



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



“EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO E/OU À CAFEÍNA NA
PUBERDADE: EXPRESSÃO DE MARCADORES DE
ALTERAÇÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DE RATO.”

CAROLINA SAROBO

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 Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof^o Dr. Sérgio Luis Felisbino

BOTUCATU-SP

2012



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

**"EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO E/OU À CAFEÍNA NA
PUBERDADE: EXPRESSÃO DE MARCADORES DE
ALTERAÇÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DE RATO."**

CAROLINA SAROBO

ORIENTADOR: PROFº DR. SÉRGIO LUIS FELISBINO

CO-ORIENTADORA: DRª. FLÁVIA KARINA DELELLA

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 Estrutural e Funcional.

BOTUCATU-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Sarobo, Carolina.

Exposição ao cádmio e/ou à cafeína na puberdade : expressão de marcadores de alterações pré-neoplásicas na próstata de rato / Carolina Sarobo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

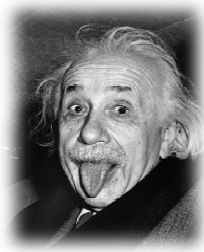
Orientador: Sérgio Luis Felisbino

Co-orientador: Flávia Karina Delella

Capes: 20601000

1. Próstata.
2. Cádmio – Efeito fisiológico.
3. Cafeína – Efeito fisiológico.
4. Citologia.

Palavras-chave: Biomarcadores; Cádmio; Cafeína; Lesões pré-neoplásicas; Próstata.



"O importante é não parar de questionar." (Albert Einstein)

Dedico essa dissertação...

“para os meus amados pais **José Carlos Sarobo** e **Marlene Lopes da Silva Sarobo**. Graças aos seus esforços, dedicação e apoio tive a oportunidade de chegar até aqui.”

“para o meu padrinho **Rogério Rodrigues Serrão** cujo companheirismo e amizade em todos os momentos foram muito importantes para a continuidade dessa caminhada. Seu exemplo e a sua vivência serão sempre um grande ensinamento para mim”

“para **Alex Gehringer Ursini** por sua amizade, acolhimento, paciência, respeito e dedicação.”

"A vida é aquilo que acontece enquanto fazemos planos para o futuro." (Jonh Lennon)

Agradeço...

Ao orientador Prof. Drº. **Sérgio Luis Felisbino**, por acreditar em mim, me apresentar o caminho da ciência, por fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, pela paciência com que me orientou, por ser um exemplo de profissional, o qual sempre será lembrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada e todos os seus funcionários.

Ao corpo docente, colegas de laboratório, técnicos, amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a construção desse trabalho.

O apoio financeiro da “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-(**FAPESP**)” (processo nº 09/52747-7) pelo auxílio pesquisa.

Aos Animais utilizados em pesquisas experimentais, “*o destino inexorável deu-lhe o poder e a grandeza de servir à humanidade*”. (Rokitansky, 1876)

"A dúvida é o princípio da sabedoria." (Aristóteles)

ÍNDICE GERAL

1. RESUMO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUÇÃO	13
3.1. <i>Próstata: características gerais, estruturais e ação androgênica</i>	13
3.2. <i>Lesões proliferativas prostáticas</i>	13
3.2.1. <i>Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)</i>	15
3.2.2 <i>Precursosores do Cancer de Próstata</i>	15
3.2.3. <i>Câncer de Próstata (CaP)</i>	17
3.3. <i>O Cádmiio e a Próstata</i>	18
3.4. <i>A Cafeína e a Próstata</i>	20
3.5. <i>Biomarcadores de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na prostate</i>	21
3.6. <i>Justificativas e Relevância</i>	24
3.7 <i>Objetivos</i>	24
4. CAPÍTULOS	25
4.1. <i>Artigo 1. “Chronic caffeine intake increases androgenic stimulus, epithelial cell proliferation and hyperplasia incidence in rat ventral prostate”</i>	26
4.2. <i>Artigo 2. “Efeitos da injestão cronica de cadmio e/ou cafeina sobre a expressão proteica da beta-catenina, GST-P e AMACRacemase na prostata ventral de rato”</i>	55
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMACR: Alpha-metilacil Coenzima-A Racemase

Bcl-2: B cell lymphoma-2 - proteína de linfoma de célula B-2

CaP: Câncer de Próstata

COX 2: Cicloxigenase 2

DHT: Dihidrotestosterona

EGF: “*Epidermal Growth Factor*” - Fator de Crescimento Epidermal

FGF: “*Fibroblast Growth Factor*” - Fator de Crescimento de Fibroblastos

GSTs: Glutationa Sulfo-transferase

GST-P: Glutationa Sulfo-transferase π

HGPIN: “*High Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia*” - Hiperplasia Prostatica Benigna de Alto Grau

HPB: Hiperplasia Prostatica Benigna

IGF: “*Insulin Growth Factor*” – Fator de Crescimento do tipo Insulina

LGPIN: “*Low Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia*” - Hiperplasia Prostatica Benigna de Baixo Grau

NIP: Neoplasia Intra-epitelial Prostática

PCNA: Antígeno Nuclear de Células Proliferativas

PIA: “*Prostatic Inflammatory Atrophy*” - Atrofia Inflamatória Proliferativa

RA: Receptor de Andrógeno

T: Testosterona

TGF- β : “*Transforming Growth Factor-beta*” - Fator Transformador de Crescimento-beta

1.RESUMO

A próstata é uma glândula associada ao sistema reprodutor que, tanto para seu desenvolvimento quanto para a sua manutenção no adulto, necessita de níveis constantes de andrógenos circulantes. A manutenção e a fisiologia dessa glândula dependem de uma complexa interação entre os compartimentos epitelial e estromal. No organismo masculino, a próstata permanece num crescimento lento até a puberdade, etapa em que ocorre considerável aumento da produção de andrógenos, com conseqüente crescimento e maturação desta glândula. O contato com fatores exógenos durante a puberdade, tais como a exposição ambiental ao cádmio ativa ou passiva pela fumaça do cigarro, associada à ingestão de bebidas energéticas, as quais contêm relativamente alta concentração de cafeína, podem favorecer o surgimento de lesões prostáticas proliferativas na fase adulta. No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum e, no mundo, o mais incidente entre os homens. O avanço nas técnicas de detecção de lesões prostáticas benignas, pré-malignas e malignas favorecem o diagnóstico precoce dessas lesões e a sobrevida dos pacientes. Este projeto teve por objetivo avaliar os efeitos isolados e combinados do cádmio (15ppm) e da cafeína (20ppm) sobre os lobos prostáticos ventral e dorsal do rato Wistar a partir da quinta semana até a 25ª semana de idade pós-natal e o desenvolvimento de lesões proliferativas. Para isso foram empregadas análises citoquímicas, imuno-histoquímicas (Bcl-2, p-53, Cox-2, Ki-67, AR, GSTP-1, β -catenina e AMACRacemase) e bioquímicas de western blotting (GSTP-1, β -catenina, PCNA, PAR-4, AMACRacemase e beta-actina). Os resultados sobre os efeitos da cafeína isoladamente sobre a próstata mostraram que este composto aumenta os níveis plasmáticos de testosterona e diidrotestosterona, aumenta o peso absoluto e relativo do lobo prostático ventral e também os índices de proliferação celular e expressão do receptor de andrógeno neste lobo, sem alterações significativas no lobo dorsal. Além disso, as próstatas ventrais dos animais tratados pela cafeína desenvolveram lesões hiperplásicas focais e difusas. Nos animais tratados pelo cádmio e posteriormente ou simultaneamente com cafeína não foram encontradas diferenças significativas nas lesões e na expressão das proteínas investigadas quando comparadas ao grupo de animais tratados isoladamente com cádmio. Os resultados obtidos permitem concluir que a cafeína aumenta o estímulo androgênico sobre a próstata podendo induzir hiperplasia nesta glândula e podendo agir como uma agente promotor das lesões proliferativas induzidas pelo cádmio na próstata.

Palavras-Chave: *Próstata, Hiperplasia, Cádmio, Cafeína, Biomarcadores.*

2. ABSTRACT

Prostate is accessory gland of male reproductive system, in which is dependent of constant levels of androgen for correct development, growth and maintenance. Besides androgen, prostate normal physiology depends on complex interaction between epithelial and stromal compartments via growth factors. In the humans, after birth, the prostate gland exhibits a low rate of growth until puberty, when a new pick of androgens star to induce a remarkable growth of gland. Puberty can be considered a critical window which exogenous factors, such as environmental exposure to carcinogenous as cadmium ando or dietary factors as caffeine intake, may act as risk factors to develop prostate proliferative lesions in adulthood. In Brazil, prostate cancer is the second most common and word's most incident câncer in male. Advances in diagnostic techniques favor the early detection of prostate lesions increasing the patien's life span. In this sense, the aim of this project was to investigate the isolated or combined effects of cadmium (15 ppm) and caffeine (20 ppm) on ventral and dorsal rat prostatic lobe frin fifth to twenty fifth weeks of post-natal age ando n development of prostatic proliferative lesions. For this, prostatic lobes were submitted to histopathological, immuhistochemical and biochemical analysis of proteins and enzymes relatated to prostate cells normal and anormal physiology, such as Bcl-2, p53, Cox-2, Ki-67, AR, GSTP-1, β -catenin e AMACRacemase). The results about caffeine isolated on prostate gland showed that this component increases the plasma levels of testosterone and dihydrotestosterone, ventral prostate absolute and relative weight, proliferation index and androgen receptor tissue expression, while dorsal lobe exhibited no such alterations. Furthermore the prostates from caffeine treated animals developed focal and difuse hiperplasic lesions. In the animals treated by cadmium, simultaneously or sequencely, no significantly differences were found in the lesions incidence or proteins expressions when compared to the prostates from cadmium treatment alone. Togehter, the results allow to conclude that chornic caffeine intake increase the androgenic stimulus in the prostate gland inducing prostate hyperplasia and may act as promoter agent for the cadmium-induced proliferative lesions on prostate.

3. INTRODUÇÃO

O crescimento da expectativa de vida da população mundial contribuiu com o aumento dos diagnósticos de lesões benignas, pré-malignas e malignas na próstata associadas ao envelhecimento (DINI & KOFF, 2006; SPRENGER et al., 2010; DE NUNZIO et al., 2011). Desta forma, estudos sobre a biologia da glândula prostática têm despertado grande interesse médico-científico. Fatores envolvidos com o desenvolvimento e a progressão das lesões prostáticas são os principais alvos de pesquisas que visam compreender os mecanismos envolvidos no câncer de próstata.

Os modelos roedores têm sido amplamente utilizados nos estudos da fisiologia e fisiopatologia da próstata (ROY-BURMAN et al., 2004). Estes modelos permitem explorar os mecanismos moleculares do desenvolvimento de lesões que podem desenvolver-se em tumores malignos, além de possibilitar o melhor entendimento da ação de fármacos utilizados no tratamento e prevenção dessas lesões.

3.1. *Próstata: características gerais, estruturais e ação androgênica*

A próstata é uma glândula sexual masculina acessória, encontrada apenas em mamíferos, que tem por função produzir uma importante fração do fluido seminal (MARKER et al., 2003). Em humanos, a próstata é um conjunto de glândulas túbulo-alveolares compactada por um estroma fibro-muscular; dividida anatomicamente em quatro regiões glandulares, representadas por zona periférica (70%), zona central (25%), zona de transição (5%) e tecido glandular periuretral (<1%), e uma quinta região não glandular, o estroma fibromuscular anterior (COAKLEY & HRICAK, 2000). Em roedores, a próstata é composta por um complexo sistema de ramificações de túbulos e alvéolos não compactados, mas sim divididos em partes ou lobos, direito e esquerdo, que são nomeados de acordo com a posição anatômica: ventral, dorsal, lateral e anterior (LEE et al., 1990).

Em termos de homologia com a próstata humana, os lobos anteriores dos ratos são considerados homólogos às glândulas da zona central, enquanto os lobos dorsolaterais são considerados homólogos às glândulas da zona periférica. Os lobos ventrais do rato não têm um homólogo humano e a zona de transição humana não tem um lobo homólogo no rato (ROY-BURMAN et al., 2004). Apesar da falta de homologia com as zonas da próstata humana, o lobo ventral é o mais extensivamente estudado devido a sua localização anatômica, que permite fácil acesso para dissecação, e também pelo fato de apresentar grande dependência androgênica, permitindo fácil manipulação hormonal. Estas características

refletem o grande número de publicações resultantes de estudos experimentais com roedores utilizando o lobo ventral como modelo.

O desenvolvimento da próstata, tanto de humanos quanto de roedores, apresenta dois períodos críticos de rápido crescimento glandular: o período fetal/neonatal e a puberdade (RISBRIDGER et al., 2005; VILAMAIOR et al., 2006).

Tanto a próstata humana como a dos roedores são constituídas por epitélio secretor, composto por células epiteliais colunares, células basais e células neuroendócrinas, todas apoiadas em uma membrana basal. Este epitélio é sustentado por um estroma composto principalmente de células musculares lisas e fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos e nervos. Ao redor destas células estromais existe uma complexa matriz extracelular composta principalmente por fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas (VILAMAIOR et al., 2000; MARKER et al., 2003). O estroma é bem espesso na próstata humana e mais delgado nos lobos prostáticos dos roedores (MCNEAL 1988; NEMETH & LEE, 1996).

O desenvolvimento prostático e a função secretora do seu epitélio são determinados e regulados por andrógenos, os quais participam da diferenciação e da manutenção do estado ativo da glândula (CUNHA et al., 1985; DONJACOUR & CUNHA, 1993). Durante a embriogênese, sob ação de andrógenos, células epiteliais da uretra em formação invaginam para o interior do mesênquima do seio urogenital. Este mesênquima induz a proliferação epitelial, com formação de tubulos e suas ramificações, expressão de receptores de andrógenos e secreção de proteínas específicas da próstata (CUNHA et al., 1985; HAYWARD et al., 1997; MARKER et al., 2003).

A testosterona (T) é o principal andrógeno (95%) circulante no organismo masculino, sendo produzida principalmente pelas células de Leydig, nos testículos. A zona reticular da glândula adrenal também produz andrógenos, a androstenediona e diidroepiandrosterona, contribuindo com 5% dos andrógenos circulantes (AUMÜLLER & SEITZ, 1990). Apesar da T ser o principal andrógeno circulante, ela é convertida em um andrógeno mais potente nas células prostáticas, a diidrotestosterona (DHT), através da ação da enzima 5 α -redutase. A DHT tem afinidade dez vezes maior ao receptor de andrógeno (AR) do que a testosterona (DESLYPERE et al., 1992). Embora cada um desses andrógenos se ligue ao mesmo receptor, cada um exerce efeitos biológicos distintos. No desenvolvimento prostático, por exemplo, quando a conversão da T em DHT é bloqueada, a testosterona é capaz de induzir a diferenciação do seio urogenital em próstata, mas o desenvolvimento e

crescimento glandular são grandemente reduzidos (MARKER et al., 2003). Além disso, uma deficiência na atividade da 5 α -redutase está relacionada com casos de pseudo-hermafroditismo masculino (IMPERATO-MCGINLEY & ZHU, 2002).

Alguns estudos mostram que as células estromais também são essenciais para a diferenciação e organização arquitetural do epitélio da próstata, pois na presença de andrógenos, mas na ausência de células estromais, a organização epitelial e a função glandular não são produzidas (HAYWARD et al., 1992). Assim, a interação parácrina entre o epitélio e o estroma, mediada por andrógenos e outros fatores, tais como EGF, FGF, TGF- β , IGF, desempenham papel fundamental na regulação da atividade funcional e na manutenção da próstata (LEE et al., 1990; MARKER et al., 2003).

3.2. Lesões proliferativas prostáticas

As lesões proliferativas mais frequentes na próstata são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), que afetam 1/6 dos homens com idade avançada (SCHULMAN & LUNENFELD, 2002; THOMPSON et al., 2003; HO et al., 2004, DE NUNZIO et al., 2011). Na próstata, também ocorre à atrofia inflamatória proliferativa prostática (PIA), lesão inflamatória e a neoplasia intra-epitelial prostática (NIP), ambas, vistas como precursoras do carcinoma invasivo (PUTZI & DE MARZO 2000). A NIP é caracterizada pela proliferação e anaplasia celular dos túbulos e ácinos prostáticos (BOSTWICK & BRAWER, 1987) e pode ser dividida em NIP de baixo grau e de alto grau (BOSTWICK, 1996; BONKHOLFF & REMBENGER, 1998).

Embora nem todos os mecanismos que contribuem para a rápida progressão dessas lesões estejam completamente compreendidos, sabe-se que o desequilíbrio na interação homeostática entre epitélio e o estroma prostático participa do início e da promoção destas alterações (SUNG & CHUNG, 2002). Além disso, outros fatores também podem iniciar e promover as lesões na próstata, tais como a desregulação dos hormônios androgênicos e estrogênicos, a suscetibilidade genética, o estilo de vida, os hábitos nutricionais (HAYWARD et al., 1997; HSING et al., 2002; HO et al., 2004; SHAPPELL et al., 2004) e contaminantes ambientais (MUIR et al., 1991; ZENG et al., 2002; MULLINS & LOEB, 2012).

3.2.1. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A hiperplasia prostática benigna é uma afecção comumente associada ao envelhecimento em homens (BERRY et al., 1984; DE NUNZIO et al., 2011). A HPB é uma

hipertrofia que promove o aumento da pressão sobre a uretra e subsequente obstrução do fluxo urinário. Pacientes com HPB podem não apresentar sintomas, mas, em sua maioria, apresentam dificuldade de micção e irritabilidade da bexiga (BARRY et al., 1993; VERHAMME et al., 2002; BUSHMAN, 2009).

No homem, ocorre especialmente nas glândulas da zona de transição e clinicamente é caracterizada por provocar obstrução do canal da uretra, resultando em retenção urinária dolorosa (CARSON & RITTMASER, 2003). Nos ratos, pode ser detectada nos quatro lobos prostáticos, apresentando importantes características em comum com o padrão encontrado em humanos (BOSLAND, 1992).

Histologicamente, a HPB é caracterizada pelo crescimento do tecido epitelial e proliferação do estroma, com nódulos hiper celulares (SHAPELL et al., 2004). Embora a HPB seja uma lesão de caráter proliferativo, ela não é considerada uma precursora do CaP (HOMMA et al., 1996).

3.2.2. Precursores do Câncer de Próstata

A PIA na próstata consiste em áreas glandulares atróficas associadas à inflamação crônica e proliferação de células epiteliais. A inflamação tem sido implicada como um potencial agente etiológico em CaP humano (DE MARZO et al., 2006; WANG et al., 2009). A PIA ocorre principalmente na periferia do órgão e surge em consequência da proliferação de células epiteliais regenerativas, como resposta às lesões causadas por infecção, trauma celular resultante de danos oxidativos, hipoxia ou auto-imunidade (NELSON et al., 2003).

As principais características da PIA são a presença de duas camadas de células distintas, mononucleadas e/ou células inflamatórias polinucleares em ambos os compartimentos epiteliais e estromais; estroma atrófico, com variável quantidade de fibrose (DE NUNZIO et al., 2011). A glândula atrófica é identificada pela redução do seu volume e do seu estroma, sendo comumente associada à inflamação da próstata e considerada um possível precursor da neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HG PIN) e CaP (DE MARZO et al., 1999).

