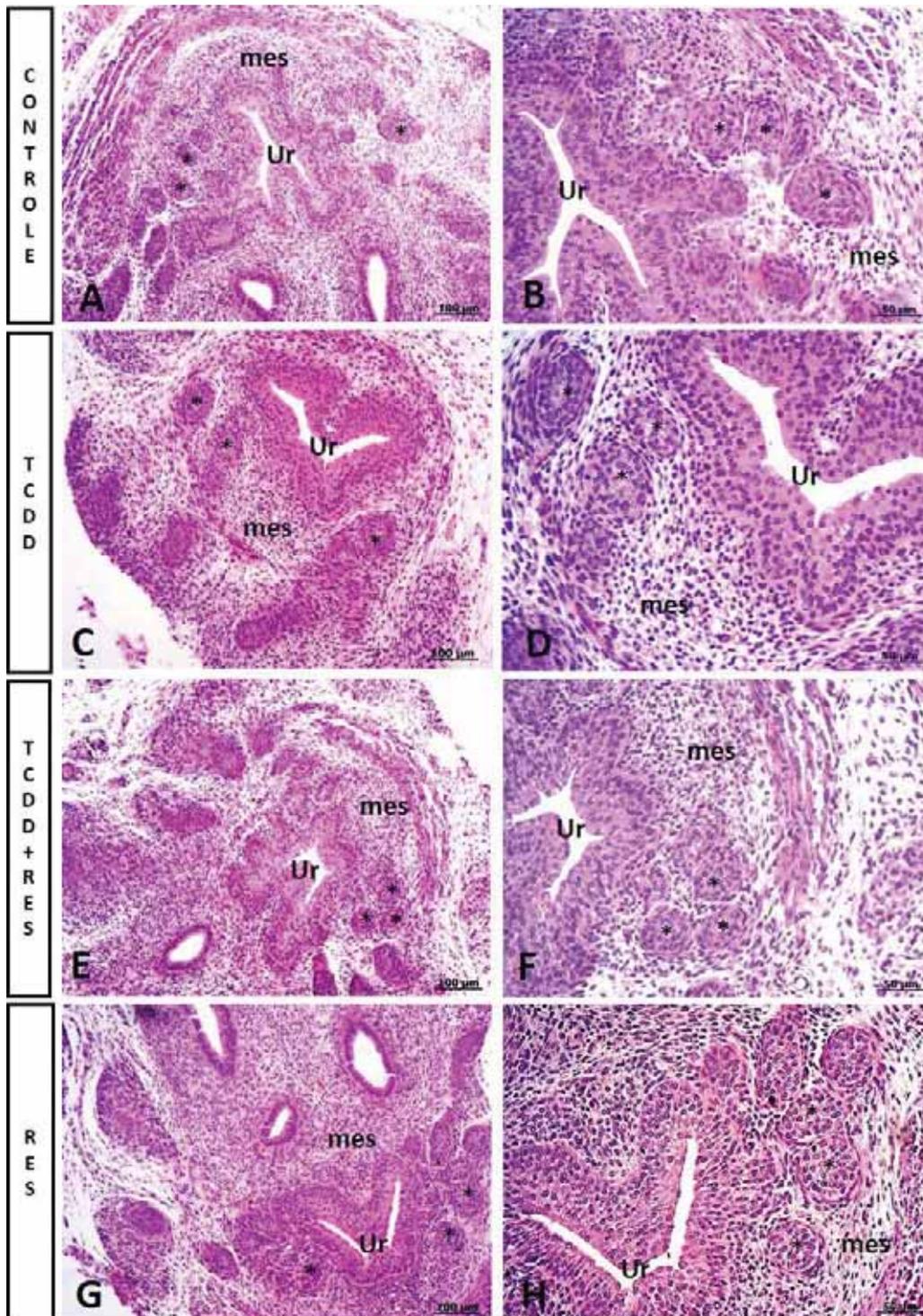
#### 4.2.3. Análise Histológica do Seio Urogenital

A região ventral do seio urogenital foi constituída por brotos prostáticos, ou cordões celulares maciços com característica epitelial, que se diferenciarão nos ductos e nos ácinos prostáticos no decorrer do desenvolvimento da próstata. Como ilustrado na Figura 13, os brotos prostáticos formaram-se ao redor da porção inicial da uretra em todos os grupos experimentais. Além disso, observou-se que esses brotos se desenvolveram dentro de um mesênquima rico em células e pobre em matriz extracelular. Esses brotos ou cordões prostáticos se desenvolveram em sentido distal para formação dos futuros lobos prostáticos. A contagem dos brotos epiteliais mostrou uma redução no número de brotos no grupo TCDD quando comparado ao Controle (Figura 13). Além disso, o grupo TCDD+Res revelou um número de brotos semelhante ao grupo Controle. Esse dado também pode ser observado através dos cortes histológicos corados com Hematoxilina-

Eosina, onde o grupo TCDD mostrou menos brotos formados em relação ao grupo Controle, e o grupo TCDD+Res apresentou uma morfologia semelhante ao grupo Controle.



**Figura 13.** Contagem dos brotos prostáticos nos animais de DPN1. Dados expressos em Média ± Erro Padrão da Média. O asterisco (\*) significa diferença em relação ao grupo Controle e letras diferentes significam diferenças entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ).

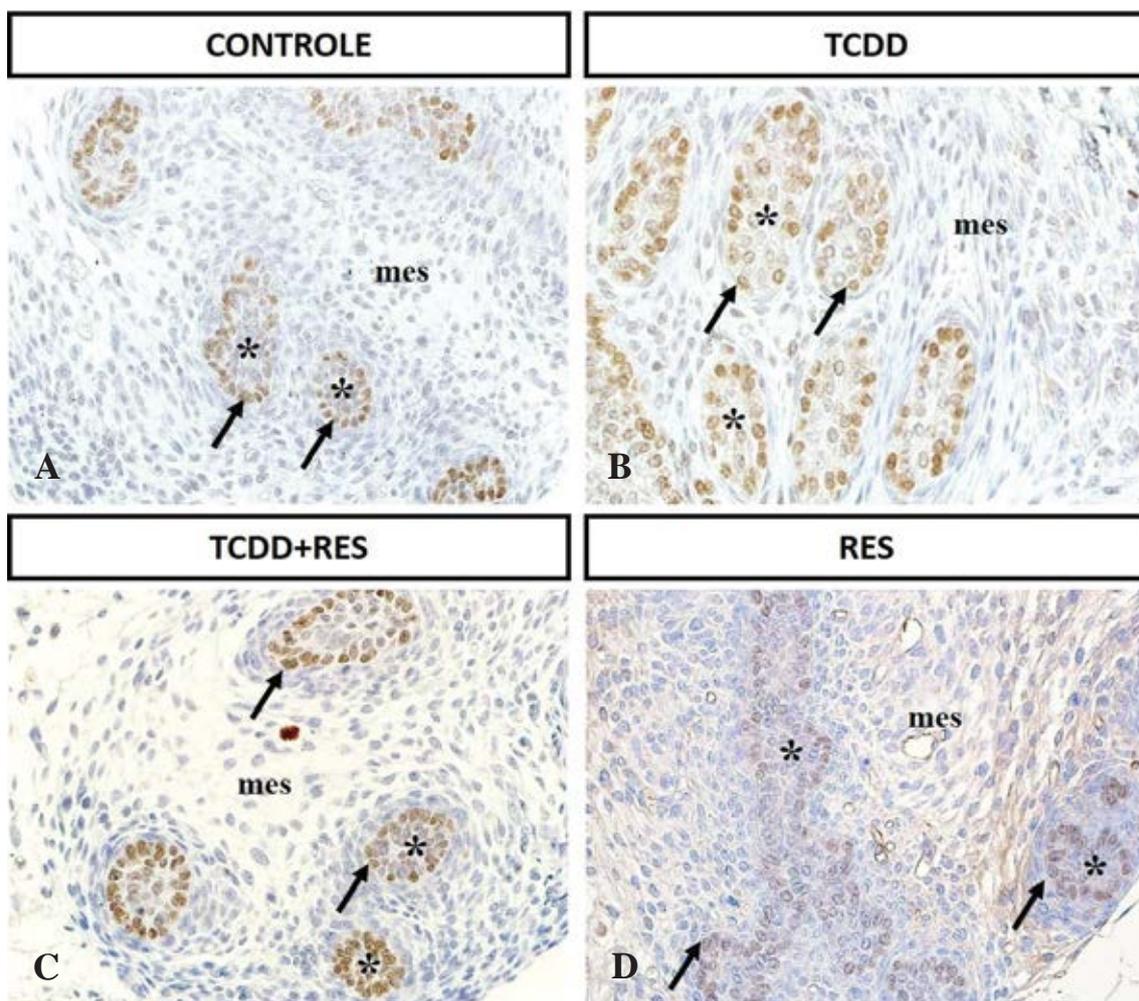


**Figura 13.** Cortes histológicas da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) corados com hematoxilina-eosina (n=8). **A** e **B** pertencem ao grupo Controle, **C** e **D** ao grupo TCDD, **E** e **F** ao grupo TCDD+Res e **G** e **H** ao grupo Res.\*: brotos prostáticos; Ur: uretra proximal; mes: mesênquima. Figuras A, C, E e G estão em aumento de 50x, e as Figuras B, D, F e H estão em aumento de 400x.

