



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

Simone Jacovaci Colleta

**Efeitos da exposição intrauterina e durante a lactação ao bisfenol A sobre
próstata de Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos e idosos**

São José do Rio Preto
2023

Simone Jacovaci Colleta

**Efeitos da exposição intrauterina e durante a lactação ao bisfenol A sobre
próstata de Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos e idosos.**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2020/00160-1
CAPES

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto
2023

C698e

Colleta, Simone Jacovaci

Efeitos da exposição intrauterina e durante a lactação ao bisfenol A sobre próstata de Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos e idosos / Simone Jacovaci Colleta. -- São José do Rio Preto, 2023
59 p.

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

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

1. Próstata. 2. Bisfenol A. 3. Gerbilo da Mongólia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Simone Jacovaci Colleta

**Efeitos da exposição intrauterina e durante a lactação ao bisfenol A sobre
próstata de Gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos e idosos.**

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2020/00160-1
CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Thaís Santana Gastardelo Bizotto
FAMERP- faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Rodrigo Zieri
IFSP - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo de
Barretos

São José do Rio Preto
25 de setembro de 2023

Dedico

À minha família,
minhas conquistas só fazem sentido se
compartilhadas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por ter me inspirado a seguir esse caminho. Tudo começou quando eu assisti uma palestra dele. Muito obrigada por ser uma pessoa inspiradora e por todo apoio e compreensão nesse caminho.

Aos membros da banca de qualificação, a Profa. Dra. Ana Claudia Polli, a Profa. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos, agradeço sinceramente pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Aos membros titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, Profa. Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni, Profa. Dra. Thaís Santana Gastardelo Bizotto, Prof. Dr. Rodrigo Zieri, pela disposição em contribuir para a finalização deste processo. Também gostaria de agradecer aos membros suplentes da banca examinadora, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingo, Profa. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos, Prof. Dr. Ricardo Alexandre Fochi, expresso meus sinceros agradecimentos.

Ao Ibilce, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, por ter disponibilizado o espaço físico para a realização deste trabalho. Também quero estender meus agradecimentos a todos os seus dedicados servidores e professores, que desempenharam um papel fundamental em minha formação.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências, aos coordenadores que passaram pelo programa que sempre me ajudaram de alguma forma, ao departamento de Ciências Biológicas e à Seção Técnica de Pós-Graduação.

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

Agradeço à FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de pesquisa sob o processo nº 2020/00160-1."

Ao Luiz Roberto Falleiros Jr. desejo expressar minha gratidão pelo apoio técnico prestado no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM), bem como pela amizade, acolhimento, momentos de descontração e pelos nossos cafés diários."

Agradeço à Vanessa Reame e ao Thalles Fernando Rocha Ruiz pela valiosa assistência nas eutanásias dos gerbilos e na contagem de espermatozoides.

A todos do Laboratório de Microscopia e Microanálises, obrigada pela companhia, convivência, incentivo, pela ajuda constante quando necessário, bem como pelas valiosas lições que aprendi a cada dia. Em particular, desejo agradecer à Silvana, Carol e Luiz Henrique, amigos da velha guarda, pelas conversas, risadas e momentos de desabafo. Ao Luiz Henrique, meu amigo desde Buritama, por sempre ter me defendido, pelo apoio moral, pela ajuda na finalização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus por me guiar e abençoar em todos os caminhos, ao meu querido santo de devoção, São José, fonte inesgotável de bênçãos. À minha família, expresso profunda gratidão por todo o amor e dedicação a mim, sem os quais eu não seria quem sou. À minha mãe, meu maior exemplo, que dedicou sua vida a mim e ao meu irmão. Ao meu pai, agradeço por todo o carinho que sempre me deu. Ao meu irmão, expresso meu reconhecimento pelos conselhos, conversas e amizade. Aos meus primos, que se tornaram os irmãos que a vida me deu. Ao Robert, agradeço por ter sido minha principal companhia nos últimos tempos, quando precisei me isolar socialmente para finalizar este doutorado; ele esteve ao meu lado. A todos os meus colegas de república, com quem dividi meu espaço, especialmente a Cibele e a Natiele. Aos meus amigos, desejo expressar minha sincera gratidão por sempre torcerem por mim, pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelos conselhos e por todo o amor. Às minhas parceiras nessa jornada acadêmica, Julia e Vanessa, minhas gêmeas acadêmicas, agradeço de coração por sempre estarem ao meu lado, por ouvirem meus desabafos e por proporcionarem conforto em muitos momentos em que eu me sentia perdida e desesperada.

Vocês amenizaram muitas das minhas angústias pessoais e acadêmicas, e eu sou imensamente grata por isso.

Dizem que somos um pedacinho de cada pessoa com quem convivemos. Que sorte a minha ter todos vocês em minha vida.

