

FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DO PRAGUICIDA DICLORVÓS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PROSTÁTICAS INDUZIDAS POR
MNU EM RATOS – AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
DE INFLAMAÇÃO

Assis

2019

FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DO PRAGUICIDA DICLORVÓS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PROSTÁTICAS INDUZIDAS POR
MNU EM RATOS – AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
DE INFLAMAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Leão Castilho

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Pereira

Assis

2019

S237i

Santos, Fernanda Oliveira dos

Influência do praguicida diclorvós sobre o desenvolvimento de lesões prostáticas induzidas por MNU em ratos : Avaliação de marcadores moleculares de inflamação / Fernanda Oliveira dos Santos. -- Assis, 2019

58 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Letras, Assis

Orientador: Antonio Leão Castilho

Coorientador: Sergio Pereira

1. Diclorvós. 2. Inflamação. 3. Próstata. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **INFLUÊNCIA DO PRAGUICIDA DICLORVÓS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PROSTÁTICAS INDUZIDAS POR MNU EM RATOS – AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE INFLAMAÇÃO**

AUTORA: FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS

ORIENTADOR: ANTONIO LEÃO CASTILHO

COORIENTADOR: SERGIO PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora;

Prof. Dr. SERGIO PEREIRA
Departamento Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP

Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO
Departamento de Anatomia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. ROGERIO CAETANO DA COSTA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP

Assis, 13 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria, inicialmente, de agradecer meus pais, **José Carlos** e **Verônica**, minha eterna gratidão pela paciência, apoio, incentivo, conselhos, puxões de orelha, amor e confiança depositados em mim.

Agradeço ao meu orientador **Antonio Leão Castilho** pela orientação.

Ao meu co-orientador, **Sergio Pereira**, pelo acolhimento desde a iniciação científica até o mestrado, pelas oportunidades, e por todos os conhecimentos transmitidos desde quando o conheci.

Ao **Sammer Lima**, por ser um pedacinho de SP na cidade sem limites, pelo ombro amigo, por escutar todas reclamações e frustrações, por todas as tardes de jogos, por todos os bolos, almoços e caronas, por me acompanhar do cursinho até a qualificação sempre me apoiando, incentivando e brigando quando necessário.

Ao **Caio Brandão Schiewaldt**, por todo incentivo e força, por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava, por toda as vezes que pensei em desistir e você não permitiu, por trazer tranquilidade para cada momento de estresse, por ser compreensivo em todas situações, por nunca deixar eu esquecer dos meus objetivos e sonhos.

À minha irmã **Vanessa**, por cada ligação, por cada abraço, por sempre me escutar, por sempre cuidar de mim, por ser além de irmã, ser amiga e ser mãe muitas vezes. Pelo incentivo e apoio em todas as fases da minha vida.

Ao meu irmão **Rodrigo** e as minhas irmãs **Rafaela** e **Renata**, por sempre me incentivarem, por me aconselharem e serem exemplos para mim.

À **Mirandy**, pelo apoio, pelo incentivo, pelo carinho e por cuida de mim como se fosse sua filha.

À **Bianca Ingrid Carvalho** e a **Fernanda Farias**, por estarem presentes, pelos anos de amizades, que apesar da distância sempre estão ao meu lado, dando broncas e conselhos, por me incentivarem a superar cada obstáculo durante todos esses anos, sempre me apoiando em cada nova jornada.

Ao **Cadu**, que mesmo estando a mais de 10 mil quilômetros sempre esteve disposto a me ajudar, escutar, aconselhar e brigar quando era preciso.

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

Aos colegas de laboratório **Henrique Stornioli, Brayan Luccas, Júlia Chiti e Lorena Cruz** por todo auxílio. Um agradecimento especial a **Giovanna Galo Quitino, Náira Ruiz Lenharo, Camila Quadrado e Maria Eduarda Verderio** pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas, loucuras em cada rotina.

À **Camila Yamashita** por me acolher, por me fazer gostar de Assis, por cada noite estudando seminários e artigos, por cada turismo em Assis, por cada gargalhada em situações trágicas, por cada perrengue nas disciplinas, por cuidar de mim em uma cidade nova e pelo sorvete de lichia. Um agradecimento aos seus pais **Regina Isumi** e **Nelson Yamashita** por acolherem de forma tão carinhosa e gentil uma até então desconhecida.

À **Marcele Kaczanoski** por me abrigar sem hesitar sempre que necessário.

Ao **Aron Restani** por me abrigar, pelas caronas à rodoviária e por cada momento de ajuda.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa e Prof. Dr. Aloisio Costa Sampaio** por aceitarem o convite.

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

Aos **funcionários** do Departamento de Ciências Biológicas por todo auxílio, em especial ao **Antônio Carlos Amaral**, pela amizade e por todos os conhecimentos passados durante as dissecações.

Ao auxílio à pesquisa nº 17/08505-5 e bolsa de treinamento técnico nº 18/03442-8, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

SANTOS, Fernanda Oliveira dos. **Influência do praguicida diclorvós sobre o desenvolvimento de lesões prostáticas induzidas por MNU em ratos – Avaliação de marcadores moleculares de inflamação**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2019.

RESUMO

O Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo. Os organofosforados, como o Diclorvós (DDVP), são um dos mais utilizados devido à sua eficiência e relativa baixa toxicidade. O DDVP pode atuar como desregulador endócrino, contribuindo para o desenvolvimento de lesões na próstata. O câncer de próstata assumiu, nestes últimos anos, o primeiro lugar em incidência de neoplasias nos Estados Unidos, e no Brasil estima-se 66,12 casos novos a cada 100 mil homens, sendo o câncer mais comum entre os homens. O processo inflamatório predispõe os indivíduos a vários tipos de câncer, pois induz a produção de citocinas como o TNF α que está envolvida no desenvolvimento do câncer de próstata. A inflamação pode ser ativada pelos receptores Toll-Like que pode resultar na ativação de duas vias, NF κ B e a JNK. A via de sinalização do NF κ B desempenha papel importante nas respostas ao câncer, inflamação, estresse e diferenciação celular. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do praguicida Diclorvós em concentrações permitidas na próstata ventral de ratos em situação controle e após indução química por MNU (N-metil-N-nitrosureia), sobre a inflamação mediada por TLR4. Foram utilizados 40 ratos da linhagem Fischer 344, com idade de 90 dias. Os ratos foram separados em quatro grupos experimentais: Sham (G1), Sham+DDVP (G2), MNU (G3), MNU+DDVP (G4). Foram feitas análises histopatológica e imunohistoquímica da próstata ventral dos ratos. Foram encontrados três tipos de lesões na próstata ventral de ratos: Displasia, Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) e Neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPI). O TLR4 esteve presente nas células epiteliais luminiais da próstata ventral de todos os grupos experimentais. Nos grupos G1, G2 e G3 houve marcação em todo citoplasma, sendo a marcação mais intensa na região do aparelho de Golgi e no grupo G4 essa marcação foi moderada na região do aparelho de Golgi e intensa na membrana apical das células. O TNF α foi detectado em todo citoplasma das células epiteliais luminiais da próstata ventral de todos os grupos experimentais destacando-se intensamente na região apical e moderadamente na região do aparelho de Golgi. O NF κ B foi imunolocalizado em todo citoplasma das células epiteliais luminiais da próstata ventral em todos os grupos experimentais, sendo mais intenso na região apical. Os grupos G1 e G2 apresentaram imunorreatividade intensa na região apical e somente os grupos G3 e G4 apresentaram imunorreatividade no envoltório nuclear. Verificamos a expressão de NF κ B no núcleo e a diminuição da expressão de TLR4 e TNF α principalmente na região do Golgi, bem como o aumento da expressão de TLR4 na membrana apical das células epiteliais luminiais, que pode ser associado ao agravamento das lesões prostáticas, corroborando com o papel desses marcadores do processo inflamatório, nas etapas iniciais da carcinogênese. Assim, podemos concluir que o DDVP em concentrações permitidas altera a imunolocalização de marcadores moleculares da inflamação na próstata ventral de ratos. Além disso, o DDVP associado à indução química pode acentuar essas alterações dos marcadores.

Palavras-Chaves: Diclorvós, inflamação, próstata, NF κ B, TNF α e TLR4.

SANTOS, Fernanda Oliveira dos. Influence of dichlorvos on the development of prostatic lesions induced by MNU in rats – evaluation of inflammation molecular markers 2019. 58 p. Dissertation (Masters in Biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2019.

ABSTRACT

Brazil is the largest consumer of pesticides in the world. Organophosphates, such as Diclorvos (DDVP), are among the most used because of their efficiency and relatively low toxicity. DDVP can act as an endocrine disrupter, contributing to the development of prostate lesions. In recent years, prostate cancer has been the number one cancer incidence in the United States, and in Brazil it is estimated 66.12 new cases per 100,000 men, the most common cancer among men. The inflammatory process predisposes individuals to various types of cancer, as it induces the production of cytokines such as TNF α , which is involved in the development of prostate cancer. Inflammation can be activated by Toll-Like receptors which can result in the activation of two pathways, NF κ B and JNK. The NF κ B signaling pathway plays an important role in cancer responses, inflammation, stress, and cell differentiation. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of the Diclorvos pesticide at permissible concentrations in the ventral prostate of rats under control and after chemical induction by MNU (N-methyl-N-nitrosourea) on TLR4-mediated inflammation. 40 rats of the Fischer 344 strain, aged 90 days, were used. The rats were separated into four experimental groups: Sham (G1), Sham + DDVP (G2), MNU (G3), MNU + DDVP (G4). Histopathological and immunohistochemical analyzes of the ventral prostate of rats were performed. Three types of lesions were found in the ventral prostate of rats: Dysplasia, Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) and High Grade Intraepithelial Neoplasia (HGPIN). TLR4 presented in luminal epithelial cells of the ventral prostate of all experimental groups. In groups G1, G2 and G3 there was staining throughout the cytoplasm, being the most intense staining in the region of the Golgi apparatus. In group G4 this staining was moderate in the region of the Golgi apparatus and intense in the apical membrane of the cells. TNF α was detected in all cytoplasm of the luminal epithelial cells of the ventral prostate of all experimental groups, standing out intensely in the apical region and moderately in the region of the Golgi apparatus. NF κ B was immunolocalized in all cytoplasm of luminal epithelial cells of the ventral prostate in all experimental groups, being more intense in the apical region. Groups G1 and G2 presented intense immunoreactivity in the apical region and only the G3 and G4 groups showed immunoreactivity in the nuclear envelope. We verified the expression of NF κ B in the nucleus and decreased expression of TLR4 and TNF α mainly in the Golgi region, as well as the increase in TLR4 expression in the apical membrane of the luminal epithelial cells, which may be associated with worsening of the prostatic lesions, corroborating with the role of these markers of the inflammatory process, in the early stages of carcinogenesis. Thus, we can conclude that DDVP at permissible concentrations alters the immunolocalization of molecular markers of inflammation in the ventral prostate of rats. In addition, the DDVP associated with chemical induction may accentuate these marker changes

Keyword: Dichlorvos, inflammation, prostate, NF κ B, TNF α and TLR4.

LISTA DE ABREVIÇÕES

DDVP	Diclorvós
DEs	Desreguladores endócrinos
UE	União Europeia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PDL	Próstata Dorsolateral
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
LGPIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática De Baixo Grau
HGPIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática De Alto Grau
PIA	Atrofia Inflamatória Proliferativa
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR	Receptor de Fator de Necrose Tumoral
NF κ B	Fator De Transcrição Nuclear Kappa B
TLRs	Receptores Toll-Like
TLR4	Receptor Toll Like 4
LRR	Repetição Rica em Leucina
TIR	Receptor Toll/IL-1
PAMPs	Padrões Moleculares Associados A Patógenos
DAMPs	Padrões Moleculares Associados A Danos Endógenos
MyD88	Proteína Adaptadora Mielóide 88
IRAK	Quinase Associada a IL-1R
TRAF6	Fator 6 Associado ao TNFR
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
I κ B	Inibidor de K β
IKK	I κ B quinase
IKK α	Inibidor de κ B alfa
IKK β	Inibidor de κ B beta
IKK γ	Inibidor de κ B gama
NEMO	Modulador essencial de NF κ B
MAPK	Proteína Quinase Ativada Por Mitógeno

MAP3K	Proteína Quinase Quinase Quinase Ativada Por Mitógeno
MNU	N-metil-N-nitrosureia
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de toxicidade segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.....	14
Figura 2 - Fórmula estrutural do praguicida diclorovós.....	15
Figura 3 - A. Vista superior da próstata humana. B. Corte transversal da próstata humana.....	18
Figura 4 - O lobo da próstata de um roedor adulto juntamente com um conjunto de secções de ductos prostáticos de cada lobo corados com hematoxilina e eosina. Cada lobo tem uma forma distinta e aparência histológica.....	19
Figura 5 -Três regiões prostáticas: região distal com células epiteliais colunares altas, região intermediária com células epiteliais colunares altas e proximal com células epiteliais colunares baixas ou cúbicas.....	21
Figura 6 - Ativação da via de sinalização de NF-κB, Etapa 1: ativação do complexo IκB quinase por diversos fatores. Etapa 2: fosforilação de IκB pelo complexo IKK e ligação da enzima ubiquitina E3 ligase para posterior ubiquitinação. Etapas 3 e 4: poliubiquitinação e degradação proteassomal do IκB. Etapa 5: livre de seu inibidor o NF-κB sofre translocação nuclear. Etapa 6: No núcleo NF-κB ativa transcrição de vários gene-alvo, incluindo genes que codificam citocinas inflamatórias e promovem a síntese de IκB.....	27
Figura 7 - Esquema demonstrando relação da via de sinalização do NFκB nas respostas ao câncer, inflamação, estresse e processos celulares fundamentais.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Agrotóxicos e DDVP	13
1.2 Desreguladores Endócrinos	15
1.3. Próstata: relações, aspectos histológicos e sistema ductal.....	17
1.4. Câncer de próstata e lesões neoplásicas.....	22
1.5. Modelo de Indução Química por MNU	23
1.6. Inflamação: aspectos gerais e relação com câncer de próstata.....	24
2. REFERÊNCIAS	30
3. CAPITULO 1	36
RESUMO	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS	38
Modelo animal	38
Grupos experimentais.....	38
Forma de análise dos resultados	40
<i>Análise histopatológica</i>	40
<i>Análise imunohistoquímica</i>	40
RESULTADOS.....	41
<i>Análise Histopatológica</i>	41
<i>TLR4</i>	44
<i>TNFα</i>	44
<i>NFkB</i>	45
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	52
REFERENCIAS.....	53
LISTA DE FIGURAS	56
4. CONCLUSÕES GERAIS	57
5. ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Agrotóxicos e DDVP

Segundo o Dossiê Abrasco (2015), o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190% nos últimos dez anos, enquanto o mercado mundial cresceu 93%. O mercado nacional de venda de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos, sendo que 833 mil toneladas são produzidas no Brasil. Em 2010, o mercado nacional representou 19% do mercado global de agrotóxicos e movimentou US\$ 8,5 bilhões em 2011. Já os Estados Unidos, foram responsáveis por 17% do mercado mundial. Com relação ao consumo médio do agrotóxico, também houve aumento, passou de 10,5 litros por hectare em 2002 para 12 litros por hectare em 2011. Esse aumento pode estar relacionado com diversos fatores, como a crescente resistência aos agrotóxicos, aumento de doenças nas lavouras, diminuição dos preços e isenção de impostos dos agrotóxicos (Pignati & Machado, 2011).