#### 4.2.4. Análises Imuno-histoquímicas

##### 4.2.4.1. Células basais progenitoras – P63

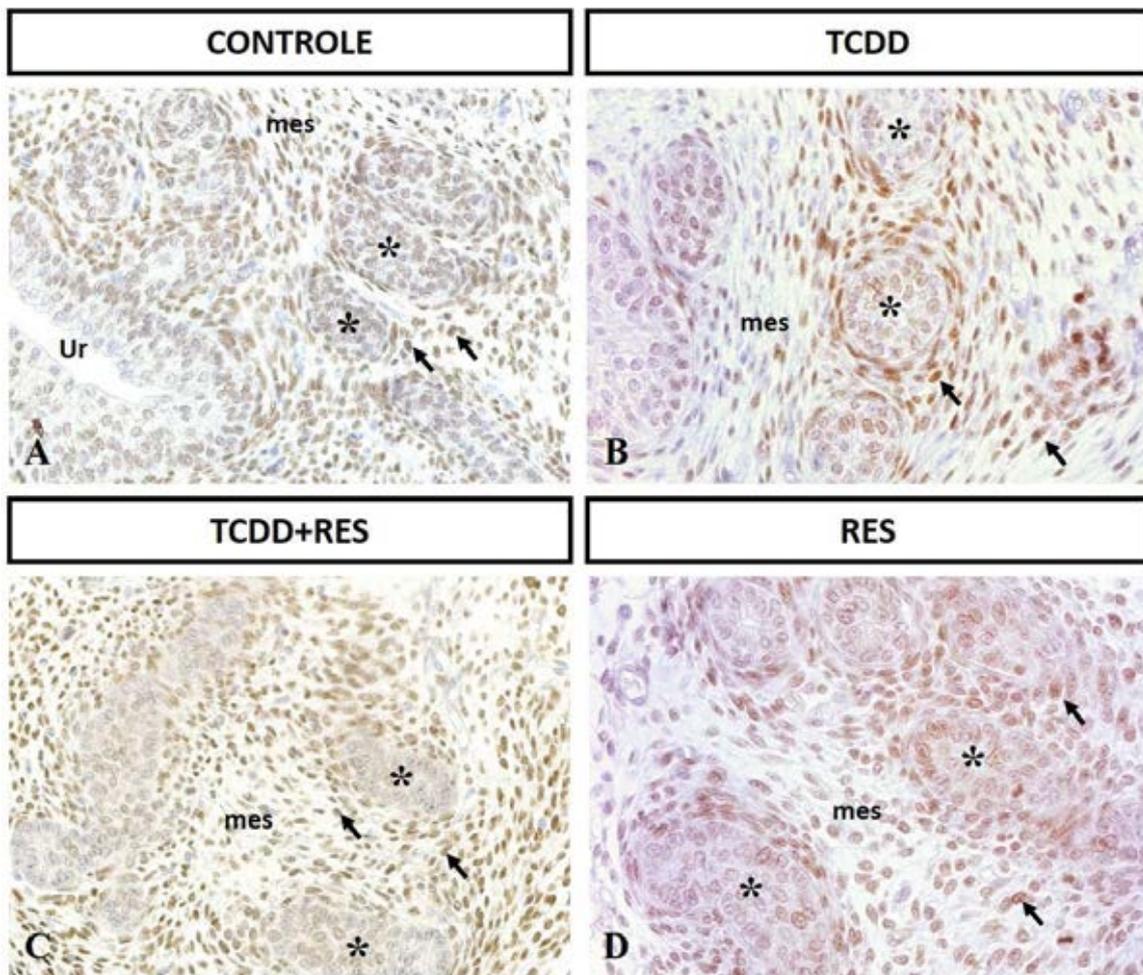
Com relação à imunomarcção de células basais progenitoras, observou-se que essa marcação foi localizada na periferia dos brotos prostáticos de todos os grupos experimentais (Figura 15a-c). Os animais do grupo TCDD (Figura 15b) apresentaram uma redução na intensidade de marcação em células positivas, quando comparado aos animais Controle (Figura 15a) e TCDD+Res (Figura 15c).



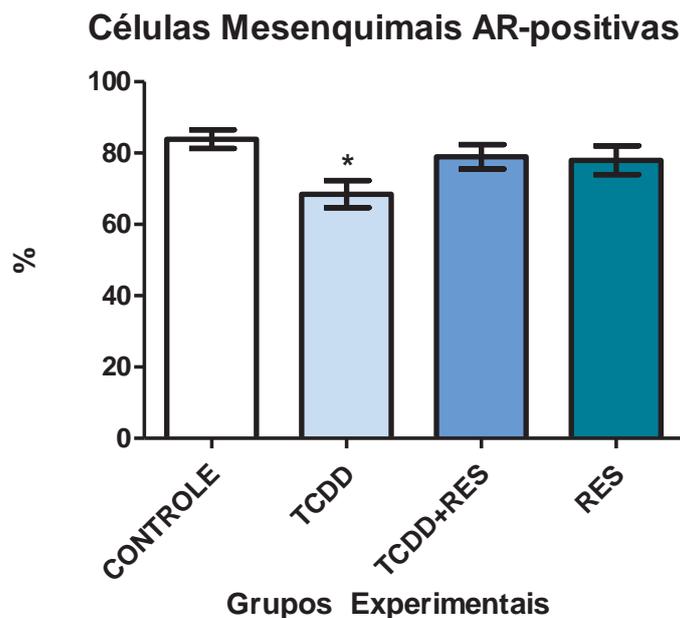
**Figura 15.** Cortes histológicas da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) após reações de imuno-histoquímica para P63 **Fig. A:** Controle; **fig. B:** TCDD; **fig. C:** TCDD+Res; **fig. D:** Res \* : brotos prostáticos; **Ur:** uretra proximal; **mes:** mesênquima; **seta:** marcação positiva. Aumento de 400x.

#### 4.2.4.2. Receptor de Andr6geno Mesenquimal

A imunomarca7ao para o AR mostrou-se intensa e frequente no mes6nquima circundante (Figuras 16). Importante notar que a marca7ao para AR foi fraca nos brotos epiteliais prostáticos. Al6m disso, a imunomarca7ao para o AR no grupo exposto ao TCDD foi menor quando comparada com os demais grupos experimentais em termos de núcleos marcados. (Figuras 16 e 17).



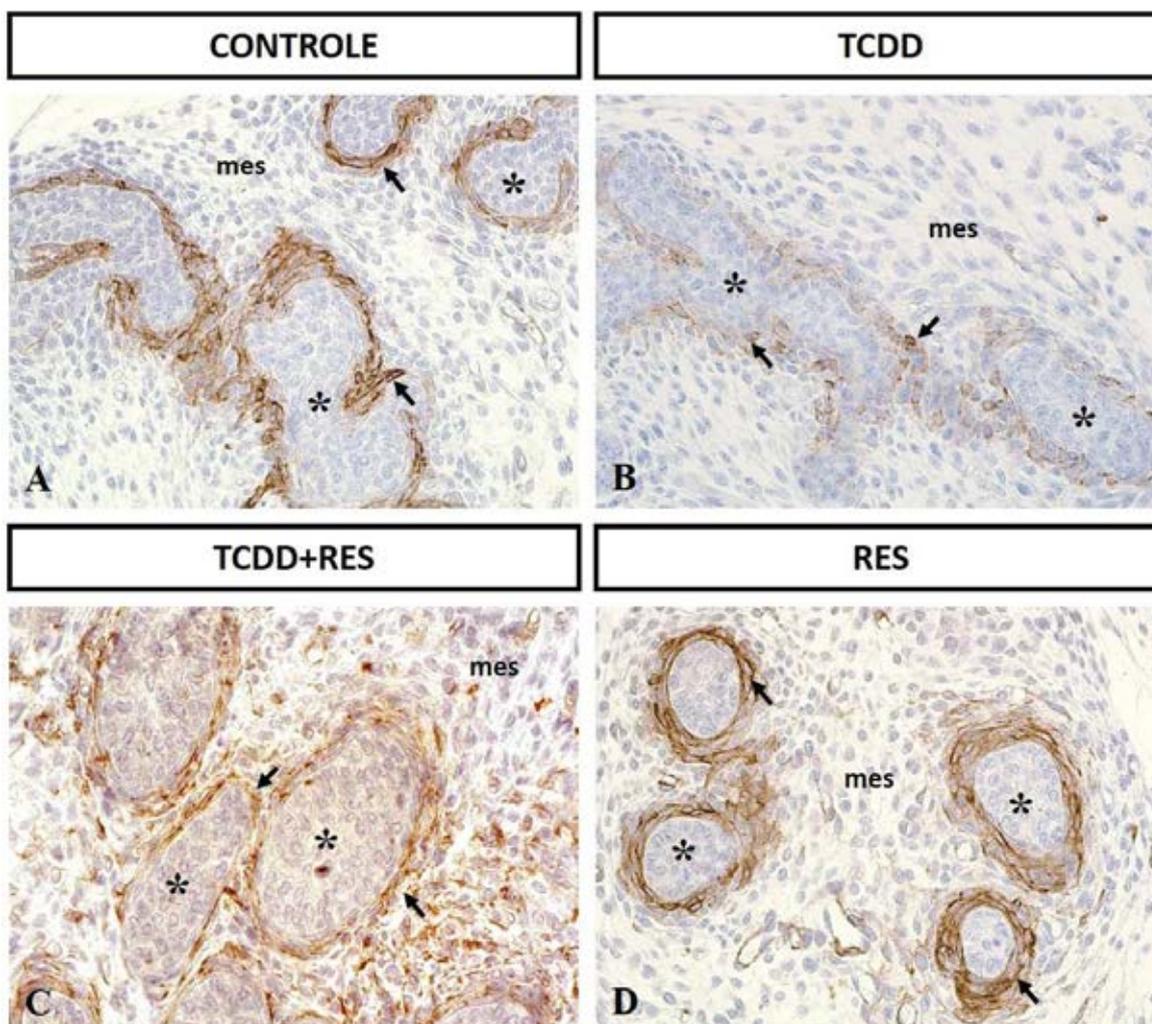
**Figura 16.** Cortes histol6gicos da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) ap6s rea7oes de imuno-histoquímica para Receptor de Andr6geno (AR) (n=3). **Fig. A:** Controle; **fig. B:** TCDD; **fig. C:** TCDD+Res; **fig. D:** Res \*: brotos prostáticos; **Ur:** uretra proximal; **mes:** mes6nquima; **seta:** marca7ao positiva. Aumento de 400x.