Bostwick e Brawer (1987) propuseram a utilização do termo neoplasia intra-epitelial prostática (NIP) (do inglês *Prostatic Intraepithelial Neoplasia* ou PIN). O termo foi endossado consensualmente em 1989, com o intuito de substituir os termos como displasia intra-ductal, hiperplasia atípica acinar, hiperplasia com alterações malignas, marcada atipia e displasia ducto acinar, unificando a terminologia NIP para designar as alterações displásicas

intra epiteliais da próstata humana (BOSTWICK, 1995). Na NIP, a proliferação de células epiteliais ocorre dentro de glândulas já existentes, onde a membrana basal continua íntegra e normal (SHAPPELL et al., 2004).

A NIP é classificada em: de baixo grau (do inglês LGPIN ou *low grade prostatic intraepithelial neoplasia*), correspondente ao NIP 1; e de alto grau (do inglês HGPIN ou *high grade prostatic intraepithelial neoplasia*), onde os graus 2 e 3 foram agrupados (BOSTWICK, 1995).

A NIP de baixo grau é identificada por apresentar ductos ou ácinos contendo epitélio com muitas células e núcleos condensados e irregulares e com marcada variação de tamanho. Núcleos alongados, hipercromáticos e pequenos nucléolos também podem estar presentes. A NIP de alto grau se diferencia da de baixo grau por apresentar o epitélio com mais células, evidenciando a estratificação celular, além de uma menor variação do volume nuclear entre as células, pois a maioria possui núcleo aumentado. A presença de nucléolo proeminente, frequentemente múltiplo, é típica na NIP de alto grau e de grande utilidade diagnóstica (SHAPPELL et al., 2004).

Para o diagnóstico de NIP em modelos experimentais, como os roedores, deve-se ter o reconhecimento histológico de alguma características ou a combinação delas. O epitélio glandular torna-se estratificado, adquire focos epiteliais em forma de tufos, com formação de micropapilas e crescimento num padrão cribiforme (BOSTWICK & ICZKOWSKI, 1997). Também é visível alterações de atipia nuclear que pode ser o aumento do tamanho nuclear, irregularidade da membrana basal, hipercromasia, acúmulo de cromatina e nucléolo evidente (BOSTWICK & ICZKOWSKI, 1997).

Em humanos, a NIP ocorre predominantemente na zona periférica (BOSTWICK, 1996). Segundo Helpap (1998), o mecanismo de proliferação e diferenciação celular está alterado na NIP, pois são observadas células basais diferenciadas atipicamente, com potencial proliferativo, migrando para o compartimento secretor, enquanto no tecido normal ou hiperplásico a capacidade proliferativa é restrita à camada basal. Com esta progressiva indiferenciação celular, tende a ocorrer também a perda gradativa das células basais, facilitando a extensão da lesão para o estroma e sua transformação em carcinoma invasivo (MONTIRONI et al., 2000).

3.2.3. Câncer de Próstata (CaP)

No Brasil, a estimativa de casos de CaP para 2012 é de 60.180 novos casos, sendo assim o primeiro entre os tipos mais comuns de cânceres entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma) (INCA, 2012). O aumento nas taxas de incidência de CaP observado nos últimos anos pode ser parcialmente justificado pelo progressivo aumento da eficácia investigativa dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos programas de rastreamento e sistemas de informação do Brasil, e pelo aumento na expectativa de vida da população mundial, uma vez que após os 50 anos, a incidência e a mortalidade devido ao CaP aumentam exponencialmente (BALDUCCI & LYMAN, 1997; HSING & CHOKKALINGAM, 2006).

Diferentemente da NIP, o carcinoma não é compatível com a morfologia normal das glândulas e algumas características histológicas permitem o seu reconhecimento (QIAN et al., 1997). O carcinoma invasivo é caracterizado pelo potencial que o tumor tem em exibir crescimento destrutivo no parênquima da próstata e pode mostrar diferenciação glandular, sendo classificado como adenocarcinoma (SHAPPELL et al., 2004).

A aquisição do comportamento invasivo e metastático dos tumores de próstata é um evento complexo e multifatorial, que envolve a transformação das células tumorais inicialmente dependentes de andrógenos a andrógeno-independentes. Neste sentido, tem sido demonstrado que fatores de crescimento podem fosforilar o AR por mecanismo independente de andrógenos (FELDMAN & FELDMAN, 2001; MEINBACH & LOKESHWAR, 2006; WU et al., 2006). Desta forma, o AR fosforilado pode migrar para o núcleo e ativar genes regulados por andrógenos, mesmo na ausência destes, o que poderia, em parte, explicar a progressão de tumores de próstata andrógeno-dependentes para andrógeno-independentes (FELDMAN & FELDMAN, 2001; MEINBACH & LOKESHWAR, 2006; WU et al., 2006).

3.3. O Cádmio e a Próstata

O cádmio (Cd) é um metal pesado, classificado como um agente carcinogênico de grupo 1 (evidências epidemiológicas suficientes para a ação carcinogênica em humanos) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2012). Naturalmente, o Cd está presente em baixas concentrações da crosta terrestre e em águas superficiais (MUNTAU & BAUDO, 1992, IARC 1993).

Atualmente, devido a poluição, a acidificação do cádmio aumentou nos sedimentos e em solos agrícolas e conseqüentemente em certos alimentos (arroz e carne de suínos, por exemplo) (OSKARSSON et al., 2004). Marcovecchio e colaboradores (1994) avaliaram o

aumento de metais pesados, entre eles o cádmio, em diferentes tecidos de animais marinhos (cetáceos e pinípedes), comprovando o acúmulo de poluentes e a transferência dos contaminantes através da cadeia alimentar.

Desde o século XX, é produzido e utilizado na indústria para várias aplicações em ligas e compostos. Possui grande aplicação na fabricação de baterias de veículos, de pedrapome, pastas de limpeza, pisos, como componente em metalúrgicas, em pigmentos, acabamentos de peças, plásticos e vidros, além dos fertilizantes fosfatados (IARC, 1993).

O Cd é responsável por grande parte de intoxicações ocupacionais e ambientais (NORDBERG, 1978). Dentre as exposições ocupacionais, as que afetam trabalhadores ligados diretamente com a produção e processamento do metal, fusão de metais e os que reciclam materiais eletrônicos são considerados de maior risco (WHO, 1992). A principal exposição não ocupacional vem da fumaça do cigarro e, assim, fumantes ativos e passivos estão expostos a concentrações de cádmio presente na fumaça do tabaco (LEWIS et al., 1972; JARUP et al., 1998).

A meia vida do Cd no organismo é longa. Em humanos, por exemplo, é de cerca de 15 anos (KJELLSTRÖM & NORDBERG, 1978) e superior a 200 dias em ratos (WEBB, 1975). Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer ou continuar mesmo após a redução ou a cessação da exposição ao metal.

O Cd pode se acumular em órgãos como o hipotálamo, hipófise e gônadas (MARQUEZ et al., 1998). Por ter uma longa meia-vida, esta acumulação pode acarretar distúrbios do sistema endócrino, afetar a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (ANTONIO et al., 1999) e alterar o mecanismo de secreção de hormônios. Laskey e Phelps (1991) observaram diminuição nos níveis de T e aumento dos níveis de ACTH em ratos.

Em roedores o Cd reconhecidamente é capaz de induzir o desenvolvimento de alterações na próstata por diferentes vias de exposição. Uma única injeção subcutânea de 1, 2, ou 4 $\mu\text{mol/kg}$ de Cd em ratos *Noble*, provocou alterações hiperplásicas proliferativas no lobo dorsolateral (WAALKES et al., 1989). Estudos mais recentes, utilizando a exposição ao metal por via oral pela água de beber (uma rota de grande importância nas exposições humanas) com concentrações de 60 ou 80 mg/L, encontraram lesões epiteliais pré-malignas no lobo ventral (WAALKES, 2000, MARTÍN et al., 2001, ARRIAZU et al., 2006). Outros estudos *in vitro* demonstraram que Cd aumenta proliferação das células epiteliais postáticas (BAKSHI et al., 2008) e é capaz de deixar as células transformadas resistentes à apoptose através da super expressão Bcl-2 (QU et al., 2007).

O mecanismo celular e molecular implicado na carcinogenicidade do Cd inclui ativação de proto-oncogenes, inativação dos genes supressores tumorais, rompimento da adesão celular e inibição do reparo de DNA (WAALKES, 2003).

Os indivíduos normalmente não estão expostos exclusivamente ao cádmio, mas sim a vários agentes químicos simultaneamente, os quais podem ser do tipo contaminante ambiental ou alimentar, fármacos, drogas lícitas ou de abuso etc., advindos das mais variadas fontes. Muitos destes agentes são capazes de, além das ações próprias, interagirem com outros compostos, provocando diversos efeitos, que podem ser potencializados ou antagonizados, diferentemente dos que provocariam ao agir isoladamente. Assim, torna-se relevante compreender os efeitos simultâneos do cádmio, um metal com potencial em causar danos na glândula prostática.

3.4. A Cafeína e a Próstata

A cafeína é provavelmente uma das substâncias farmacologicamente ativas mais freqüentemente ingerida em todo o mundo. Ela é encontrada em bebidas comuns (café, chá, refrigerantes), em alimentos que contém cacau ou chocolate e em medicamentos (IARC 1991).

Embora os efeitos da cafeína sejam extensivamente investigados, principalmente por estudos epidemiológicos e *in vitro*, muitos dos dados destas pesquisas parecem contraditórios. Por exemplo, existem inúmeros resultados diferentes sobre o efeito da cafeína na proliferação celular. Uma explicação para estas discrepâncias está no fato dos experimentos utilizarem diferentes tipos celulares em diferentes condições e concentrações de cafeína que vão desde micromolares até milimolares. Fisiologicamente, atingir tais níveis sanguíneos experimentais de cafeína seria extremamente difícil em humanos sem produzir efeitos colaterais adversos. Neste sentido, a relevância destes dados experimentais obtidos com altas concentrações de cafeína não está clara (BODE & DONG, 2006). Estudos com células iniciadas demonstram que a cafeína tem efeitos diretos sobre o ciclo celular, agindo sobre a proteína p53 de forma a induzir a morte celular programada (ITO et al., 2003; HE et al., 2005; NOMURA et al., 2005).

Um estudo de caso-controle com homens de 65 a 80 anos de idade realizado na Suíça, intitulado “Sua próstata”, relacionou sintomas de HPB com o uso de álcool, cigarro e consumo de café. Foi encontrada uma relação positiva proporcionalmente direta entre consumo de café e o aparecimento de hiperplasia prostática benigna (GASS, 2002). Estudos

anteriores já sugeriam esta correlação (GLYNN et al., 1985; MORRISSON, 1992). Por outro lado, há outros estudos caso-controle que não encontraram nenhuma relação entre o consumo de café e o risco de HPB (SIGNORELLO et al., 1999). Em contraste, um estudo de caso-controle encontrou diminuição do risco de HPB em homens que tinham o hábito de tomar café (MORRISON, 1992). Portanto, os dados ainda são conflitantes e pouco se conhece sobre a ingestão da cafeína como um fator de risco ou protetor para HPB ou outras alterações na próstata.

Ratos que receberam cafeína, teobromina e teofilina na sua dieta alimentar demonstraram atrofia nos testículos, além de varias mudanças atróficas nos órgãos sexuais acessórios, incluindo a próstata, sendo que a cafeína revelou maior toxicidade. Análises citogenéticas destes testículos demonstraram redução no número de células mitóticas e aumento no nível de testosterona, que foi correlacionado com a aparência hiperplásica das células intersticiais nos testículos atrofiados (WEINBERGER et al., 1978). Gans (1984) confirmou estes dados e também observou degeneração vacuolar nas células espermatogênicas.

3.5. Biomarcadores de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na próstata

A homeostasia do tecido e a regulação e manutenção celular dependem de um delicado equilíbrio entre: proliferação celular, diferenciação, e apoptose. Essa complexa dinâmica é dirigida pela interação célula-célula e célula-matriz (SUNG & CHUNG 2002). O estudo da cinética celular, de suas inter-relações e de seus mecanismos reguladores ajudam na compreensão, investigação e diagnóstico das neoplasias (ARISAWA et al., 1999).

A utilização de marcadores celulares que identificam células em proliferação celular, tais como, Ki-67, PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas) contribuem para o entendimento do ciclo celular (ARISAWA et al., 1999). A proteína p-53 é considerada “guardiã” do genoma, pois se um erro ocorre na transcrição do DNA ela interrompe o ciclo para que os mecanismos de reparação atuem. Se o processo falhar, acionam-se eventos apoptóticos e há destruição da célula danificada (SCHMITT, 1999). Melissari, *et al.* (2006) identificou em carcinoma de células escamosas *in situ*, células p53 e vários núcleos Ki-67 positivos.

Em células normais a proteína p-53, denominada tipo selvagem, tem meia-vida curta e não se acumula no tecido em níveis detectáveis. Mutações ou deleções no *Gene* p-53 podem levar à produção alterada da proteína, a qual deixa de desempenhar sua função e acumula-se

no tecido, podendo ser detectada por imuno-histoquímica (SCHMITT, 1999). A “via p53” envolve a indução da expressão de inúmeros outros *Genes* (STEELE & LANE 2005). O acúmulo nuclear de p-53 é observado em tumores de fenótipo agressivo e em focos de HGPIN (JOHNSON et al., 1998).

A expressão da oncoproteína inibidora de apoptose denominada Bcl-2 (linfoma de célula B-2), é considerada um importante marcadores de lesões pré-maligna e malignas na próstata (SARDANA et al. 2008). O bcl-2, um regulador pró-sobrevivência da morte celular por apoptose, é superexpresso em uma grande variedade de tumores malignos humanos, inclusive o de próstata, onde tem sido associado com a progressão para a andrógeno-independência e resistência aos tratamentos (CHI, 2005). Johnson et al. (1998) relatou uma maior expressão de Bcl-2 em HGPIN do que em CaP.

Este envolvimento já havia sido proposto por McNeal et al. (1995) os quais sugeriram que a auto-sustentação das células secretora, pela expressão aumentada de bcl-2, predispõe o epitélio displásico à instabilidade genética, o que pode gerar um fenótipo invasivo. Além da proteína p53 e da Bcl-2, outros marcadores tem sido utilizados para se identificar possíveis alterações nas células epiteliais prostáticas relacionadas com o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas nesta glândula.

Adesão célula-célula tem um importante papel na manutenção da integridade tecidual e no fenótipo normal das células e no processo de carcinogênese. A via de sinalização Wnt desempenha um papel na direção do desenvolvimento embrionário e manutenção de populações de células estaminais (KIM et al., 2012).

A β -catenina (a molécula efetora da via Wnt) é uma molécula de adesão celular produzida pelas células epiteliais e a expressão da β -catenina por estas células tem sido utilizada para avaliar o prognóstico do câncer de próstata (YARDY & BREWSTER 2005).

Estudo realizado em um modelo de ratos identificou células epiteliais glandulares expressando beta-catenina em áreas de HGPIN (GOUNARI et al., 2002). Em humanos, a expressão de beta-catenina esta relacionada com um potencial metastático em CaP, por mostrar uma expressão maior que 80% nas metástases ósseas (JUNIOR 2008; SAHA et al., 2008; PONTER et al., 2010).

Outro importante marcador, por exemplo, são os marcadores relacionados com a resposta inflamatória e ao estresse oxidativo, tais como a cicloxigenase-2 (COX-2) e a glutationa sulfo-transferase (GST), respectivamente (SARDANA et al., 2008).

A cicloxigenase 2 (COX 2) é uma enzima pró-inflamatória necessária para a síntese de prostaglandinas, particularmente prostaglandina E2 (BONKHOFF & BERGES 2010) e,

atualmente, o processo inflamatório tem sido implicado no desenvolvimento e progressão de tumores de próstata (DE MARZO et al., 1999; PAVLAKIS et al., 2010).

As GSTs são enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo celular e protegem o DNA de danos por radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Uma expressão aumentada de GST aparece no início das lesões pré-neoplásicas no fígado (PIRES et al., 2008).

Na próstata, a expressão de GST é baixa nas células epiteliais secretoras e nas células basais, porém pode ser induzida por fatores indutores de estresse oxidativo. Se uma célula deficiente na expressão de GSTs aparecer no epitélio, tal célula se torna vulnerável aos agentes oxidantes eletrofilicos que induzem danos no DNA e tendem a promover a transformação neoplásica. Esta teoria concorda com o fato da expressão de GST estar ausente nas áreas de HGPIN e de CaP (SARDANA et al., 2008).

As enzimas Glutathione S-transferases (GSTs) são dímeros classificados em quatro grupos: α , π , θ , μ . A glutathione S-transferase π (GSTP1), da família das GSTs, são enzimas de detoxicação que conjugam substratos reativos com glutathione reduzida (Hayes & Pulford 1995).

Muitos estudos têm revelado várias alterações moleculares durante a carcinogênese do câncer próstata. A hiper-metilação do *Gene* GSTP1 na “ilha CpG” é uma das alterações moleculares que ocorrem durante a carcinogênese (BASTIAN et al., 2004) e pode ser detectado na próstata, fluido de tecidos, sangue e urina (DE MARZO et al., 2004). Lee *et al.* (1994) observaram que não houve metilação do *Gene* GSTP1 em todos os tecidos humanos normais e de HPB, mas foi hiper-metilado em todas as 20 amostras analisadas de CaP. Num estudo realizado por Nakayama e colaboradores em 2004, foi detectado 90% de hiper-metilação do *Gene* GSTP1 na “ilha CpG” de casos de câncer de próstata.

A enzima α -metilacil coenzima-A racemase (AMACR), outro biomarcador de importante uso no diagnóstico de PIN, HGPIN e CaP, é pouco expressa em células epiteliais normais, mas é altamente expressa em células prostáticas tumorais. Além disso, é codificada por um *Gene* localizado na região (5p13.3) que contém polimorfismos associados com o CaP (RHODES et al., 2002). A AMACR tem grande utilidade na interpretação de biopsias de agulha de próstatas de difícil diagnóstico clínico (RUBIN et al., 2002).

Desta forma, os biomarcadores, cada qual, apresenta características úteis que auxiliam no entendimento da iniciação e progressão de lesões proliferativas que levam ao câncer de próstata. Mas em decorrência da heterogeneidade do CaP, nenhum biomarcador utilizado isoladamente oferece resultado 100% confiável (MAKAROV et al., 2009).

3.6. Justificativas e Relevância

Considerando que a próstata é um “bioacumulador” de cádmio, um cátion divalente que interfere com o metabolismo oxidativo celular e com proteínas reguladoras do ciclo celular, mostra-se extremamente relevante avaliar os efeitos deste metal, bem como da cafeína, sobre o padrão de expressão de marcadores celulares de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na glândula prostática.

Os principais resultados desta dissertação serão apresentados em forma de publicações científicas em revistas de impacto internacional na área de morfologia. Além disso, os nossos resultados poderão ajudar na compreensão de como o efeito da exposição ao cádmio em baixas doses pode contribuir no aumento da incidência de afecções na próstata de homens adultos e se a cafeína tem alguma relação benéfica ou prejudicial sobre estes efeitos, fornecendo assim subsídios à conscientização das populações que vivem nas áreas de grande exposição ao metal e que têm hábitos alimentares e estilos de vida que favoreçam o desenvolvimento destas afecções.