Conforme a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, no seu artigo 2, inciso I, entende-se agrotóxicos e afins como: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

No Brasil, os agrotóxicos são classificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), órgão de controle do Ministério da Saúde, em quatro grupos de perigo para sua saúde. Essa classificação está relacionada aos efeitos à saúde decorrentes da exposição humana a esses agentes, feita com base na dosagem letal (DL50) do agrotóxico em 50% da população de animais expostos em condições de laboratório. São quatro as Classes Toxicológicas, identificadas por cores distintas na parte inferior dos rótulos das embalagens (Figura 1), para auxiliar na identificação do grau de periculosidade (Peres, 2003). Garcia e colaboradores (2005), em um estudo sobre o perfil da classificação toxicológica de 461 agrotóxicos comerciais registrados no período de 1990 a 2000 no Brasil, identificaram 17% deles como produtos

extremamente tóxicos, 20% altamente tóxicos, 30% medianamente tóxicos e 33% pouco tóxicos.

CLASSIFICAÇÃO ANVISA DE TOXICIDADE		
CLASSE	COR DE FAIXA	NÍVEL DE TOXICIDADE
I	Vermelha	Extremamente tóxico
II	Amarela	Altamente tóxico
III	Azul	Mediamente tóxico
IV	Verde	Pouco tóxico

*Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Figura 1. Classificação de toxicidade segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA, 2011)

Os agrotóxicos são amplamente utilizados em áreas agrícolas, comerciais, industriais e domésticas. A exposição a essas substâncias pode ocorrer por meio da ingestão, inalação e contato dérmico (Li & Jennings, 2017). Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o uso em: pesticidas, inseticidas, herbicidas e fungicidas, dentre outros. Também podem ser classificados de acordo com o grupo químico em organofosforados e carbamato, piretrinas e piretróides, e organoclorados (Vommaro et al., 2010).

Os organofosforados foram desenvolvidos como armas químicas de guerra e, desde 1944, vêm sendo os compostos inseticidas mais utilizados em nível mundial, em substituição aos organoclorados. Os organofosforados podem ser derivados do ácido fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico e fosfônico (Vommaro et al., 2010), e são amplamente utilizados como inseticidas devido sua eficiência contra pragas, sua baixa bioacumulação e rápida degradação no ambiente por oxidação e hidrólise (Silva, 2011). Alguns exemplos de organofosforados são: diazinon, DDVP, clorpirifós, azametifós, temefós entre outros (ENCOP, 2013).

O Diclorvós 2-2-diclorovinil-dimetilfosfato ou DDVP (Figura 2), é um inseticida organofosforado, líquido de coloração âmbar, odor aromático, parcialmente solúvel em água e muito solúvel em hidrocarbonetos aromáticos (Oliveira & Machado, 2004).

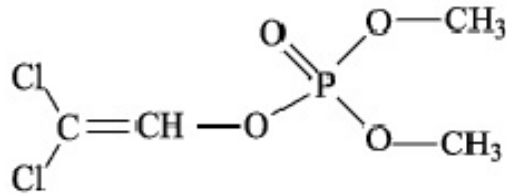


Figura 2. Fórmula estrutural do praguicida Diclorvós.

O DDVP pode ser absorvido por difusão passiva nos pulmões, no sistema digestório ou na pele (APVMA, 2008). Como qualquer outro componente dessa classe é regularmente utilizado no controle de pragas em produções agrícolas, em áreas comerciais, institucionais, industriais e residenciais (Gan et al., 2006) e, também, para tratar infecções causadas por parasitas em gado e animais domésticos (Cruz-Alcalde et al., 2018). Classificado como Classe II, é altamente tóxico por inalação, absorção cutânea e ingestão (US Public Health Service, 1995). Comparado com outros praguicidas, geralmente é escolhido devido a sua relação custo-eficácia e ampla gama de bioatividade (Zhang et al., 2007).

O DDVP exerce os seus efeitos tóxicos por meio da inibição da acetilcolinesterase neural em seres humanos e animais. Em todo o sistema nervoso central e periférico, as sinapses colinérgicas contêm esta enzima, que é responsável pela hidrólise da acetilcolina liberada a partir do terminal pré-sináptico. O DDVP reage quimicamente com o sítio ativo da acetilcolinesterase e inibe a atividade enzimática. A inibição da acetilcolinesterase neural permite que a acetilcolina se acumule na sinapse, resultando num aumento do disparo do neurônio pós-sináptico ou no aumento da atividade neuroefetora (APVMA, 2008).

1.2. Desreguladores Endócrinos

Muitos poluentes ambientais derivados de fontes industriais e agrícolas, incluindo praguicidas organofosforados são desreguladores endócrinos (DE). Os DEs abrangem uma grande faixa de classe de substâncias, incluindo, substâncias naturais e substâncias sintéticas, como os utilizados na agricultura, e hormônios sintéticos e naturais, como compostos farmacêuticos (17α -etinilestradiol) e estrógenos naturais (17β -estradiol) (Bila & Dezotti, 2007).

Os DEs são substâncias exógenas (drogas, pesticidas, aditivos plásticos, poluentes orgânicos etc) que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação a receptores, ação ou eliminação de hormônios naturais. A maioria destas substâncias

são xenoestrógenos ou antiandrógenos (Quagliariello et al., 2017). Os DEs atuam por meio de receptores nucleares, receptores de hormônios esteroides não nucleares, receptores de membrana não esteroides, via receptores órfãos, vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo de esteroides, e numerosos outros mecanismos que convergem sobre os sistemas endócrino e reprodutivo (Kuo et al., 2012). Também há relatos de que os DEs podem mediar ações por meio de neurotransmissores, receptores de hidrocarbonetos, diferentes enzimas envolvidas no metabolismo de esteroides e outros mecanismos relacionados a regulação endócrina e reprodução (Kharlyngdoh & Olsson, 2016).

Segundo a União Européia (UE), os DEs podem alterar a função e danificar diretamente um órgão endócrino, interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino. Eles interagem com os receptores mimetizando hormônios em células alvo por ativação ou repressão de genes (Kharlyngdoh & Olsson, 2016). O Bisfenol A, por exemplo, é um mimetizador de estrógeno que se liga ao receptor de estrógeno (ER) (Rouiller-Fabre et al., 2015). E também há o diclorvós que é um exemplo de antagonista do receptor de andrógeno (AR) (Mnif et al., 2011).

A exposição aos DEs pode ocorrer por meio do contato direto ou indireto pela ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo uma das maiores exposições da população a ingestão de alimentos contaminados. No caso dos seres humanos há a estimativa que mais de 90% dessas substâncias são absorvidas por ingestão (Bila & Dezotti, 2007).

Os DEs podem perturbar a homeostase mantida por hormônios e resultar em defeitos de desenvolvimento neural e anomalias do sistema endócrino e reprodutivo. Os mecanismos moleculares exatos pelos quais os desreguladores endócrinos exercem o seu efeito não foram completamente elucidados, mas estudos têm sugerido que vários mecanismos estão envolvidos na ação dos desreguladores endócrinos (Tabb & Blumberg, 2006).

Os DEs podem perturbar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo afetando o sistema endócrino e as funções reprodutivas. Além da redução da fertilidade e da disfunção erétil, desenvolvimento sexual anormal, alteração nas funções da hipófise e da glândula tireoide, supressão imunológica e efeitos neurocomportamentais, os DEs podem causar câncer de testículo e de próstata (Sikka & Wang, 2008; Schug et al.,

2011), bem como induzir alterações reprodutivas, obesidade, alterações comportamentais e inflamação (Soto & Sonnenschein, 2010).

Segundo Prins (2008), há fortes evidências em modelos animais de que DEs, como cádmio, arsênico e Bisfenol A, podem influenciar o desenvolvimento e a progressão de câncer de próstata, porque podem interferir na sinalização ou influenciar o metabolismo de estrógeno. Donato e colaboradores (2017) relataram que durante o período de desenvolvimento neonatal, a exposição ao Bisfenol A, aumentou a suscetibilidade a lesões prostáticas em ratos, alterou o padrão fisiológico da morfogênese da próstata favorecendo o desenvolvimento de câncer em adultos e induziu a metaplasia, hiperplasia e inflamação na idade adulta.

Mills & Yang (2003) observaram que o DDVP aumentou o risco de câncer de próstata em trabalhadores agrícolas na Califórnia, trabalhadores com níveis relativamente altos de exposição ao DDVP apresentaram risco elevado de câncer de próstata em comparação aos trabalhadores com níveis menores de exposição ao praguicida. Já Koutros e colaboradores (2008) também observaram um pequeno aumento no risco de câncer associado à exposição ao DDVP, entre trabalhadores agrícolas de Iowa e Carolina do Norte, com histórico familiar de câncer de próstata.

1.3. Próstata: relações, aspectos histológicos e sistema ductal

A próstata é a maior glândula acessória do sistema genital masculino (Moore, 2011), está localizada no compartimento subperitoneal entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal. Está posterior à sínfise púbica, anterior ao reto e inferior à bexiga urinária, circundando a parte proximal da uretra (Fine & Reuter, 2012). Classicamente descrita como em tamanho de noz, possui forma cônica (Lee et al, 2011). A próstata humana é composta de elementos epiteliais glandulares e estromais, bem fundidos dentro de uma pseudocápsula (Lee et al., 2011). A parte glandular representa cerca de dois terços da próstata; o outro terço é fibromuscular (Moore, 2011).

A próstata humana adulta é uma glândula sexual compacta que não exhibe os diferentes lobos vistos em muitos mamíferos (Timms et al., 1994). A princípio, foram caracterizadas três zonas glandulares na próstata humana: a central, a periférica e a de transição, além de uma região não glandular, chamada de estroma fibromuscular anterior (Figura 3). A zona central constitui quase 25% do tecido glandular da próstata, a zona periférica constitui 70% do tecido glandular, a zona de transição constitui 5%

(Lee et al., 2011). Já o estroma fibromuscular anterior representa cerca de um terço do tecido dentro da cápsula prostática (McNeal, 1981).

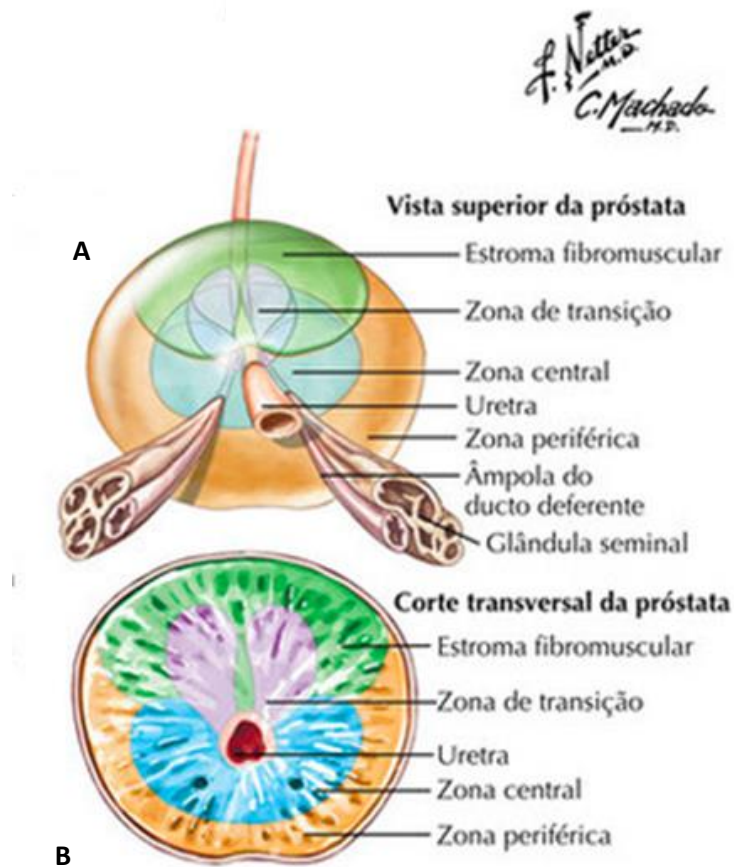


Figura 3. A. Vista superior da próstata humana. B. Corte transversal da próstata humana (adaptado de Netter, 2014)

Nos roedores, a próstata é formada por três lobos distintos: lobo ventral, lobo dorsolateral e lobo anterior ou glândula de coagulação (Figura 4) (Jesik et al., 1982). Devido às diferenças lobo-específicas no padrão de morfogênese ductal, a forma final de cada lobo é diferente (Lee et al., 1990). O lobo anterior é análogo à zona central da próstata humana e o lobo dorsolateral assemelha-se à zona periférica (Xue et al., 1997; Roy-Burman et al., 2004). Apesar de não haver evidências moleculares para uma analogia entre o lobo ventral e regiões da próstata humana (Marker et al., 2003), o lobo ventral é o mais utilizado em estudos envolvendo lesões prostáticas por ser o mais responsivo aos andrógenos (Slayter et al., 1994).