RESUMO

Nos últimos anos, vários químicos ambientais têm sido apontados como disruptores endócrinos. O bisfenol A (BPA) é um disruptor endócrino que possui atividade estrogênica e afeta o sistema reprodutivo. Este estudo teve como objetivo avaliar se o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), exposto ao BPA durante o período gestacional e lactacional, poderia causar alterações na motilidade de espermatozoides e na próstata durante a vida adulta e senil. Para isso, gerbilas prenhes foram submetidas à exposição ao BPA por meio de gavagem a partir do 8º dia de gestação até o final da lactação, de acordo com quatro grupos experimentais: controle (C) - animais livres de gavagem, controle óleo (OC) - veículo da gavagem, baixa dose (LBPA) (50 µg/kg BPA), alta dose (HBPA) (5000 µg/kg BPA). A prole masculina foi mantida em biotério até atingir 90 dias ou 1 ano de idade (subgrupo adulto ou senil, respectivamente), momento em que os animais foram eutanasiados. A exposição ao BPA causou aumento no peso corporal dos animais senis, mas não alterou o peso do lobo ventral próstata, nem o peso do complexo prostático. O BPA teve um efeito negativo na motilidade de espermatozoides e aumentou a incidência de lesões prostáticas pré-malignas. Nos animais adultos, os grupos LBPA e HBPA apresentaram diminuição nos níveis séricos de testosterona e na expressão de receptores de andrógenos em comparação com o grupo controle (C). O BPA também alterou a expressão dos receptores de estrógeno. A expressão da enzima aromatase não apresentou alterações, no entanto, a enzima 5 α -redutase demonstrou aumento no grupo LBPA em relação ao grupo controle (C) nos animais senis. Esses dados indicam que a exposição perinatal ao BPA pode causar alterações na sinalização hormonal da próstata e essas mudanças hormonais provavelmente estão relacionadas com o prejuízo na motilidade dos espermatozoides e aumento incidência de lesões pré-malignas da próstata.

Palavras-chave: Bisfenol A. Próstata do gerbilo. Motilidade de espermatozoides. Lesões prostáticas.

ABSTRACT

In recent years, several environmental chemicals have been identified as endocrine disruptors. Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor that exhibits estrogenic activity and affects the reproductive system. This experiment aimed to assess whether the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) exposed to BPA during the gestational and lactational period could lead to alterations in sperm motility and the prostate during adulthood and senescence. For this, pregnant gerbils were subjected to BPA exposure through gavage from the 8th day of gestation until the end of lactation, according to four experimental groups: control (C) - animals without gavage, oil control (OC) - gavage vehicle, low dose (LBPA) (50 µg/kg BPA), high dose (HBPA) (5000 µg/kg BPA). The male offspring were allocated in isolators until 90 days or 1 year of age (adult or senile subgroup, respectively), at which point the animals were euthanized. Exposure to BPA resulted in an increase in body weight in senile animals but did not alter the weight of the ventral prostate lobe or the prostate complex. BPA had negative effect on sperm motility and increase the incidence of premalignant prostate lesions. In adult animals, the LBPA and HPBA groups showed a decrease in testosterone serum levels and in androgen receptor expression compared to the control group (C). BPA also altered the expression of estrogen receptors. The expression of the aromatase enzyme showed no changes; however, the 5α-reductase enzyme exhibited an increase in the LBPA group compared to the control group (C) in senile animals. These data suggest that perinatal exposure to BPA can promote changes in prostate hormonal signaling, and these hormonal changes are probably related to impairment of sperm motility and increase the incidence of pre-malignant prostate lesion.

Keywords: Bisphenol A. Gerbil prostate. Sperm motility. Prostate lesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1. Ação dos hormônios	17
Figura 2. Próstata humana e de roedores	20
Figura 3. Esquema ilustrativo da estrutura microscópica da próstata	21
Figura 4. Modelo hipotético do potencial efeito do BPA no câncer de próstata	24
Figura 5. O Gerbilo e a próstata do gerbilo	25