3.7. Objetivos

O presente projeto teve por objetivo investigar, em ratos *Wistar*, os efeitos da cafeína isoladamente e os efeitos da cafeína sobre as lesões proliferativas induzidas pelo cádmio na próstata ventral.

Mais especificamente, os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar as alterações morfológicas e a expressão prostática das proteínas Ki-67, RA, PCNA, PAR-4, por imuno-histoquímica e western blotting dos lobos prostáticos ventral e dorsal expostos ao tratamento crônico por cafeína;
2. Avaliar a expressão tecidual, através da técnica de imuno-histoquímica e western blotting, dos marcadores celulares de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, tais como Bcl-2, p-53, Cox-2, GSTP-1, β -catenina e AMACRacemase, AR e Ki-67; no lobo prostático ventral dos animais expostos ao tratamento crônico por cafeína e/ou cádmio.

4. CAPÍTULOS

4.1. Artigo 1. *“Chronic caffeine intake increases androgenic stimulus, epithelial cell proliferation and hyperplasia incidence in rat ventral prostate”*

4.2. Artigo 2. *“Efeitos da injeção crônica de cádmio e/ou cafeína sobre a expressão proteica da beta-catenina, GST-P e AMACRase na próstata ventral de rato”*

Chronic caffeine intake increases androgenic stimulus, epithelial cell proliferation and hyperplasia incidence in rat ventral prostate

Carolina Sarobo, Livia M. Lacorte, Marcela Martins, Jaqueline C. Rinaldi, Ivan J. Vechetti Junior, Andrei Moroz, Wellerson R. Scarano, Flavia K. Delella, Sérgio L. Felisbino.

Univ Estadual Paulista (UNESP), IB, Morphology, Botucatu, SP, Brazil

Running title: Caffeine intake and prostate morphology.

Key words: caffeine, prostate, stroma, collagen, cell proliferation, apoptosis

Correspondence to: Dr Sérgio L. Felisbino, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18.618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3811 6264

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

Grant Sponsor: This research was supported by FAPESP, CNPq, CAPES and FUNDUNESP.

Abstract

Coffee intake has been associated with low risk of developing cancer, including prostate cancer, the most commonly diagnosed cancer in men. However, few studies evaluated the effects of chronic caffeine, the main coffee methylxanthine, intake on prostate morphology and physiology. In the present study, we investigated the effects of low-dose caffeine chronic intake on rat prostate morphology since puberty to adulthood. Five-week-old male Wistar rats were randomized into two experimental groups: caffeine-treated (20 ppm in drinking water, n = 12) and control (n = 12). The ventral and dorsolateral prostates were dissected, weighted and submitted to morphological, morphometrical and immunohistochemical analysis of cellular proliferation, apoptosis and androgen receptor (AR) tissue expression. The testosterone and dihydrotestosterone concentrations were measured in the plasma. Our results show that caffeine intake increased concentration of T and DHT, and weight, epithelial cell proliferation and AR tissue expression in the ventral prostatic lobe. All ventral prostates from caffeine-treated animals presented some degree of epithelial and stromal hyperplasia. Our results suggest that chronic caffeine intake, since pubertal period, increases androgen signaling into the prostate gland. Since low testosterone levels have been associated with prostate disease in older man, caffeine intake may have potential benefits on late life prostate physiology. Otherwise, some individual may develop prostate hyperplasia under chronic caffeine stimulation.

Introduction

Caffeine (1,3,7- trimethylxanthine) is a key component in many popular beverages including coffee, cocoa and tea. In addition, caffeine can be artificially synthesized and included in foods and drinks, like in the energy drinks. In this sense, caffeine is probably the most frequently ingested neuroactive drug in the world (IARC, 1991; Bode & Dong 2007). Studies have shown that caffeine induces a wide spectrum of cellular and pharmacologic responses such as the central nervous system and motor activity stimulation (Fredholm *et al.* 1999) and antioxidant activity (Inkielewicz-Stepniak & Czarnowski 2010). Caffeine intake has been also associated with reduced risk of developing type 2 diabetes (Huxley *et al.* 2009). Furthermore, epidemiologic evidences demonstrated a strong association between caffeine intake and cancer chemoprevention for many organs in humans, such as pancreas, liver and lung (Butt & Sultan 2011).

It is well known that caffeine might act as an endocrine disruptor in the reproductive system due to its effects on sex hormone levels, both in the male and female (Pollard 1988; Celec & Behuliak 2010; Hirose *et al.* 2007). Previous experimental studies have shown that this alkaloid increases plasma testosterone levels via sympathetic stimulation of testis Leydig cells, but causes testicular atrophy and impaired spermatogenesis (Ezzat & el-Gohary 1994; Weinberger *et al.* 1978). Since caffeine intake disrupts circulating androgens, it would be expected to affect androgen-dependent sex accessory glands. However, no previous experimental studies evaluated the effects of long-term caffeine intake on the prostate gland, where physiology is tightly regulated by androgens and the second most frequently diagnosed cancer in males (Jemal *et al.* 2011).

Since previous reports relating caffeine intake and prostate have shown inconsistent results (Glynn *et al.* 1985; Morrisson 1990, 1992; Signorello 1999; Gass 2002; Wilson *et al.* 2011), this study was conducted to determine the effects of a low-dose long-term caffeine intake, on the morphology, epithelial cell proliferation, apoptosis, androgen receptor protein expression, and incidence of prostatic diseases on the rat ventral and dorsolateral prostatic lobes.

Material and Methods

Animals

Five-week-old male Wistar rats ($n=24$), obtained from the Central Stock breeder of the São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP/Brazil, were used in this study. The animals were maintained under controlled temperature and lighting conditions and received food and water *ad libitum*. Animals were randomized into two experimental groups ($n=12$): a control group (CT) and a caffeine treated group (CF). The treated group received caffeine (20 mg/L caffeine, Sigma™, Saint Louis, MO) in the drinking water for 140 days and the CT group received tap water only. The caffeine dose has been chosen to simulate moderate caffeine human consumption (~2-4 mg/kg/day) (Heckman *et al.* 2010). During the experiment, water and food intake were registered daily, and body weight gain was measured weekly.

At the end of the treatment, animals were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital. Animals' weights were determined previous to euthanasia, and blood samples from each animal were collected. The ventral (VP) and dorsolateral (DLP) prostatic lobe pairs were excised and weighted. The right lobes were immersed in a fixative solution, and the left lobes were frozen for western blotting analysis.

Hormonal Assay

The plasma was separated from the blood and stored at -4°C . Plasma testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) concentration were determined by chemiluminescence (VITROS ECi-JohnsonTM and Johnson Ultra-Sensitive ChemiluminescenceTM analysis) in a renowned clinical analysis laboratory using specific reagents (JohnsonTM and Johnson OrthoclinicalTM).

Histological Procedures, Morphometric and Stereological Analysis

The VP and DLP were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde/phosphate buffered saline (PBS) solution for 24 h, washed in PBS for 24 h, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in glycol methacrylate resin (Historesin® embedding kit, LeicaTM Heidelberg) or cleared in xylene and embedded in Paraplast (Sigma-COTM, Saint Louis, MO, USA). Resin sections (3 μm) were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for morphological and morphometric analysis. Paraplast sections (5 μm) were stained with Picrosirius (Junqueira *et al.* 1979) for collagen (type I and type III collagen fibers) detection followed by stereological analysis or used to proceed to immunohistochemistry protocol.

Morphometric analysis was performed using a LeicaTM DMLB 80 microscope connected to a LeicaTM DC300FX camera and LeicaTM Q-win software Version 3 for WindowsTM.

Epithelial height measurements were evaluated on 10 VP and DLP lobes from both experimental groups. A total of 10 random microscopic fields (X40 magnification) of prostatic lobe sections from 10 different animals were acquired with 10 random interactive measurements per field (1,000 measurements per experimental group).

To determine absolute collagen fiber volume, another 10 random microscopic fields (X20 magnification) of prostatic lobe sections from 10 different animals were acquired. The Sirius red

stained area was determined by automatic image detection of red colors and the collagen volume fraction was calculated as a percentage of red-stained areas per total prostatic area. It has previously been determined that 1 mg of fresh rat ventral tissue has a volume of approximately 1 mm³ (DeKlerk & Coffey 1978). Therefore, the volume (or absolute volume) of collagen fibers was calculated by multiplying the collagen fiber volume fraction by the mean prostatic weight.

All the measurements were performed in the intermediate and distal regions of the prostate lobe ducts, which represent the major portions of the prostatic lobes (Nemeth & Lee 1996).

The morphological criteria described in Shapell et al. (2004) were utilized for discerning lesions in the ventral and dorsal lobe.

Immunohistochemistry

Paraplast embedded prostate samples were sectioned onto silanized glass slides. Antigen retrieval was performed by boiling the fixed samples in citrate buffer pH 6.0 in a pressure cooker for 35 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. The prostate sections were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature. These sections were then incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with mouse monoclonal anti-Ki-67 (Novo Castra™) and polyclonal rabbit anti-androgen receptor (AR) (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) diluted 1:100 in a 1% BSA/PBS solution. Excess primary antibody was removed with PBS washing, and the slides were incubated with a biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) diluted 1:100 in 1% BSA/PBS for 1 h at room temperature. After subsequent PBS washing, the primary antibody was detected using a secondary

peroxidase-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology™, Santa Cruz, CA, USA). Chromogen color was developed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, EUA). Slides were then counterstained with hematoxylin.

Ki-67 Detection and Proliferation Index

The proliferation index was determined by counting the number of Ki-67 positive epithelial cells in 10 microscopic fields (X40 magnification) visualized from 10 VP and 10 DLP lobe sections from both caffeine-treated and control animals. The results are expressed as a percentage of Ki-67 positive cells (number of labeled nuclei X 100/total cell number). Approximately 10,000 cells were counted per experimental group. Image acquisition and quantitative measurements were performed by an investigator who had no prior knowledge of animal identity or experimental group.

In Situ Cell Apoptosis Detection by TUNEL Assay

The apoptosis detection was based in a reaction of *in situ* Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Biotinylated UTP Nick End-Labeling (TUNEL). This was essentially performed using the FragEL™ DNA (Calbiochem, CA, USA) according to the manufacturer's directions. Briefly, samples of the Paraplast embedded tissue were collected in silanized glass slides. The slides were treated with Proteinase K (2 mg/ml) diluted at 1:100 in 10mM Tris-HCl pH 8.0. After that, the slides were washed in TBS and endogenous peroxidase was blocked for 5 min in 3% H₂O₂ diluted in methanol. After washing in TBS, sections were treated with 1X TdT Equilibration Buffer at room temperature for 30 min, and incubated with TdT Labeling Reaction Mix (57µm Equilibration Buffer plus 3µm of TdT Enzyme) for 1:30 h at 37°C. The slides were

rinsed in TBS and incubated with Blocking Buffer for 10 min at room temperature. Next, the sections were incubated with 50X Conjugated (diluted 1:50 in Blocking Buffer) for 30 min at room temperature. After 3 washings in TBS, the detection of TUNEL-positive cells was performed with DAB for 5 min. The specimens were counterstained with Hematoxylin and mounted in Permount. The epithelial cells were counted in 10 random microscopic fields (X40 magnification) from 10 different ventral and dorsal prostatic sections from both caffeine-treated and control animals. Approximately 10,000 cells were counted per experimental group. The TUNEL index was expressed as a percentage of total cells counted (number of TUNEL-positive cells X 100/total cell number). Image acquisition and quantitative measurements were performed by an investigator blind to both the animal identity and experimental group.

Western Blotting Analysis of PCNA and PAR-4

Frozen samples of ventral and dorsal adult rat prostatic lobes from control and caffeine group were mechanically homogenized in 50mM Tris-HCl buffer pH 7.5 plus 0.25% Triton-X 100 by Polytron for 30 sec at 4°C, centrifuged, and protein was extracted on supernatant and quantified as per Bradford methods (Bradford 1976). A protein sample (70µg) was loaded into 10% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transblotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma-CO™, Saint Louis, MO, USA). The blot was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBST (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 150mM NaCl; 0.1% Tween-20) for 1h. The blot was then incubated overnight at 4°C with 3% BSA in TBST containing a 1:1000 dilution of monoclonal mouse anti-PCNA (Proliferation cell nuclear antigen, Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal goat anti-PAR-4 (Prostate apoptosis response 4, Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal rabbit anti-

androgen receptor (AR) (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal goat anti-beta actin (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) primary antibodies. The blot membranes were then washed five times for 20 minutes in TBST and incubated for 1h at room temperature with a secondary peroxidase-conjugated antibody. After washing in TBS-T, antibody location was detected using chemiluminescence substrate kit (Pierce ECL Western Blotting Substrate - GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The substrates were removed from membranes and ECL signals were captured by CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini[®], GE Healthcare™). The integrated optical density (IOD) of the target proteins bands were measured using the Image J software downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to compare the protein levels. The PCNA and PAR-4 expression was normalized to the β -actin values. Normalized data are expressed as means \pm SD.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and statistical significance ($P < 0.05$) was determined by Student's t-test. Statistical analyses were performed using the INSTAT[®] software (version 3.0; GraphPad™, Inc., San Diego, CA).

Results

Animals and prostatic lobes biometry

After 140 days of caffeine treatment (20 ppm), no significant differences were observed in body weight, water and food intake (Table 1). However, plasma T and DHT concentration and

prostatic lobe absolute and relative weight were significantly higher in animals exposed to caffeine than in control animals ($P<0.01$) (Table 1).

Histology

Ventral prostates from CT animals presented regular glandular structures lined by tall, columnar and polarized epithelial cells surrounded by thin stroma (Fig. 1a-b). Significant morphological changes were observed in the VP from caffeine-treated animals (Fig. 1c-f). Some VP from caffeine-treated animals presented enlarged luminal space lined by simple squamous epithelial cells and reduced number of epithelial infolds (Fig. 1c). All VP from caffeine-treated animals presented glandular dysplasia, classified as papilliferous hyperplasia, with different degrees of severity and number of committed acini (Fig. 1d-f). Five VP from CF animals presented several foci of epithelial hyperplasia dispersed through the distal edge of the acini (Fig. 1d). Three VP from CF animals presented a large area committed by epithelial and stromal hyperplasia (Fig. 1d). In these animals, distal and intermediate regions of VP acini presented epithelium lined by activated epithelial cells, exhibiting prominent nucleoli, and forming several papillae, without signs of cellular atypia (Fig. 1f). Dorsal prostate did not exhibit morphological differences between the groups and no dysplastic lesions were observed in this lobe from caffeine-treated animals (Fig. 1g-h).

Collagen fibers stained by Picrosirius were located below the epithelium, in the interstitium and surrounded by smooth muscle cells from the ventral and dorsal prostatic lobes (Fig. 2). Quantitative analysis of collagen volume fraction showed no significant differences in caffeine-treated prostatic lobes compared to the control group (Table 1).

Epithelial cell Proliferation and Apoptosis

To evaluate whether caffeine exposure interferes with epithelial cell proliferation, we performed immunohistochemistry to detect Ki-67 nuclear expression (Fig. 3). The number of positive nuclei appeared increased in the VP caffeine-treated group when compared to the control group (Fig. 3a-b), which was significant when confirmed by quantitative analysis (Fig. 5a).

The effect of caffeine treatment on epithelial cell apoptosis was also assessed by analyzing the frequency of positive nuclei by TUNEL reaction (Fig. 4). This analysis revealed no significant changes in the epithelial cell apoptotic index in both prostatic lobes from caffeine-treated rats when compared to control rats (Fig. 5b).

Western Blotting for PCNA and PAR-4

Western blotting results confirmed the increased cellular proliferation in the VP from caffeine-treated animals (fig. 6). The western blotting showed increased expression of PCNA in the VP, without changes in the DP. The analysis of PAR-4 showed no differences in the expression of this protein related to apoptosis in the prostatic lobes between the groups.

AR Immunostaining

Finally, we performed immunohistochemistry for tissue expression of the AR. AR immunostaining was detected in the nuclei from columnar and basal epithelial cells of the prostatic lobes from both control and caffeine-treated animals (Fig. 7). However, the AR immunostaining was more intense in the nuclei of VP epithelial cells from caffeine-treated group (Fig. 7).

Discussion

In the present study, we examined the effects of long-term low-dose caffeine administration on prostatic lobes from puberty to adulthood rats. At this age, the prostate gland undergoes an intense proliferative activity and glandular maturation stimulates testis testosterone synthesis (Vilamaior *et al.* 2006).

Several studies have reported the role of coffee on cancer prevention, including prostate cancer (Lu *et al.* 2006; Bettuzzi *et al.* 2006; Butt & Sultan 2011), however, this beverage contains several bioactive molecules such as chlorogenic acid (3-3,4-Dihydroxycinnamoyl quinic acid), caffeic acid (3,4-Dihydroconnamic acid), diterpenes (Kahweol and Cafestol) and hydroxyhydroquinone (1,2,4-Trihydroxybenzene) with different properties, compromising the precise comprehension of its effects in the organism (Cavin *et al.* 2002; Butt & Sultan 2011). Caffeine is a powerful bioactive compound found in many foods and beverage (IARC 1991). However, the effects of this alkaloid on prostate growth, morphology and physiology have not been well-established.

The findings of the present study demonstrated that long-term low-dose caffeine intake increases plasmatic T and DHT levels. These findings are in agreement with the results from Weinberger *et al.* (1978) and Ezzat & el-Gohary (1994), who also observed increased androgen levels after caffeine intake. Regarding the prostate gland, caffeine exposure increased the VP lobe weight, proliferation and tissue AR expression of the epithelial cells. Together, these results suggest that caffeine intake increases androgenic signaling in the VP epithelial cells and increase their proliferative activity. On the other hand, the apoptotic index was unchanged in prostatic epithelial cells from both experimental groups. Imbalances between cell proliferation and cell

apoptosis have been considered a key factor in development of prostate diseases (Xie *et al.* 2000).

It is not well-established if caffeine have the potential to induce proliferative lesions in the prostatic gland. However, in our study, we found hyperplastic epithelium in 70% of VP from caffeine-treated rats. Thus, we believe that long-term increased androgenic stimulation induced by caffeine treatment may cause prostate hyperplasia. Yun & Doux (2006) also suggested that elevated sympathetic stimulation by caffeine intake may cause benign prostate hyperplasia (BPH). Futures studies should address in more prolonged exposure to caffeine may induces neoplastic lesions in prostate epithelium and this hyperplastic phenotype will be reversed by suspension of caffeine administration. Nevertheless, some individuals may benefit from caffeine-induced higher testosterone levels, considering that an unbalance between T and estrogen (E) in adulthood is a important prostate cancer risk factor (Ellem & Risbridger, 2010).

Our group has previously demonstrated a major role for the stromal components on prostate morphophysiology in several experimental conditions (Delella *et al.* 2007; Felisbino *et al.* 2007; Justulin *et al.* 2008; 2010; Lacorte *et al.* 2011; Vilamaior *et al.* 2000). Caffeine is known as a nonselective adenosine receptor antagonist; this receptor is a potent endogenous regulator of inflammation and tissue repair, which is increased in hypoxic tissue conditions, to toxins and drugs, thus can induce fibrosis in the lung and liver, and caffeine has been related with reduced collagen deposition (Chan *et al.* 2006). Here, caffeine treatment did not alter prostate collagen fiber absolute volume in both the VP and DLP when compared to the prostates of control animals, and this result is probably related to caffeine dose. Usually, adenosine activity inhibition by caffeine is archived by higher doses (50 mg/kg/day) than that was used in our experiment (~2,5 mg/kg/day).