**Figura 17.** Contagem das células mesenquimais dos animais de DPN1. Dados expressos em Média± Erro Padrão da Média. O asterisco (\*) significa diferença significativa em relação ao Controle (\* $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.4.3. Diferenciação em células musculares lisas

Na imunomarcagem para  $\alpha$ -actina pode-se observar que o grupo exposto ao TCDD (Figura 18b) mostrou imunorreatividade pontual ao redor dos brotos, quando comparado ao grupo Controle (Figuras 18a). Além disso, o grupo TCDD+Res (Figura 18c) mostrou uma marcação mais intensa e homogênea para  $\alpha$ -actina, evidenciando uma fina camada de células mesenquimais se diferenciando em músculo liso ao redor dos brotos, o que o assemelhou ao grupo Controle. Enquanto isso, no grupo que só recebeu o Resveratrol (Figuras 18d) foi observado que houve uma forte marcação para essa proteína e uma camada bem espessa e organizada de células mesenquimais que já expressam a  $\alpha$ -actina, evidenciando uma maior diferenciação do mesênquima em células musculares lisas ao redor dos brotos prostáticos.

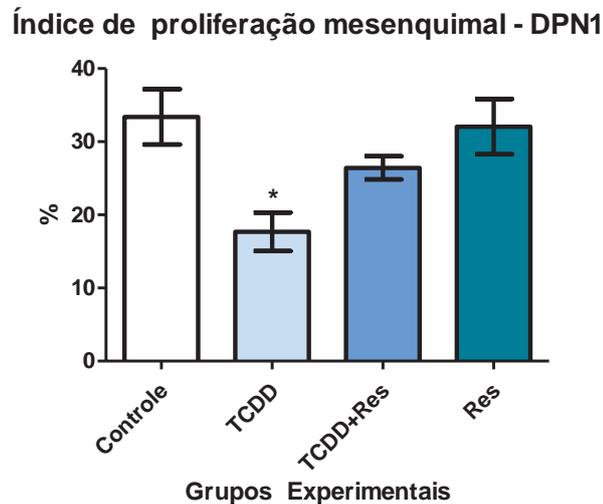


**Figura 18.** Cortes histológicas da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) após reação de imuno-histoquímica para alfa-actina (n=3). **Fig. A:** Controle; **fig. B:** TCDD; **fig. C:** TCDD+Res; **fig. D:** Res. \*: brotos prostáticos; **mês:** mesênquima; **seta:** marcação positiva. Aumento de 400x.

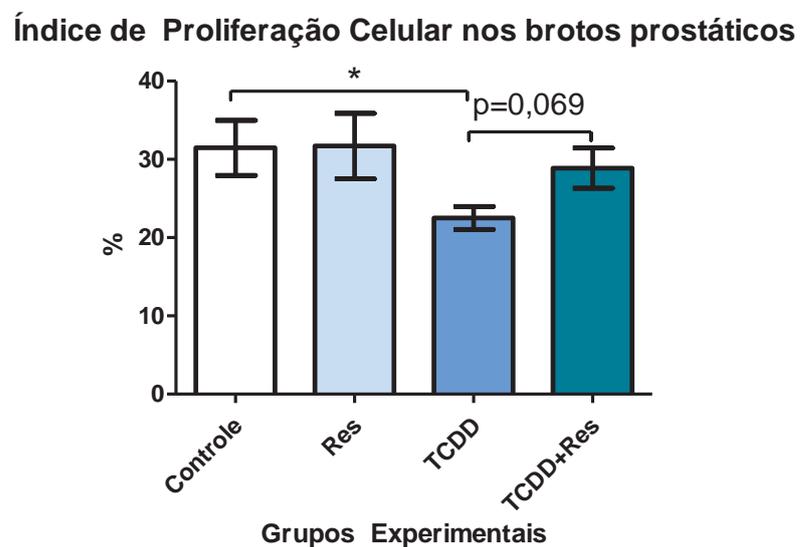
#### 4.2.4.4. Índice de proliferação mesenquimal e nos brotos prostáticos

No que diz respeito à marcação para Ki67 nos mesênquima periductal, o índice de proliferação mostrou que o grupo TCDD teve menos núcleos marcados quando comparado com o grupo Controle (Figuras 19 e 20). Isso se reflete no índice de proliferação nos brotos prostáticos, onde o grupo TCDD teve um menor índice quando comparado com o grupo Controle. Além disso, houve uma tendência à redução no índice de proliferação nos brotos prostáticos no grupo exposto ao TCDD em relação ao grupo TCDD+Res (Figuras 20 e 21). Em ambos os parâmetros, o grupo TCDD+Res se

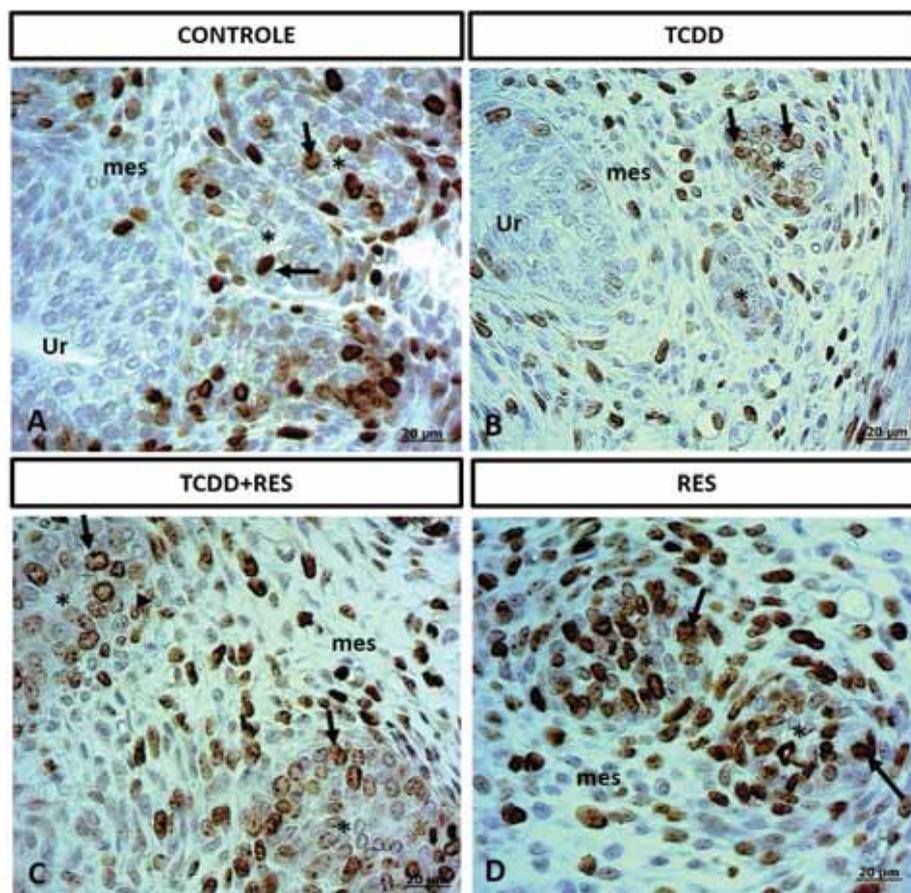
assemelhou ao grupo Controle em termos de núcleos marcados (Figuras 19, 20 e 21) e não houve diferença entre os grupos Controle e Res (Figura 17).



**Figura 19.** Dados expressos pela Média  $\pm$  EPM do índice epitelial de proliferação celular no mesênquima prostático dos grupos experimentais no DPN1. O asterisco (\*) significa diferença significativa em relação ao Controle ( $*p < 0,05$ ).



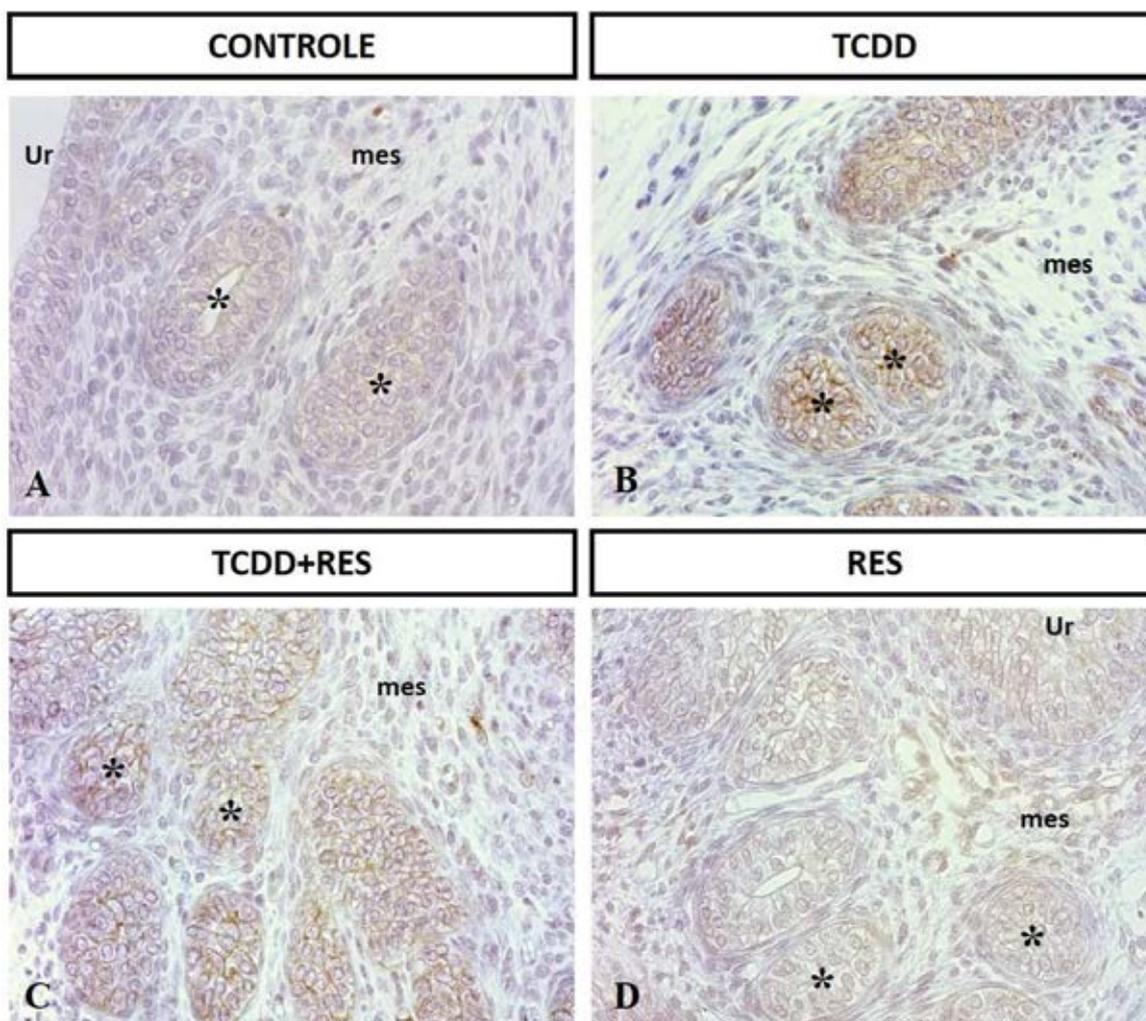
**Figura 20.** Dados expressos pela Média  $\pm$  EPM do índice epitelial de proliferação celular nos brotos prostáticos dos grupos experimentais no DPN1. O asterisco (\*) significa diferença significativa em relação ao Controle ( $*p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Cortes histológicas da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) após reação de imuno-histoquímica para Ki67 (n=5). **Fig. A:** Controle; **fig. B:** TCDD; **fig. C:** TCDD+Res; **fig. D:** Res. \*: brotos prostáticos; Ur: uretra proximal; mes: mesênquima; seta: marcação positiva. Aumento de 400x