Manuscrito

Figura 1. Delineamento experimental	45
Figura 2. Representação das lesões do lobo ventral da próstata do Gerbilo da Mongólia	46
Figura 3. Dosagem hormonal de testosterona e estradiol	47
Figura 4. Motilidade dos espermatozoides	48
Figura 5. Representação da camada muscular lisa e quantificação da expressão de α -actina	49
Figura 6. Quantificação das lesões prostáticas	50
Figura 7. Imunomarcção para AR, ER- α , ER- β , aromatase e 5 α -redutase nos animais adultos	51
Figura 8. Imunomarcção para AR, ER- α , ER- β , aromatase e 5 α -redutase nos animais senis	52
Figura 9. Quantificação das células imunorreativas para AR, ER- α , ER- β , aromatase e 5 α -redutase nos animais adultos e senis	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos gerbilos dos diferentes grupos experimentais	41
Tabela 2. Estereologia do lobo ventral da próstata de Gerbilos da Mongólia dos diferentes grupos experimentais	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de andrógeno
BPA	Bisfenol A
C	Grupo Controle (Control)
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEs	Disruptores endócrinos
DES	Dietilstilbestrol
DHT	Di-hidrotestosterona
E	Estradiol
ERα	Receptor de estrógeno tipo alfa
ERβ	Receptor de estrógeno tipo beta
HBPA	Grupo Alta dose de BPA (High-dose BPA)
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HPIN	Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau
LBPA	Grupo Baixa dose de BPA (Low-dose BPA)
LPIN	Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau
MM	Metaplasia Mucoide
OC	Grupo Controle óleo (Oil Control)
PCa	Câncer de próstata
pH	Potencial (ou potência) hidrogeniônico
5α-r	5 α -redutase

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
μg	Micrograma
kg	Quilograma
mL	Mililitros
mol	Mol
m/m^2	Milímetros ao quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Sistema endócrino	16
1.2 Disruptores endócrino	18
1.3 A próstata	19
1.4 Regulação Hormonal da próstata	21
1.5 Impactos do BPA na próstata.....	23
1.6 O Gerbilo da Mongólia	24
2 OBJETIVOS	25
3 RESULTADOS	26
Artigo	26
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema endócrino

O sistema endócrino é responsável por controlar diversas funções corporais, como o metabolismo, a regulação do meio interno (homeostase), a reprodução, o crescimento e desenvolvimento. De modo geral, o sistema endócrino, juntamente com o sistema nervoso, estabelece relações do corpo com o meio ambiente, permitindo o desenvolvimento, adaptação e manutenção da saúde e dos processos corporais (GORE et al., 2014).

De acordo com a definição tradicional, um hormônio é uma substância química produzida por uma célula ou grupo de células, liberada na corrente sanguínea e transportada para um alvo distante, onde exerce seu efeito em concentrações muito baixas (SILVERTHORN, 2017). No entanto, é importante ressaltar que alguns hormônios e substâncias com atividade hormonal não são necessariamente lançados na corrente sanguínea; às vezes, são liberados nos espaços do tecido conjuntivo e podem atuar sobre células adjacentes que expressam receptores específicos para aquele hormônio em particular (ROSS, MICHAEL H; PAWLINA, 2012).

A primeira etapa na ação do hormônio consiste na sua ligação a um receptor hormonal específico presente na célula alvo. Os hormônios interagem com esses receptores, que podem estar expostos na superfície da célula alvo, situados no seu citoplasma ou núcleo, e desencadeiam uma resposta celular (ROSS, MICHAEL H; PAWLINA, 2012) (Figura 1). Ou seja, os hormônios são moléculas sinalizadoras envolvidas na comunicação celular. Dessa forma, juntamente com outros mecanismos de comunicação celular, os hormônios coordenam o desenvolvimento de cada indivíduo. Isso possibilita o desenvolvimento dos embriões dos organismos partir de uma única célula fertilizada para muitos milhões de células especializadas.