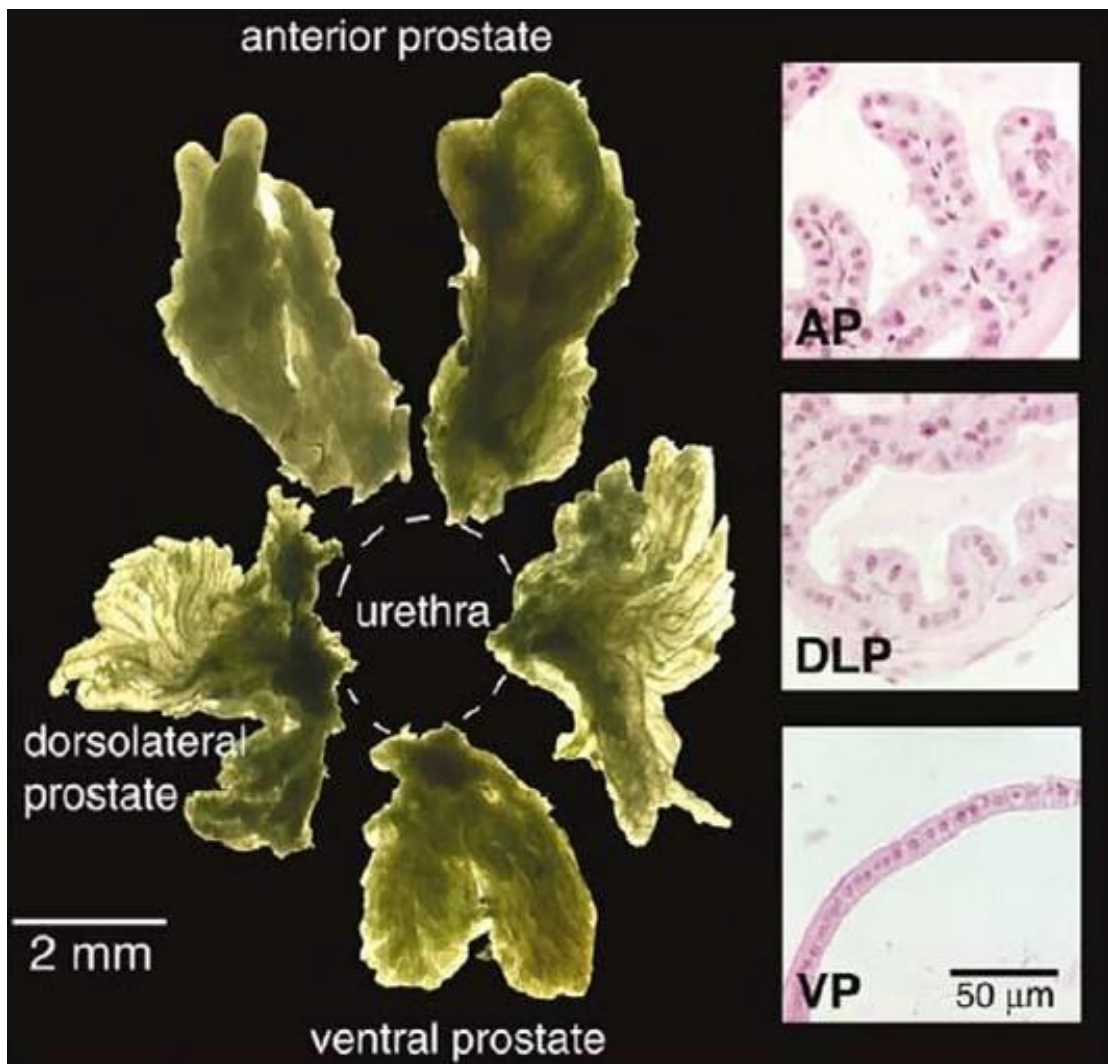


Figura 4. O lobo da próstata de um roedor adulto juntamente com um conjunto de secções de ductos prostáticos de cada lobo corados com hematoxilina e eosina. Cada lobo tem uma forma distinta e aparência histológica (adaptado de Marker et al., 2003).

Além disso, os lobos têm algumas características histológicas distintas (Lee et al., 1990). No lobo anterior da próstata de rato, cada ácino tem muitas dobras mucosas proeminentes compreendendo projeções ramificadas. Seu epitélio consiste de uma camada de células colunares com núcleos menores, redondos e localizados centralmente e citoplasma acidófilo. Os ácinos do lobo dorsal são estruturalmente semelhantes aos do lobo anterior, embora consideravelmente mais estreito, e seu epitélio também se assemelha ao do lobo anterior, mas os núcleos são maiores e o citoplasma é mais granular. O lobo lateral está localizado inferiormente à glândula de coagulação e à glândula seminal, ele está relacionado à próstata dorsal na região dorsal, por esse motivo podem ser estudados em conjunto, recebendo o nome de

próstata dorsolateral (PDL). Ventralmente, a próstata lateral se sobrepõe parcialmente a próstata ventral (Hayashi et al., 1991, Roy-Burman et al., 2004).

Os ácinos no lobo dorsolateral possuem uma quantidade intermediária de dobra epitelial em comparação com o lobo ventral e o lobo anterior. O lobo dorsal possui epitélio colunar simples com citoplasma granular basófilo e núcleos centralmente posicionados. Quando comparado com o lobo ventral, tanto o tamanho dos núcleos quanto à altura do epitélio são levemente maiores, e seu estroma é relativamente denso quando comparado com os outros lobos (Roy-Burman et al., 2004).

As células epiteliais do lobo lateral, por sua vez, podem ser mais cuboides e menos basófilas e as células secretoras têm núcleos menores que estão localizados na base. Em comparação com o lobo dorsal, seu estroma é muito mais estreito, e as secreções são granulosas e mais eosinófilas (Roy-Burman et al., 2004). Já no lobo ventral, o epitélio geralmente não se dobra, mas algumas dobras são vistas em alguns ácinos, que são revestidos por um epitélio colunar baixo. O pequeno núcleo está localizado perto da base da célula epitelial e o citoplasma aparece ligeiramente basófilo (Xue et al., 1997).

O sistema ductal da próstata ventral de ratos pode ser dividido em três regiões: proximal, intermediária e distal, cada uma delas com características histológicas e funcionais diferentes (Figura 5). Na região distal as células epiteliais são colunares altas com alta atividade proliferativa. A região intermediária apresenta características intermediárias entre a região proximal e a distal e é a região responsável pela produção da secreção prostática, com células epiteliais colunares altas. Enquanto na região proximal, as células epiteliais são colunares baixas ou cúbicas com alta taxa de morte celular (Nemeth & Lee, 1996).

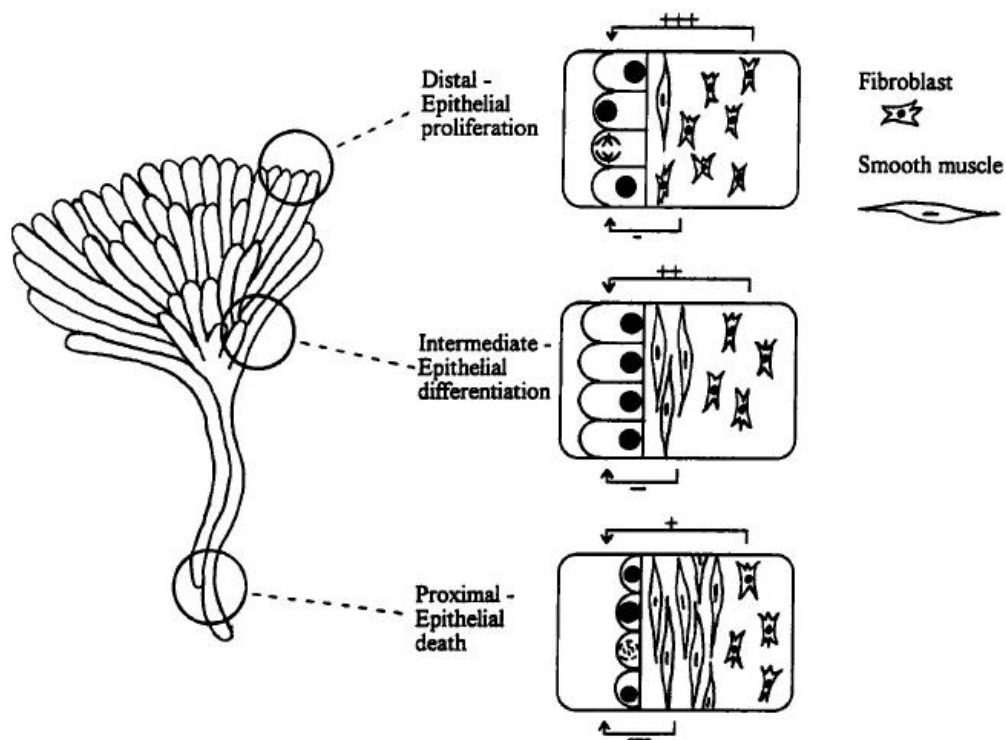


Figura 5. Três regiões prostáticas: região distal com células epiteliais colunares altas, região intermediária com células epiteliais colunares altas e proximal com células epiteliais colunares baixas ou cúbicas (adaptado de Nemeth & Lee, 1996).

A distribuição relativa dos tipos celulares é diferente entre a próstata humana e a de roedores, mas em ambas as espécies a luz ductal é revestida por células epiteliais secretoras colunares altas. Essas células apresentam uma polaridade ápico-basal e secretam proteínas e fluídos de sua superfície apical na luz prostática (Lee et al., 1990). Na próstata humana, as células epiteliais basais formam uma camada quase contínua entre as células secretoras e a membrana basal, enquanto em ratos, poucas células basais estão dispersas formando uma camada descontínua ao redor dos ductos, que formam o sistema ductal (Marker et al., 2003).

Embora o estroma da próstata de roedores e, também, da próstata humana ser composto em grande maioria por células musculares lisas, o estroma contém ainda fibroblastos, linfócitos, células endoteliais, neuronais e vasculares. A camada de células musculares lisas na próstata humana é muito mais espessa do que na de roedores, já que a próstata humana tem uma proporção mais elevada de células estromais para células epiteliais (Marker et al., 2003). Nos roedores, a região distal é rica em fibroblastos e apresenta esparsas células musculares lisas, enquanto na

região proximal ocorre o contrário, ou seja, o estroma é rico em células musculares lisas e apresenta esparsos fibroblastos (Nemeth & Lee, 1996).

1.4. Câncer de próstata e lesões neoplásicas

O Instituto Nacional do Câncer – INCA, estimou a ocorrência de 600 mil novos casos de cânceres no Brasil para cada ano, tanto no biênio 2016-2017 (INCA, 2015) quanto no biênio 2018-2019 (INCA, 2017). Embora não tenha ocorrido aumento na estimativa de casos de cânceres, houve aumento na estimativa de novos casos de câncer de próstata de 61.200 para 68.220. Também houve aumento na estimativa de incidência de câncer de próstata de 61,82 para 66,12 casos novos a cada 100 mil homens. Segundo esses dados, o câncer de próstata permanece como o mais incidente entre os homens em todas as Regiões do Brasil, desconsiderando o câncer de pele não melanoma.

Nos Estados Unidos, comparando os dados para os anos de 2017 e 2018, observa-se um aumento na estimativa de mortes por câncer de 600.920 para 609.640 com consequente aumento no número de óbitos por dia de 1650 para 1700. O câncer de próstata é o mais incidente em homens, com estimativa de 161.360 novos casos em 2017 e 164.690 novos casos em 2018, o que representa 19% dos casos novos diagnosticados em cada ano. Na estimativa de mortes, o câncer de próstata passou de 3º lugar com 26.730 mortes em 2017 para 2º lugar com 29.430 mortes em 2018, o que representa 8% e 9% das mortes por câncer em homens, nos respectivos anos (Siegel et al., 2017; Siegel et al., 2018).

O câncer de próstata parece ter origem multifatorial, e pode-se destacar como fatores de risco alterações de genes, dieta, idade, infecção, inflamação, bem como excesso de andrógenos e outros hormônios sexuais (Jemal et al., 2004; Donato et al., 2017).

A próstata pode apresentar diversas patologias como o adenocarcinoma prostático, a neoplasia intraepitelial próstática, a atrofia prostática e a atrofia inflamatória proliferativa. A Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) é definida como uma proliferação anormal com alterações nucleares nas células luminais, semelhante ao câncer de próstata e pode ser classificada como neoplasia intraepitelial próstática de baixo grau (LGPIN) ou de alto grau (HGPIIN) (Haggman et al., 1997). Geralmente, a HGPIIN é aceita como uma precursora da maioria dos adenocarcinomas invasivos na próstata (Haffner et al., 2016), e é caracterizada pela substituição das células

luminais normais por células neoplásicas, com núcleos grandes e hipercromáticos, e com a preservação da lâmina basal (Lee et al., 2011).

Outra patologia descrita na próstata é a atrofia prostática, identificada como uma redução dos ácinos e do estroma e, também, está relacionada com o adenocarcinoma prostático (De Marzo et al., 1999) e quando gera um foco inflamatório, desenvolve-se a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (De Marzo et al., 2003). No trabalho de De Marzo e colaboradores (1999), PIA é descrita como discretos focos proliferativos no epitélio nos ácinos com o aspecto da atrofia simples ocorrendo associação com a inflamação e indicam que a PIA pode levar de forma direta ao carcinoma ou de forma indireta por meio do desenvolvimento do PIN.

A progressão do câncer de próstata para um estágio metastático é um processo com diversas etapas envolvendo fatores de crescimento, hormônios e citocinas inflamatórias (Bok & Small, 2002).

1.5. Modelo de Indução Química por MNU

Há diversas maneiras de estudar o câncer de próstata e seu desenvolvimento, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vivo*, a indução química é a mais comum, quatro compostos são utilizados em estudos com modelo de carcinogênese prostática: o N-Metil-N-Nitrosureia (MNU), o N-nitrosobis 2-oxopropil amino (BOP), o 3,2' -dimetil-4-amino-bifenil (DMAB) e o 2-amino-1-metil-5-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP) (Shira et al., 2000).

O N-Metil-N-Nitrosureia (MNU) é um dos compostos nitrosos mais utilizados em ensaios de carcinogênese induzida quimicamente, tendo a capacidade de atuar como iniciador da carcinogênese em diversos tecidos como na mama, ovário, baço, rim e próstata. Pode ser administrado em água, intraperitonealmente, por vias subcutânea, oral, intravenosa, intragástrica, intra-uterina, intratraqueal, intravesical e intravaginal (Faustino-Rocha et al., 2015). Bosland e colaboradores (1983) obtiveram hiperplasia inflamatória e adenocarcinomas prostáticos em ratos Wistar com administração única de MNU associado com doses diárias de acetato de ciproterona seguido de testosterona. Bosland (1992) concluiu que o tratamento apenas com MNU causa baixa incidência de lesões prostáticas, assim como o tratamento isolado com testosterona. Mas modelos baseados em combinação de carcinógenos químicos, como o MNU, com posterior administração de testosterona são modelos de alta

incidência de carcinogênese. A testosterona aumenta a carcinogênese da próstata, sendo uma forte promotora de tumores na próstata de ratos.

1.6. Inflamação: aspectos gerais e relação com câncer de próstata

A inflamação é uma resposta imunológica às injúrias, infecção e mau funcionamento celular. Quando controlada, a inflamação induz o reparo tecidual, defesa contra patógenos, adaptação ao estresse e restauração da homeostase (Medzhitov, 2008). A inflamação é importante por conferir proteção imediata por meio da ativação das células e de produtos solúveis que constituem a resposta imune inata. Além disso, a inflamação cria um ambiente que inicia a resposta imune adaptativa. Entretanto, se não for controlada, a inflamação pode ser a principal causa de danos no tecido (Lodish et al., 2014). Em um estágio mais avançado de inflamação, pode ocorrer a metaplasia e crescimentos tumorais associados à autoimunidade e danos teciduais causados pelo aglomerado de células inflamatórias (Medzhitov, 2008).

Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação na próstata, como as infecções bacterianas e virais, os compostos carcinogênicos na dieta e alterações na razão entre testosterona e estradiol (T:E) (Puhr et al., 2016). Sabe-se que a inflamação crônica da glândula prostática, está associada a uma concentração maior de citocinas, interleucinas e fatores de crescimento que estimulam a divisão celular com maior probabilidade de mutações e modificações epigenéticas (Quagliariello et al., 2017). As citocinas têm sido classificadas com base em suas respostas biológicas (pró ou anti-inflamatórias), de acordo com os receptores utilizados ou de acordo com suas estruturas tridimensionais (Nicola, 1994).