#### 4.2.4.5. Expressão do Receptor Aril-hidrocarboneto

A imunomarcção citoplasmática para o AhR foi localizada no epitélio dos brotos prostáticos e ausente no mesênquima periuretral dos quatro grupos experimentais (Figura 22). Com relação à intensidade dessa marcação, o grupo exposto ao TCDD mostrou uma maior intensidade de marcação citoplasmática, evidenciando uma maior expressão do AhR nesse grupo (Figura 22b), quando comparado aos demais grupos experimentais. Além disso, o grupo TCDD+Res (Figura 22c) mostrou uma menor intensidade quando comparado ao grupo que recebeu TCDD, porém um pouco mais intensa quando comparado ao grupo Controle. Já o grupo que recebeu somente o Resveratrol mostrou uma marcação bem leve no citoplasma das células dos brotos prostáticos.



**Figura 22.** Cortes histológicas da região pélvica da uretra dos animais experimentais no DPN1 (brotos prostáticos) após reação de imuno-histoquímica para AhR (n=3). **Fig. A:** Controle; **fig. B:** TCDD; **fig. C:** TCDD+Res; **fig. D:** Res. \*: brotos prostáticos; Ur: uretra proximal; mes: mesênquima. Aumento de 400x.

### 4.3. Dia Pós-Natal 90 (DPN90)

#### 4.3.1. Parâmetros Biométricos e Hormonal

No DPN90, o peso corpóreo dos machos foi mensurado, e pôde-se observar que o grupo exposto a uma dose única de TCDD teve um peso corpóreo maior quando comparado com os demais grupos experimentais (Tabela 3). No entanto, nem o peso absoluto e nem o peso relativo do lobo ventral da próstata foram alterados pela exposição ao TCDD, ou seja, não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Com relação à dosagem de testosterona sérica realizada nesses animais, os dados mostraram que não houve diferença entre os grupos experimentais (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no DPN90

Parâmetros	Grupo/Tratamento			
	G1 Controle (n=6)	G2 TCDD (n=10)	G3 TCDD + RES (n=10)	G4 RES (n=7)
<b>PARÂMETROS BIOMÉTRICOS</b>				
Peso dos machos (g)	361,47±6,12	406,07±6,98*	391,73±8,95	391,39±9,03
Peso da Próstata Ventral (g)	0,38±0,03	0,37±0,01	0,37±0,01	0,44±0,03
Peso Relativo da Próstata Ventral (mg/g)	1,06±0,08	0,91±0,03	0,96±0,04	1,14±0,06
<b>PARÂMETROS HORMONAIS</b>				
Testosterona Sérica (ng/mL)	1,92±0,37	2,09±0,72	2,58±0,75	1,60±0,60

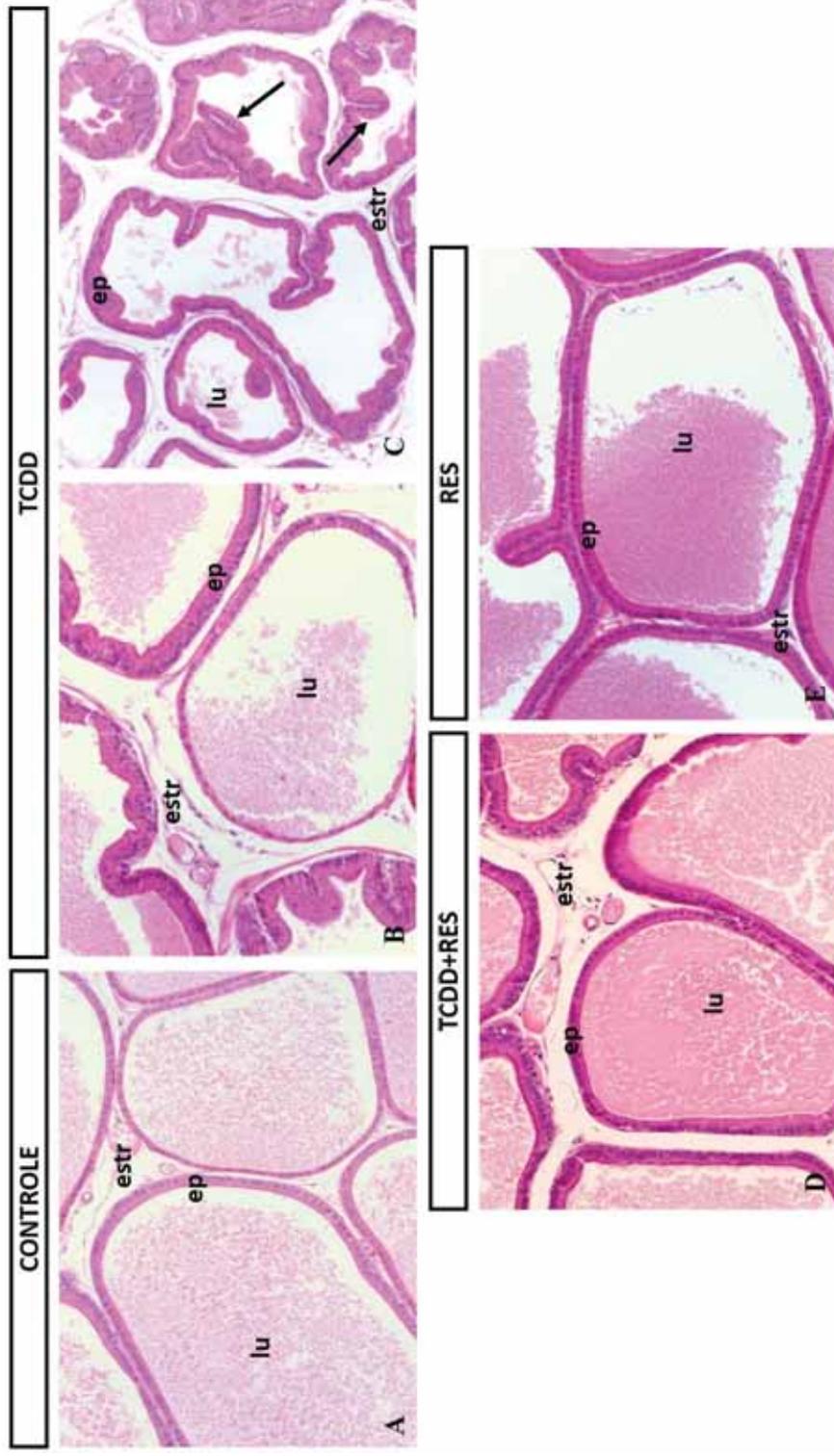
Valores em média ± erro padrão da média. DPN: dia pós-natal.

Valores com \* diferem do grupo Controle ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2. Análise Morfológica e Estereologia da Próstata Ventral

No que diz respeito à morfologia do lobo ventral da próstata, todos os grupos experimentais apresentaram uma regularidade na arquitetura glandular, com a presença de ácinos compostos por um epitélio contínuo variando de colunar simples a um epitélio simples mais baixo, sustentado por um estroma fibromuscular (Figura 23a, c, d). No entanto, no grupo exposto ao TCDD houve uma predominância de ácinos pregueados localizados na periferia, caracterizando uma hiperplasia epitelial, além desses ácinos serem menores quando comparados com os demais grupos experimentais (Figura 23b).

A análise estereológica da próstata ventral dos animais de DPN90 não revelou nenhuma diferença nos compartimentos epitelial, luminal e estromal entre os grupos experimentais (Tabela 4)



**Figura 23.** Cortes histológicos do lobo ventral da próstata dos animais experimentais no DPN90 corados com hematoxilina-eosina (n=10). **Fig. A** pertence ao grupo Controle; **fig. B**, ao grupo TCDD; **fig. C**, ao grupo TCDD; **fig. D**, ao grupo TCDD+Res; **fig. E**, ao grupo Res. **ep:** epitélio; **lu:** lumen; **estr:** estroma; **seta:** hiperplasia glandular fisiológica. Aumento de 200x.

**Tabela 4:** Dados quantitativos dos diferentes grupos experimentais no DPN90

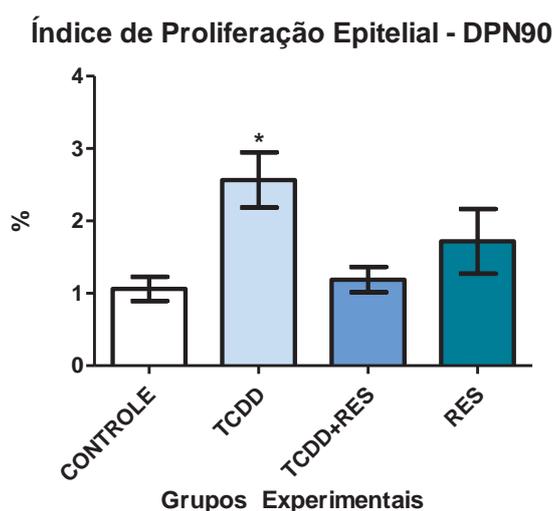
Parâmetros Estereológicos	Grupo/Tratamento			
	G1	G2	G3	G4
	Controle (n=5)	TCDD (n=5)	TCDD + RES (n=5)	RES (n=5)
Compartimento Luminal (%)	54,78±4,65	58,71±3,5	57,35±1,82	62,52±2,60
Compartimento Estromal (%)	20,85±3,5	17,96±1,43	22,01±0,66	16,04±1,38
Compartimento Epitelial (%)	24,35±2,89	23,30±2,33	20,64±1,59	21,60±1,36

Valores em média ± erro padrão da média.