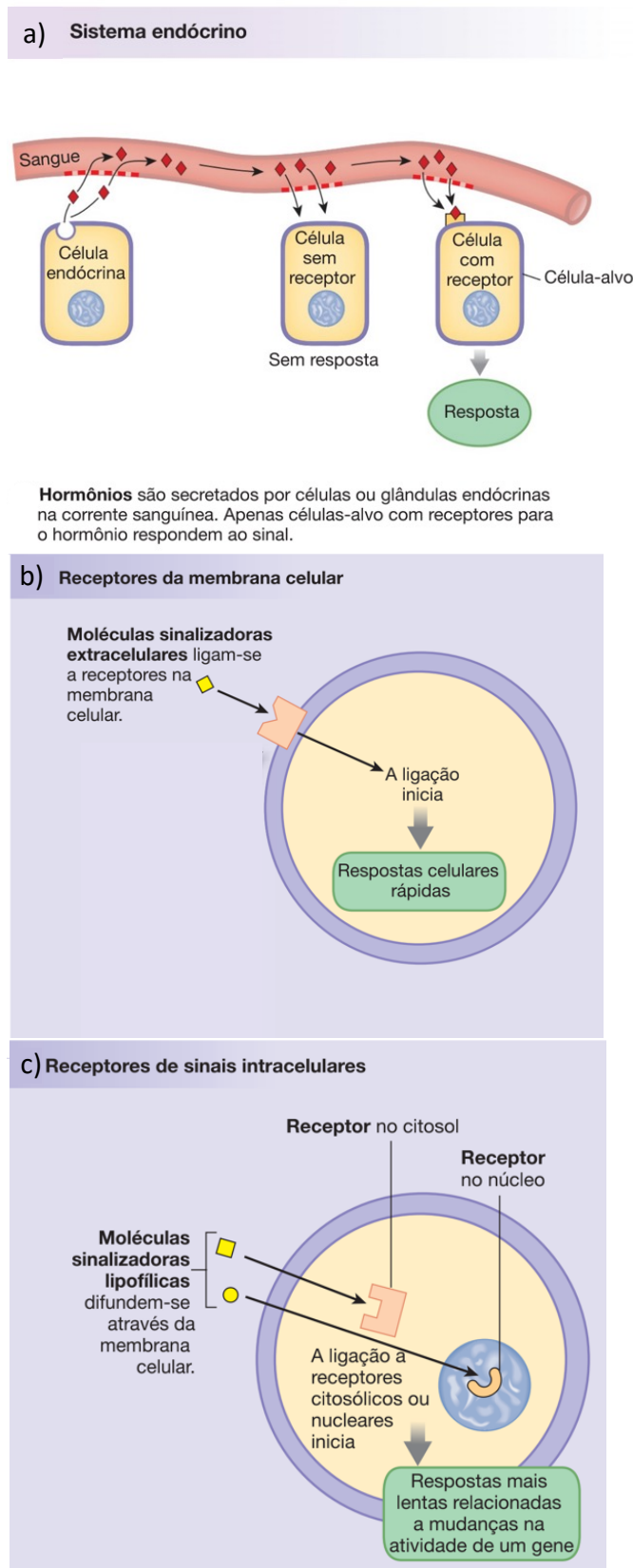


Figura 1: (A) Os hormônios são secretados por células ou glândulas endócrinas na corrente sanguínea, e apenas as células-alvo que possuem receptores para o hormônio respondem ao sinal. Os hormônios interagem com seus receptores, (b) que podem estar expostos na superfície da célula alvo, (c) ou situados no seu citoplasma ou núcleo celular (adaptado de Silverthorn, 2017).

1.2 Disruptores endócrinos

Devido ao papel crítico do sistema endócrino em várias funções biológicas e fisiológicas, deficiências ou interferência em qualquer parte do sistema endócrino podem levar ao desenvolvimento de doenças. Nas últimas décadas, tem sido observado que a exposição a diversas substâncias químicas presentes no meio ambiente pode causar alterações no sistema endócrino. Estas substâncias, foram denominadas desreguladores ou disruptores endócrinos (DEs).

Os DEs são definidos pela *Endocrine Society* (maior organização internacional de cientistas especialistas em endocrinologia) como: “substância química exógena, ou mistura de substâncias químicas, que interferem com qualquer aspecto da ação hormonal.” Ao interferirem com o sistema endócrino, a exposição aos DEs pode perturbar muitas das funções endócrinas e ser prejudicial à saúde. Semelhantes aos hormônios naturais, os DEs têm efeitos em doses muito baixas. Os desreguladores endócrinos podem ser separados em classes de produtos químicos, incluindo pesticidas (dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e metoxicloro), fungicidas (vinclozolina), herbicidas (atrazina), produtos químicos industriais (bifenilas policloradas -PCBs, dioxinas), plásticos (ftalatos, bisfenol A, alquilfenóis) e hormônios vegetais (fitoestrógenos) (SKINNER; MANIKKAM; GUERRERO-BOSAGNA, 2011).

Certos estágios de vida são particularmente vulneráveis a exposição aos DEs, especialmente no início do desenvolvimento. Foi demonstrado que os DEs desempenham um papel significativo no desenvolvimento de doenças na vida adulta após a exposição perinatal, corroborando a hipótese de Barker de que as doenças adultas têm origem na vida fetal (SKINNER; MANIKKAM; GUERRERO-BOSAGNA, 2011).

Crianças e recém-nascidos são mais sensíveis às toxinas ambientais em comparação com os adultos. As vias metabólicas em lactentes são imaturas, e os recém-nascidos diferem dos adultos na capacidade de metabolizar, desintoxicar e eliminar muitas toxinas (ÜNÜVAR; BÜYÜKGEBİZ, 2012).

Dentre os DEs, destaca-se o bisfenol A (BPA), um composto utilizado na fabricação de plásticos de policarbonato e resinas epóxi, encontrado em uma ampla variedade de produtos da vida cotidiana. O BPA está presente em garrafas plásticas, embalagem de alimentos, selantes dentais, materiais de revestimento para tubos de PVC, revestimento de latas de alimentos e bebidas, mamadeiras e muitos outros produtos de uso diário (DI DONATO et al., 2017). O BPA pode ser facilmente liberado para o

ambiente devido a repetidas lavagens, mudanças de pH ou mesmo devido a alterações de temperatura (TEILMANN et al., 2002; PRINS, 2008). O BPA é um dos químicos ambientais mais amplamente difundido e é encontrado no ambiente, incluindo no ar, solo, sedimentos, água e alimentos, bem como em seres vivos, como nos seres humanos, animais selvagens e organismos aquáticos (ABRAHAM; CHAKRABORTY, 2019).