In summary, our results suggest that chronic caffeine intake from puberty to adulthood increases androgen signaling into prostate gland. Since low testosterone levels and inherent reduction of testosterone/estrogen ratio have been associated with prostate disease on older man, caffeine-intake may have potential benefits on prostate physiology late in life. In addition, it should not be ruled out that some predisposed individuals may develop benign prostatic hyperplasia under prolonged caffeine stimulation.

Acknowledgments

This article is part of the dissertation presented by CS to the Universidade Estadual Paulista, UNESP, Brazil to receive the degree of Master of Science.

References

- Bettuzzi S., Brausi M., Rizzi F., Castagnetti G., Peracchia G., Corti A. (2006) Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res.* **66(2)**, 1234-1240.
- Bode A.M., Dong Z. (2007) The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* **247**, 26-39.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**,248-254.
- Butt M.S., Sultan M.T. (2011) Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51(4)**, 363-373.

- Cavin C., Holzhaeuser D., Scharf G., Constable A., Huber W.W., Schilter B. (2002) Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1155-1163.
- Celec P., Behuliak M. (2010) Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. *J. Psychopharmacol.* **24**, 1569-1572.
- Chan E.S., Montesinos M.C., Fernandez P., Desai A., Delano D.L., Yee H., Reiss A.B., Pillinger M.H., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Friedman S.L., Cronstein B.N. (2006) Adenosine A2A receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *British J. Pharmacol.* **148**, 1144–1155.
- DeKlerk D.P., Coffey D.S. (1978) Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique biomorphometrics. *Invest Urol.* **16**, 240–245.
- Delella F.K., Felisbino S.L. (2010) Doxazosin treatment alters stromal cell behavior and increases elastic system fibers deposition in rat prostate. *Microsc. Res. Tech.* **73**, 1036-1044.
- Delella F.K., Justulin L.A. Jr., Felisbino S.L. (2007) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) location in the ventral, lateral, dorsal and anterior lobes of rat prostate by immunohistochemistry. *Cell. Biol. Int.* **31**, 229-234.
- Ellem SJ, Risbridger GP. (2010) Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **118**, 246-251.
- Ezzat A.R., Gohary Z.M. (1994) Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabbits. *Funct. Dev. Morphol.* **4**, 45-50

- Felisbino S.L., Justulin L.A. Jr., Carvalho H.F., Taboga S.R. (2007) Epithelial-stromal transition of MMP-7 immunolocalization in the rat ventral prostate following bilateral orchiectomy. *Cell Biol Int* **31**, 1173-1178.
- Fredholm B.B., Battig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E.E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **51**, 83-133.
- Gass R. (2002) Benign prostatic hyperplasia: the opposite effects of alcohol and coffee intake. *BJU Int.* **90**, 649-654.
- Glynn R.J., Campion E.W., Bouchard G.R., Silbert J.E. (1885) The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Normative Aging Study. *Am. J. Epidemiol.* **121**, 78-90.
- Heckman M.A., Weil J., Gonzalez de Mejia E. (2010) Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *75*, 77-87.
- Hirose K, Niwa Y, Wakai K, Matsuo K, Nakanishi T, Tajima K. (2007) Coffee consumption and the risk of endometrial cancer: Evidence from a case-control study of female hormone-related cancers in Japan. *Cancer Sci.* **98**, 411-415.
- Huxley R., Lee C.M., Barzi F., Timmermeister L., Czernichow S., Perkovic V., Grobbee D.E., Batty D., Woodward M. (2009) Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **169(22)**, 2053-2063.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. Volume 51 coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal [monografia da internet]. Lyon, 1991 [atualizada em

1997 Nov 11; acesso em 2012 Apr 01]. Disponível em:
monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol51/volume51.pdf

Inkielewicz-Stepniak I., Czarnowski W. (2010) Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1607–1611.

Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**, 69–90.

Junqueira L.C.U., Bignolas G., Brentani R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. *J. Histochem.* **11**, 447–455.

Justulin L.A. Jr., Della-Coleta H.H., Taboga S.R., Felisbino S.L. (2010) Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int. J. Androl.* **33**, 696-708.

Justulin L.A. Jr., Delella F.K., Felisbino S.L. (2008) Doxazosin reduces cell proliferation and increases collagen fibers in rat prostatic lobes. *Cell Tissue Res.* **332(1)**, 171-183.

Lacorte L.M., Delella F.K., Porto Amorim E.M., Justulin L.A. Jr., Godinho A.F., Almeida A.A., Felipe Pinheiro P.F., Amorim R.L., Felisbino S.L. (2011) Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. *Microsc. Res. Tech.* **74(11)**, 988-997.

Lu Y., Rosenfeld R., Bar-Joseph Z. (2006) Identifying cycling genes by combining sequence homology and expression Data. *Bioinformatics* **22**, 314-322.

Nemeth, J.A., Lee, C. (1996) Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* **28**, 124-128.

- Nkondjock A. (2009) Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett.* **277**, 121-125.
- Pollard I. (1988) Increases in plasma concentrations of steroids in the rat after the administration of caffeine: comparison with plasma disposition of caffeine. *J. Endocrinol.* **119(2)**:275-80.
- Signorello L.M., Tzonou A., Lagiou P., Samoli E., Zavitsanos X., Trichopoulos, D. (1999) The epidemiology of benign prostatic hyperplasia: a study in Greece. *BJU Int.* **84**, 286-291.
- Vilamaior P.S., Felisbino S.L., Taboga S.R., Carvalho H.F. (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* **45**, 253-258.
- Vilamaior P.S., Taboga S.R., Carvalho H.F. (2006) Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **288**, 885-892.
- Weinberger M.A., Friedman L., Farber T.M., Moreland F.M., Peters E.L., Gilmore C.E., Khan M.A. (1978) Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J. Environ Pathol Toxicol.* **1(5)**, 669-88.
- Wilson K.M., Kasperzyk J.L., Rider J.R., Kenfield S., van Dam R.M., Stampfer M.J., Giovannucci E., Mucci L.A. (2011) Coffee Consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1-9.
- Yun AJ, Doux JD. (2006). Opening the floodgates: benign prostatic hyperplasia may represent another disease in the compendium of ailments caused by the global sympathetic bias that emerges with aging. *Med Hypotheses.* **67**, 392-394.

Xie W., Wong Y.C., Tsao S.W. (2000) Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the noble rat. *Prostate* **44**, 31-39.

Legend of the figures

Fig. 1. Morphological aspects of control (**a, b and g**) and caffeine-treated (**c-f and h**) ventral (VP) (**a-f**) and dorsal (DP) (**g and h**) prostatic lobes stained by Hematoxylin-Eosin. **a)** Morphological aspect of rat VP from control group showing tubular-alveolar structures with large lumen (L) and lined by regular secretory epithelium. Epithelium unfolding was concentrated in the distal edge of the tubules (arrows). **b)** Detail of control VP showing regular and well polarized epithelial cells (ep) lining the tubular-alveolar glandular and the reduced cellular an extracellular stromal components (st). **c)** VP from from caffeine-treated animals exhibited altered morphological aspects, such as enlarged luminal space (L), reduced epithelium height and unfolding (arrows). Insert showing a detail from figure **c** presenting simple squamous epithelium (arrow) lining the glandular structures. **d)** Papilliferous hyperplastic structures and tufts of cells (arrows) were observed at distal edge of acini in five caffeine-treated prostate **e)** Others three VP from caffeine-treated animal presented a large glandular area committed by epithelial (arrows) and stromal (asterisks) dysplasia. **f)** Detail of figure **e** showing stromal (st) enlargement and epithelial hyperplasia (arrows) with prominent nucleoli without cellular atypia. **g)** DP from control and **h)** DP from caffeine-treated group. No morphological differences were observed in this lobe between the groups. Scale bars: **a, f, h and i** = 500 μm ; **b, e and g** = 10 μm ; **c** = 250 μm ; **d** = 250 μm .

Fig. 2. Picrosirius-stained sections of control (**a** and **c**) and caffeine-treated (**b** and **d**) prostatic lobes. Ventral (**a-b**) and dorsal (**c-d**) prostates. Overall, caffeine-treated prostates showed no differences in collagen fibers distribution (arrows). Scale bars: 50 μm .

Fig. 3. Representative ventral (VP) and dorsal (DP) prostatic lobe sections from control (CT) and caffeine-treated (CF) group submitted to immunohistochemistry for Ki-67. Note an increased number of Ki-67 positive nuclei (arrows) in caffeine-treated ventral prostates when compared to control prostates. Scale bars: 30 μm .

Fig. 4. Representative ventral (VP) and dorsal (DP) prostatic lobe sections from control (CT) and caffeine-treated (CF) group submitted to TUNEL reaction. The arrows point typical apoptotic epithelial cells positively stained and used to determine TUNEL index. Scale bars: 10 μm .

Fig. 5. Bar graphs for proliferation and apoptotic indexes of ventral and dorsal prostatic lobe epithelial cells from control (CT) and caffeine-treated (CF) animals. a) The proliferation index was significantly higher in the ventral prostatic lobe from the CF group. b) No significantly difference in the prostatic lobe epithelial cell apoptotic index were found between the groups. Results are expressed as mean \pm SD. * indicate $P < 0.05$ when compared to CT group.

Fig. 6. A) Representative western blotting for PAR-4, PCNA and beta-actin expression in the rat ventral (VP) and dorsal (DP) prostatic lobe from control (CT) and caffeine-treated animals (CF). B) Densitometric analysis of PAR-4 band showing no differences between the groups in the both

prostatic lobes. C) Densitometric analysis of PCNA band showing a significant higher expression only in the ventral prostatic lobe from CF group. Results are expressed as mean \pm SD.

* indicates significantly different with $P < 0.05$.

Fig. 7. Immunohistochemistry for the androgen receptor in control (**a** and **c**) and caffeine-treated (**b** and **d**) prostates. Ventral (**a-b**) and dorsal (**c-d**) prostatic lobes. Note a higher intensity of positive staining in the nuclei (arrows) in the VP from caffeine-treated group compared to VP from control group. Scale bars: 30 μ m.

Table 1. Caffeine effects on biometric parameters of the animals and prostatic lobes

Parameters	Experimental groups	
	CT	CF
Body weight (g)	487.95 ± 36.65	518.06 ± 49.99
Testosterone (ng/mL)	1.34 ± 0.72	2.26 ± 0.44 *
Dihydrotestosterone (ng/mL)	0.21 ± 0.03	0,33 ± 0,08 *
Water intake (ml/day)	39.38 ± 6.78	42.15 ± 6.57
Absolute weight (g)	0.57 ± 0.09	0.71 ± 0.09 *
VP Relative weight	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.02 *
Epithelium height (µm)	26.06 ± 2.85	24.39 ± 3.95 *
Collagen fibers	5.37 ± 1.85	6.06 ± 2.26
DLP Absolute weight (g)	0.46 ± 0.10	0.50 ± 0.09
Relative weight	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02
Epithelium height (µm)	14.10 ± 2.73	12.67 ± 2.76
DP Collagen fibers	4.94 ± 2.5	4.66 ± 0.77

Statistical analyses based on t-Student test. Values represent mean ± SD. Control group, (CT); Caffeine-treated group, (CF); VP, ventral prostatic lobe; DLP, dorsolateral prostatic lobe; DP, dorsal prostatic lobe.