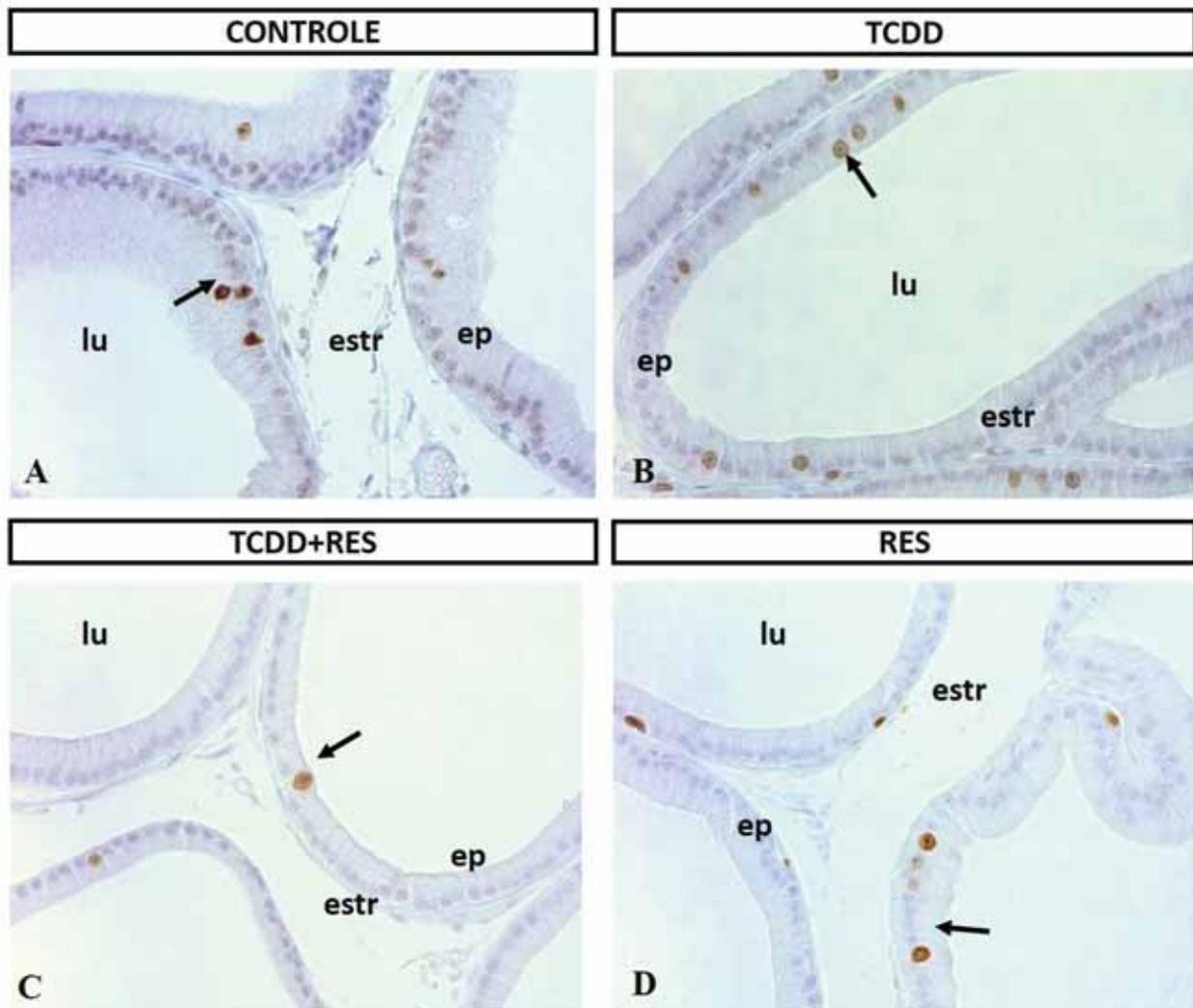
### 4.3.3. Análises Imuno-histoquímicas

#### 4.3.3.1. Índice de Proliferação Epitelial

A imuno-histoquímica para Ki-67 revelou uma quantidade significativamente maior de células em proliferação no epitélio prostático dos animais pertencentes ao grupo TCDD, revelando um maior índice de proliferação epitelial, quando comparado com o grupo Controle (Figuras 24 e 25). Já os demais grupos não diferiram entre si.



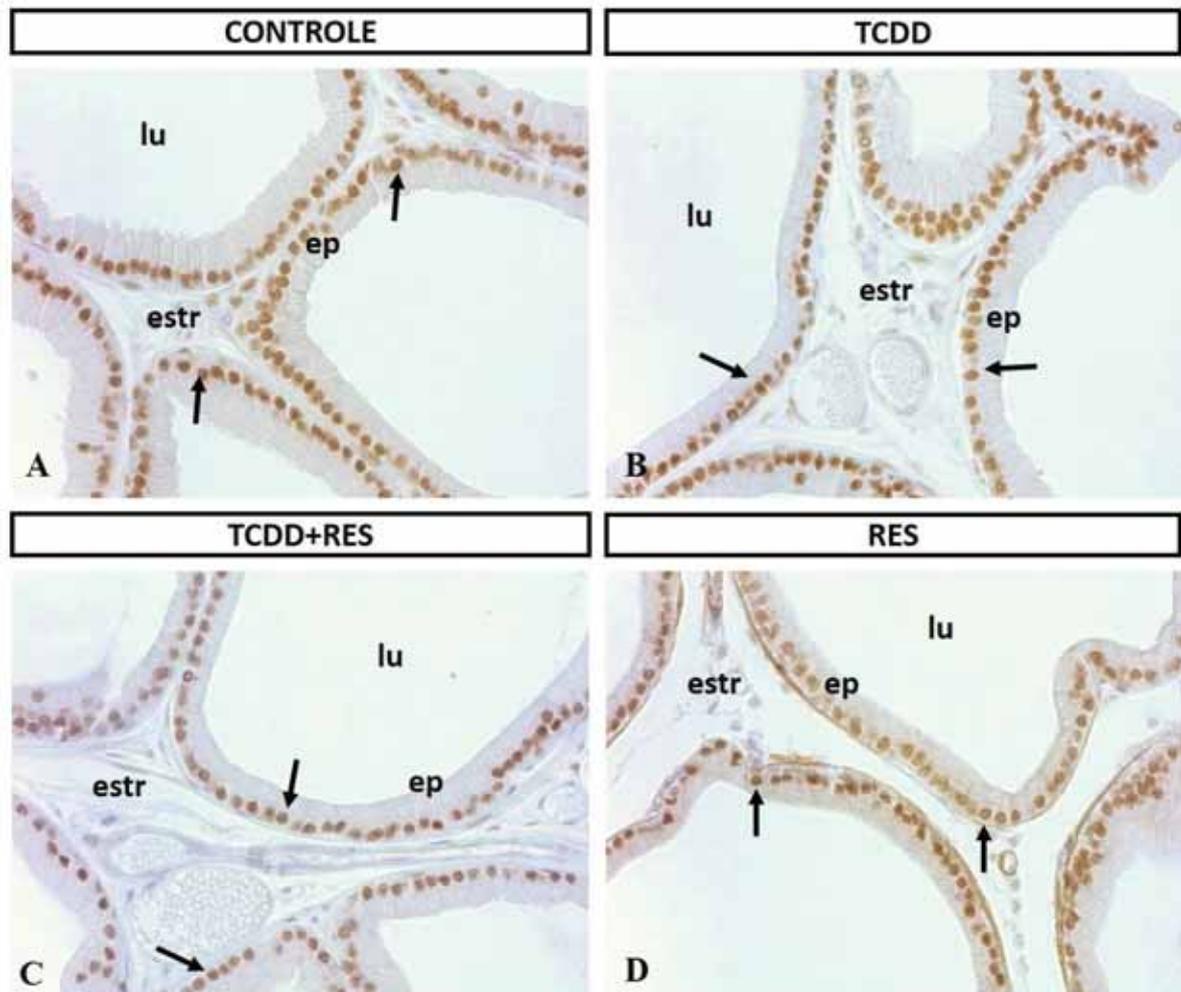
**Figura 24.** Dados expressos pela Média ± EPM do índice epitelial de proliferação celular no epitélio do lobo ventral da próstata dos grupos experimentais no DPN1. (\* $p < 0,05$ ).



**Figura 26.** Cortes histológicos do lobo ventral da próstata dos animais experimentais no DPN90 submetidos à técnica de imuno-histoquímica para o Ki-67 (n=5). **Fig. A** pertence ao grupo Controle; **fig. B**, ao grupo TCDD; **fig. C**, ao grupo TCDD+Res; **fig. D**, ao grupo Res. ep: epitélio; lu: lumen; estr: estroma; seta: marcação positiva. Aumento de 400x.

#### 4.3.3.2. Imuno-histoquímica para AR Epitelia

A imuno-histoquímica para AR nos animais de 90 dias não revelou nenhuma diferença de intensidade entre os quatro grupos experimentais em termos de núcleos epiteliais marcados (Figura 26).



**Figura 26.** Cortes histológicos do lobo ventral da próstata dos animais experimentais no DPN90 submetidos à técnica de imuno-histoquímica para o AR (n=3). **Fig. A** pertence ao grupo Controle; **fig. B**, ao grupo TCDD; **fig. C**, ao grupo TCDD+Res; **fig. D**, ao grupo Res. **ep**: epitélio; **lu**: lumen; **estr**: estroma; **seta**: marcação positiva. Aumento de 400x.