As rotas de exposição ao BPA em seres humanos são principalmente por ingestão, inalação e absorção dérmica (LI; SUH, 2019). O BPA possui uma estrutura semelhante à do estradiol (E) e, portanto, pode estimular a resposta celular ao se ligar aos receptores de estrogênio (RUBIN, 2011), sendo, então, conhecido por apresentar atividade estrogênica. As consequências da exposição ao BPA incluem problemas cardiovasculares, reprodutivos, problemas no desenvolvimento da glândula mamária, baixa produção de espermatozoides, diminuição no crescimento fetal, ansiedade e depressão, obesidade, cânceres relacionados a hormônios, como câncer de mama e câncer de próstata (ABRAHAM; CHAKRABORTY, 2019).

1.3 A próstata

A próstata integra o sistema reprodutor masculino como a maior glândula acessória, desempenhando um papel crucial na fertilidade dos homens. A secreção prostática secretada pelo epitélio da próstata age na ativação e capacitação dos espermatozoides (VERZE et al, 2016). A próstata está localizada na pelve, abaixo da bexiga, e envolve a parte prostática da uretra (ROSS, MICHAEL H; PAWLINA, 2012) (Fig. 2A).

No homem, a próstata é uma glândula compacta que não possui distinção em lobos, sendo organizada em diferentes zonas: zona central, de transição, zona fibromuscular e periférica, como mencionado por VERZE et al. (2016) (Figura 2A). (Fig. 2A). Em contrapartida, em roedores, observa-se um complexo prostático composto por quatro pares de lobos bilateralmente simétricos que circundam a uretra, sendo designados como anterior (ou glândula coaguladora), ventral, lateral e dorsal (Fig. 2B) (JESIK et al., 1982). Os lobos prostáticos apresentam diferenças entre si em diversos aspectos, como o padrão de ramificação dos ductos, a histologia, a sensibilidade hormonal e a secreção (AUMÜLLER; SEITZ, 1990).