Figure 1

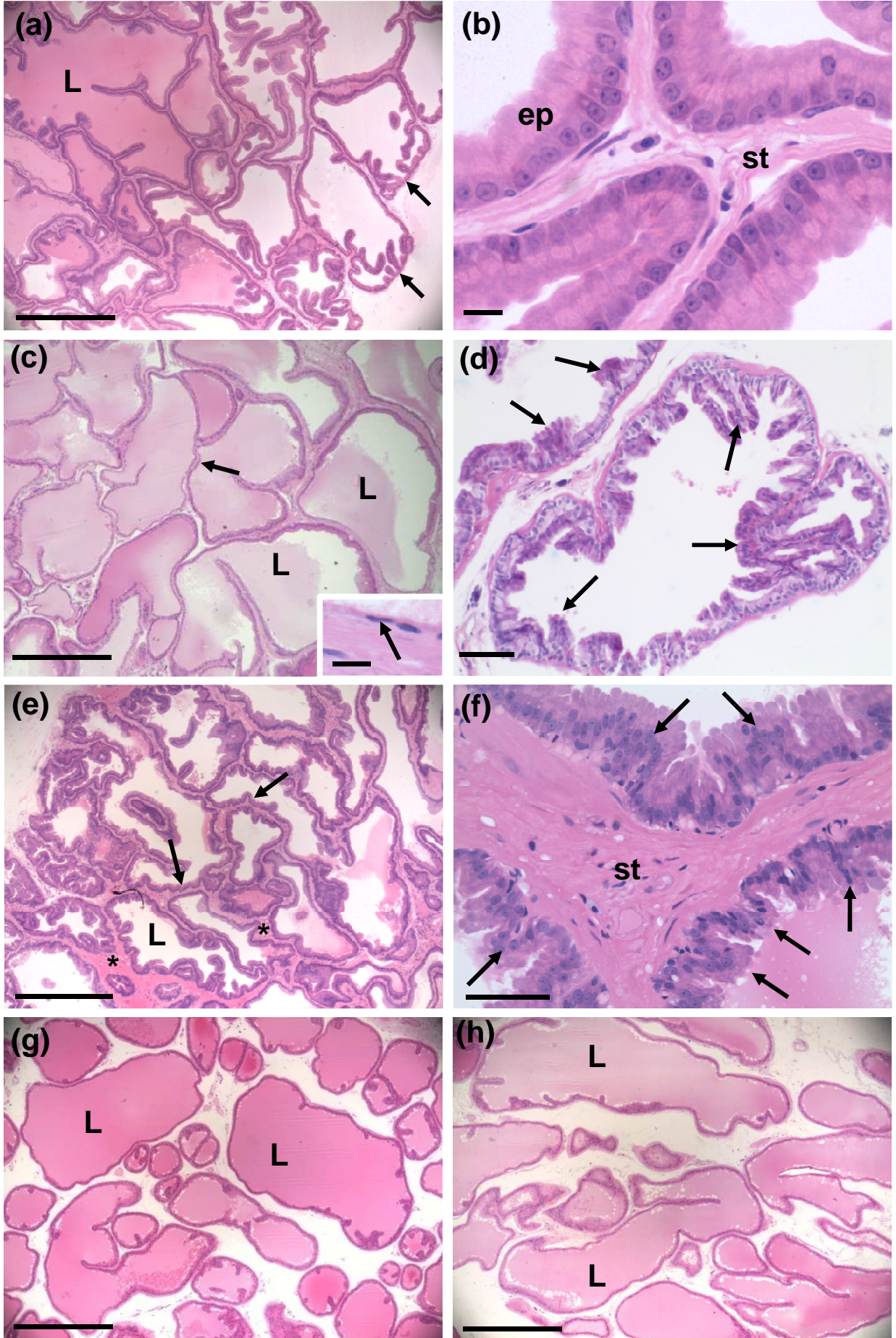


Figure 2

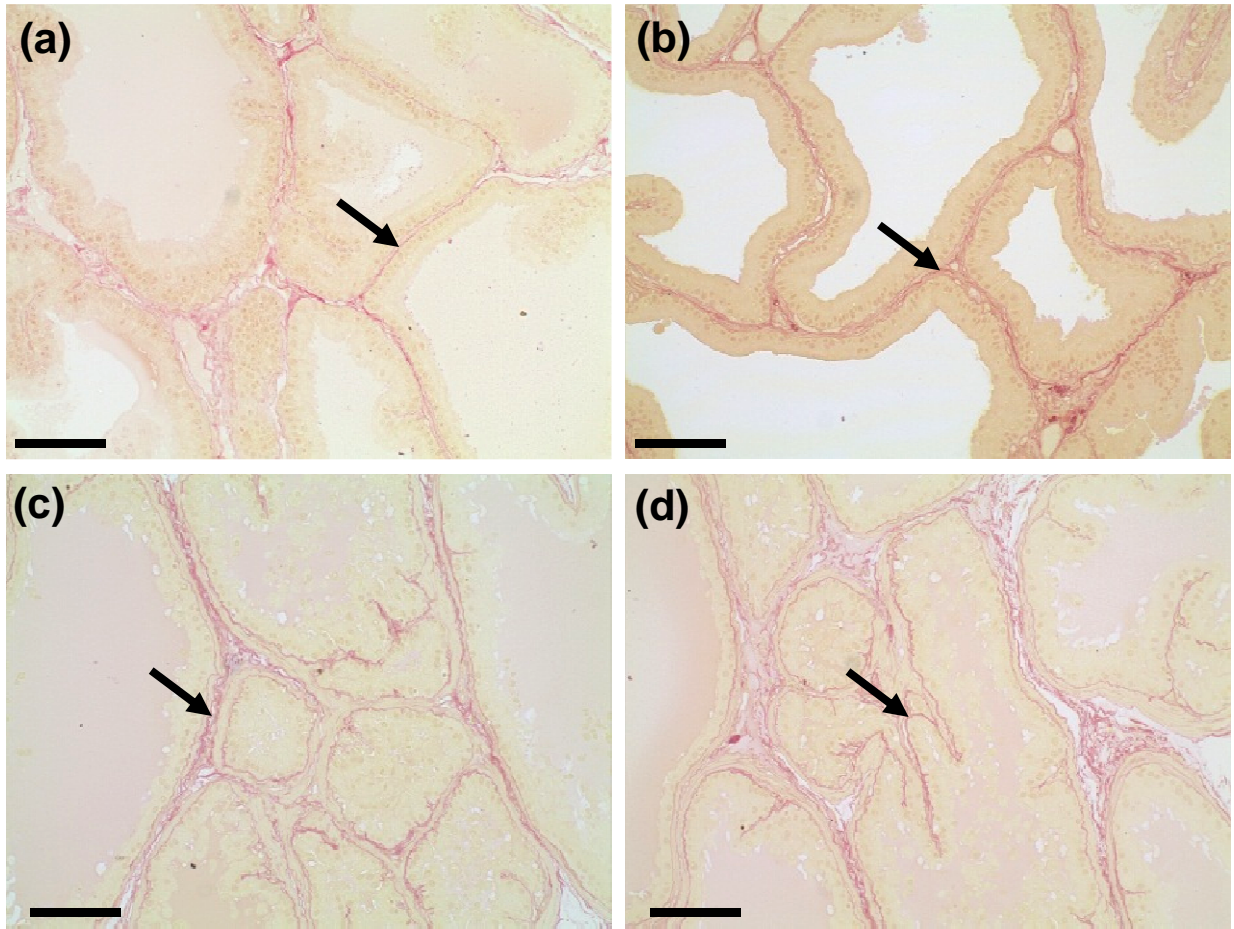


Figure 3

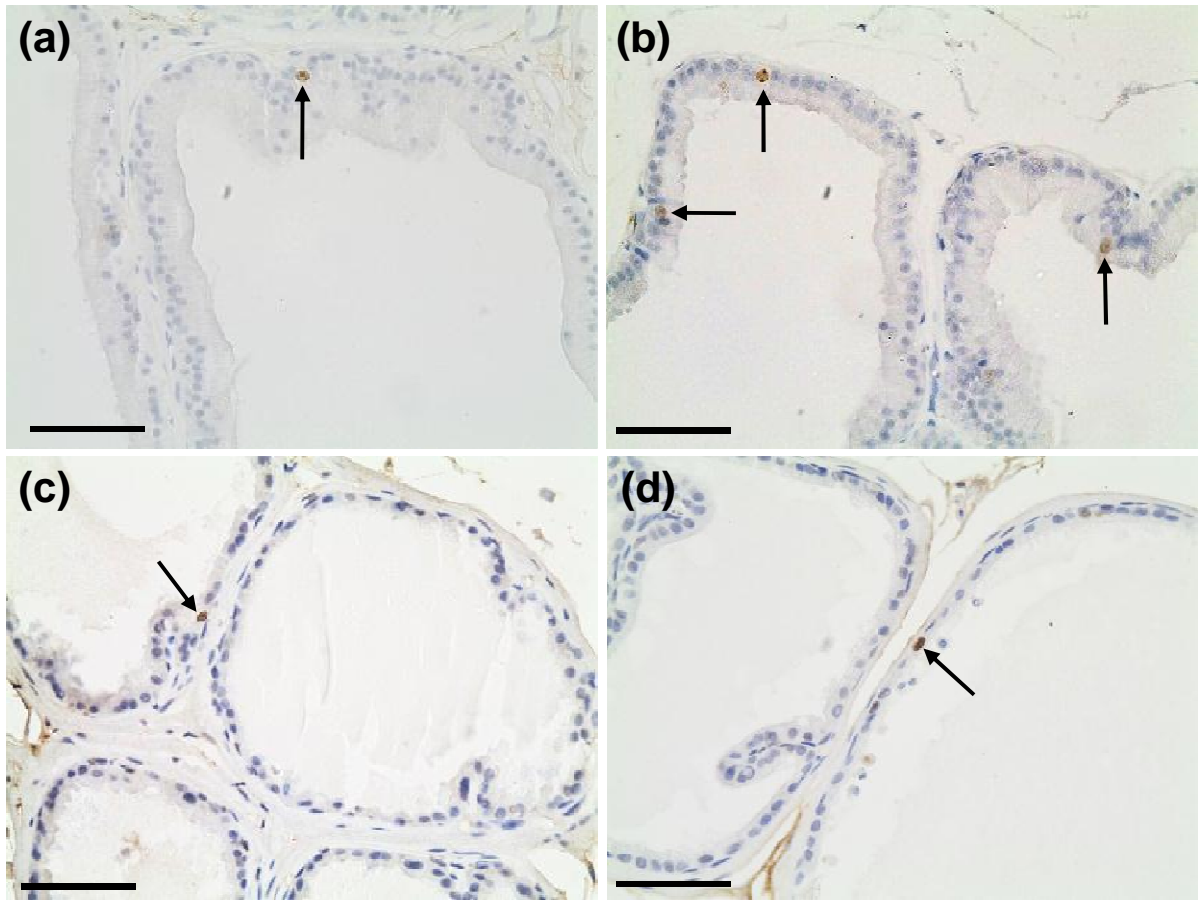


Figure 4

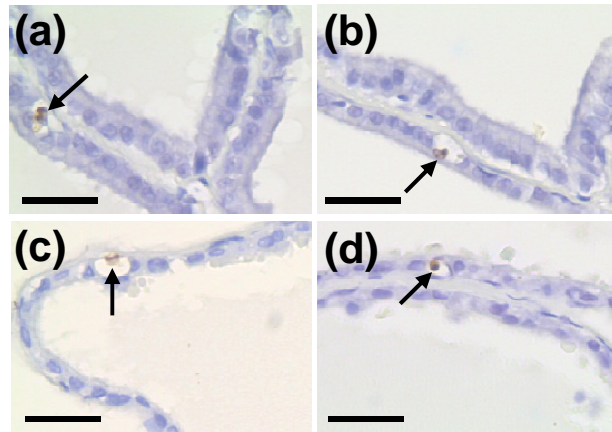


Figure 5

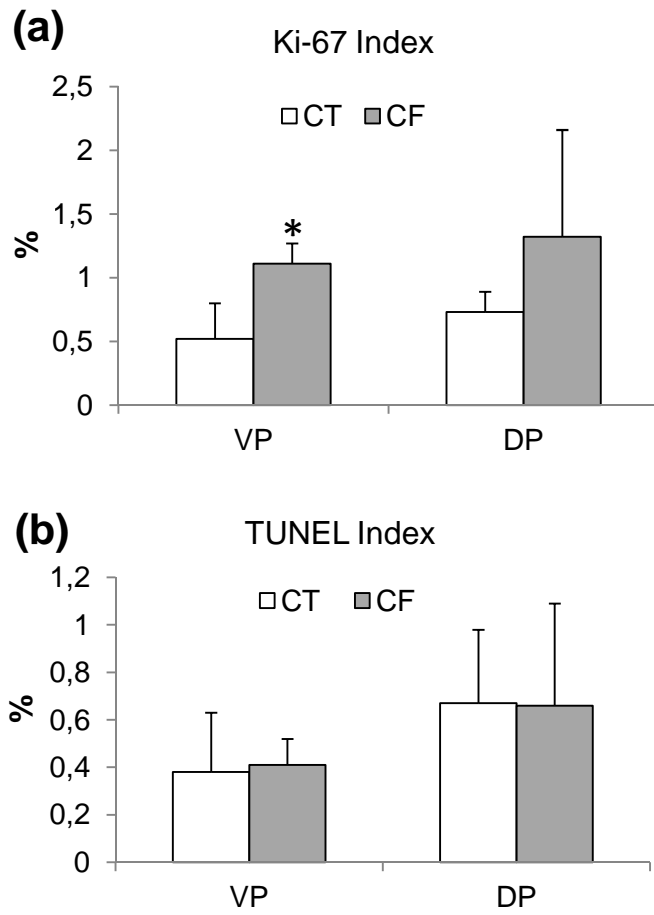
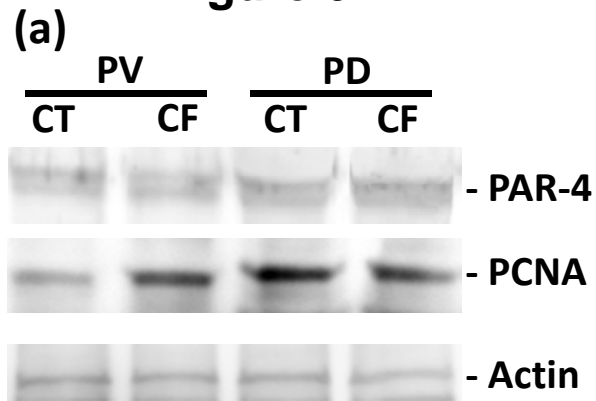
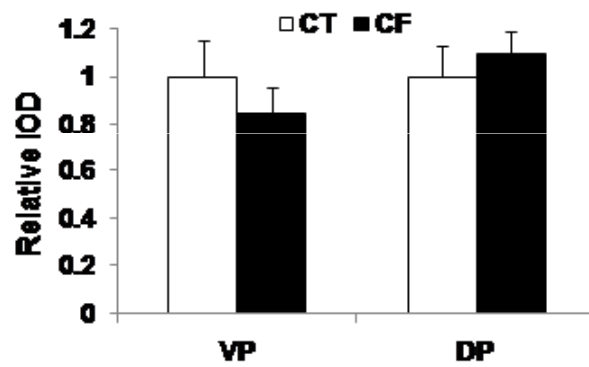


Figure 6



(b) Quantification PAR-4 expression



(c) Quantification of PCNA expression

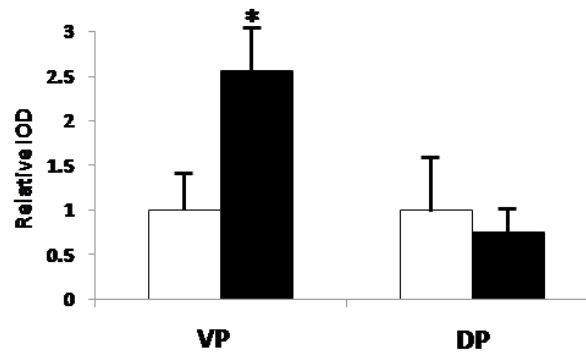
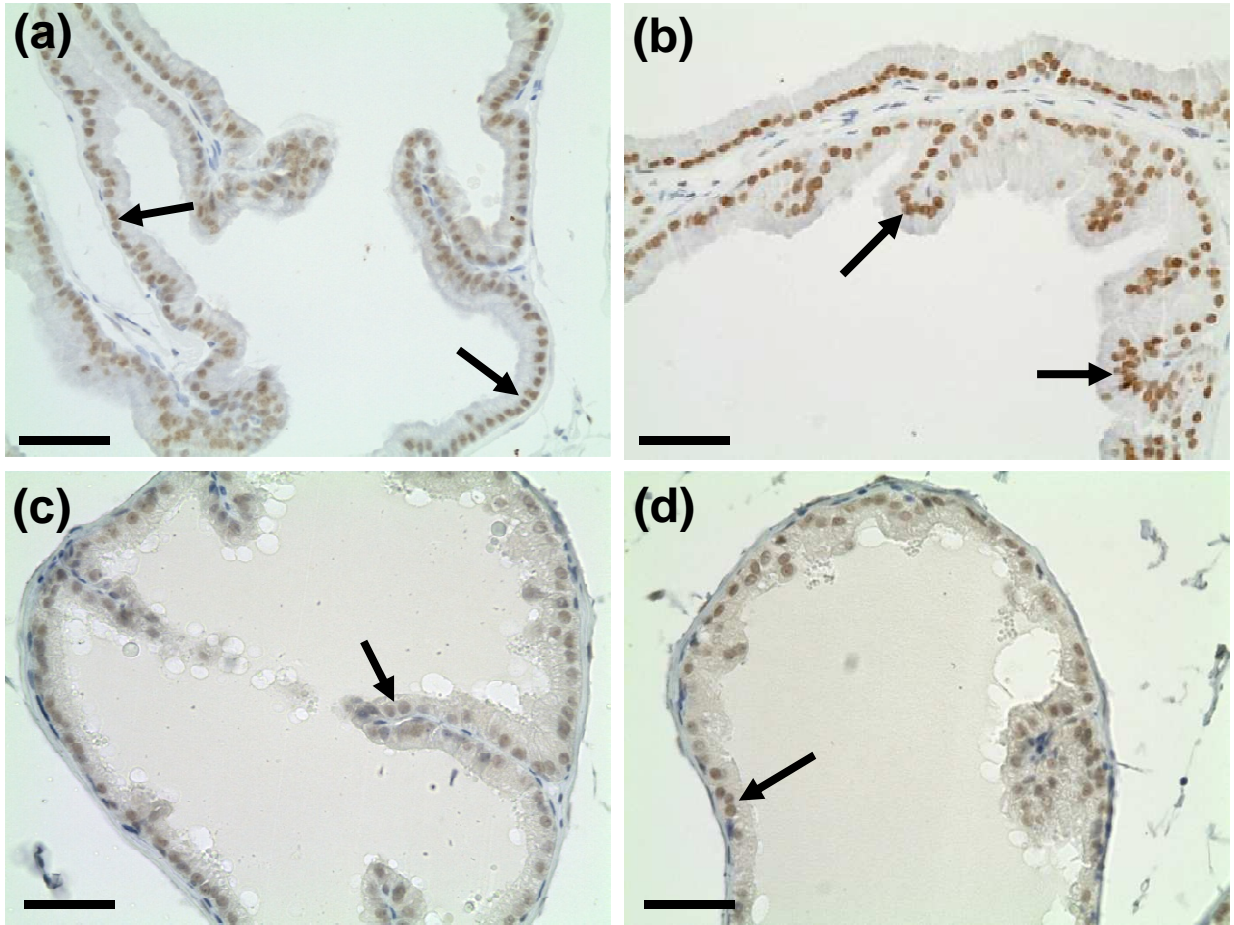


Figure 7



**Efeitos da injeção crônica de cádmio e/ou cafeína sobre
a expressão proteica da beta-catenina, GST-P e AMACRacemase
na próstata ventral de rato**

Carolina Sarobo, Livia M. Lacorte, Jaqueline C. Rinaldi, Ivan J. Vechetti Junior, Andrei
Moroz, Wellerson R. Scarano, Flavia K. Delella, Sérgio L. Felisbino.

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), IB, Departamento de Morfologia, Botucatu,
SP, Brasil

Título curto: Efeito do cádmio e da cafeína sobre a próstata

Palavras chave: cádmio, cafeína; próstata; GST-P, beta catenina, Racemase;

Correspondence to: Dr Sérgio L. Felisbino, Departamento de Morfologia, Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18.618-970, Botucatu, SP,
Brazil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3811 6264

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

This research was supported by FAPESP, CNPq, CAPES and FUNDUNESP.

RESUMO

O consumo de café e de cafeína, seu principal componente, tem sido associado com reduzido risco de desenvolvimento de câncer, incluindo câncer de próstata. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão crônica de cafeína sobre os efeitos carcinogênicos do cádmio na próstata ventral do rato Wistar. Para isso, os animais foram tratados a partir da 5 semana pós-natal com diferentes combinações de cafeína (20 ppm) e cádmio (15 ppm) diluídos na água de beber por 20 semanas. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e as próstatas ventrais removidas e processadas por análises histopatológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas de western blotting para as proteínas beta-catenina, glutathione-sulfo-transferase tipo placentária (GST-P), alpha-metilacil-racemase (AMACR), Bcl-2, p53, ciclooxigenase-2 (COX-2). Os resultados histopatológicos mostraram que as próstatas ventrais dos diferentes grupos experimentais tratados por cádmio e/ou cafeína desenvolveram na maior parte dos alvéolos lesões hiperplásicas focais. Não foram detectadas marcações positivas para as proteínas BCL-2, p53, e COX-2. Já a expressão das proteínas GST-P, beta-catenina e AMACR apresentaram aumento de expressão nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Os resultados mostram que a cafeína não teve efeito preventivo sobre as lesões proliferativas induzidas pelo cádmio, ao contrário, a cafeína pode ser um agente indutor de lesões proliferativas hiperplásicas e um agente promotor sobre as lesões induzidas pelo cádmio. Futuros estudos deverão avaliar se a mais longo prazo estas lesões hiperplásicas podem evoluir ou não para lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o câncer mais diagnosticado e o segundo de maior mortalidade entre os homens na América e nos países da Europa Ocidental (Jemal et al., 2011; INCA, 2012). As taxas de incidência desse tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos comparadas aos países em desenvolvimento. Os valores crescentes das taxas de incidência do CaP ao longo dos anos pode ser decorrente do aumento na expectativa de vida da população, da evolução dos métodos diagnósticos e da melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país. Apesar dos inúmeros estudos, a etiologia do câncer de próstata no homem é complexa e pode incluir idade, etnia, estilo de vida, fatores ambientais e genéticos, entre outros.

Estudos epidemiológicos e experimentais associam a exposição ao cádmio (Cd) com o surgimento de lesões proliferativas prostáticas em humanos e roedores (Waalkes et al. 1989; Goyer et al. 2004; Arriazu et al., 2006; Vinceti et al. 2007), desta forma, o Cd é classificado como um carcinógeno humano pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993). A meia vida do metal no organismo humano é de 15 anos (Kjellström & Nordberg, 1978) e superior a 200 dias em ratos (Web, 1975). Devido à baixa taxa de excreção (~ 0.001%/dia) o Cd é acumulado no organismo (Satarug & Moore, 2004), e a próstata é um dos órgãos com alta bioacumulação deste metal (0.45–28 μM) (Lindegard et al., 1990; Achanzar et al., 2001; Lacorte et al., 2011). Pacientes com câncer de próstata demonstraram ter níveis mais altos do metal na próstata e na circulação (Brys et al., 1997).

Sabe-se que o Cd induz aumento na atividade proliferativa das células epiteliais (Waalkes, 2000; Arriazu et al., 2006; Bakshi et al., 2008) e induz às células a adquirem caráter maligno, tornando-se resistentes à apoptose via super-expressão do gene Bcl-2 e da sua proteína (Qu et al., 2007; Arriazu et al., 2006).

Em estudo anterior, nosso laboratório demonstrou que o cádmio administrado por 30 dias em ratos durante a puberdade aumentou o nível do Cd acumulado na próstata, bem como aumento da expressão proteica de receptores de andrógeno, do índice de proliferação celular e lesões hiperplásicas atípicas (Lacorte et al., 2011).

Devido a sua incidência crescente e alta taxa de mortalidade, a busca de compostos com atividade protetora contra o câncer tem despertado grande interesse da comunidade científica. Neste sentido, componentes provenientes da dieta são considerados grandes contribuintes para a promoção do câncer ou para proteção contra o mesmo. Dentre estes, o consumo de café e do seu principal componente, a cafeína, destaca-se por estar presente não só nos hábitos nutricionais como chás, cafés, chocolates, bebidas energéticas, como também em medicamentos da maioria dos segmentos da população.

Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1991) avaliou que o consumo de café e cafeína tem limitados efeitos protetores sobre o desenvolvimento de câncer e um potencial efeito de aumentar o risco de desenvolver câncer de bexiga. Sabe-se que a cafeína estimula a via simpática, e disfunção simpática parece ter efeito de aceleração das mitoses na próstata, sugerindo aumento do risco de desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna pela ingestão de alimentos que contenham cafeína (Yun & Doux, 2006). Além disso, sabe-se que a cafeína pode atuar como um desregulador endócrino pelo fato de alterar os níveis hormonais em homens e mulheres (Pollard 1988; Cellec & Behuliak 2010; Hirose et al. 2010). Por outro lado, uma revisão detalhada sobre os efeitos da cafeína sobre o ciclo celular ainda mostram resultados contraditórios (Bode & Dong, 2007).

Considerando que na puberdade a próstata, apresenta expressivo crescimento glandular por processos proliferativos (Risbridger et al., 2005; Vilamaior et al., 2006), o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da cafeína sobre as lesões proliferativas induzidas pelo cádmio, mais especificamente sobre a expressão de proteínas relacionadas a homeostase glandular e frequentemente alteradas nas lesões neoplásicas, tais como a proteína de adesão celular beta-catenina, a enzima glutationa-sulfo-transferase tipo-placentária (GST-P) relacionada com proteção celular contra danos de estresse oxidativo, a enzima alpha-metil-acil-racemase (AMACR) relacionada com o metabolismo de lipídeos e aumentada nas neoplasias de próstata, a enzima cicloxigenase-2 que esta elevada em condições de resposta inflamatório e que induz aumento de proliferação de células epiteliais na próstata, e as proteínas Bcl-2 e p53 relacionadas com indução de apoptose e aumentadas nas lesões prostáticas proliferativas (Johnson et al., 1998; Makarov et al., 2009; De Nunzio et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 72 ratos *Wistar*, machos pré-puberes (5 semanas), fornecidos pelo Centro Multi-disciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas, CEMIB - UNICAMP. Os animais serão adaptados e mantidos no Biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, em caixas de polietileno, 3 animais por caixa, com substrato de maravalha autoclavadas, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 25°C, sendo fornecido água e ração “*ad libitum*”. Durante o experimento, os

animais passarão por avaliação clínica semanal e serão pesados semanalmente, sendo o consumo de ração e água registrados semanalmente ao longo do experimento.