Acredita-se que a inflamação estimule a carcinogênese, causando danos às células e ao genoma, promovendo a substituição celular e criando um microambiente tecidual rico em citocinas e fatores de crescimento que podem aumentar a replicação celular, angiogênese e tecidos de reparação (Cerutti & Trump, 1991; Hussain et al., 2003). Além de dados que apontam que processos inflamatórios estão relacionados ao desenvolvimento do câncer na próstata (Palapattu et al., 2005).

Segundo Mantovani e colaboradores (2004), estudos mostraram que a inflamação crônica predispõe indivíduos a vários tipos de câncer. Estima-se que infecções subjacentes e respostas inflamatórias estão ligadas de 15% a 20% a todas as mortes por câncer no mundo. Ho (2017) verificou que entre 35% a 100% das biópsias realizadas em homens com suspeita de câncer de próstata apresentaram

evidências histológicas de inflamação, demonstrando a relação entre câncer de próstata e inflamação.

Quagliariello e colaboradores (2017) relataram que a inflamação crônica contribui para a iniciação e progressão do câncer de próstata. Por exemplo, estudos de susceptibilidade genética mostraram que indivíduos com mutações específicas em genes que codificam proteínas com um papel fundamental na cascata de inflamação como IL-6, TNF α e IL-8 apresentaram maior risco de câncer de próstata em comparação com pacientes sem esse tipo de mutação, o que indica um papel essencial da inflamação na transformação maligna das células da próstata.

Existem dois tipos de resposta inflamatória: a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda, que é caracterizada principalmente pelo inchaço, há o aumento da permeabilidade vascular, induzida pelas aminas vasoativas produzidas por mastócitos e basófilos. Além disso, há migração de leucócitos pelo exsudato para o local da injúria, formando o edema característico. Na fase crônica, a inflamação é de duração prolongada, que pode levar de semanas a meses, e tem como principais características, que a distinguem da fase aguda, a destruição do tecido devido aos produtos das células inflamatórias e a posterior reparação tecidual e angiogênese (Kumar et al., 2012).

Há muitos gatilhos de inflamação crônica que aumenta o risco de desenvolver câncer, esses gatilhos incluem infecções microbianas, doenças autoimunes e condições inflamatórias de origem desconhecida, como a prostatite que está associada ao câncer da próstata (Mantovani et al., 2004). A inflamação crônica induz a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucinas (IL) e radicais livres, que podem levar à lesão no DNA celular (Wajant et al., 2003).

Há dois tipos de fatores de necrose tumoral (TNF), α e β , que atuam após ligarem-se aos seus receptores de membrana (TNFR) levando a uma série de respostas intracelulares, que tem como consequência a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B) (Chen & Goeddel, 2002). Dentre as principais funções do TNF α pode-se destacar a indução da produção de proteínas reativas da fase aguda pelo fígado e um efeito secundário estimulando algumas células a produzirem Interleucina-6 (IL-6) (Feghali & Wright, 1997).

IL-6 e TNF α , são citocinas com propriedades biológicas múltiplas e sobrepostas, estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de próstata (Shariat et al., 2001;

Smith et al., 2001). A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por diferentes tipos celulares como os linfócitos T e monócitos, e atua por meio de um complexo receptor de membrana, que é formado por receptor de IL-6 (IL-6R α) e uma glicoproteína 130 (gp130) (Heinrich et al., 1998).

Além dos receptores de TNF e IL, o processo inflamatório pode ser ativado pelos receptores Toll-Like (TLRs). Esses são expressos em células do sistema imunológico, mas também são expressos em células tumorais, onde podem influenciar o crescimento tumoral e as respostas imunitárias do hospedeiro (Huang et al., 2005). Os membros da família TLR são caracterizados estruturalmente pela presença de um domínio de repetições de leucina (LRR) no seu domínio extracelular, e um domínio receptor Toll/IL-1 (TIR) no seu domínio intracelular (Takeda et al., 2003).

Entre os TLRs, há o receptor Toll-Like 4 (TLR4) que reconhece patógenos por meio dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como os lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas (Zheng et al., 2004) e por meio dos padrões moleculares associados a danos endógenos (DAMPs), como a fibronectina que é liberada durante o processo inflamatório (Awasthi, 2014). Os TLRs são expressos tanto em células do sistema imune, quanto em células tumorais de diversos tecidos, como da mama, pulmão, colo e próstata, podendo influenciar as respostas imune e o crescimento tumoral (Huang et al., 2005).

A via de sinalização da família TLR é homóloga à da família IL-1R. Tanto TLR como IL-1R interagem com uma proteína adaptadora mielóide 88 (MyD88), que tem um domínio TIR na sua porção C-terminal e um domínio de morte na sua porção N-terminal, ao contrário dos TLRs que possuem um domínio transmembrana. O MyD88 associa-se tanto com os TLRs, quanto com IL-1R, por meio da interação entre os respectivos domínios TIR. Após estimulação, MyD88 recruta o domínio de morte contendo uma serina/treonina quinase, a quinase associada a IL-1R (IRAK). IRAK é ativado pela fosforilação e, em seguida, associa-se com Fator 6 associado ao TNFR (TRAF6), levando à ativação de duas vias de sinalização distintas, *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) e NF κ B (Muzio et al., 1997; Medzhitov et al., 1998).

A proteína NF κ B faz parte de uma família de proteínas de transcrição nuclear compostas por cinco membros: NF κ B p50 (p105/ NF- κ B1), NF κ B p52 (p100/NF κ B2), p65 (RelA), RelB e c-Rel. NF κ B p50 e NF κ B p52 são sintetizados respectivamente como precursores maiores, p105 e p100, os quais são clivados no processo pós-

traducional de DNA nas subunidades p50 e p52 (Gilmore, 1999). O NF κ B é uma proteína citosólica, que em sua forma inativa, está ligada covalentemente ao inibidor de κ B (I κ B). Quando o NF κ B é ativado, ele se dissocia do I κ B e é translocado para o núcleo da célula (Ranjan & Baltimore, 1986).

Segundo Baldwin Junior (2001), a ativação de NF κ B está relacionada à vários tipos de doenças encontradas em humanos como: asma, inflamação colorretal e AIDS. Além disso, tem um papel central na regulação da transcrição de genes relacionados ao câncer, promovendo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, proteínas anti-apoptóticas e reguladores de ciclo celular.

A ativação do NF κ B realizada pelas citocinas pró-inflamatórias como TNF α , Interleucina 1 (IL-1) e pelos receptores do tipo Toll-like é conhecida como via canônica ou clássica. Na via canônica, a ativação do NF κ B é controlada pelo complexo I κ B quinase (IKK), composto pelas subunidades IKK α e IKK β e uma subunidade regulatória IKK γ também conhecida como NEMO (modulador essencial de NF κ B) (Figura 6) (Israel, 2010).

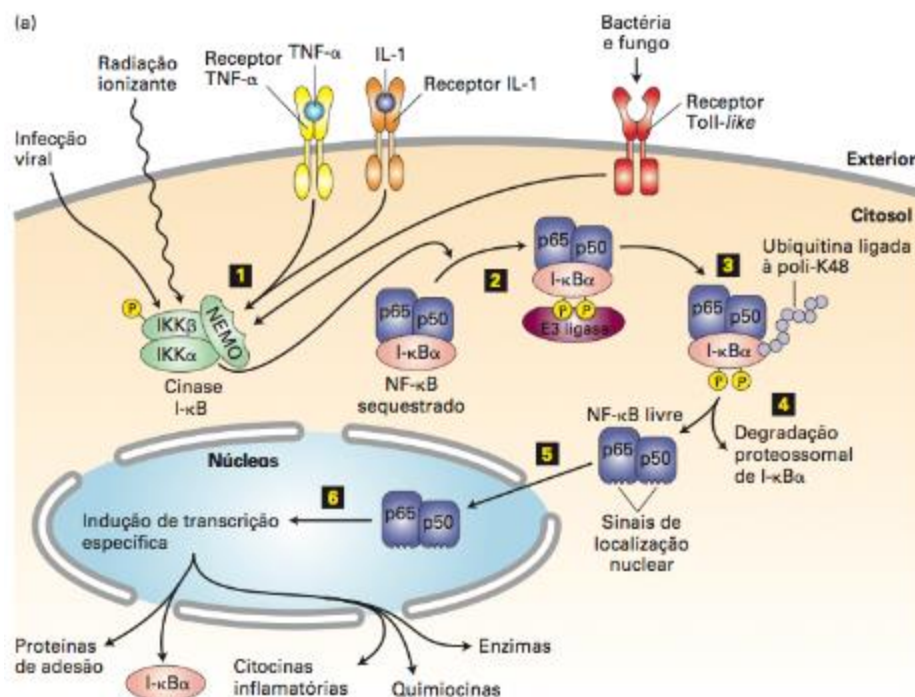


Figura 6: Ativação da via de sinalização de NF- κ B, Etapa 1: ativação do complexo I κ B quinase por diversos fatores. Etapa 2: fosforilação de I κ B pelo complexo IKK e ligação da enzima ubiquitina E3 ligase para posterior ubiquitinação. Etapas 3 e 4: poliubiquitinação e degradação proteossomal do I κ B. Etapa 5: livre de seu inibidor o NF- κ B sofre translocação nuclear. Etapa 6: No núcleo NF- κ B ativa transcrição de vários gene-alvo, incluindo genes que codificam citocinas inflamatórias e promovem a síntese de I κ B. (Adaptado de Lodish et al., 2014)

O complexo IKK é ativado por proteínas da família das MAP quinases, em uma cascata de reações, cuja função é fosforilar as subunidades IKK α e IKK β com propriedades catalíticas (Suh et al., 2002). Devido à alta afinidade pelo I κ B, IKK α e IKK β fosforilam o I κ B resultando na ubiquitinação do mesmo e posterior degradação pelo proteossoma 26s. Livre de seu inibidor, o NF κ B é translocado para o núcleo onde realizará a transcrição de genes específicos (Karin & Greten, 2005).

O NF κ B normalmente é regulado pelo mecanismo de retroalimentação negativa, pois tem a capacidade de transcrever o gene para produção de I κ B, mas, em doenças como o adenocarcinoma prostático humano, foi relatada a ativação constante do fator, o que está relacionado com a progressão tumoral (Shukla et al., 2004). A ativação de NF κ B mediada por TNF α exibe dois padrões de resposta: a primeira é de curta duração, caracterizada por intensa regulação por retroalimentação negativa, que logo inativa o NF κ B. A segunda é caracterizada por longa exposição à TNF α , causando um padrão oscilatório de ativação e inativação de NF κ B, mediada pela transcrição e destruição de I κ B, alguns genes-alvo do processo de carcinogênese só são transcritos na fase oscilatória (Alberts et al., 2017).

Nguyen e colaboradores (2014) mostraram que a ativação de NF κ B tem sido reconhecida como o maior efetor de processos pró-inflamatórios, bem como da patogênese na próstata. As citocinas inflamatórias favorecem a formação de complexos de NF κ B para sinalização anti-apoptótica em células do câncer de próstata. A via de sinalização do NF κ B desempenha papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse (Pahl, 1999), além de participar de processos celulares fundamentais, como a apoptose, proliferação e diferenciação (Figura 7) (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005).

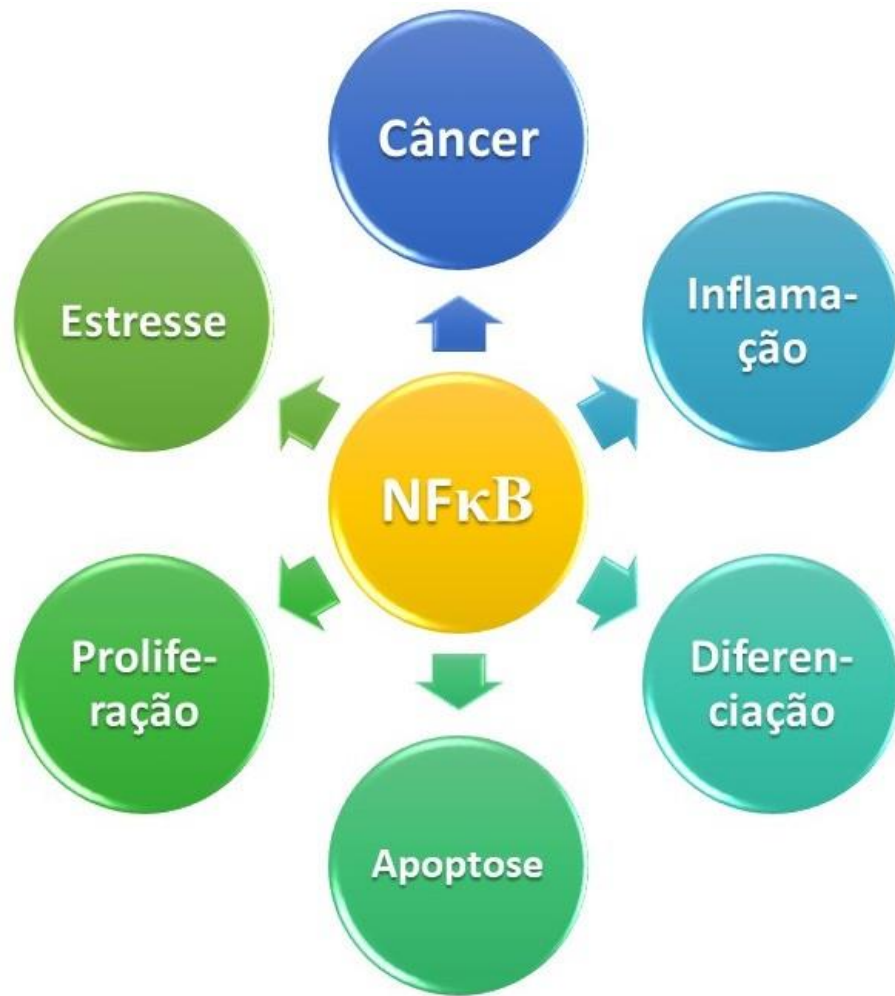


Figura 7- Esquema demonstrando relação da via de sinalização do NFκB nas respostas ao câncer, inflamação, estresse e processos celulares fundamentais. (Adaptado de Pahl, 1999; Pham et al., 2004; Luo et al., 2005).

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a influência do praguicida Diclorvós em concentrações permitidas na próstata ventral de ratos em situação controle e após indução química por MNU (N-metil-N-nitrosureia), sobre a inflamação mediada por TLR4.

2. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.P. **A Química e a Guerra. Química e Sociedade**. V.1, Escolar Editora e Sociedade Portuguesa de Química, 1990.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 873-874.
- ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre agrotóxicos**. Série trilha de campo. 2011
- APOLINÁRIO, L. M. **Efeitos da imunoterapia com PMAPA associada à terapia antiangiogênica no tratamento de lesões prostáticas quimicamente induzidas em ratos**. 2016. 142 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- APVMA. “DICHLORVOS - Toxicology Assessment: The reconsideration of approvals of the active constituent, registrations of products containing dichlorvos and approvals of their associated labels.” **Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority**, KINGSTON ACT 2604; 2008.
- AWASTHI, S. Toll-like receptor-4 modulation for cancer immunotherapy. **Front. Immunol.** v. 5, p. 1-5, 2014
- BALDWIN JR, A. The transcription factor NF- κ B and human disease. **J. Clin. Invest.** v. 107, n. 1, 2001.
- BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jan 1990.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BOSLAND, C. M. Animals models for the study of prostate carcinogenesis. **J. Cell. Biochem.** v. 16, p. 89-98, 1992.
- BOSLAND, C. M.; PRINSEN, K. M.; KROES, R. Adenocarcinomas of the prostate induced by N-nitroso-N-methylurea in rats pretreated with cyproterone acetate and testosterone. **Cancer Lett.** v. 18, p. 69-78, 1983.
- BOK, R. A.; SMALL, E. J. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. **Nat. Rev. Cancer.** v.2, p.918-926, 2002.
- CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- CERUTTI, P. A.; TRUMP, B. F. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis **Cancer Cells**, v. 3, p. 1–7, 1991.
- CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1634-1635, 2002.

- CRUZ-ALCADE, A.; SANS, C. ESPLUGAS, S. Priority pesticide dichlorvos removal from water by ozonation process: reactivity, transformation products and associated toxicity. **Sep Purif Technol.** v.192, p.123–129, 2018.
- DE MARZO, A. M. et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. **Urology.** v. 62, p.55-62, 2003.
- DE MARZO, A. M. et al. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for carcinogenesis. **Am J Pat,** v. 155, n. 6, p.1985-1992, 1999.
- DONATO, M. et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.** p. 1-8, 2017.
- ENCOP. **Controle de Pragas/ inseticidas organofosforados.** Disponível em: <www.encoppragas.com.br/organofosforado_96.html> Acesso em 13 jun. 2018.
- European Workshop on Endocrine Disruptors*, European ED workshop, Aronsborg (Balsa) Sweden, 2001.
- FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. **Tumor Biol.** v. 36 (2), p. 9095–9117. 2015
- FAVARO, W.J. Laboratorio de Carcinogenese Urogenital e Imunoterapia – Instituto de Biologia – UNICAMP. Comunicação pessoal. 2014.
- FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci,** v. 2, n. 1, p. d12-d26, 1997.
- FIGUEROA, M. N. **Estudo epidemiológico do câncer de pênis e dos marcadores tumorais p53, TNF α , c-MYC, Toll-like e MMP-2.** 2014. 91 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014
- FINE S. W.; REUTER, V. E. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. **Histopathology.** v. 60, p. 142–152, 2012.
- GAN, Q. et al. Kinetics and mechanism of degradation of dichlorvos in aqueous solutions containing reduced sulfur species. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 5717-5723, 2006.
- GARCIA, E. G.; BUSSACOS, M. A.; FISCHER, F. M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Rev. Saúde Pública.** v. 39, n. 5, p. 832-839, 2005.
- GILMORE, T. The Rel/ NF- κ B signal transduction pathway: introduction. **Oncogene.** v. 18, n. 49, p. 6842-6844, 1999.
- HAFFNER, M. C. et al. Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. **J. Pathol.** v. 23, p. 31–41, 2016
- HAGGMAN, M. J. et al. The Relationship Between Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostate Cancer. **J. Urology.** v. 158, p. 12-22, 1997.
- HAYASHI, N. et al. Morphological and Functional Heterogeneity in the Rat Prostatic Gland. **Biol. Reprod.** v. 45, p. 308-321, 1991.

- HEINRICH, P. C. et al. Interleukin 6-type cytokine signaling through the gp130/jak/stat pathways. **Biochem. J.** v. 334, p. 297, 1998.
- HO, D-R. Prostate inflammation: A brief review. **Urol. Sci.** p.1-6, 2017.
- HUANG, B. et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 218-224, 2008.
- HUANG, B. et al. Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. **Cancer Res.** v.65, n.12, p. 5009-5014, 2005.
- HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nature Rev. Cancer.** v. 3, p. 276–285, 2003.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2015.
- ISRAËL, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. **Csh. Perspect Biol.** v. 2, a000158, 2010.
- JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** v. 54 p. 8-29, 2004.
- JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **Prostate**, v.3, p.81-97, 1982.
- KARIN, M.; GRETEN, F. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature.** v. 5, n.1, p. 749-759, 2005.
- KHARLYNGDOH, J. B.; OLSSON, P-E. Endocrine Disrupting Compounds and Prostate Cell Proliferation. **Clin. Oncol.** v.1, p. 1116, 2016.
- KOUTROS, S. et al. Dichlorvos exposure and human cancer risk: results from the Agricultural Health Study. **Cancer Causes Control.** vol. 19, p. 59-65, 2008.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. Robbins basic pathology. **Elsevier Health Sciences.** 2012.
- KUO, C. H. et al. Immunomodulatory effects of environmental endocrinedisrupting chemicals. **Int. J. Med. Sci.**, v. 28, p. 37-42, 2012.
- LEE, C. et al. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. **Biol. Reprod.** v. 43, p.1079-86, 1990
- LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrin. Metab. Clin.** v. 40, n. 3, p. 565-575, 2011.
- LI, Z.; JENNINGS A. A. Implied Maximum Dose Analysis of Standard Values of 25 Pesticides Based on Major Human Exposure Pathways. **AIMS Public Health.** v. 4, p. 383-398, 2017.
- LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular.** 7ª Ed., Artmed Editora. 2014. 1210p.

- LUO, J. L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. **J. Clin. Invest.** v.115, p.2625–2632, 2005.
- MACCIÒ, A.; GRAMIGNANO, G.; MADEDDU, C. A Multitargeted Treatment Approach for Anemia and Cachexia in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **J. Pain Symptom Manage.** v. 50, n. 2, p. 1-4, 2015.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature.** v. 454, n.24. 2004.
- MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular and molecular control of prostate developmental. **Develop. Biol.**, v. 253, p. 165-74, 2003.
- MCNEAL, J. E. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate**, v. 2, n. 1, p. 35-49, 1981.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature.** v. 454, n. 24, 2008.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol. Cell** v. 2, p. 253-58, 1998.
- MILLS, P. K.; YANG, R. Prostate cancer risk in California farm workers. **J. Occup. Environ. Med.** v. 45, p. 249–58, 2003.
- MNIF W. et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** vol. 8(6), p. 2265-303. 2011.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica.** 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 376-378.
- MUZIO, M. et al. (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science.** v. 278, p.1612–15, 1997.
- carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. **Prostate.** v.69, p.133 -141, 2009.
- NEMETH, J. A.; LEE C. Prostatic Ductal System in Rats: Regional Variation in Stromal Organization. **Prostate.** v. 28, p. 124-128, 1996.
- NETTER, F. H. **Atlas de anatomía humana.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 6ed.
- NGUYEN, D. P. et al. Recent insights into NF-κB signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. **BJU Int.** v. 114, p. 168-176, 2014.
- NICOLA, N. A. (ed.) Guidebook to Cytokines and their Receptors. **Oxford University Press.** Oxford. p. 1-7, 1994.
- OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO, S. A. S. Quantificação do pesticida Diclorvós por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. **Quim. Nova.** v. 27, n. 6, p. 911-915, 2004.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene.** v.18, p. 6853– 6866, 1999.
- PALAPATTU, G. S. et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights, **Carcinogenesis.** v. 26, n. 7, p. 1170–1181, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUNOIS, G. S. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. cap 1.

PHAM, C.G. et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. **Cell**. v.119, p.529–542, 2004

PIGNATI, W. A; MACHADO, J. M. H. O agronegócio e seus impactos na saúde dos trabalhadores e da população do estado de Mato Grosso. *In*: GOMEZ, CM; MACHADO, JMH; PENA PGL (orgs.). **Saúde do trabalhador na sociedade brasileira contemporânea**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011.

PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endoc.-Relat. Cancer**. v. 15, n. 3, p. 649–656, 2008.

PUHR, M. et al. Inflammation, Microbiota and Prostate Cancer. **Eur. Urol. Focus**. v.2, p. 374 – 382, 2016.

QUAGLIARIELLO, V. et al. Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. **Oncotarget**. v. 8, p. 30606-30616, 2017.

RANJAN, S.; BALTIMORE, D. Inducibility of K Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NFkB by a Posttranslational Mechanism. **Cell**. v. 47, p. 921-926, 1986.

ROUILLER-FABRE V. et al. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. **Front. Endocrinol**. v. 6, p. 1-13, 2015.

ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrinol. Relat. Cancer**. v. 11, p. 225-254, 2004.

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

SHARIAT, S. F. et al. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. **Urology**. v. 58, p.1008-1015, 2001.

SHIRA, T. et al. Experimental prostate carcinogenesis: rodent models. **Mutat. Res**. v. 462, p. 219-226, 2000.

SHUKLA, S.. et al. Nuclear factor-κB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. **Neoplasia**. v. 6, p. 390–400, 2004,

SIEGEL, L. R.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **Ca Cancer J. Clin**. v. 68, p. 7- 30, 2018.

SIEGEL, L. R.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **Ca Cancer J. Clin**. v. 67, p. 7- 30, 2017.

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

- SILVA, M. P. **Determinação de pesticidas organofosforados através de método enzimático.** Universidade Estadual de Campinas, tese de doutorado, Instituto de Química, Campinas, 2011.
- SLAYTER, M. V. et al. Histogenic of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. **Cancer Res.** v. 54, p. 1440-1445, 1994.
- SMITH, P. C. et al. Interleukin-6 and prostate cancer progression. **Cytokine Growth F. R.** v. 12, p. 33-40, 2001
- SOTO, A., SONNENSCHNEIN, C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens **Nat. Rev. Endocrinol.** v. 6, p. 363-370, 2010.
- SUH, J. et al. Mechanisms of Constitutive NF- κ B Activation in Human Prostate Cancer Cells. **Prostate.** v.52 n.1 p.183-200, 2002.
- TABB, M.M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine disrupting chemicals. **Mol. Endocrinol.** v. 20, p. 475-482, 2006.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.** v. 21, p. 335-76, 2003.
- TIMMS, B. G.; MOHS, T. J.; DIDIO, L. J. A. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **J. Urology.** v. 151, p.1427-1432, 1994
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. DDVP: Risk Assessment Issues for the FIFRA Science Advisory Panel, July 8, 1998.
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE. Hazardous Substance Data Bank, Washington DC 5, 1995.
- VOMMARO, A. et. al.; **Praguicidas organofosforados e sua toxicidade.** Universidade do Vale do Rio Doce, Monografia de conclusão do curso de Farmácia Generalista da Faculdade de Ciências da Saúde, Governador Valadares, 2010.
- WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor Necrosis Factor Signaling. **Cell Death Differ.** v.10, p. 45-65, 2003
- XUE, L. et al. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. **Carcinogenesis.** v.18, n.5, p. 995-999, 1997.
- ZHANG, Q.; QU, X.; WANG, W. Mechanism of OH-initiated atmospheric photooxidation of dichlorvos: a quantum mechanical study. **Environ. Sci. Technol.** v. 41, p. 6109- 6116, 2007.
- ZHENG, S. L. et al. Sequence Variants of Toll-Like Receptor 4 Are Associated with Prostate Cancer Risk: Results from the CAncer Prostate in Sweden Study. **Cancer R.** v.64, p.2918–2922, 2004.

3. CAPITULO 1

DICLORVÓS PROMOVE ALTERAÇÕES NA IMUNOLocalIZAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS

RESUMO

Objetivo: Este estudo buscou imunolocalizar marcadores moleculares envolvidos no processo inflamatório como o TLR4, NFκB e TNFα na próstata ventral de ratos em situação controle e após exposição ao DDVP associado ou não a indução química por MNU

Materiais e métodos: Foram utilizados 40 ratos da linhagem Fischer 344, com idade de 90 dias. Os ratos foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Sham (G1), Sham+DDVP (G2), MNU (G3), MNU+DDVP (G4). Para indução química, G3 e G4 foram inoculados com MNU a 15 mg/kg, seguido de injeções subcutâneas diárias de 2,5 mg/kg de cipionato de testosterona durante 20 dias. Os animais dos grupos G2 e G4, de 120 a 240 dias de idade receberam a dieta basal suplementada com 10 mg/kg de DDVP. Foram feitas análises imunohistoquímicas da próstata ventral.

Resultados: Foram encontrados três tipos de lesões na próstata ventral de ratos: Displasia, Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) e Neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPI). O TLR4 esteve presente nas células epiteliais luminais da próstata ventral de todos os grupos experimentais. Nos grupos G1, G2 e G3 houve marcação em todo citoplasma, sendo a marcação mais intensa na região do aparelho de Golgi e no grupo G4 essa marcação foi moderada na região do aparelho de Golgi e intensa na membrana apical das células. O TNFα foi detectado em todo citoplasma das células epiteliais luminais da próstata ventral de todos os grupos experimentais destacando-se intensamente na região apical e moderadamente na região do aparelho de Golgi. O NFκB foi imunolocalizado em todo citoplasma das células epiteliais luminais da próstata ventral em todos os grupos experimentais, sendo mais intenso na região apical. Os grupos G1 e G2 apresentaram imunorreatividade intensa na região apical e somente os grupos G3 e G4 apresentaram imunorreatividade no envoltório nuclear.

Conclusão: Concluímos que o DDVP em concentrações permitidas altera a imunolocalização dos marcadores TLR4, TNFα e NFκB na próstata ventral de ratos. Além disso, o DDVP associado à indução química pode acentuar essas alterações dos marcadores.

Palavras-chaves: Diclorvós, inflamação, próstata, TLR4, TNFα e NFκB

INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190% nos últimos dez anos, enquanto o mercado mundial cresceu 93%. Em 2010, o mercado nacional representou 19% do mercado global de agrotóxicos (Dossiê Abrasco, 2015). Os organofosforados, como o Diclorvós (DDVP), são um dos mais utilizados devido à sua eficiência e relativa

baixa toxicidade (Zhang et al., 2007) e são desreguladores endócrinos (DE) (Bila & Dezotti, 2007).

Os DEs podem perturbar a homeostase mantida por hormônios e resultar em defeitos de desenvolvimento neural e anomalias do sistema endócrino e reprodutivo (Tabb & Blumberg, 2006). Os DEs podem perturbar o eixo hipotálamo-hipófise-testículo afetando o sistema endócrino e as funções reprodutivas, e podem também, causar câncer de testículo e de próstata (Sikka & Wang, 2008; Schug et al., 2011), bem como induzir alterações reprodutivas, obesidade, alterações comportamentais e inflamação (Soto & Sonnenschein, 2010).