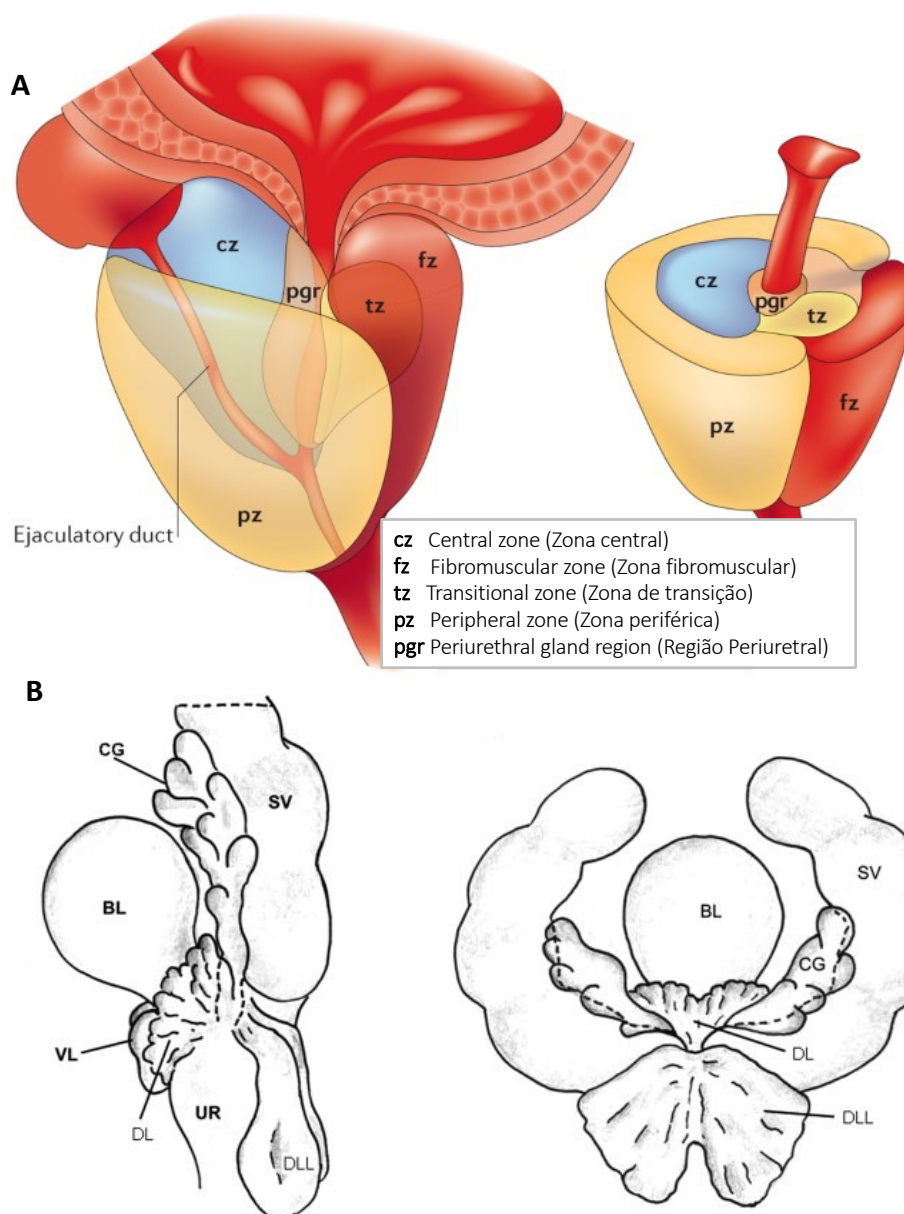


Figura 2. A: Posição anatômica da próstata humana, localizada abaixo da bexiga e circundando a uretra. Em humanos, a próstata é dividida em zona central (cz), transicional (tz) periférica (pz) e fibromuscular (fz) (Verza et al, 2016, adaptado). B: complexo prostático de roedores, composto por quatro pares de lobos bilateralmente simétricos que circundam a uretra, (cg) lobo anterior (ou glândula coaguladora), (vl) lobo ventral, (dll) lobo dorsolateral, (bl) bexiga, (sv) glândula seminal (Rochel et al, 2007).

Do ponto de vista histológico, a próstata é composta por duas partes distintas: uma epitelial e outra estromal, que em conjunto formam os túbulos secretores e os ácinos da glândula. A camada epitelial é constituída por três tipos de células: basais, secretoras e neuroendócrinas (Fig. 3) (RUMPOLD et al., 2002). As células secretoras apresentam um citoplasma rico em organelas responsáveis pelos processos de síntese e secreção de glicoproteínas. Esse epitélio é suportado por um estroma principalmente composto por células musculares lisas e fibroblastos, imersos em uma matriz extracelular (MEC) na qual são encontradas células do sistema imune, nervos e vasos sanguíneos (TUXHORN

et al., 2001). As células basais estão posicionadas entre o epitélio secretor e a membrana basal, desempenhando um papel crucial como células-tronco na manutenção do crescimento prostático. As células neuroendócrinas são encontradas na camada epitelial, e estão envolvidas na regulação das secreções autócrinas e parácrinas das células epiteliais (MARKER et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2003)

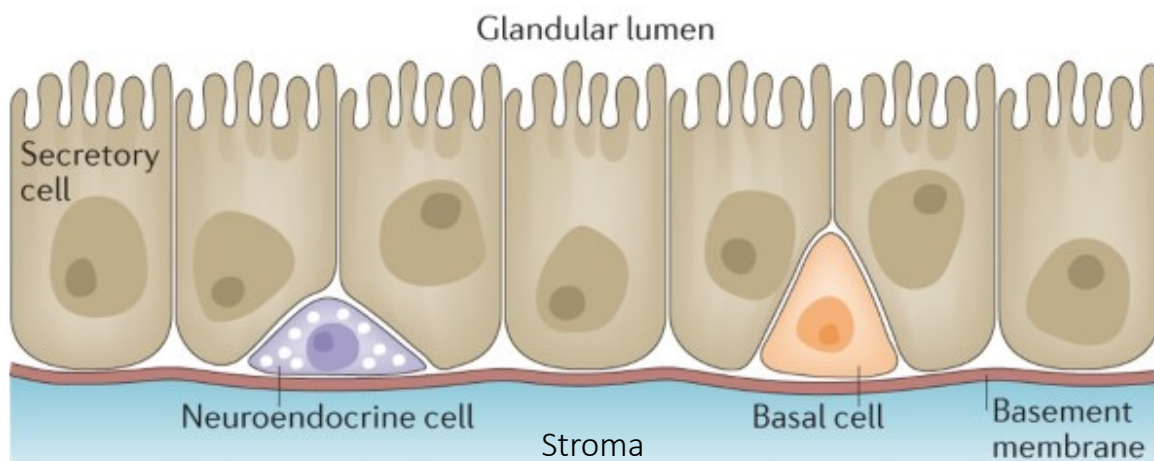


Figura 3: Esquema ilustrativo da estrutura microscópica da próstata. A próstata consiste em epitélio glandular embutido em um estroma fibromuscular (Verze et al, 2016).