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (nº 139/09).

Os animais serão divididos aleatoriamente em 6 grupos, os quais receberão pela água de beber cádmio, cafeína ou cádmio + cafeína. Todos os grupos iniciarão o tratamento na fase pré-púbere com 5 semanas de idade (Vilamaior *et al.*, 2006) e serão sacrificados na fase adulta com 25 semanas. Este delineamento experimental está ilustrado na figura 1. O grupo controle (CT) ou GI; O grupo Cádmio (CD) ou GII tem por objetivo avaliar o efeito do cádmio; o grupo GIII tem por objetivo avaliar se as alterações induzidas pelo cádmio até a 15ª semana persistem até a 25ª semana mesmo com a interrupção da exposição; o grupo GIV tem por objetivo avaliar o efeito da cafeína isolada; o grupo GV tem por objetivo avaliar os efeitos de uma exposição simultânea ao cádmio e à cafeína; e, finalmente, o grupo GVI tem por objetivo avaliar os efeitos da exposição à cafeína posterior a exposição ao cádmio. Em relação ao projeto anterior, o tempo (30 dias) de exposição ao cádmio e a cafeína foram aumentados para caracterizar melhor uma exposição crônica.

A dose de cádmio escolhida para ser utilizada neste experimento é de 15 ppm, baseada em dados da literatura (Alvarez *et al.*, 2004), sendo considerada semelhante a uma exposição ambiental. O cádmio será administrado na forma de cloreto de cádmio por via oral dissolvido na água de beber. A dose de cafeína é 20ppm por litro, dissolvida na água de beber. Esta dose, corresponde aproximadamente a uma ingestão diária de 3 mg/kg por dia de cafeína, sendo equivalente a média de ingestão diária de cafeína de

homens por meio do consumo de café, bebidas energéticas ou alimentos cafeinados (Tsuda *et al.* 1999).

Após o período de tratamento, alguns animais serão sacrificados utilizando-se alta dose de pentobarbital sódico, injetado intraperitonealmente e outros serão anestesiados com pentobarbital sódico e será realizada fixação por perfusão. Os pares de lobos prostáticos ventral e dorsal serão removidos, pesados e imediatamente processados.

Os pares dos lobos prostáticos dos diferentes grupos experimentais serão separados em direito e esquerdo e divididos aleatoriamente entre as diferentes metodologias. Neste caso, dos 12 animais de cada grupo experimental serão retirados 12 lobos direito e 12 lobos esquerdo. Destes 24 lobos: 6 lobos serão processados inclusão em parafina para as análises imunocitoquímicas, 6 lobos serão processados para microscopia eletrônica de transmissão e para inclusão em historesina para as análises morfométricas, 6 lobos serão processados para as análises bioquímicas de western blotting e zimografia e cortes congelados e 6 lobos serão processados para quantificação espectrofométrica do conteúdo de cádmio.

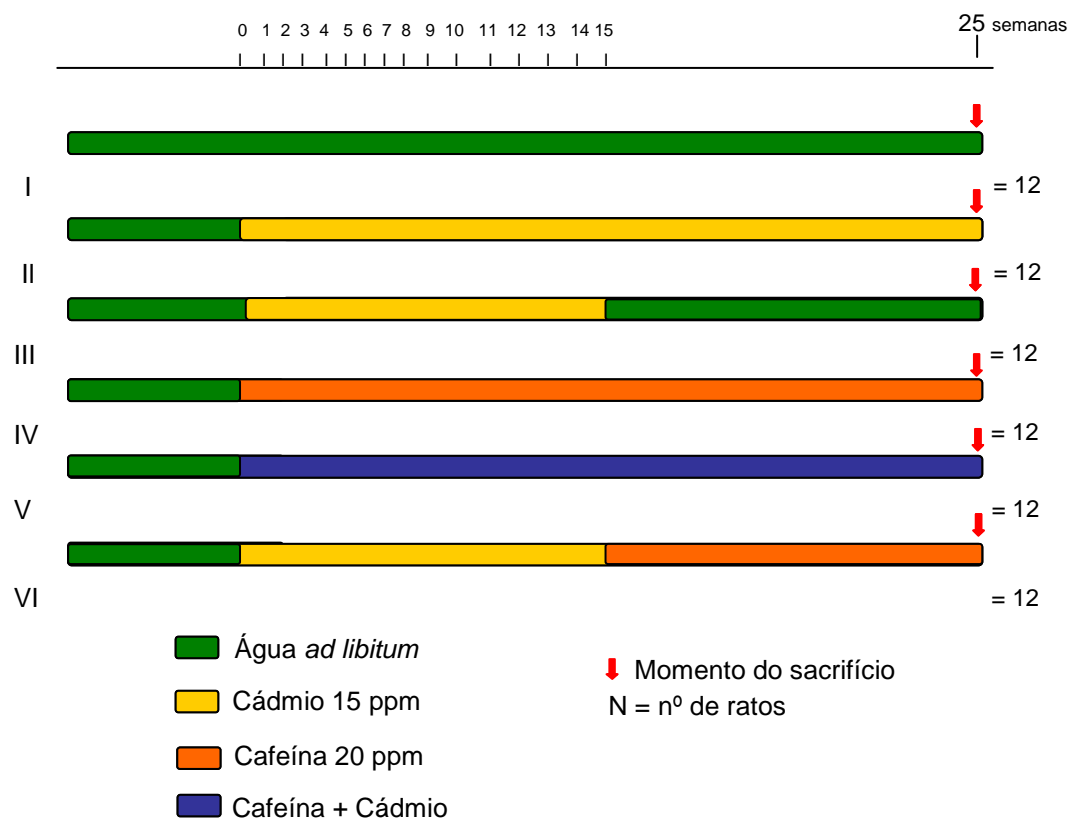


Figura 1. Diagrama esquemático mostrando os diferentes grupos experimentais, os diferentes tratamentos e períodos de tratamentos e o momento do sacrifício.

Obtenção de cortes em Paraplast

Seis lobos prostáticos ventrais e dorsais de rato submetidos à perfusão serão pós-fixados em paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 24 horas. Após a fixação, o material será desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5 μ m serão produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso. Paralelamente, outros seis fragmentos de lobos prostáticos ventrais e dorsais serão desidratados em série crescente de etanóis e incluídos em resina metil-metacrilato (Historesin - Leica). Cortes de 3 μ m serão produzidos em microtomo rotativo motorizado, coletados em lâminas e armazenados até o momento de uso.

Análise histopatológica

Cortes em Paraplast e resina serão corados pela hematoxilina e eosina para a realização da análise geral da estrutura glandular. O critério morfológico utilizado para identificar as lesões displásicas foi: (a) aumento do epitélio de revestimento das estruturas túbulo-alveolares comumente associado com pseudo-estratificação dos núcleos; (b) aumento da aparência basofílica do epitélio devido ao acúmulo de núcleos; (c) pleomorfismo nuclear; (d) núcleos com nucléolos evidentes e de tamanho aumentado; (e) padrão cribiforme, com estratificação do epitélio e formação de arcos e pontes epiteliais. Quando três ou mais destes critérios foram encontrados em uma mesma área epitelial foi considerada a presença de displasia epitelial (Arriazu *et al.*, 2006). Como critério para caracterizar prostatite crônica foi considerado a presença de células inflamatórias, tais como linfócitos, plasmócitos e macrófagos no espaço estromal ao redor das porções glandulares e para prostatite aguda a presença de neutrófilos no interior das glândulas, entre as células epiteliais e no espaço estromal, de acordo com Shappell *et al.* (2004).

Os cortes serão observados em luz normal em microscópio Leica DMLB e as imagens serão digitalizadas em analisador de imagens no software Leica Q-win versão 3.1 para WindowsTM.

Imunocitoquímica

Cortes em Paraplast (com recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 em microondas ou panela de pressão) ou cortes congelados foram mergulhados em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e embebidos em solução contendo 3% de albumina de soro bovino

para o bloqueio das interações proteína-proteína não-específicas. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário contra Bcl-2, p53, GST-P, Cox-2, Beta-Catenina e AMACRacemase. Os anticorpos foram adquiridos comercialmente de procedência norte americana, fornecidos pelas empresas Santa Cruz Biotechnology, Calbiochem, Sigma, Chemicom e ABCAM. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou de cabra, marcado com peroxidase. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina e os cortes serão contra-corados com hematoxilina. Os resultados foram analisados ao microscópio e fotodocumentados.

Western blotting

A expressão das proteínas Bcl-2, p53, GST-P, Cox-2, Beta-catenina e AMACRacemase na próstata ventral dos diferentes grupos experimentais foram analisadas por western blotting.

Amostras da extração dos tecidos (70µg de proteínas) foram submetidas à eletroforese, sob condições redutoras, em gel de poliacrilamida a 8%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBS-Tween por 1h e então serão incubadas por 12 horas a 4° C com o mesmo anticorpo primário utilizado na reação imunocitoquímica. Os procedimentos de bloqueio, incubação e revelação seguirão as mesmas metodologias utilizadas nas reações imunocitoquímicas, apenas a albumina bovina foi substituída por leite em pó desnatado. O peso molecular relativo das bandas será determinado de acordo com o padrão de peso molecular pré-corado, que foi colocado na eletroforese. As reações foram reveladas por kit ECL em câmara escura e

as imagens fluorescentes das bandas foram capturadas por câmera CCD (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare). Posteriormente, foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas em Software livre Image-J e os valores de IOD analisados estatisticamente. Os valores foram normalizados com os valores das bandas da proteína endógena Beta-actina para os seus respectivos estratos.

Análises estatísticas

Para análise dos dados numéricos obtidos será utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tuckey-Kramer ou o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas serão realizadas no programa Instat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Histopatologia

As próstatas ventrais dos animais controle apresentavam estruturas glandulares bem regulares e revestidas por um epitélio cilíndrico simples secretor circundado por um estroma fibro-muscular fino (figura 1a). Nas próstatas ventrais, dos animais dos diferentes grupos experimentais, algumas alterações morfológicas foram observadas tais como redução da altura das células epiteliais, irregularidades no formato dos túbulos e alvéolos, espessamento do estroma e aumento do número de células epiteliais no epitélio (figura 1b-f). Além disso, as próstatas dos animais dos grupos CF, CD, CD+CF e CD-CF apresentaram pelo menos um foco de epitélio hiperplásico em 50% das amostras (Figura 1-b-f). Também foram observados focos de infiltrado inflamatório no

estroma das próstatas de animais do grupo experimental cádmio seguido de água (figura 1D).

Expressão da protein Beta-Catenina

A avaliação da expressão tecidual da proteína beta-catenina por imunohistoquímica mostrou marcação positiva nas laterais das células epiteliais secretoras em todos os grupos estudados, sem diferenças significativas de intensidade de reação entre os grupos (Figura 2). No grupo CF, algumas áreas epiteliais mostram marcação mais fraca em relação ao restante do epitélio (Figura 2B). A avaliação da expressão de beta-catenina por western blotting mostrou um aumento na expressão desta proteína nos grupos experimentais tratados por cafeína e cádmio, mas principalmente cádmio (Figura 2G-H).

Expressão da protein GST-P

A avaliação da expressão tecidual da enzima GST-P por imunohistoquímica mostrou forte marcação positiva citoplasmática nas células epiteliais basais e fraca marcação nas células epiteliais secretoras do grupo controle (Figura 3A). Nos grupos experimentais, a marcação para esta enzima se mostrou forte no citoplasma das células epiteliais basais e também nas células epiteliais secretoras (Figura 3B-F). A avaliação da expressão de GST-P por western blotting mostrou um aumento na expressão desta proteína nos grupos experimentais tratados por cafeína e/ou cádmio, mas principalmente cádmio seguido de cafeína (Figura 3G-H).

Expressão da enzima AMACR

A avaliação da expressão tecidual da enzima α -metilacil coenzima-A racemase (AMACR) por imunohistoquímica mostrou fraca marcação positiva citoplasmática nas células epiteliais secretoras do grupo controle (Figura 4A). Nos grupos experimentais, a marcação para esta enzima se mostrou aumentada no citoplasma das células epiteliais secretoras (Figura 4B-F). A avaliação da expressão de AMACR por western blotting mostrou um aumento na expressão desta proteína nos grupos experimentais tratados por cafeína e/ou cádmio, mas principalmente cádmio seguido por cafeína (Figura 4G-H).

A expressão tecidual das proteínas beta-catenina, GST-P e AMACR, não apresentou diferenças significativas entre áreas normais e áreas hiperplásicas, não sendo capaz de identificar diferentemente estas duas áreas.

Expressão das proteínas Bcl-2, p53 e COX-2

Os testes imunohistoquímicos e de western blotting para as proteínas Bcl-2, COX-2 and p53 não mostraram marcação positiva em nenhum dos grupos estudados (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O cádmio é considerado um agente químico carcinogênico para a próstata (IARC, 1993). Entretanto, estudos experimentais em roedores têm mostrado que o tempo de exposição, a dose, linhagem dos animais, bem como os lobos prostáticos são fatores importantes fatores de variabilidade para o desenvolvimento de lesões proliferativas nestes animais (Waalkes, 2000).

Por outro lado, os efeitos da cafeína, principal componente do café e outras bebidas e alimentos, ainda são controversos, não sendo ainda bem estabelecido se a ingestão regular de cafeína tem associação com menor o maior desenvolvimento de

câncer em humanos ou animais de experimentação (Nkondjock, 2008). Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Cancer (IARC, 1991), existem pequenas evidências de que a cafeína aumente o risco de desenvolver câncer de bexiga, enquanto que para a próstata as evidências não são insuficientes para afirmar qualquer efeito.

Neste sentido, nosso estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos de uma ingestão crônica de cafeína sobre os conhecidos efeitos adversos do cádmio na próstata ventral de rato. Os resultados do presente estudo demonstram que a cafeína não alterou o padrão de alterações histopatológicas na próstata induzidas pela ingestão crônica de cádmio. Além disso, a ingestão de cafeína também não alterou o padrão de expressão dos marcadores celulares, beta-catenina, GST-P e AMACR, alterados pelo cádmio na próstata ventral do rato.

Em nosso estudo, o cádmio induziu lesões proliferativas classificadas como hiperplasia, focais ou difusas, pois não foram encontradas atipias celulares (estratificações, perda de polaridade celular, aumento da área nuclear) características de lesões pré-neoplásicas na próstata. Notavelmente, a ingestão de cafeína também induziu lesões hiperplásicas nas próstatas ventrais. Desta forma, alguns marcadores celulares de lesões neoplásicas não apresentaram expressão tecidual, tais como Bcl-2, p53 e COX-2. Por outro lado, outras proteínas que estão comumente alteradas neoplásicas de próstata e outros órgãos, tais como beta-catenina, GST-P e AMACR, apresentaram suas expressões teciduais alteradas, em geral aumentadas, nas próstata dos animais tratados por cádmio e/ou cafeína, isolados ou combinados. Entretanto, a expressão destas três proteínas apareceu aumentada no tecido prostático em geral, não ocorrendo diferenças de expressão entre as áreas normais e áreas hiperplásicas de um mesmo animal, portanto, não sendo bons marcadores teciduais de lesões proliferativas na próstata de rato.

Juntos, estes resultados sugerem que, nestas condições experimentais, a cafeína não apresentou efeitos protetores sobre os efeitos adversos do cádmio na próstata, apresentado ela mesma efeito adverso de induzir hiperplasia na próstata. Entretanto, mais estudos e em mais longo prazo são necessários para avaliar se estas lesões hiperplásicas podem ou não evoluir para lesões pré-neoplásicas e neoplásicas na próstata.

REFERÊNCIAS

- Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP. Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 2001;61:455-8.
- Alvarez SM, Gomez NN, Scardapane L, Zirulnik F, Martinez D, Gimenez MS. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. *Toxicol Lett.* 2004;153:365-76.
- Arriazu R, Pozuelo JM, Henriques-Gil N, Perucho T, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Immunohistochemical study of cell proliferation, Bcl-2, p53, and caspase-3 expression on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the ventral rat prostate. *J Histochem Cytochem.* 2006;54:981-90.
- Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RYS, Sartor MA, Medvedovic M, Ho I S. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. *Envir Health Persp.* 2008;116:769-76.
- Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* 2007;247:26-39.
- Brys M, Nawrocka AD, Miekos E, Zydek C, Foksinski M, Barecki A, Krajewska WM. Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms. *Biol Trace Elem Res.* 1997;59:145-52.
- Celec P, Behuliak M. Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. *J Psychopharmacol.* 2010;24:1569-72.

- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011;60:106-17.
- Goyer RA, Liu J, Waalkes MP. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals.* 2004;17:555-8.
- Hirose K, Niwa Y, Wakai K, Matsuo K, Nakanishi T, Tajima K. Coffee consumption and the risk of endometrial cancer: Evidence from a case-control study of female hormone-related cancers in Japan. *Cancer Sci.* 2007;98:411-5.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. Volume 51 coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal [monografia da internet]. Lyon, 1991 [atualizada em 1997 Nov 11; acesso em 2012 Apr 01]. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol51/volume51.pdf
- IARC – International Agency for Research on Cancer. Volume 58 beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry [monografia da internet]. Lyon, 1993 [atualizada em 1997 Aug 22; acesso em 2012 Mar 28]. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/volume58.pdf.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage da internet]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; c2006-2012 [acesso em 2012 Apr 01]. Câncer de próstata; [aproximadamente 01 tela]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.
- Jarup P, Berglund J, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Environ Health.* 1998;24:1-51.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
- Johnson MI, Robinson MC, Marsh C, Robson CN, Neal CN, Hamdy FC. Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Localized Prostate Cancer: Relationship With Apoptosis and Proliferation. *The Prostate* 1998;37:223–9.
- Kjellström T, Nordberg GF. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ Res.* 1978;16:248-69.
- Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin Jr LA, Godinho AF, Almeida AA, Felipe Pinheiro PF, Amorim RL, Felisbino SL. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. *Microsc Res.Tech.* 2011;74:988-997.

- Lindegaard PM, Hansen SO, Christensen JE, Andersen BB, Andersen O. The distribution of cadmium within the human prostate. *Biol Trace Elem Res.* 1990;25:97-104.
- Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, and Partin AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:139-51.
- Nkondjock A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett.* 2009;277:121-125.
- Nordberg M. Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res.* 1978;15:381-404.
- Pollard I. Increases in plasma concentrations of steroids in the rat after the administration of caffeine: comparison with plasma disposition of caffeine. *J Endocrinol.* 1988;119:275-80.
- Qu W, Ke H, Pi J, Broderick D, French JE, Webber MM, Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. *Environ Health Perspec.* 2007;115:1094-100.
- Satarug S, Moore MR. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspec.* 2004;112:1099-103.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the mouse models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 2004;64:2270-305.
- Tsuda H, Sekine K, Uehara N, Takasuka N, Moore MA, Konno Y, Nakashita K, Degawa M. Heterocyclic amine mixture carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats. *Cancer Lett.* 1999;143:229-34.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288:885-92.
- Vinceti M, Venturelli M, Sighinolfi C, Trerotoli P, Bonvicini F, Ferrari A, Bianchi G, Serio G, Bergomi M, Vivoli G. Case-control study of toenail cadmium and prostate cancer risk in Italy. *Sci Total Environ.* 2007;373:77-81.