O câncer de próstata assumiu, nestes últimos anos, o primeiro lugar em incidência de neoplasias nos Estados Unidos (Siegel 2018), e no Brasil estima-se 66,12 casos novos a cada 100 mil homens, sendo o câncer mais comum entre os homens (INCA 2017). O câncer de próstata parece ter origem multifatorial, e pode-se destacar como fatores de risco alterações de genes, dieta, idade, infecção, inflamação, bem como excesso de andrógenos e outros hormônios sexuais (Jemal et al., 2004; Donato et al., 2017). Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação na próstata, como as infecções bacterianas e virais, os compostos carcinogênicos na dieta e alterações na razão entre testosterona e estradiol (T:E) (Puhr et al., 2016). Sabe-se que a inflamação crônica da glândula prostática, está associada a uma concentração maior de citocinas, interleucinas e fatores de crescimento que estimulam a divisão celular com maior probabilidade de mutações e modificações epigenéticas (Quagliariello et al., 2017).

Acredita-se que a inflamação estimule a carcinogênese, causando danos às células e ao genoma, promovendo a substituição celular e criando um microambiente tecidual rico em citocinas e fatores de crescimento que podem aumentar a replicação celular, angiogênese e tecidos de reparação (Cerutti & Trump, 1991; Hussain et al., 2003). Além de dados que apontam que processos inflamatórios estão relacionados ao desenvolvimento do câncer na próstata (Palapattu et al., 2005).

O processo inflamatório predispõe os indivíduos a vários tipos de câncer, pois induz a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) que está envolvida no desenvolvimento do câncer de próstata (Shariat et al., 2001; Smith et al., 2001). A inflamação pode ser ativada pelos receptores Toll-Like, como o Receptor Toll-Like 4 (TLR4) que pode resultar na ativação de duas vias, fator de transcrição

nuclear kappa B (NFκB) e a *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) (Muzio et al., 1997; Medzhitov et al., 1998). A via de sinalização do NFκB desempenha papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse, além de participar de processos celulares fundamentais, como a apoptose, proliferação e diferenciação (Pahl, 1999; Pham et al., 2004; Luo et al., 2005).

Portanto, o objetivo desse estudo foi imunolocalizar marcadores moleculares envolvidos no processo inflamatório como TLR4, NFκB e TNFα na próstata ventral de ratos em situação controle e após exposição ao DDVP associado ou não a indução química por MNU.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo animal

No trabalho foram utilizados 40 ratos da linhagem Fischer 344 com 90 dias de idade, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

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

Grupos experimentais

Foram formados aleatoriamente 4 grupos experimentais com 10 animais por grupo: G1: Controle (Sham); G2: Controle (Sham) + DDVP; G3: Indução MNU; G4: Indução MNU + DDVP. Os animais de todos os grupos foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/kg intra-peritonal) e Cloridrato de cetamina 10% (50mg/kg, intra-peritonal) antes da realização do procedimento cirúrgico.

Aos 90 dias, foi realizada uma incisão suprapúbica para a inoculação de citrato de sódio 1M, pH 6,8 para a simulação da indução nos animais dos grupos G1 e G2 e de MNU na dose de 15 mg/Kg dissolvida em citrato de sódio 1M pH 6,8 para indução química nos animais dos grupos G3 e G4. As inoculações foram realizadas na cápsula da próstata ventral dos ratos.

Após o procedimento cirúrgico os animais de todos os grupos experimentais receberam Paracetamol (200mg/kg) diluídos na água do bebedouro durante 5 dias para analgesia (80μg/mL).

Após a administração do MNU, os animais dos grupos G3 e G4 receberam injeções subcutâneas diárias de 2,5mg/Kg de Cipionato de Testosterona (Deposteron-Novaquímica, São Paulo, Brasil) por 20 dias (FAVARO, 2014).

A partir dos 120 dias de idade os animais dos grupos G2 e G4 receberam ração basal enriquecida com 10 mg/Kg de DDVP até 240 dias de idade.

O delineamento experimental é apresentado na Figura 1.

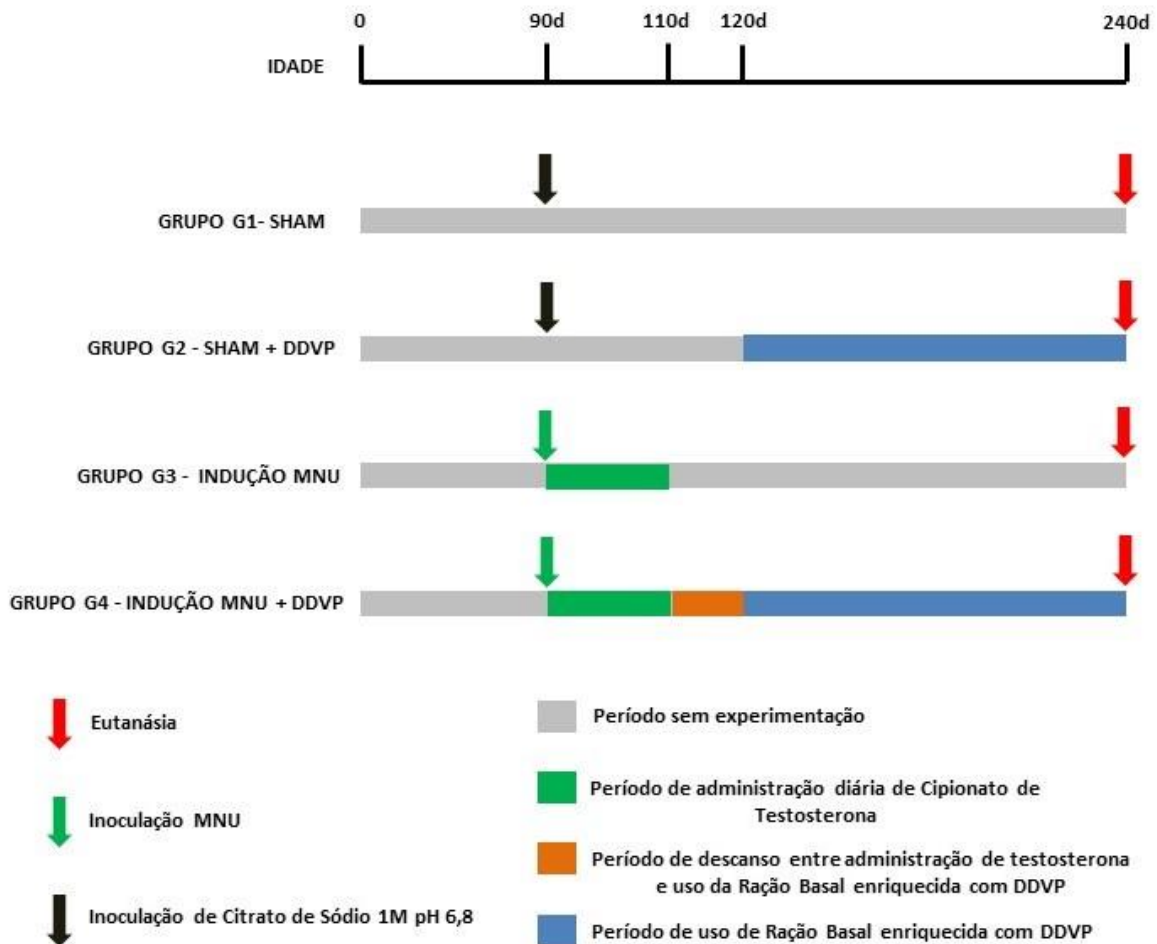


Figura 1

Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados e submetidos à avaliação clínica semanal durante todo o período experimental. Qualquer alteração foi registrada em ficha clínica individual. Diante da detecção de morbidade, sofrimento ou morte eminente, o animal foi eutanasiado.

Aos 240 dias de idade foi induzida morte dos animais por excesso de anestésicos via intra-peritonal (Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de cetamina 10%), seguida de decapitação.

Todos os protocolos seguiram os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a regulamentação estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (processo nº996/46/01/2013 – CEUA/FC) (Anexo 1).

Forma de análise dos resultados

Análise histopatológica

Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente por 24h. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de álcoois e incluídos em polímero plástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Depois, os blocos foram seccionados em micrótomo com espessura de 5 µm e os cortes colocados em lâminas histológicas silanizadas para posterior análise histopatológica e imunohistoquímica.

Para análise histopatológica, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e fotografadas em fotomicroscópio. O diagnóstico das lesões prostáticas foi baseado em critérios morfológicos de acordo com Apolinário (2016) e Shappell e colaboradores (2004).

Análise imunohistoquímica

Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente por 24h. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de álcoois e incluídos em polímero plástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Depois, os blocos foram seccionados em micrótomo com espessura de 5 µm e os cortes colocados em lâminas histológicas silanizadas para posterior análise imunohistoquímica.

Para análise imunohistoquímica, os cortes histológicos foram colocados sobre lâminas silanizadas. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em uma série de álcoois com concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%). A técnica de imunohistoquímica foi padronizada de acordo com o protocolo do fabricante para cada anticorpo (anti-TLR4 abbiotec 251111; Anti-TNFα orb129753; anti-NFkb ab7970).

O método para a análise de imunorreatividade utilizado nesse experimento foi adaptado do método proposto por Apolinário (2016), a avaliação da imunorreatividade foi sob três aspectos: localização celular da marcação, o percentual de células marcadas e a intensidade de marcação.

A localização celular da marcação foi analisada em quatro possíveis regiões celulares: região apical, aparelho de Golgi, região supranuclear e núcleo.

A Intensidade de Marcação foi classificada em marcação: leve, moderada e intensa. Para cada compartimento celular uma nota de 0 a 3 foi determinada baseada no percentual de células marcadas (PCM) e na Intensidade de Marcação (Int).

Para o Percentual de Células Marcadas (PCM), foram adotados os seguintes critérios: Nota 0: nenhuma célula marcada; Nota 1: $0\% < n^{\circ}$ de células marcadas $\leq 50\%$; Nota 2: $50\% < n^{\circ}$ de células marcadas $< 100\%$; Nota 3: 100% de células marcadas.

A Intensidade de Marcação (Int) foi atribuída da seguinte forma: Nota 0: sem marcação; Nota 1: leve; Nota 2: moderada; Nota 3: intensa.

A atribuição de nota para a marcação em cada possível compartimento celular seguiu a fórmula: $\text{Nota} = (\text{PCM})^{\text{int}}$, sendo $\text{PCM} > 0$ e $\text{int} > 0$. Quando não houve marcação ($\text{PCM} = 0$ e $\text{int} = 0$), não foi atribuída nota.

RESULTADOS

Análise Histopatológica

Na análise histopatológica, foram encontrados dois tipos de lesões na próstata ventral de ratos: Displasia e Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). A Displasia foi caracterizada como um tipo de lesão com organização anormal ou uma diferenciação celular desordenada, manifesta-se por variação da maturação citoplasmática associada a alterações nucleares. A PIN foi caracterizada pela proliferação neoplásica de células epiteliais atípicas, dentro de membranas basais preexistentes ou normais. Essa proliferação pode ser reconhecida como a estratificação de células epiteliais com atipia nuclear, o que conduz à aquisição de um padrão micropapilar ou crescimento cribiforme. (Shapell et al., 2004).

A HGPIN caracterizou-se por proliferação focal do epitélio, com intensidade variável de atipias citológicas identificadas através de núcleos volumosos e nucléolos proeminentes. As células epiteliais basais foram caracterizadas não demonstrando desorganização estrutural (Apolinário, 2014).

No grupo G1 não foi encontrada nenhuma lesão. No grupo G2, foram encontradas displasia e PIN, sendo mais prevalente PIN. No grupo G3, a única lesão encontrada foi PIN. No grupo G4, foram encontradas PIN e HGPIN (Figura 1). A frequência de cada tipo de lesão em cada um dos grupos experimentais encontra-se na tabela 1.

Tabela 1. Avaliação histopatológica da próstata ventral de ratos.

Lesões	Grupos			
	G1 (n=5)	G2 (n=5)	G3 (n=5)	G4 (n=5)
D	-	40%	-	-
PIN	-	60%	100%	60%
HGPIN	-	-	-	40%

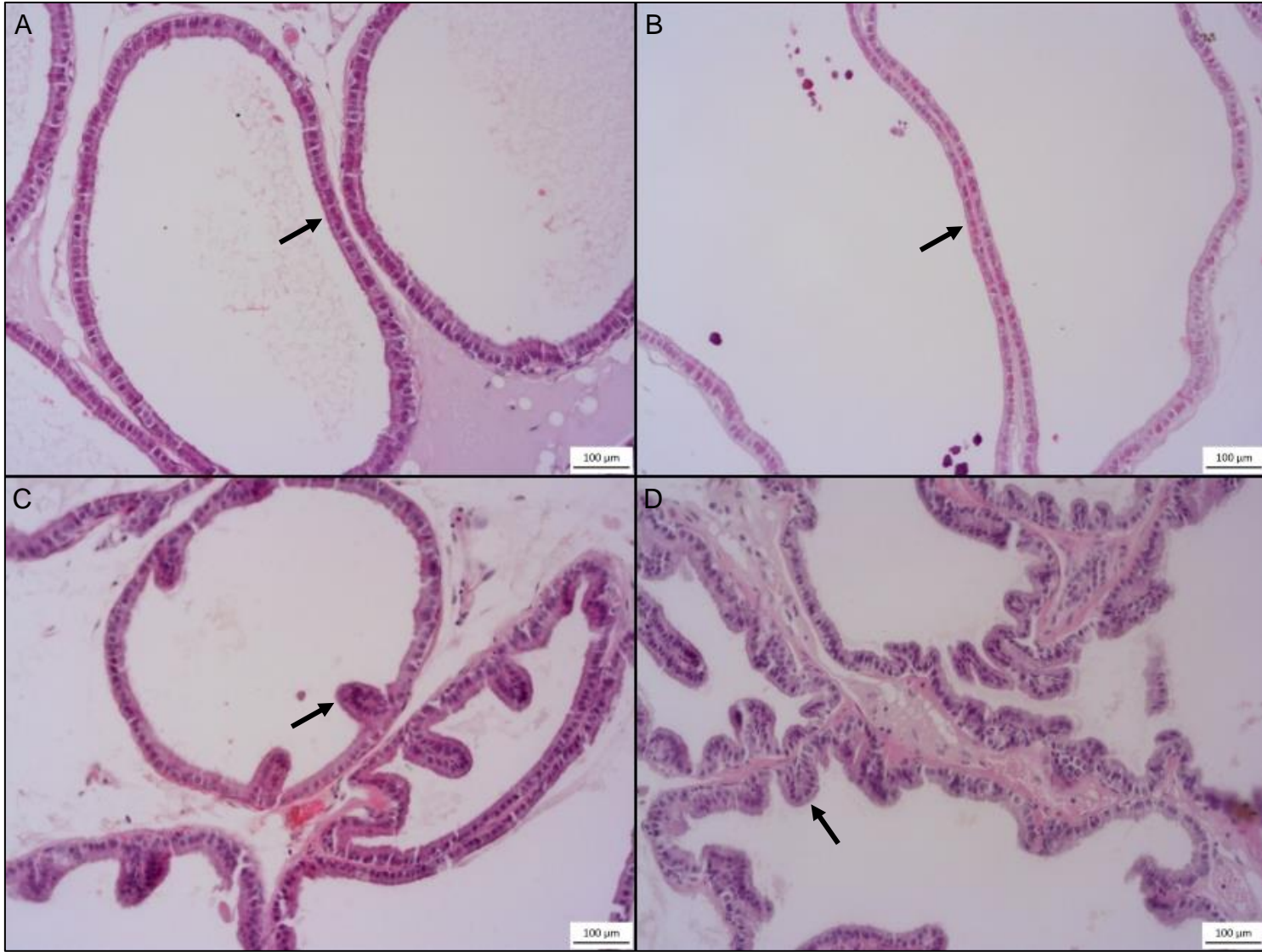


Figura 2

TLR4

Nas análises de imunolocalização, detectou-se a presença de TLR4 nas células epiteliais luminais. Nos grupos G1, G2 e G3 houve marcação em todo citoplasma da célula, sendo a marcação mais intensa da região do aparelho de Golgi. Já no grupo G4, também, houve marcação em todo citoplasma, porém com intensidade moderada no aparelho de Golgi e intensa na membrana apical das células epiteliais luminais (Figura 2).