1.4 Regulação Hormonal da próstata.

Os andrógenos desempenham um papel fundamental no crescimento e função da próstata (TAPLIN; HO, 2001; BANERJEE et al., 2001; CUNHA et al., 2004). A testosterona (T) é o principal andrógeno presente na circulação masculina, sendo que aproximadamente 95% desse hormônio é produzido pelas células de Leydig nos testículos (BERMAN et al.; 2012). Além dos testículos, a glândula adrenal também é uma fonte significativa de T nos homens, contribuindo com cerca de 5% da produção desse hormônio. No entanto, é importante notar que, apesar de a T ser o andrógeno predominante na circulação, é a di-hidrotestosterona (DHT) que exerce a maior influência sobre a próstata. A DHT é sintetizada a partir da conversão da T pela ação da enzima 5 α -redutase (5 α -r) (LUU-THE; LABRIE, 2010). Tanto a T quanto a DHT atuam como fatores de sobrevivência, inibindo a apoptose e estimulando a produção de fatores que promovem a atividade proliferativa no epitélio prostático (CARSON; RITTMASER, 2003). A ação desses hormônios é mediada por meio de receptores hormonais específicos, conhecidos como receptores de andrógenos (ARs).

Os estrógenos também desempenham um papel significativo na regulação dos hormônios sexuais masculinos, no crescimento, na diferenciação (PREZIOSO et al.,

2007) e na manutenção de células prostáticas, tanto normais quanto malignas (HÄRKÖNEN; MÄKELÄ, 2004). No organismo masculino, a maior parte dos estrógenos é produzida por meio da aromatização da testosterona (T), graças à ação da enzima aromatase. Os efeitos dos estrógenos na próstata são mediados por dois principais tipos de receptores nucleares, conhecidos como receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$).

Na próstata, o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) é predominantemente encontrado no compartimento estromal, enquanto o receptor de estrógeno beta ($ER\beta$) está principalmente presente no epitélio, embora também seja detectado no estroma (WEIHUA et al., 2001; CARRUBA, 2007; ROCHEL-MAIA et al., 2013b). A ativação do $ER\alpha$ promove a progressão do ciclo celular, a proliferação celular e influencia a inflamação e a carcinogênese prostática (ELLEM; RISBRIDGER, 2009; RICKE et al., 2008). Por outro lado, as vias de sinalização estimuladas pelo $ER\beta$ são pró-apoptóticas e antiproliferativas, o que resulta em efeitos benéficos na luta contra o câncer de próstata (RISBRIDGER; ELLEM; MCPHERSON, 2007; ELLEM; RISBRIDGER, 2009).

O equilíbrio entre andrógenos e estrógenos desempenha um papel crucial na manutenção funcional da glândula prostática. Qualquer desequilíbrio nesse sistema está associado ao desenvolvimento de doenças prostáticas. Aumentos nos níveis de 5α -redutase (5α -r) e de di-hidrotestosterona (DHT), assim como alterações na sinalização dos receptores de andrógenos (AR), têm sido associados ao processo de tumorigênese prostática (ZHU, 2005; ZHU; SUN, 2005).

A redução dos andrógenos durante o processo de envelhecimento é uma das condições mais comuns nos homens mais velhos, e os níveis de testosterona tendem a diminuir (CANNARELLA et al., 2021). Em contrapartida, ao contrário da diminuição dos níveis de testosterona, os níveis de estradiol aumentam com o envelhecimento masculino. Como resultado, o aumento dos níveis circulantes de estrógenos e a diminuição dos níveis de testosterona resultam em um aumento significativo na relação entre E/T (PREZIOSO et al., 2007; NICHOLSON; RICKE, 2011). Portanto, a intensificação da estimulação estrogênica na próstata de homens idosos pode estar associada à reativação do crescimento prostático e, consequentemente, ao desenvolvimento de transformações neoplásicas (HO, 2004; KING; NICHOLSON; ASSINDER, 2006).

1.5 Impactos do BPA na próstata

O interesse em compreender a biologia da próstata é impulsionado pela alta incidência de doenças relacionadas a essa glândula, como a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o adenocarcinoma (MARKER et al., 2003). Doenças prostáticas ou uma próstata em estado de saúde comprometido podem afetar a funcionalidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, a fertilidade masculina (VERZE et al.; 2016). O câncer de próstata (PCa) é o tipo mais comum de câncer entre os homens e representa a segunda principal causa de óbito (PERNAR et al., 2018). Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no impacto de alguns desreguladores endócrinos, como o BPA, sobre o desenvolvimento do PCa (DI DONATO et al., 2017).