## 5. DISCUSSÃO

O TCDD é o composto mais potente dos dibenzo-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos (PCDD/PCDF). Estes poluentes ambientais persistentes são formados como subprodutos nocivos de processos químicos, térmicos ou técnicos. Os seres humanos são expostos às dioxinas, principalmente através dos alimentos (peixes gordurosos, carne e produtos lácteos), uma vez que as dioxinas são solúveis em gordura, estáveis e acumulativas na cadeia alimentar. As dioxinas diferem em seus potenciais tóxicos, mas compartilham uma semelhança estrutural bem como um modo de ação comum. A exposição a elas pode causar uma variedade de efeitos adversos, incluindo câncer, defeitos de desenvolvimento, imunotoxicidade, distúrbios endócrinos, e hipo hipertrofia de tecidos-alvo (Pohjanvirta & Tuomisto, 1994; Lindén *et al.*, 2010).

O desenvolvimento, crescimento e função da próstata são eventos dependentes de andrógenos, o qual atua sinergicamente com outros hormônios, como a prolactina e o estrógeno (Prins *et al.*, 2001). Nos roedores, o desenvolvimento prostático tem início no fim do período intrauterino, seguido por uma extensiva ramificação e diferenciação celular durante o período neonatal (Prins & Birch, 1995). Embora o TCDD não diminua os níveis de andrógeno circulante (Chen *et al.*, 1993; Roman *et al.*, 1995), é possível que o TCDD interfira com a produção ou liberação dos sinais estromais que estimulam o brotamento, a proliferação, e/ou a citodiferenciação celular.

Atualmente, não há estudos que correlacionem tratamentos para prevenir e/ou reverter os efeitos tóxicos do TCDD e seus congêneres. Entretanto, devido aos seus efeitos tóxicos serem mediados pelo AhR, o consenso geral é bloquear as interações TCDD-AhR, o que seria a maneira mais eficaz de inibir a toxicidade do TCDD. Dessa maneira, o Resveratrol é um composto polifenólico presente em plantas, incluindo: uvas, vinho tinto, nozes, *berries*, e outros alimentos. Possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer, podendo atuar como um antagonista do AhR e inibir as ações do TCDD (de la Lastra *et al.*, 2005; Donnelly *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Falchetti *et al.*, 2001; Fremont *et al.*, 2000). Recentemente, o resveratrol mostrou atenuar os efeitos tóxicos induzidos pelo TCDD em vários órgãos *in vivo* e em camundongos adultos (Ishida *et al.*, 2009).

Em muitos modelos experimentais, a administração do TCDD pode causar redução da ingestão de ração, o que pode resultar em caquexia em doses letais

(Pohjanvirta & Tuomisto, 1990a). Apesar da anorexia ser uma das respostas ao TCDD, existe uma grande variabilidade entre as espécies animais e as linhagens. Além disso, a exposição ao TCDD não afeta somente o consumo de ração, mas também provoca alterações no comportamento alimentar (Pohjanvirta & Tuomisto, 1990a; Tuomisto *et al.*, 2000; Lensu *et al.*, 2011b, 2011c), apesar de serem pequenas em ratos adultos expostos a uma dose aguda de TCDD (Sirkka *et al.*, 1992). Conforme observado em nossos resultados, não houve alteração da evolução do peso corpóreo nas mães e nas respectivas ninhadas masculina e feminina. Além disso, a ingestão de água e ração não mostrou diferença entre os quatro grupos experimentais. Essa ausência de efeitos sobre a ingestão de alimentos, nesses casos, pode ser devido à linhagem utilizada neste estudo, ratos *Wistar*, os quais podem ser mais resistentes às ações do TCDD. Esse preceito é verdadeiro para estudos envolvendo carcinogênese química, onde a linhagem *Wistar* mostra-se mais resistente à indução tumoral no trato urogenital (Oliveira *et al.* 2006).

Com relação à distância anogenital, o TCDD foi responsável pela redução dessa medida na ninhada de ratas *Sprague-Dawley* expostas a 1µg/kg corpóreo no DG15 (Mably *et al.*, 1991; Wilker *et al.*, 1996). No entanto, nossos resultados não mostraram diferenças na distância anogenital dos machos e fêmeas. Semelhante ao discutido para o peso dos animais, a ausência de significância na DAG seja devido à linhagem utilizada.

Nossos resultados a respeito da histologia do UGS dos animais recém-nascidos mostraram que a exposição ao TCDD reduziu o número de brotos prostáticos emergentes do UGS. Esse resultado concorda com o trabalho de Vezina e colaboradores (2008), onde observou-se que a exposição a uma dose única de 5µ/kg de TCDD no DG15,5 inibiu a formação dos brotos epiteliais ventrais, mas restaurou a posição dos brotos epiteliais dorsais e laterais nos camundongos *C57BL/6J*. Apesar dos resultados serem diferentes, a dose utilizada no trabalho citado foi 5 vezes maior do que a dose utilizada em nosso trabalho, mostrando dessa forma, uma efetiva inibição na morfogênese prostática. Roman e colaboradores (1998) relataram que uma dose única de TCDD (1µg/kg) no DG15 interferiu com o crescimento inicial dos cordões epiteliais das regiões dorsal, lateral e ventral do UGS fetal, verificando um menor número de brotos. Importante notar que os animais recém-nascidos pertencentes ao grupo TCDD+Res mostraram um aspecto morfológico semelhante aos animais do grupo controle e ainda um maior número de brotos prostáticos em relação ao grupo TCDD, mostrando que o Resveratrol

possivelmente foi capaz de reverter, ao menos parcialmente, a inibição inicial do desenvolvimento prostático provocada pelo TCDD.

A avaliação pela técnica de imuno-histoquímica mostrou que os recém-nascidos expostos ao TCDD tiveram uma redução na marcação de células epiteliais basais e uma tendência a um índice de proliferação celular reduzido nos brotos, junto com uma redução no índice de proliferação mesenquimal e uma menor expressão de AR mesenquimal, o qual atua como indutor do brotamento epitelial. Esses resultados sugerem que a exposição ao TCDD resulta em uma resposta hipoplásica nos estágios iniciais do desenvolvimento da próstata, o que também foi evidenciado por um número reduzido de brotos prostáticos nesse grupo (Roman *et al.*, 1998), além de um atraso na diferenciação epitelial das células. Com relação a esses mesmos aspectos, o grupo TCDD+Res mostrou imunomarcação semelhante ao grupo Controle. Isso evidencia uma possível restauração no desenvolvimento prostático, o qual foi aparentemente prejudicado pela exposição ao TCDD.

A morfogênese prostática é um processo responsivo aos andrógenos e dependente das interações entre epitélio e mesênquima, e é modulado por fatores de crescimento parácrinos (Cunha *et al.*, 1995). De acordo com Chen *et al.* (1993) e Roman *et al.* (1995), o TCDD não diminui os níveis de andrógeno circulante, o que foi confirmado em nossos resultados de DPN1 e DPN90. Por isso, é possível que ele interfira com a produção e/ou liberação dos sinais estromais que estimulam o brotamento, a proliferação, e/ou a citodiferenciação celular (Chen *et al.*, 1993; Roman *et al.*, 1995). Apesar dos resultados apresentados não confirmarem definitivamente alteração nos níveis de AR entre os grupos experimentais, observou-se que menos células mesenquimais foram AR positivas no grupo TCDD em relação aos demais grupos. Sendo assim, mesmo com a expressão do AR, alguma interação entre as duas vias (AhR e AR), provavelmente interfere entre os sinais parácrinos estabelecidos entre o mesênquima e o epitélio dos brotos prostáticos. No entanto, o modo como essa interferência e interação ocorrem ainda permanece desconhecido.

Entre os dias pós-natal 10 e 15, a diferenciação funcional do epitélio tem início e é definida pela síntese de produtos secretórios pelas células epiteliais luminiais (Prins & Birch, 1995). Ao mesmo tempo que a diferenciação epitelial ocorre, o mesênquima prostático sofre diferenciação pós-natal. Os ductos epiteliais penetram dentro do mesênquima, as células mesenquimais se condensam ao redor das extremidades dos

brotos e adquirem um padrão distinto ao longo da membrana basal. Entre os dias pós-natal 3 e 5, as células adjacentes aos ductos formam uma camada periductal de células musculares lisas, enquanto as células interductais se diferenciam em fibroblastos maduros (Prins & Birch, 1995; Hayward *et al.*, 1996). Segundo Roman e colaboradores (1998), a exposição uterina e lactacional ao TCDD, em ratos *Holtzman*, prejudicou levemente a diferenciação das células mesenquimais prostáticas em células musculares lisas, o que foi evidenciado pela redução da marcação pela  $\alpha$ -actina nos animais de DPN1. Portanto, nossos resultados estão de acordo com Roman *et al.* (1998) e mostraram que o grupo exposto ao TCDD teve um retardo na diferenciação do mesênquima em musculatura lisa ao redor dos brotos prostáticos. No entanto, a suplementação com o Resveratrol, parece ter contribuído para a diferenciação das células mesenquimais em células musculares lisas.

Em camundongos da linhagem C57BL/6 expostos ao TCDD na dose materna de 5 $\mu$ g/kg no DG13, o peso da próstata dorsolateral e o número de ductos principais em ambos os lobos foram reduzidos. Na próstata anterior, o peso foi reduzido em um grau maior, e a expressão de genes andrógeno-dependentes foi suprimida, além de uma ramificação ductal severamente inibida. A próstata ventral é o lobo no qual o peso e a expressão gênica são extensamente prejudicados, e sua estrutura ductal é inteiramente ausente. Esses efeitos são vistos em camundongos selvagens durante o desenvolvimento pós-natal e persistem na idade adulta, mas muitos desses efeitos são ausentes em camundongos *knockout* para AhR (AHRKO<sup>-/-</sup>) (Ko *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002a). Conseqüentemente, os efeitos do TCDD dependem da presença do AhR. Além disso, de acordo com Roman e colaboradores (1998), a via do AhR necessita de disponibilidade do TCDD para exercer seus efeitos tóxicos. Diante disso, nossos resultados dos animais de DPN1 mostram que o grupo TCDD apresentou uma maior marcação citoplasmática para o AhR nos brotos quando comparado aos demais grupos, mostrando que o TCDD foi capaz de induzir uma resposta através da ativação do receptor aril-hidrocarboneto. Além disso, o grupo TCDD+Res apresentou uma leve marcação para esse receptor, mostrando que esse polifenol foi capaz de inibir, ao menos parcialmente, a atividade desse receptor.