A intensidade de imunorreatividade foi intensa nos grupos G1, G2 e G3 e moderada no G4.

Quadro 1. Percentual de células marcadas (PCM) e intensidade de marcação (Int) para TLR4 em cada compartimento celular para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Proteína	Grupos	Compartimentos							
		Apical		Golgi		SN		Núcleo	
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int
TLR4	G1	0	0	2	3	0	0	0	0
	G2	0	0	2	3	0	0	0	0
	G3	0	0	2	3	0	0	0	0
	G4	0	0	2	2	0	0	0	0

Quadro 2. Valor da nota para marcação de TLR4 em cada compartimento celular. A (apical), G (aparelho de Golgi), SN (supranuclear) e N (núcleo).

Grupos	Valor da nota por compartimento			
	A	G	SN	N
G1	0	8	0	0
G2	0	8	0	0
G3	0	8	0	0
G4	0	4	0	0

TNF α

Em análises de imunolocalização foram detectadas marcações de TNF α em todo citoplasma das células epiteliais luminais e no estroma da próstata ventral de todos os grupos experimentais, destacando-se imunorreatividade intensa na região apical e moderada na região do aparelho de Golgi das células epiteliais luminais (Figura 3)

Comparando a intensidade de imunorreatividade, verificamos que os grupos G1, G2 e G3 tiveram mesmo padrão de intensidade da imunorreatividade, sendo forte nos três grupos. Já o grupo G4 apresentou intensidade de imunorreatividade moderada.

Quadro 3. Percentual de células marcadas (PCM) e intensidade de marcação (Int) para TNF α em cada compartimento celular para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Proteína	Grupos	Compartimentos							
		Apical		Golgi		SN		Núcleo	
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int
TNFα	G1	3	3	3	2	0	0	0	0
	G2	3	3	3	2	0	0	0	0
	G3	3	3	3	2	0	0	0	0
	G4	2	2	2	2	0	0	0	0

Quadro 4. Valor da nota para marcação de TNF α em cada compartimento celular. A (apical), G (aparelho de Golgi), SN (supranuclear) e N (núcleo).

Grupos	Valor da nota por compartimento			
	A	G	SN	N
G1	27	9	0	0
G2	27	9	0	0
G3	27	9	0	0
G4	4	4	0	0

NF κ B

Nas análises de imunolocalização, todos os grupos experimentais apresentaram marcação em todo citoplasma das células epiteliais luminais e no estroma da próstata ventral de ratos, sendo essa marcação mais intensa na região apical das células epiteliais luminais (Figura 4). Além disso, nos grupos G1 e G2 nota-se a presença de complexos proteicos imunorreativos dispersos na célula.

Nota-se que os grupos G1 e G2 apresentaram imunorreatividade intensa na região apical e somente os grupos G3 e G4 apresentaram imunorreatividade no núcleo e no envoltório nuclear.

Nas análises de intensidade de imunorreatividade, os grupos experimentais G3 e G4 apresentaram marcação fraca, enquanto o grupo G1 moderada e G2 marcação intensa.

Quadro 5. Percentual de células marcadas (PCM) e intensidade de marcação (Int) para NFkB em cada compartimento celular para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Proteína	Grupos	Compartimentos							
		Apical		Golgi		SN		Núcleo	
		PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int	PCM	Int
NFkB	G1	2	3	0	0	0	0	0	0
	G2	2	3	0	0	0	0	0	0
	G3	1	2	0	0	0	0	1	3
	G4	1	2	0	0	0	0	1	3

Quadro 6. Valor da nota para marcação de NFkB em cada compartimento celular. A (apical), G (aparelho de Golgi), SN (supranuclear) e N (núcleo).

Grupos	Valor da nota por compartimento			
	A	G	SN	N
G1	8	0	0	0
G2	8	0	0	0
G3	1	0	0	1
G4	1	0	0	1