Waalkes MP, Rehm S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE, Poirier LA. Cadmium carcinogenesis in male Wistar rats: dose-response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.* 1989;49:4282-8.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.* 2000; 79:241-4.

Webb, M. Cadmium. *Br Med Bull.* 1975;31:246-50.

Yun AJ, Doux JD. Opening the floodgates: benign prostatic hyperplasia may represent another disease in the compendium of ailments caused by the global sympathetic bias that emerges with aging. *Med Hypotheses.* 2006;67:392-4.

Legenda das figuras

Figura 1. Aspectos morfológicos da prostate ventral de rato corada em HE dos diferentes grupos experimentais. Grupo Controle (A); Grupo cafeína (B); Grupo cádmio (C); Grupo cádmio seguido de água (D); Grupo cádmio mais cafeína (E); Grupo cádmio seguido de cafeína (F). **A)** As próstatas ventrais dos animais controle apresentavam estruturas glandulares bem regulares e revestidas por um epitélio cilíndrico simples secretor uniforme (seta). **B-F)** Nas próstatas ventrais, dos animais dos diferentes grupos experimentais, algumas alterações morfológicas foram observadas, tais como redução da altura das células epiteliais, irregularidades no formato dos túbulos e alvéolos e focos de epitélio hiperplásico (setas). Na figura **D**, os asteriscos apontam para focos de infiltrado inflamatório no estroma. Bars: 50 µm.

Figura 2. Análise da expressão da proteína beta-catenina por imunohistoquímica e western blotting nos diferentes grupos experimentais. A) Controle (CT); B) Cafeína (CF); C) Cádmio (CD); D) Cádmio 10 semanas seguido de água sem cádmio por 10 semanas (CD – Água); E) Cádmio e Cafeína (CD + CF); F) Cádmio 10 semanas seguido de Cafeína por 10 semanas (CD – CF). A reação imunohistoquímica mostrou marcação positiva nas laterais das células epiteliais secretoras (setas). As setas na figura B mostram áreas epiteliais com marcação positiva forte e enfraquecida nas próstatas deste grupo. G) Western Blotting representativo dos diferentes grupos: linha 1 = CT; linha 2 = CF; Linha 3 = CD; linha 4 = CD – Água; linha 5 = CD + CF; linha 6 = CD – CF; As bandas mostram a identificação da proteína beta-catenina e da proteína beta-actina nos estratos dos diferentes grupos. H) Análise densitométrica das bandas de beta-

catenina e normalizadas pelos valores da beta-actina mostrando aumento da expressão desta proteína em todos os grupos experimentais, principalmente nos grupos tratados pelo cádmio.

Figura 3. Análise da expressão da proteína GST-P por imunohistoquímica e western blotting nos diferentes grupos experimentais. A) Controle (CT); B) Cafeína (CF); C) Cádmio (CD); D) Cádmio 10 semanas seguido de água sem cádmio por 10 semanas (CD – Água); E) Cádmio e Cafeína (CD + CF); F) Cádmio 10 semanas seguido de Cafeína por 10 semanas (CD – CF). A reação imunohistoquímica mostrou marcação positiva nas células epiteliais basais do grupo controle e nas células basais e secretoras dos grupos experimentais (setas). G) Western Blotting representativo dos diferentes grupos: linha 1 = CT; linha 2 = CF; Linha 3 = CD; linha 4 = CD – Água; linha 5 = CD + CF; linha 6 = CD – CF; As bandas mostram a identificação da proteína GST-P e da proteína beta-actina nos estratos dos diferentes grupos. H) Análise densitométrica das bandas de GST-P e normalizadas pelos valores da beta-actina mostrando aumento da expressão desta proteína em todos os grupos experimentais, mas principalmente no grupo tratado por cádmio seguido de cafeína.

Figura 4. Análise da expressão da enzima AMACR por imunohistoquímica e western blotting nos diferentes grupos experimentais. A) Controle (CT); B) Cafeína (CF); C) Cádmio (CD); D) Cádmio 10 semanas seguido de água sem cádmio por 10 semanas (CD – Água); E) Cádmio e Cafeína (CD + CF); F) Cádmio 10 semanas seguido de Cafeína por 10 semanas (CD – CF). A reação imunohistoquímica mostrou fraca marcação positiva células epiteliais secretoras do grupo controle e marcação aumentada nas células epiteliais secretoras dos demais grupos experimentais (setas). G) Western Blotting representativo dos diferentes grupos: linha 1 = CT; linha 2 = CF; Linha 3 = CD; linha 4 = CD – Água; linha 5 = CD + CF; linha 6 = CD – CF; As bandas mostram a identificação da proteína AMACR e da proteína beta-actina nos estratos dos diferentes grupos. H) Análise densitométrica das bandas de AMACR e normalizadas pelos valores da beta-actina mostrando aumento da expressão desta proteína em todos os grupos experimentais, mas principalmente no grupo cádmio seguido de cafeína.

Figura 1

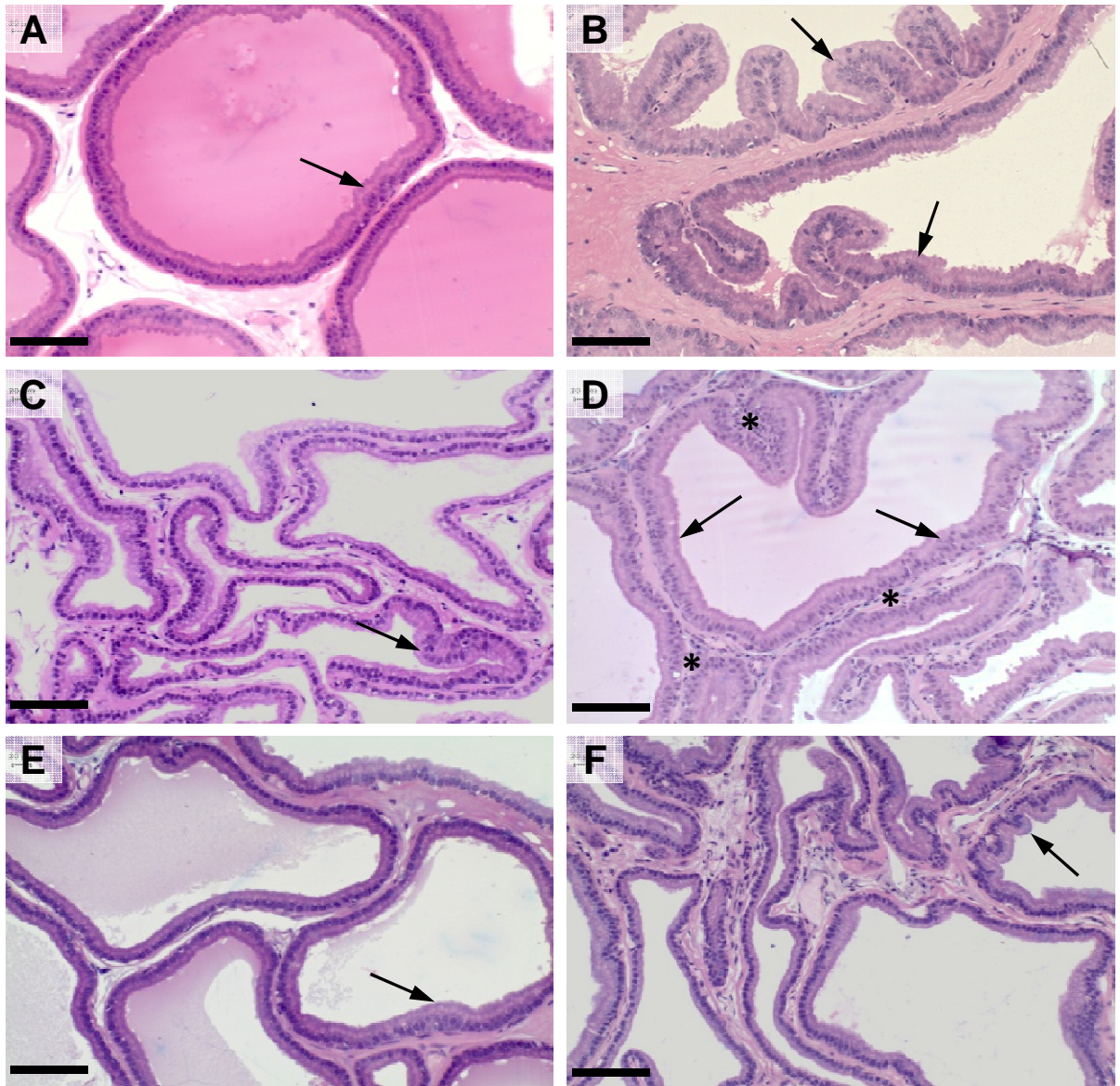


Figura 2 – Beta-Catenina

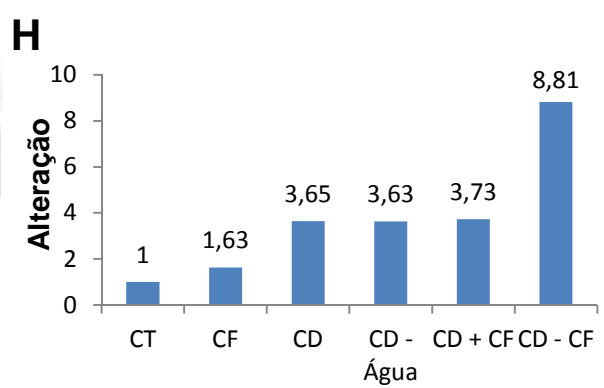
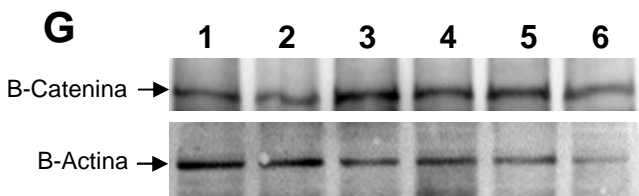
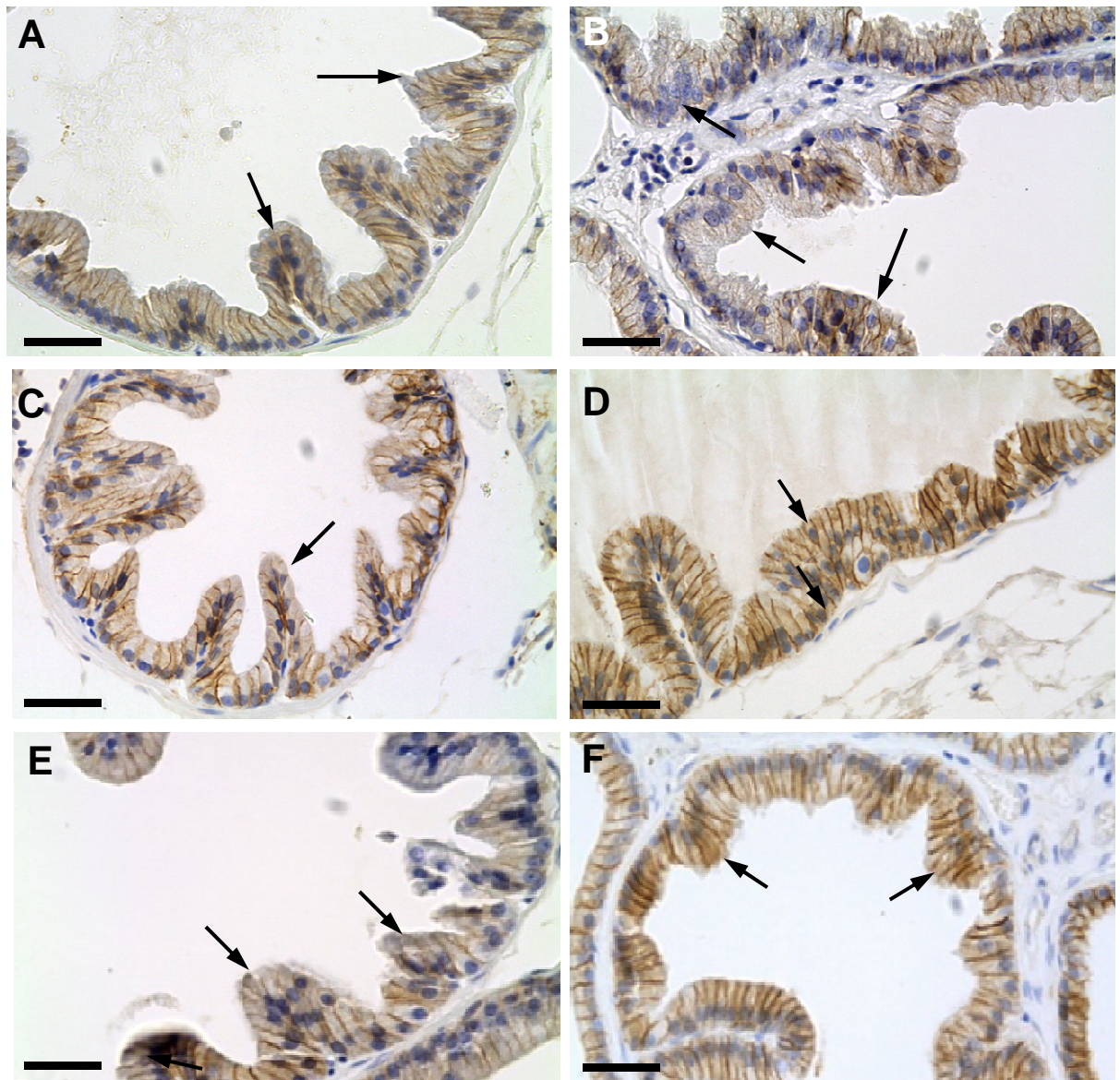


Figura 3 – GST-P

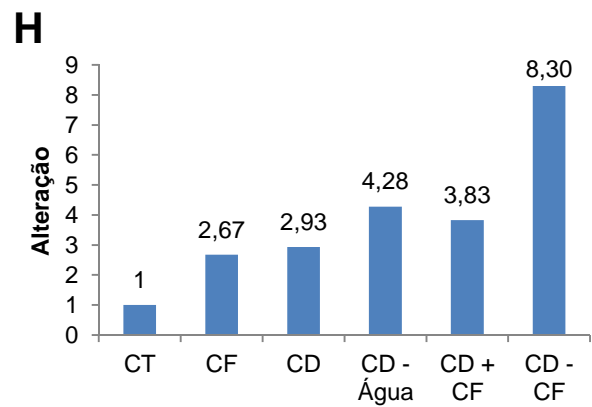
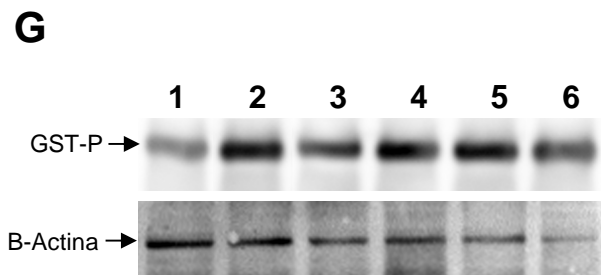
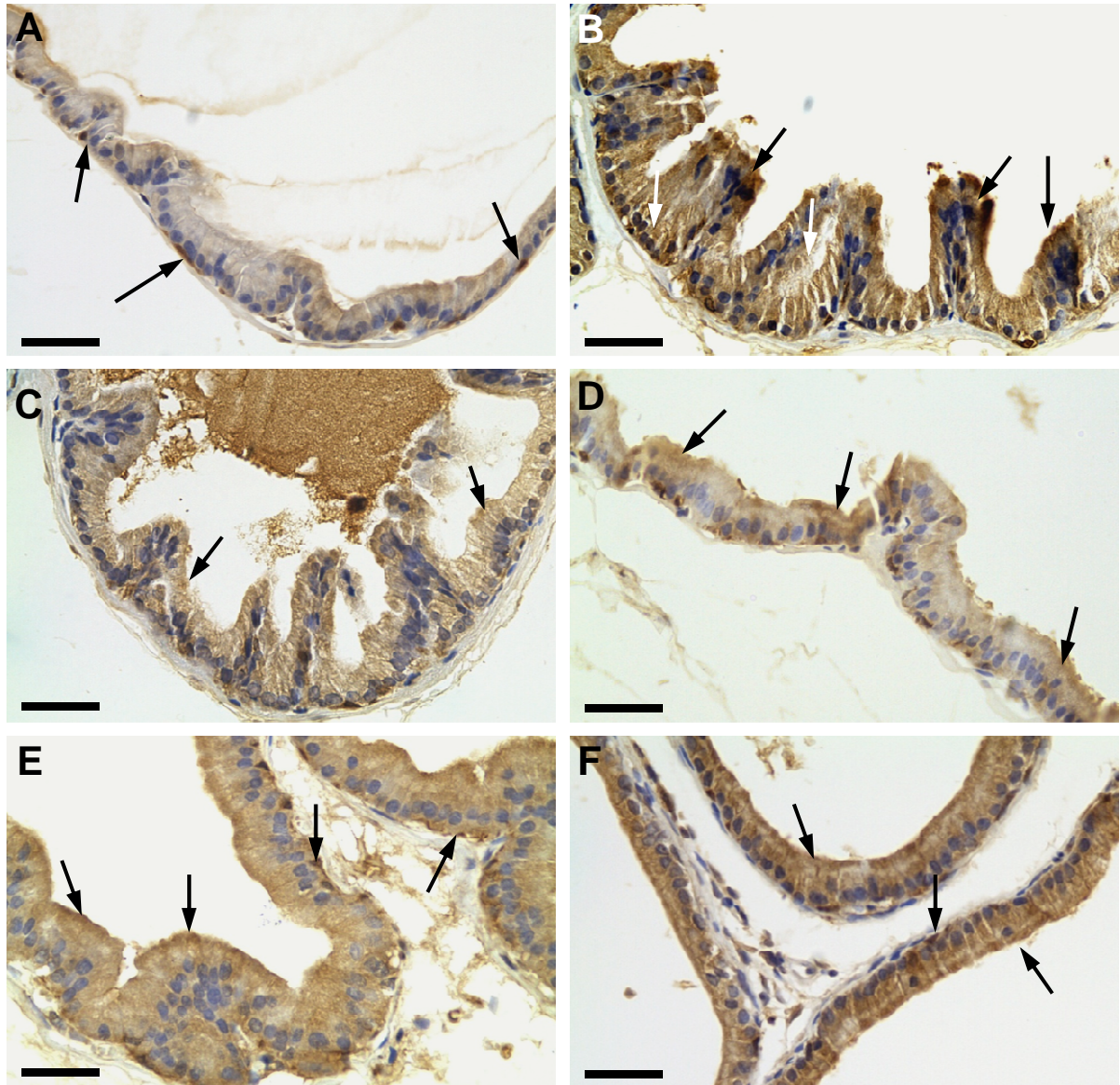
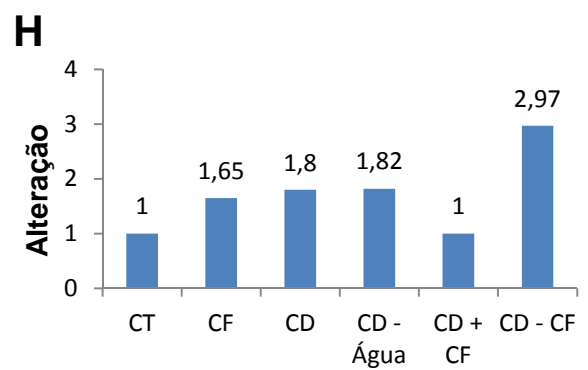
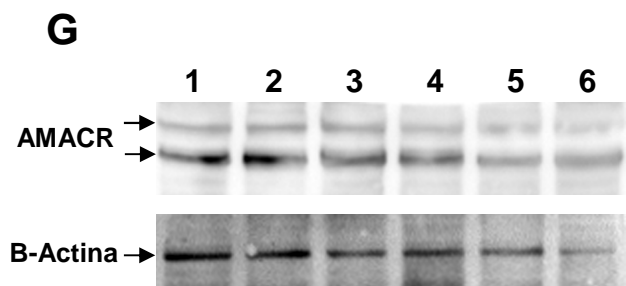
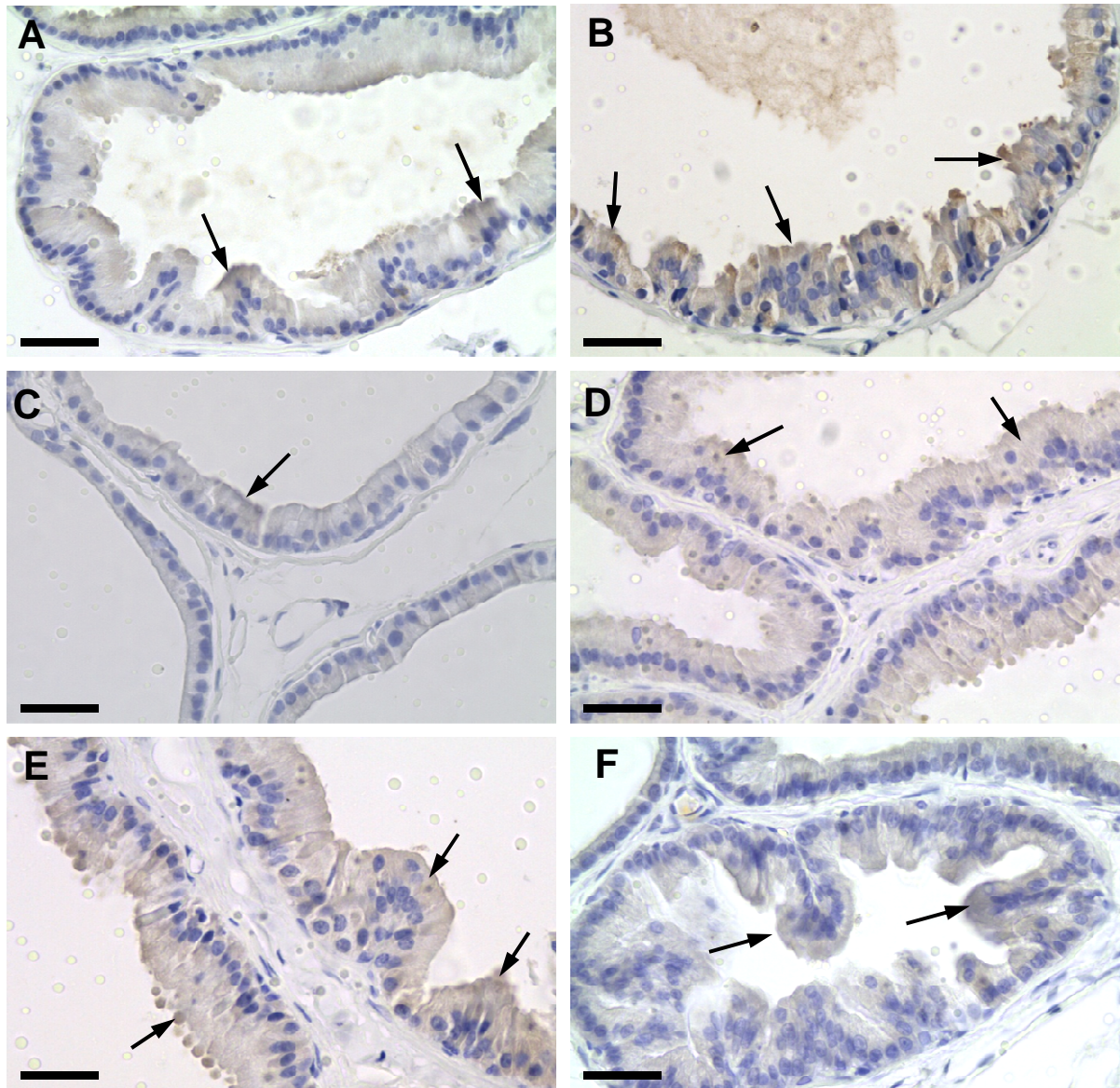