Vezina e colaboradores (2008) relataram que uma dose única de TCDD (5 $\mu$ g/kg, DGs15,5-17,5) em camundongos da linhagem C57BL/6J causou uma redução do peso do lobo ventral da próstata em cerca de 50% nos animais de DPN90. Além disso, Roman e colaboradores (1998) relataram uma redução no peso da próstata ventral de ratos *Holtzman* expostos ao TCDD (1 $\mu$ g/kg no DG15) no DPN32. No entanto nossos resultados

não apontam nenhuma alteração no peso absoluto ou peso relativo da próstata ventral, revelando uma possível recuperação da glândula frente à exposição ao TCDD e/ou uma resistência por parte da linhagem animal utilizada no estudo.

No DPN90, as análises histológicas permitiram observar que os animais pertencentes ao grupo TCDD apresentaram uma arquitetura glandular composta por um epitélio com muitas dobras na periferia dos alvéolos, caracterizando um padrão de hiperplasia glandular fisiológica. Esse tipo de hiperplasia é resultado de um tecido que sofreu atrasos no crescimento devido a um certo estímulo inibidor e, para compensar essa perda, o epitélio se divide e fica mais estratificado e com inúmeras dobras, porém a atividade glandular permanece normal (Shappell *et al.*, 2004). Já o grupo TCDD+Res apresentou uma estrutura glandular mais parecida como grupo Controle, evidenciando, mais uma vez, a possível atividade protetora do Resveratrol sob o TCDD durante o desenvolvimento.

Juntamente com essas observações, a análise do índice de proliferação celular nos animais adultos (DPN90) mostrou que o grupo TCDD apresentou um maior índice de proliferação epitelial, quando comparado com o grupo Controle. Provavelmente isso também se deve ao fato da capacidade de recuperação que a próstata possui quando o estímulo inibidor do desenvolvimento/crescimento é removido. Além disso, o grupo TCDD+Res apresentou um índice de proliferação celular semelhante ao grupo Controle, dado que comprova que o Resveratrol foi eficaz em inibir, ao menos parcialmente, os efeitos tóxicos do TCDD sobre a próstata. Outro fato que ilustra a recuperação da glândula frente à exposição ao TCDD é a manutenção da expressão do AR epitelial, o qual não diferiu entre os grupos epiteliais.

A atividade protetora do Resveratrol foi evidenciada pela histologia e análises imuno-histoquímicas em ambas as idades dos animais. Dessa forma, pode-se concluir que a administração de Resveratrol foi capaz de reduzir os efeitos inibitórios do TCDD sobre o desenvolvimento prostático em ratos exposto a uma única dose de TCDD em ambiente uterino.

Dados moleculares estão sendo produzidos visando agregar informações importantes e melhor substanciar a discussão dos resultados na forma final da dissertação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog.* 2002, 28:129–138.
- Aggarwal BB, Shishodia S. Resveratrol in health and disease. *CRC Press* Taylor & Francis Group. Los Angeles 2006.
- Aggarwal BB, Takada Y, Oommen OV. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Investig. Drugs* 2004, 13:1327–38.
- Alsharif NZ, Schlueter WJ, Stohs SJ. Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat peritoneal lavage cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994, 26:392–397.
- Andersson P, McGuire J, *et al.* A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99:9990-9995.
- Andersson P, Ridderstad A, *et al.* A constitutively active aryl hydrocarbon receptor causes loss of peritoneal B1 cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2003, 302:336-341.
- Aylward LL, Brunet RC, *et al.* Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 2005, 15:51-65.
- Bagchi M, Stohs SJ. In vitro induction of reactive oxygen species by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, endrin and lindane in rat peritoneal macrophages and hepatic mitochondria and microsomes. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 14:11–18.
- Banerjee PP, Banerjee S, Lai JM, Strandberg JD, Zirkin BR, Brown TR (1998) Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod.* 1998, 59:1163-1170.
- Baur JA & Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5:493-506.
- Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signaling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2008, 288:30-37.

- Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, Peterson RE. Effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994, 127(2): 250-257.
- Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B. Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis and chemoimmunosensitizing activities. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* 2003, 3:77-93.
- Carlson DB, Perdew GH. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2002, 16: 317-325.
- Carvalho HF, Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int.* 1996, 20:809-819.
- Casper RF, Quesne M, Rogers I, Shirota T, Jolivet A. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol. Pharmacol.* 1999, 56:784-790.
- Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. Pharmacol* 2000, 60:1539-1548.
- Chen SW, Roman BL, Saroya SZ, Shinomiya K, Moore RW, Peterson RE. *In utero* exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) does not impair testosterone production by fetal rat testes. *Toxicologist.* 1993, 13:104.
- Clifford AJ, Ebeler SE, Ebeler JD, Bills ND, Hinrichs SH, Teissedre PL, Waterhouse AL. Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-basic diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 64:748-756.
- Committee, NRN. A unified nomenclature system for nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999, 97:87-96.
- Cooke PS, Young P, Cunha GR. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 199, 128:2867-2873.
- Cunha GR, Foster BA, Thomson A, Sugimura Y, Tanji N, Tsuji M, Terada N, Finch PW, Donjacour AA. Growth factors as mediators of androgen action during the development of the male urogenital tract. *World J. Urol.* 1995, 13:264-276.
- Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour A, Boutin EL, Foster BA. Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *Journal of Andrology* 1992, 13:465-475.

- Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem Cell Biol.* 1986, 64:608-614.
- Czuczwa JM, McVeety BD, *et al.* Polychlorinated dibenzo- $\rho$ -dioxins and dibenzofurans in sediments from Siskiwit Lake, Isle Royale. *Science* 1984, 226:568-569.
- De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49:405-430.
- Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2002, 187:1-7.
- Denison MS and Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003, 43: 309-334.
- Dercks W; Creasy LL. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1989, 34: 203-13.
- Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS *et al.* Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004, 287:L774-L783.
- Emond C, Michalek JE, Birnbaum LS, De Vito MJ. Comparison of the use of a physiologically based pharmacokinetic model and a classical pharmacokinetic model for dioxin exposure assessments. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113(12), 1666-1674.
- Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci.* 2001, 70:81-96.
- Ferrario J, Byrne C. 2,3,7,8-Dibenzo- $\rho$ -dioxins in mined clay products from United States: evidence for possible natural origin. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34:4524-4532.
- Foster, W. G., S. Maharaj-Briceno, *et al.* Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Environ. Health Perspect.* 2000, 118(4):458-464.
- Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000, 66:663-673.
- Fritz AF, Lin T-M, D.Cardiff R, Peterson RE. The aryl hydrocarbon receptor inhibits prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Carcinogenesis* 2007, 28:497-505.
- Fritz WA, Lin T-M, Peterson RE. Effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD) exposure on the prostate and its response to castration in senescent C57BL/6J mice. *Toxicol. Sci.* 2005, 86:387-395.
- Furuhashi CJ, Kurl RN, Wong J, Vilee CA. A cytosolic binding protein for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD) in the uterus and deciduoma of rats. *Pharmacology* 1986, 33:110-120.

- Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González O, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, Bonet-Costa V, Borrás C, Viña J. Resveratrol: Distribution, properties and perspectives. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* in press, 2013.
- Gasiewicz TA, (eds) Dioxins and Health. John Wiley and Sons, Inc., 491–532.
- Gasiewicz TA, Park S-K. Ah receptor: involvement in toxic responses. In: Scheeter A and Gilpin RK, Wagel DJ, *et al.* Production, distribution, and fate of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and related organohalogenes in the environment. In: Scheeter A, Gasiewicz, TA. (Eds), Dioxins and Health. Wiley, Hoboken, NJ 2003, 89-136.
- Gray LE, Jr., Kelce, WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated and epididimal sperm numbers and sex accessory gland weight in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995, 131: 108-118.
- Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, Kim JH, Aggarwal BB. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011, 1215:150-160.
- Hamilton W, Boyd J, Mossman H. Human embryology. Williams e Wilkins Co., Baltimore. 1959.
- Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 2008, 7:1020-1035.
- Hayward SW, Baskin L, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Bakiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anatom.* 1996a, 155:94–103.
- Hayward SW, Baskin L, Haughney PC, Foster BA, Prins GS, Dahiya R, Cunha GR. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.* 1996b, 155:81-93.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal–epithelial interactions in normal and neoplastic prostate, *Br. J. Urol.* 1997, 79 (2):18–26.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 2002, 52:213-235.
- Hussmann DA, McPhaul MJ, Wilson JD. Androgen receptor expression in the developing rat prostate is not altered by castration, flutamide, or suppression of the adrenal axis. *Endocrinology* 1991, 128:1902-1906.

- Ikeda M, Tamura M, Yamashita J, Suzuki C, Tomita T. Repeated *in utero* and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 206:351-355.
- Imamov O, Morani A, Shin G-J, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson J-A. Estrogen receptor  $\beta$  regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101(25):9375-9380.
- Ishida T, Takeda T, Koga T, Yahata M *et al.* Attenuation of 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxina toxicity by resveratrol: a comparative study with different routes of administration. *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32:876-881.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997, 275:218–220.
- Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. *Am. J. Enol. Viticult*, 1991, 42:41-46.
- Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. *trans*-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *The Journal of Nutrition* 2005, 135:757-760.
- Karr JF, Kantor JA, Hand PH, Eggenesperger DL, Scholm J. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.* 2005, 55:2455-2462.
- Kinbara H, Cunha GR. Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. *Prostate* 1995, 28:58–64.
- Ko K., Theobald HM, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the C57BL/6J mouse prostate: lobe-specific effects on branching morphogenesis. *Toxicol. Sci.* 2002, 70:227–237.
- Kubo, M.; Kimura, Y.; Shin, H.; Haneda, T.; Tani, T.; Namba, K. *Shoyakugaku Zasshi*, 1981, 35:58-61.
- Lensu S, Tuomisto JT, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Characterization of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-provoked strong and rapid aversion to unfamiliar foodstuffs in rats. *Toxicol.*, 2011b, 283:140–50.
- Lensu S, Tuomisto JT, Tuomisto J, Viluksela M, Niittynen M, Pohjanvirta R. Immediate and highly sensitive aversion response to a novel food item linked to AH receptor stimulation. *Toxicol. Lett.* 2011c, 203:252–7.
- Liao S, Fang S. Receptor-proteins for androgens and the mode of action of androgens on gene transcription in ventral prostate. *Vitamin and Hormones* 1969, 21:17-90.