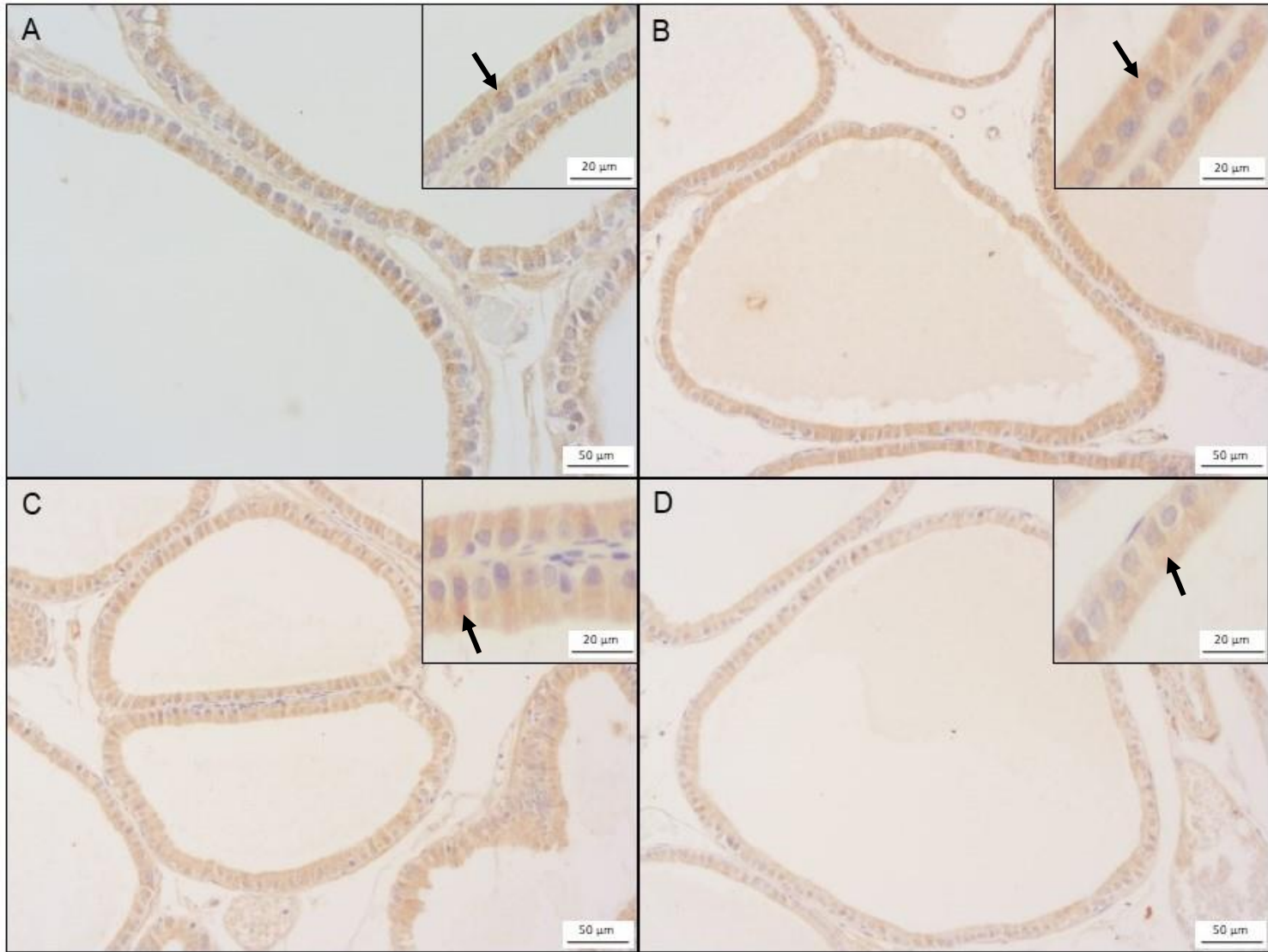


Figura 3

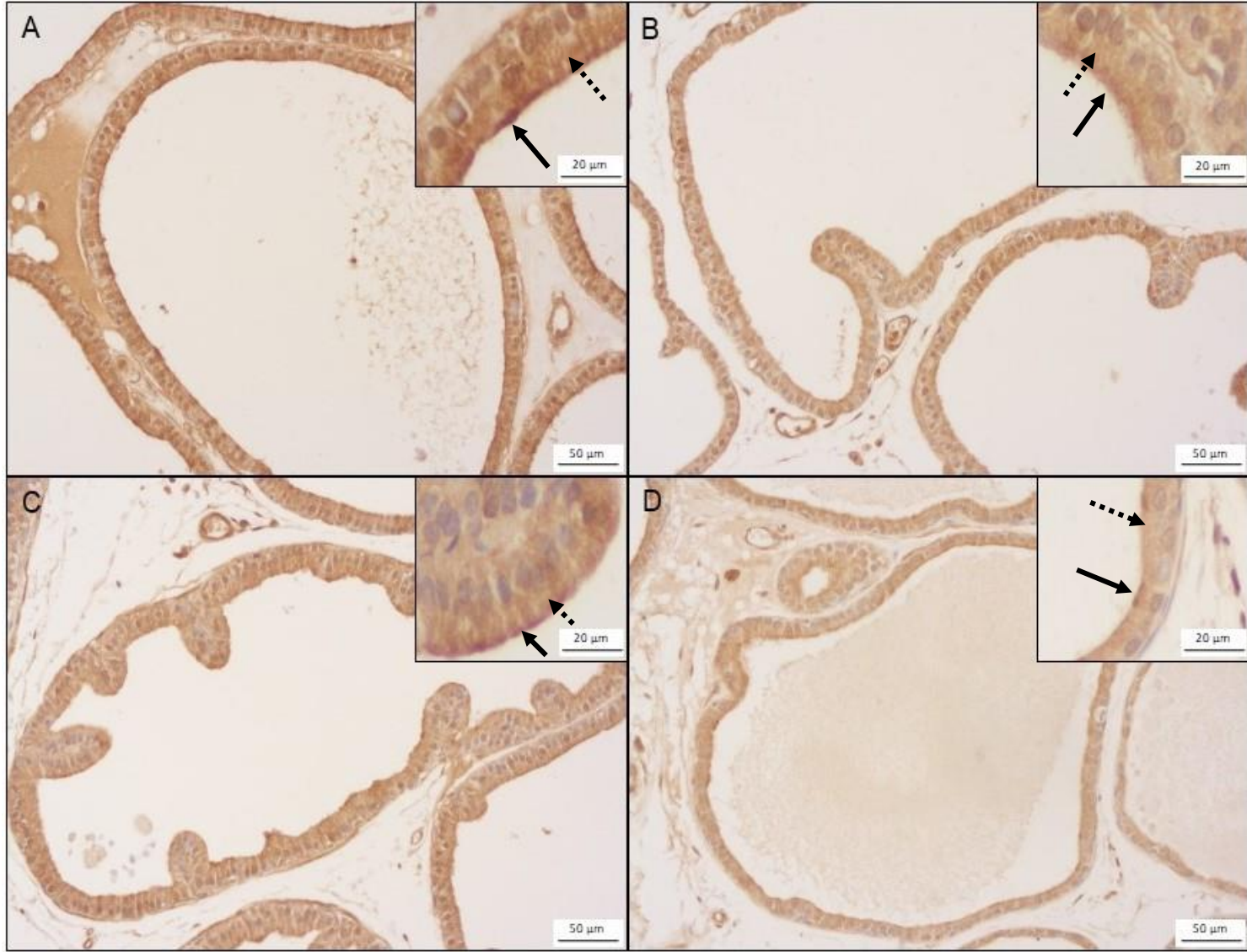


Figura 4

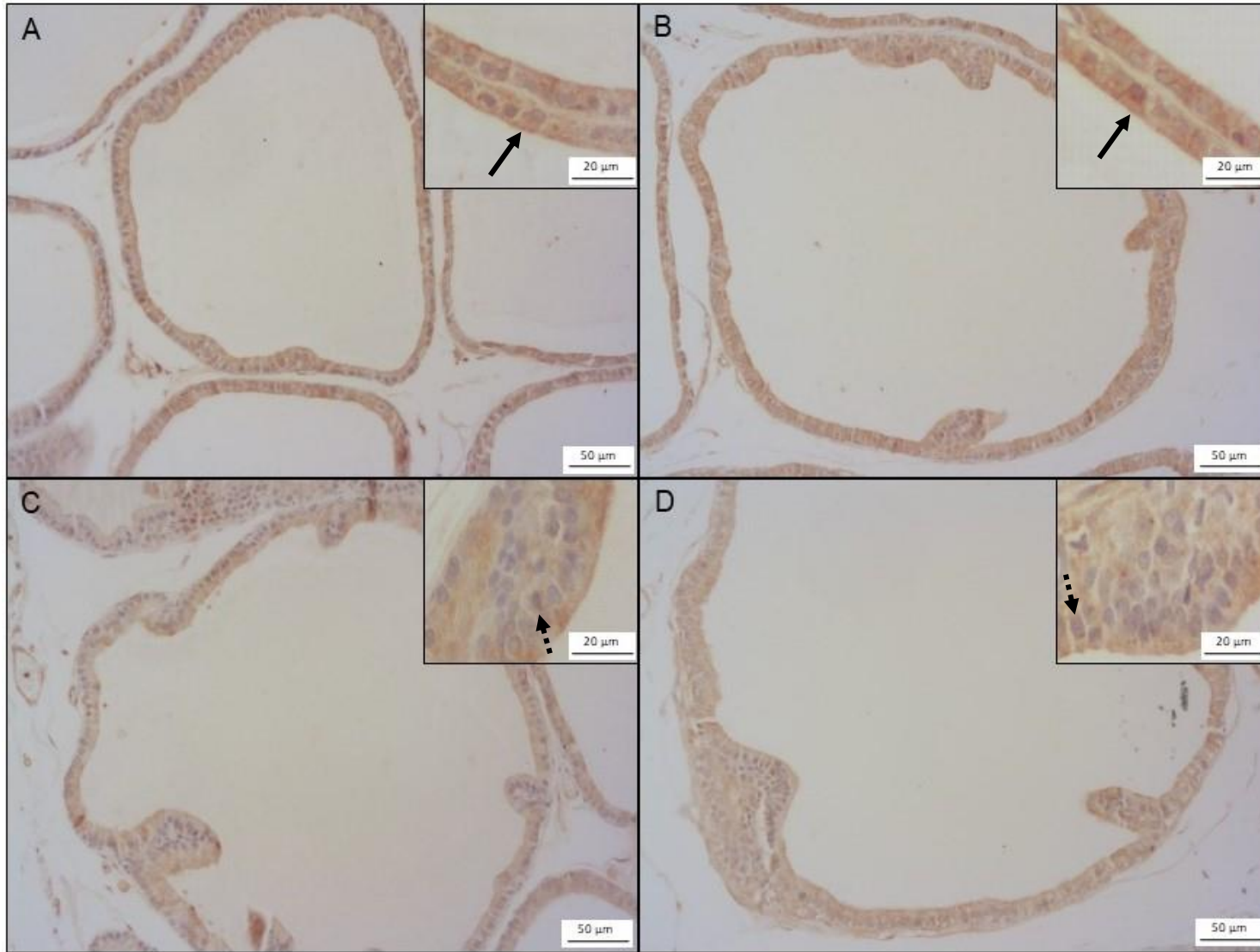


Figura 5

DISCUSSÃO

Comparando os dados da análise histopatológica (tipo de lesão e frequência de cada lesão) entre os grupos, verificamos que o modelo experimental de indução de lesões prostáticas com MNU mostrou-se eficiente já que a frequência de lesões graves foi maior nos grupos G3 e G4. Também podemos notar que a ração enriquecida com DDVP contribuiu para o agravamento das lesões desenvolvidas na próstata dos ratos, visto que as lesões encontradas foram mais graves nos grupos G2 e G4 em comparação com os grupos G1 e G3, respectivamente.

Apesar da análise histopatológica mostrar aumento gradual das lesões, os animais de nenhum dos grupos experimentais apresentaram lesões invasivas como adenocarcinoma. Acreditamos que isso não ocorreu devido ao protocolo de indução química (dose única de MNU seguido por doses diárias de cipionato de testosterona por 20 dias), pois Apolinário (2016) em seu trabalho observou o desenvolvimento de adenocarcinoma prostático, porém utilizando um protocolo de indução química por um período maior (duas doses de MNU seguido por doses de cipionato de testosterona por 120 dias em dias alternados).

Nossos resultados confirmaram a presença de TLR4 na região do aparelho de Golgi em todos os grupos, como descrito por Latz e colaboradores (2002), que afirma que o TLR4 possui uma certa mobilidade intracelular antes de ser alocado na membrana plasmática, tendo como local de término da síntese o aparelho de Golgi que irá direcionar a proteína até a membrana plasmática por transporte vesicular. No grupo G4 detectou-se, também, imunorreatividade para TLR4 na membrana apical, o que também confirma sua mobilidade.

A imunorreatividade de TLR4 nos grupos G2 e G3 foi igual ao grupo G1. Porém, no grupo G4 a imunorreatividade é ligeiramente menor que no G1. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Gatti e colaboradores (2009), que afirmam que com a progressão e aumento da agressividade da lesão, a presença do TLR4 diminui devido à perda de diferenciação celular.

O grupo G4, é o único grupo que apresenta marcação intensa na membrana apical além da marcação no aparelho de Golgi como nos outros grupos. Nesse grupo também foi observado o HGPIN, o que comprova que a ração enriquecida com DDVP juntamente com a indução química por MNU, alterou a localização e imunorreatividade do TLR4. Essa alteração provavelmente está relacionada a perda de diferenciação

celular caracterizada em HGPIN, pois os TLRs desempenham um papel importante na reparação tecidual e na inflamação induzida por lesão tecidual (Galli et al., 2013). Por outro lado, nos grupos G2 e G3 onde foram encontradas lesões iniciais, o TLR4 está altamente expresso na região do aparelho de Golgi, comprovando a fase de maturação da proteína (Uronen-Hasson et al, 2004).

A imunorreatividade do TNF α na região apical e na região do aparelho de Golgi das células epiteliais luminiais, sugere que o TNF α está presente na membrana apical devido sua estrutura transmembrana e no aparelho de Golgi onde a proteína sofre glicosilação o que corrobora com Silva (1991).

Nossos resultados apontam que não houve alteração na imunorreatividade de TNF α nos grupos G2 e G3 em comparação com G1. Isso indica que nem o DDVP e nem o MNU isolados modificam a expressão de TNF α . Já no grupo G4, a imunorreatividade foi menor do que no G1, demonstrando que a associação entre DDVP e a indução química foi determinante para isso. Além disso, o fato do grupo G4 apresentar lesões mais graves (HGPIN) pode indicar que nessa fase da carcinogênese a expressão de TNF α não tem mais tanta importância para a progressão das lesões. Isso, também, corrobora com Pova (2008), que aponta o TNF α como uma citocina necessária nos estágios iniciais da promoção tumoral. No entanto, divergem de Narayanan e colaboradores (2009), detectaram nível elevado de TNF α no soro de ratos tratados com MNU mais testosterona, bem como, nível mais alto de TNF α nas células epiteliais no adenocarcinoma, porém baixo nível nas lesões de PIN.

O NF κ B apresentou imunorreatividade na região apical nos grupos G1 e G2, provavelmente devido sua inativação pelo complexo I κ B, pois normalmente em sua forma inativa é encontrado no citoplasma da célula (Barnes, 1997). Nos grupos G3 e G4, o NF κ B estava presente no núcleo e no envoltório nuclear o que pode demonstrar sua ativação. Isso corrobora com os dados de Ismail e colaboradores (2004), que observaram localização nuclear de NF κ B, demonstrando a ativação e evidenciando a translocação nuclear em metástases linfonodais do câncer de próstata, indicando a relação do NF κ B (subunidade p65) com a progressão do câncer de próstata.

A imunorreatividade no grupo G2 foi maior que no G1, provavelmente devido a diminuição da altura do epitélio provocado pela displasia, como observado anteriormente pelo grupo de pesquisa. Já nos grupos G3 e G4 a imunorreatividade na região apical das células luminiais foi menor do que no G1, porém foi maior no

envoltório nuclear e núcleo demonstrando ativação e, conseqüente, translocação nuclear do NFkB (Seo et al, 2009). Narayanan e colaboradores (2009), observaram aumento de quatro vezes na expressão de NFkB no adenocarcinoma em comparação ao tecido não neoplásico, o que indica a relação entre o aumento da expressão de NFkB e o grau de estadiamento de suas lesões. Resultados preliminares, apontam alterações menores possivelmente porque os animais não apresentaram lesões malignas.

No grupo G4, onde foi observado previamente HGPIN, apresentou translocação nuclear do NFkB, o que está associada a vários estágios do processo inflamatório e tumorigênese (Seo et al, 2009). Isso demonstra que a associação entre DDVP e indução química promoveu alteração na localização e expressão do NFkB nas células epiteliais luminais. Com relação ao grupo G2, que recebeu somente a ração enriquecida com DDVP, houve alteração da marcação na região apical quando comparado ao G1, mas essa alteração provavelmente ocorreu devido a displasia, caracterizada pela diminuição na altura do epitélio. Nota-se que, de maneira geral, no grupo G2 as lesões foram menos graves e a expressão dos marcadores moleculares da inflamação foram menos evidentes em comparação com o G4, indicando que o DDVP isolado foi menos efetivo em promover tais alterações do que quando associado pela indução química por MNU. Provavelmente, porque o câncer é uma patologia de origem multifatorial (Jemal, 2004) e, ainda, como afirma Hiatti e colaboradores (1994) a associação de vários fatores aumenta o risco de câncer de próstata.

Em resumo, podemos verificar que a expressão de NFkB no núcleo e a diminuição da expressão de TLR4 e TNF α principalmente na região do Golgi, bem como o aumento da expressão de TLR4 na membrana apical das células epiteliais luminais, pode ser associado ao agravamento das lesões prostáticas, corroborando com o papel desses marcadores do processo inflamatório, nas etapas iniciais da carcinogênese.

CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que o DDVP em concentrações permitidas altera a imunolocalização de marcadores moleculares da inflamação na próstata ventral de

ratos. Além disso, o DDVP associado à indução química pode acentuar essas alterações dos marcadores.

REFERENCIAS

- APOLINÁRIO, L. M. **Efeitos da imunoterapia com PMAPA associada à terapia antiangiogênica no tratamento de lesões prostáticas quimicamente induzidas em ratos**. 2016. 142 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- BARNES, P. J. Nuclear Factor- κ B. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v.29, n.6, p. 867-870. 1997.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015
- CERUTTI, P. A.; TRUMP, B. F. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis **Cancer Cells**, v. 3, p. 1–7, 1991.
- DONATO, M. et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.** p. 1-8, 2017.
- GALLI, R. et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RAR β and tumor regression. **PNAS**. v.110, p; 9812-9817. 2013.
- GATTI, G. et al. Expression of Toll-Like Receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. **Prostate**. v.69, p. 1387 – 1397, 2009.
- HIATTI, R. A. et al. Alcohol consumption, smoking, and other risk factors and prostate cancer in large health plan cohort in California (United States). **Cancer Cause Control**. v. 5, p. 66-72, 1994.
- HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nature Rev. Cancer**. v. 3, p. 276–285, 2003.
- ISMAIL, H. A. et al., Expression of NF- κ B in prostate cancer lymph node metástases. **Prostate**. v.58, p. 308-313, 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017.
- JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** v. 54 p. 8-29, 2004.
- LATZ, E. et al. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD4 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 47834-47843, 2002.
- LUO, J. L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. **J. Clin. Invest.** v.115, p.2625–2632, 2005.

- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol. Cell** v. 2, p. 253-58, 1998.
- MUZIO, M. et al. (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88as proximal mediators of IL-1 signaling. **Science**. v. 278, p.1612–15, 1997.
- NARAYANAN K. N. et al., Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. **Prostate**. v.69, p.133-141, 2009.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**. v.18, p. 6853– 6866, 1999.
- PALAPATTU, G. S. et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights, **Carcinogenesis**. v. 26, n. 7, p. 1170–1181, 2005.
- PHAM, C.G. et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. **Cell**. v.119, p.529–542, 2004
- POVOA, H. C. C. **Efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral alfa e gama interferon na carcinogênese mamária em ratas Wistar**. 2008. 93 p. Tese (Doutorado em Patologia Investigativa) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008
- PUHR, M. et al. Inflammation, Microbiota and Prostate Cancer. **Eur. Urol. Focus**. v.2, p. 374 – 382, 2016.
- QUAGLIARIELLO, V. et al. Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. **Oncotarget**. v. 8, p. 30606-30616, 2017.
- SCHUG, T.T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J. Steroid Biochem**. v.127, p. 204-215, 2011.
- SEO, S. I. et al. Immunohistochemical analysis of NF-κB signaling proteins IKKε, p50/p105, p52/p100 and RelA in prostate cancers. **APMIS**. v. 117, p. 623–628, 2009.
- SHAPPELL, S. B. et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Res**. v.64, p. 2270-2305, 2004.
- SIEGEL, L. R.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **Ca Cancer J. Clin**. v. 68, p. 7- 30, 2018.
- SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian J. Androl**. v.10, n.1, p.134-145, 2008.
- SILVA, J. M. Caracterização bioquímica e efeitos metabólicos do factor de necrose tumoral. **Acta Medica Port**. v.4, p. 20-27, 1991
- SMITH, P. C. et al. Interleukin-6 and prostate cancer progression. **Cytokine Growth F. R**. v. 12, p. 33-40, 2001

SOTO, A., SONNENSCHNEIN, C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens **Nat. Rev. Endocrinol.** v. 6, p. 363-370, 2010.

TABB, M.M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine disrupting chemicals. **Mol. Endocrinol.** v. 20, p. 475-482, 2006.

URONEN-HANSSON, H. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. **Immunology**, v. 111, n. 2, p. 173-178, 2004.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo experimental dos tratamentos.

Figura 2 – Fotomicrografia da próstata ventral de rato corada com HE. (A) Grupo G1. Seta sólida: epitélio colunar alto normal. (B) Grupo G2. Seta sólida: displasia. (C) Grupo G3. Seta sólida: padrão micropapilar. (D) Grupo G4. Seta sólida: padrão micropapilar

Figura 3 – Fotomicrografia da próstata ventral de rato com reação imunohistoquímica anti-TLR4. (A) Grupo G1. Seta sólida: região do aparelho de Golgi. (B) Grupo G2. Seta sólida: região do aparelho de Golgi. (C) Grupo G3. Seta sólida: região do aparelho de Golgi. (D) Grupo G4. Seta sólida: região do aparelho de Golgi.

Figura 4 - Fotomicrografia da próstata ventral de rato com reação imunohistoquímica anti-TNF α . (A) Grupo G1. Seta sólida: região apical. Seta pontilhada: região do aparelho de Golgi. (B) Grupo G2. Seta sólida: região apical. Seta pontilhada: região do aparelho de Golgi. (C) Grupo G3. Seta sólida: região apical. Seta pontilhada: região do aparelho de Golgi. (D) Grupo G4. Seta sólida: região apical. Seta pontilhada: região do aparelho de Golgi.

Figura 5 - Fotomicrografia da próstata ventral de rato com reação imunohistoquímica anti-NF κ B. (A) Grupo G1. Seta sólida: região apical. (B) Grupo G2. Seta sólida: região apical. (C) Grupo G3. Seta pontilhada: núcleo. (D) Grupo G4. Seta pontilhada: núcleo.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Assim, podemos concluir que o DDVP em concentrações permitidas pode influenciar no desenvolvimento de lesões na próstata ventral de ratos, bem como, alterar a imunolocalização de marcadores moleculares da inflamação, como NFkB, TNF α e TLR4. Além disso, o DDVP associado à indução química pode agravar tais lesões e acentuar as alterações nos marcadores.

5. ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado Comissão de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - FC/UNESP BAURU

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Influência do praguicida diclorvós sobre o desenvolvimento de lesões prostáticas induzidas por MNU em ratos**", (processo nº 996/46/01/2013 - CEUA/FC), sob a responsabilidade do Prof. Dr. SERGIO PEREIRA, está de acordo com a legislação (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008), com as resoluções normativas aplicáveis e à luz dos Princípios Éticos de Experimentação Animal elaborados pelo CONCEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, em reunião de 03 de abril de 2014.

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Presidente da CEUA