Figura 4 – AMACRacemase



5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a ingestão crônica de cafeína desde a idade da puberdade até a idade adulta, em ratos, aumenta o estímulo androgênico na próstata causando hiperplasia glandular e que a ingestão crônica de cafeína não previne os efeitos da ingestão crônica de cádmio sobre a próstata, podendo até mesmo agir como um promotor de lesões prostáticas neste contexto.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO

Antonio MT, Corpas I, Leret M.L. Neurochemical changes in newborn rats' brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol Lett.* 1999;104:1-9.

Arisawa EAL, Moraes E. PCNA and Ki-67 cell-cycle makers: A brief review. *Rev Fac Odontol.* 1999;2:54-60.

Arriazu R, Pozuelo JM, Henriques-Gil N, Perucho T, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Immunohistochemical study of cell proliferation, Bcl-2, p53, and caspase-3 expression on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the ventral rat prostate. *J Histochem Cytochem.* 2006;54:981-90.

Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int Rev Cytol.* 1990;121:127-231.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RYS, Sartor MA, Medvedovic M, Hol S. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. *Envir Health Persp.* 2008;116:769-76.

Balducci L, Lyman GH. Cancer in the elderly. Epidemiologic and clinical implications. *Clin Geriatr Med.* 1997;13:1-14.

Barry MJ, Cockett AT, Holtgrewe HL, McConnell JD, Sihelnik SA, Winfield HN. Relationship of symptoms of prostatism to comm. used physiological and anatomical measures of the severity of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1993;150:351-8.

Bastian PJ, M Nakayama, De Marzo AM, Nelson WG. CpG island hypermethylation of the DNA. Perspectives of a molecular biomarker for prostate cancer. *Urologe A.*43:573-9

Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 1984;132:474-9.

Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* 2007;247:26-39.

Bonkhoff H, Berges R. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate.* 2010;70:100-12.

- Bonkhoff H, Rembenger K. Diagnostic criteria and differential diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia. *Pathol.* 1998;19:33-41.
- Bosland MC, Prinsen MK, Dirksen TJ, Spit BJ. Characterization of adenocarcinomas of the dorsolateral prostate induced in Wistar rats by N-methyl-N-nitrosourea, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, following sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. *Cancer Res.* 1990;50:700-9.
- Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer.* 1987;59:788-94.
- Bostwick DG, Iczkowski KA. Minimal criteria for the diagnosis of prostate cancer on needle biopsy. *Ann Diagn Pathol.* 1997;1:104-29.
- Bostwick DG. High grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1995;75:1823-36.
- Bostwick DG. Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol.* 1996;30:145-52.
- Bushman W. Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2009;36:403-15.
- Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2003;61:2-7.
- Chi KN. Targeting Bcl-2 with oblimersen for patients with hormone refractory prostate cancer. *World J Urol.* 2005;23:33-37.
- Coakley F, Hricak H. Radiologic anatomy of the prostate gland: a clinical approach. *Radiol Clin North Am.* 2000;38:13-30.
- Cunha GR, Bigsby RM, Coople PS, Sugmura Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Diff.* 1985;17:137-48.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155:1985-92.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155:1985-92.
- De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI, Ali T, Billis A, Chan TY, Cheng L, Datta M, Egevad L, Ertoy-Baydar D, Farre X, Fine SW, Iczkowski KA, Ittmann M, Knudsen BS, Loda M, Lopez-Beltran A, Magi-Galluzzi C, Mikuz G, Montironi R, Pikarsky E, Pizov G, Rubin MA, Samaratunga H, Sebo T, Sesterhenn IA, Shah RB, Signoretti S, Simko J, Thomas G, Troncoso P, Tsuzuki TT, van Leenders GJ, Yang XJ, Zhou M, Figg WD, Hoque A, Lucia MS. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1281-91.
- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011;60:106-17.

- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;88:15-22.
- Dini LI, Koff WJ. Perfil do câncer de próstata no hospital de clínicas de Porto Alegre. *Rev Ass Med Bras.* 2006;52:28-31.
- Donjacour AA, Cunha GR. Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen intensive mice. *Endocrinol.* 1993;132:2342-50.
- Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1:34-45.
- Gans JH. Comparative toxicities of dietary caffeine and theobromine in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1984;22:365-9.
- Gass R. Benign prostatic hyperplasia: the opposite effects of alcohol and coffee intake. *BJU Int.* 2002;90:649-54.
- Glynn RJ, Champion EW, Bouchard GR, Silbert JE. The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Normative Aging Study. *Am J Epidemiol.* 1985;121:78-90.
- Gounari F, Signoretti S, Bronson R, Klein L, Sellers WR, Kum J, Siermann A, Taketo M, von Boehmer H, Khazaie K. Stabilization of beta-catenin induces lesions reminiscent of prostatic intraepithelial neoplasia, but terminal squamous transdifferentiation of other secretory epithelia. *Oncogene.* 2002;21:4099-107.
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30:445-600.
- Hayward SW, Del Buono R, Deshpande N, Hall PA. A functional model of adult human prostate epithelium. The role of androgens and stroma in architectural organization and the maintenance of differentiated secretory function. *J Cell Sci.* 1992 Jun;102:361-72.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol.* 1997;2:18-26.
- He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode CS, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res.* 2005;63:4396-401.
- Helpap B. Differential diagnosis of glandular proliferation in the prostate. A conventional and immunohistochemical approach. *Virchows Arch. Freiburg,* 1998;433:397-405.
- Ho E, Boileau TW, Bray TM. Dietary influences on endocrine-inflammatory interactions in prostate cancer development. *Arch Biochem Biophys.* 2004;428:109-17.
- Homma Y, Kawabe K, Tsukamoto T, Yamaguchi O, Okada K, Aso Y, Watanabe H, Okajima E, Kumazawa J, Yamaguchi T, Ohashi Y. Estimate criteria for efficacy of treatment in benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol.* 1996;3:261-6.

Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006;11:1388-413.

Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate.* 2002;52:213-35.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-104 [monografia da internet]. Lyon, 2012 [atualizada em 2012 Mar 27; acesso em 2012 Apr 01]. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationAlphaOrder.pdf.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Volume 51 coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal [monografia da internet]. Lyon, 1991 [atualizada em 1997 Nov 11; acesso em 2012 Apr 01]. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol51/volume51.pdf

IARC – International Agency for Research on Cancer. Volume 58 beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry [monografia da internet]. Lyon, 1993 [atualizada em 1997 Aug 22; acesso em 2012 Mar 28]. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/volume58.pdf.

Imperato-Mcginley J, Zhu YS. Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;198:51-9.

INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage da internet]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; c2006-2012 [acesso em 2012 Apr 01]. Câncer de próstata; [aproximadamente 01 tela]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.

Ito K, Nakasato Y, Miyakawa K, Yamato Y, Ikeda M, Kisaki M. Caffeine induces G2/M arrest and apoptosis via a novel p53-dependent pathway in nb-4 promyelocytic leukemia cells. *J Cell Physiol.* 2003;196:276-83.

Jarup P, Berglund J, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Environ Health.* 1998;24:1-51.

Johnson MI, Robinson MC, Marsh C, Robson CN, Neal CN, Hamdy FC. Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Localized Prostate Cancer: Relationship With Apoptosis and Proliferation. *The Prostate* 1998;37:223–9.

Junior JP, Srougi M, Borra PM, Dall'Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Leite KR. E-cadherin and beta-catenin loss of expression related to bone metastasis in prostate cancer. *Appl Immunohistochem*

Kim H , Y Ele , Yang eu , Zeng Y , Y Kim , Seo YW , Murnane MJ , Jung C , Lee JH , Min JJ , Kwon DD , Kim KK , Lu Q , K Kim. δ -Catenin promotes E-cadherin processing and activates β -catenin-mediated signaling: Implications on human prostate cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:509-21. Kjellström T, Nordberg GF. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ Res.* 1978;16:248-69.

Laskey JW, Phelps PV. Effect of cadmium and other metal cations on “in vivo” Leydig cell testosterone production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;108:296-306.

- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka S, Liao S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morfological and functional activities. *Biol Reprod.* 1990;43:1079-86.
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:11733-37.
- Lewis GP, Coughlin LL, Jusko WL, Hartz S. Contribution of cigarret smoking to cadmium accumulation in man. *Lancet.* 1972;299:291-2.
- Luo J, Zha S, Gage WR. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 2002;62:2220-6.
- Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, and Partin AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:139-51.
- Marcovecchio JE, Gerpe MS, Bastida RO, Rodríguez DH, Morón SG. A contaminação ambiental e de mamíferos marinhos em águas costeiras da Argentina: uma visão geral. *Sci Total Environ.* 1994;154:141-51.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Develop Biol.* 2003;253:165-74.
- Marquez N, Alvarez-Demanuel E, Piquero S, Esquifino AI, Lafuente A. Chronic alternate or dialy cadmium exposure differentially affects its accumulation within the tissues. Effects of age. *Toxicol Lett.* 1998;95:125.
- Martín JJ, Martín R, Codesal J, Fraile B, Paniagua R, Santamaría L. Cadmium chloride induced displastic changes in the ventral rat prostate: an immunohistochemical and quantitative study. *Prostate.* 2001;46:11-20.
- McNeal JE, Haillet O, Yemoto C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. *Prostate.* 1995;27:258-68.
- Mcneal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988;12:619-33.
- Meinbach DS, Lokeshwar BL. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urol Oncol.* 2006;24:294-306.
- Melissari M, Lopez Beltran A, Mazzucchelli R, Froio E, Bostwick DG, Montironi R. High grade prostatic intraepithelial neoplasia with squamous differentiation. *J Clin Pathol.* 2006;59:437-9.
- Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Lopez-Beltran A. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol.* 2000;53:655-65.
- Morrison AS. Risk factors for surgery for prostatic hipertrophy. *Am J Epidemiol.* 1992;135:974-80.
- Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol.* 1991;30:133-40.

- Mullins JK, Loeb S. Environmental exposures and prostate cancer. *Urol Oncol*. 2012;30:216.
- Muntau H, Baudo R. Sources of cadmium, its distribution and turnover in the freshwater environment. *IARC Sci Publ*. 1992;118:133-48.
- Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. CpG island hypermethylation of the DNA. Perspectives of molecular biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2004;91:540-52.
- Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:366-81.
- Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate*. 1996;28:124-8.
- Nomura M, Ichimatsu S, Moritani S, Koyama I, Dong Z, Yokogawa K, Myiamoto K. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine. *Mol Carcinog*. 2005;44:67-76.
- Nordberg M. Studies on metallothionein and cadmium. *Environ Res*. 1978;15:381-404.
- Oskarsson A, Widell A, Olsson IM, Grawe KP. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *Biometals*. 2004;17:531-4.
- Pavlakakis K, Stravodimos K, Kapetanakis T, Gregorakis A, Athanassiadou S, Tzaida O, Constantinides C. Evaluation of routine application of P504S, 34betaE12 and p63 immunostaining on 250 prostate needle biopsy specimens. *Int Urol Nephrol*. 2010;42:325-30.
- Pires PW, Furtado KS, Justulin Jr LA, Rodrigues MAM, Felisbino SL, Barbisan LF. Chronic ethanol intake promotes double GST-P/TGF-alpha positive hepatocellular lesions with persistent phenotype in rats. *Cancer Science*. 2008;99:221-8.
- Pontes J Jr , Srougi M , Borra PM , Oglio Dall 'MF , Ribeiro-Filho LA , Leite KR .E-caderina e beta-catenina perda de expressão relacionada com metástase óssea em cancro da próstata. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:179-84.
- Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*. 2000;56:828-32
- Qian J, Wollan P, Bostwick DG. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 1997;28:143-8.
- Qu W, Ke H, Pi J, Broderick D, French JE, Webber MM, Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. *Environ Health Perspec*. 2007;115:1094-100.
- Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res*. 2002;62:4427-33.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res*. 2005;322:173-81.

- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11:225-54.
- Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA*. 2002;287:1662-70.
- Saha B, Arase A, Imam SS et al. Overexpression of E-cadherin and betacatenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *Prostate* 2008;68:78–84
- Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2008;54:1951-60.
- Schmitt FC. Marcadores prognósticos em carcinomas mamários. In: Alves VAF et al. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 30-46.
- Schulman C, Lunenfeld B. The ageing male. *World J Urol*. 2002;20:4-10.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the mouse models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*. 2004;64:2270–305.
- Signorello LM, Tzonou A, Lagiou P, Samoli E, Zavitsanos X, Trichopoulos D. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia: a study in Greece. *BJU Int*. 1999;84:286-91.
- Sprenger CC, Plymate SR, Reed MJ. Aging-related alterations in the extracellular matrix modulate the microenvironment and influence tumor progression. *Int J Cancer*. 2010;127:2739-48.
- Steele RJC, Lane DP. p53 in cancer: A paradigm for modern management of câncer. Department of Surgery and Molecular Oncology, University of Dundee, UK. 2005;197-205
- Sung SY, Chung LW. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation*. 2002;70:506-21.
- Thompson IM, Klein EA, Lippman SM, Coltman CA, Djavan B. Prevention of prostate cancer with finasteride: US/European perspective. *Eur Urol*. 2003;44:650-5.
- Verhamme KMC, Dieleman JP, Bleumink GS, van der Lei J, Sturkenboom MCJM. Incidence and prevalence of lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia in primary care – the Triumph Project. *Eur Urol*. 2002;42:323-8.
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*. 2000;45:253-8.

- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288:885-92.
- Waalkes MP, Rehm S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE, Poirier LA. Cadmium carcinogenesis in male Wistar rats: dose-response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.* 1989;49:4282-8.
- Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem.* 2000; 79:241-4.
- Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003;533:107-20.
- Wang W, Bergh A, Damber JE. Morphological transition of proliferative inflammatory atrophy to high-grade intraepithelial neoplasia and cancer in human prostate. *Prostate.* 2009;69:1378-86.
- Webb, M. Cadmium. *Br Med Bull.* 1975;31:246-50.
- Weinberger MA, Friedman L, Farber TM, Moreland FM, Peters EL, Gilmore CE, Kham MA. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxantines caffeine, theobromine, or theophylline. *J Environ Pathol Toxicol.* 1978;1:669-88.
- WHO – World Health Organization [homepage da internet]. Geneva: Environmental Health Criteria 134, 1992 [acesso em 2012 Mar 26]. Cadmium [aproximadamente 350 telas]. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>.
- Wu JD, Haugk K, Woodke L, Nelson P, Coleman I, Plymate SR. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J Cell Biochem.* 2006;99:392-401.
- Yardy GW, Brewster SF. Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005;8:119-26.
- Zeng X, Jin T, Zhou Y, Nordberg GF. Changes of serum sex hormone levels and MT mRNA expression in rats orally exposed to cadmium. *Toxicology.* 2003;186:109-18.

"Tenho em mim todos os sonhos do mundo." (Fernando Pessoa)