- Lin T-M, Ko K., Moore RW, Simanainen U, Oberley TD, Peterson RE. Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 2002, 68:479–487.
- Lin T-M, Rasmussen NT, Moore RW, Albrecht RM, Peterson RE. Region-specific inhibition of prostatic epithelial bud formation in the urogenital sinus of C57BL/6 mice exposed in utero to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Sci.* 2003, 76:171–181.
- Lindén J, Lensu S, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol.* 2010, 31:452–78.
- Liu HS, Pan CE, Yang W, Liu XM. Antitumor and immunomodulatory activity of resveratrol on experimentally implanted tumor of H22 in Balb/c mice. *World J. Gastroenterol.* 2003, 9:1474-1476.
- Lopes ES, Foster BA, Donjacour AA, Cunha GR. Initiation of secretory activity of rat prostatic epithelium in organ culture. *Endocrinology* 1996, 137:4225–4234.
- Lowsley OS. The development of the human prostate gland with reference to the development of the other structures at the neck of the urinary bladder. *Am. J. Anat.* 1912, 13:299-348.
- Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects of spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992a, 114:118-126.
- Mably TA, Moore RW, Goy RW, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992b, 114:108-117.
- Mably TA, Moore RW, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992c, 114:97-107.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 2003, 253:165–174.
- McConnell EE. Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various species of animals. *Environ. Health Perspect.* 1985, 60:29–33.

- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton T, McNeal JE. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr. Urol.* 1983, 4:3-37.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003, 1619:263-268.
- Neal RA, Beatty PW, Gasiewicz TA. Studies on the mechanism of toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1979, 320:204-213.
- Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* 1996, 28:124-128.
- Nonomura, S, Kanagawa H, Makimoto YZ. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-J O-Kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc). *Yakugaku Zasshi* 1963, 83:988-990.
- Okey AB, Bondy GP, Mason ME, Kahl GF, Eisen HJ, Guenther TM, Nebert DW. Regulatory gene product of the Ah locus. *J. Biol. Chem.* 1979, 254:11636-11648.
- Olie K. Chlorodibenzo- $\rho$ -dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands. *Chemosphere* 1980, 9: 501-522.
- Oliveira PA; Colaco A; De la Cruz LFP; Lopes C. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp Oncol.* 2006, 28:1,2 –11.
- Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: Cross-species comparisons. *C.R.C. Crit. Rev. Toxicol.* 1993, 23:283-335.
- Pirkle JL, Wolfe WH, *et al.* Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD) in Vietnam veterans of Operation Ranch Hand. *J. Toxicol. Environ. Health* 1989, 27:335-342.
- Pohjanvirta R, Unkila M, Tuomisto J. The loss of glucoprivic feeding is an early-stage alteration in TCDD-treated Han/Wistar rats. *Pharmacol. Toxicol.* 1990a, 67:441-443.
- Pohjanvirta R, Unkila M, Tuomisto J. TCDD-induced hypophagia is not explained by nausea. *PharmacolBiochemBehav.* 1994, 47:273–82.
- Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin by hepatic cytosol. *J. Biol. Chem.* 1976, 251:4936-4946.
- Poland A, Kimbrough RD. Biological mechanisms of dioxin action. *Bambrury Report* 1984, 18:500.
- Price D. Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. *Am. J. Anat.* 1936, 60:79-127.

- Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1963, 12:1-27.
- Prins GS. Development of the prostate. In: Haseltine F, Paulsen C, Wang C. ed. Reproductive issues and the aging male. *Embryonic Inc.* 1993, 101-112.
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. Influence of neonatal oestrogens on rat prostate development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001, 13:241-252.
- Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to oestrogen. *Endocrinology.* 1995, 136:1303-1314.
- Prins GS, Cooke PS., Birch L, Donjacour AA, Yalcinkaya TM, Siiteri PK, Cunha GR. Androgen receptor expression and 5 $\alpha$ -reductase activity along the proximal-distal axis of the rat prostatic duct. *Endocrinology* 1992, 130:3066-3073.
- Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 2008, 76:641-659.
- Puga A, Tomlinson CR, *et al.* Ah receptor signals cross talk with multiple developmental pathways. *Biochem. Pharmacol.* 2005, 69:199-207.
- Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (Methanol-Carnoy) Fixation: Practical and Theoretical Considerations. *Histochem. Cell Biol.* 1970, 21:97-116.
- Roman BL, Peterson RE. *In utero* and lactacional exposure to the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs prostate development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 150:240-253.
- Roman BL, Pollenz RS, Peterson RE. Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure: Ah receptor and ARNT expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998, 150:228-239.
- Roman BL, Sommer RJ, Shinomiya K, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Impaired prostate growth and development without inhibited androgen production. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 1995, 134-241-250.
- Roman BL, Timms BG, Prins GS, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs prostate development: effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 1998, 150:254-270.

- Romkes M, Piskorska-Pliszczynska J, Safe S. Effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987, 87:306-314.
- Romkes M, Safe S. Comparative activities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and progesterone as antiestrogens in the female rat uterus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988, 92:368-380.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrinol. Relat. Cancer* 2004, 11:225-254.
- Schechter A, Ryan JJ. Polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofurans levels in human adipose tissues from workers 32 years after occupational exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 1988, 17:915-920.
- Schechter, A., L. Birnbaum, *et al.* Dioxins: an overview. *Environ. Res.* 2006, 101(3):419-28.
- Shakibaei M, Harikumar K, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53:115-128.
- Shannon JM, Cunha GR. Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 1983, 4:367-373.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, *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.* 2004, 64:2270–305.
- Sharpe RM, Skakkebaek NF. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* 1993, 341:1392-1395.
- Shirai T, Tahashi, S, Cui L, Futakuchi M, Kato K, Tamano S, Imaida K. Experimental prostate carcinogenesis – rodent models. *Mutat. Res.* 2000, 462:219-226.
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MC. Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction* 2003, 9:437-448.
- Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the phytoalexin Resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992, 43:49-52.
- Simanainen U, Haavisto T, Tuomisto JT, Paranko J, Toppari J, Tuomisto J, Peterson RE, Viluksela M. Pattern of male reproductive system effects after in utero and lactational

- 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure in three differentially TCDD-sensitive rat lines. *Toxicol. Sci.* 2004, 80:101-108.
- Sirkka U, Pohjanvirta R, Nieminen SA, Tuomisto J, Ylitalo P. Acute neurobehavioral effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Han/Wistar rats. *PharmacolToxicol*, 1992, 71:284-8.
- Söderkvist P, Poellinger L, Gustafsson, J-A. Carcinogen-binding proteins in the rat ventral prostate: Specific and nonspecific high-affinity binding sites for benzo(a)pyrene, 3-methylcholanthrene, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* 1986, 46: 651-657.
- Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998, 273:21875-21882.
- Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2001, 281:1093-1099.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol. Reprod.* 1986, 34:961-971.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol. Reprod.* 1986, 34:973-983.
- Takaoka M. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.). *J. Faculty sci. Hokkaido Imperial University* 1940, 3:1-16.
- Takeda H, Nakamoto T, Kokontis J, Chodak GW, Chang C. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Prostate. In press.* 2013.
- Takeda H, Mizuno T, Lasnitzki I. Autoradiographic studies of androgen-binding sites in the rat urogenital sinus and postnatal prostate. *J. Endocrinol.* 1985, 104:87-92.
- Taplin ME, Ho S. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, 3467-3477.
- Thomsen MK, Francis JC, Swain A. The role of Sox9 in prostate development. *Differentiation* 2008, 76:728-735.

- Timms TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- $\beta$  expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology* 1994, 134:1039-1045.
- Tuomisto JT, Viluksela M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. Changes in food intake and food selection in rats after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure. *PharmacolBiochemBehav*, 2000, 65:381-7.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 2001, 166:2472-2483.
- Uenobe F, Nakamura S, Miyazawa M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat. Res.* 1997, 373:1997-2000.
- Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.* 2005, 40:121-128.
- Van den Berg M, Peterson RE, *et al.* Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 1998, 106:775-792.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, *et al.* The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 2006, 93(2):223-41.
- Vezina CM, Allgeier SH, Moore RW, Lin TM, Bemis JC, Hardin HA, Gasiewicz TA, Peterson RE. Dioxin causes ventral prostate agenesis by disrupting dorso-ventral patterning in developing mouse prostate. *Toxicological Sciences.* 2008, 106(2):488-496.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol. Int.* 2005, 29:809-816.
- Weibel, ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation* 1963, 12:131-155.
- Welsh M, Saunders PT, Finken M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, Sharpe RM. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 2008, 118:1479-90.
- Welsh M, Saunders PT, Sharpe RM. The critical time window for androgen-dependent development of the Wolffian duct in the rat. *Endocrinology* 2007, 148:3185-95.
- Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005, 49:472-481.

Wilker C, Johnson L, Safe S. Effects of Developmental Exposure to Indole-3-carbinol or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Reproductive Potential of Male Rat Offspring. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 1996, 141:68-75.

## 7. ANEXOS



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



## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº 477-CEUA, sobre “Papel do Resveratrol sobre a modulação do Receptor Aril-hidrocarboneto (AhR) e o desenvolvimento da próstata de ratos expostos a 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) durante a gestação”, sob a responsabilidade de **Wellerson Rodrigo Scarano**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, em reunião de 05 de abril de 2013.

Botucatu, 08 de abril de 2013.

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra de Moraes Gimenes Bosco**  
Vice-Presidente da CEUA