Evidências crescentes apontam que a exposição ao BPA tem o potencial de perturbar o equilíbrio endócrino, resultando em alterações nos níveis hormonais nos homens (LASSEN et al., 2014; LIU et al., 2015; ZHUANG et al., 2015; SCINICARIELLO; BUSER, 2016). O BPA pode interferir na sinalização dos hormônios esteroides por meio de diversos mecanismos, incluindo sua capacidade de se ligar tanto aos receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$) quanto aos receptores de estrógenos beta ($ER\beta$), além de ter a capacidade de se ligar ao receptor de andrógenos (AR) (ROCHESTER, 2013). Além disso, foi demonstrado que a exposição de adultos ao BPA altera a expressão das enzimas 5α -redutase e aromatase na próstata de ratos (CASTRO et al, 20113). Devido à sua capacidade de interferir no equilíbrio hormonal, o BPA tem sido associado como um fator de risco no desenvolvimento de doenças prostáticas, incluindo hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

Embora ainda não esteja completamente esclarecido como o BPA atua no desenvolvimento do câncer de próstata (PCa), recentemente, Di Donato et al. (2017) propuseram um modelo hipotético que resume as principais vias potencialmente envolvidas na ação do BPA no desenvolvimento do PCa. Segundo esse modelo, o BPA pode alterar o níveis de T e do seu derivado DHT, assim como os níveis de E; o BPA pode estimular a expressão gênica, ou ativar diretamente os AR, ER e os receptores de fator de crescimento, o que pode causar o aumento da proliferação e migração celular; o BPA também está associado a alterações nas respostas inflamatórias (Fig. 4). Esses diferentes mecanismos, muitas vezes sobrepostos, sustentam a ideia de que o BPA pode estar envolvido no desenvolvimento e na progressão do câncer de próstata.

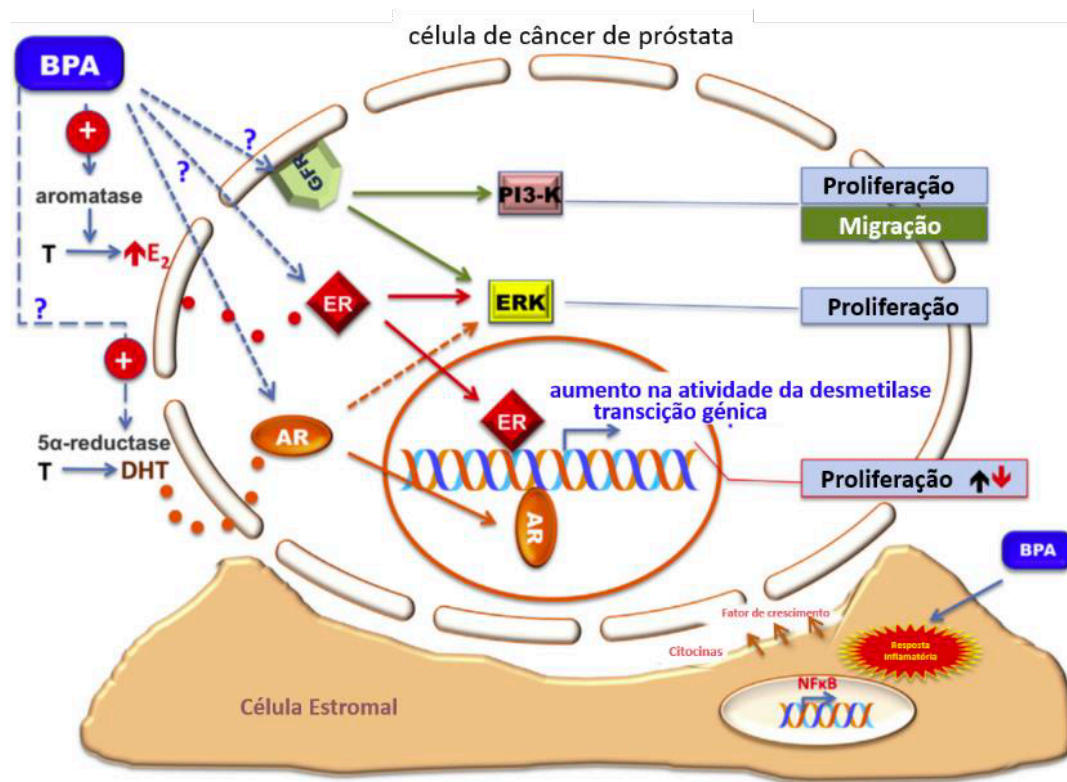


Figura 4: Modelo hipotético que representa o potencial efeito do BPA no câncer de próstata. O BPA tem a capacidade de influenciar os níveis de Testosterona (T), di-hidrotestosterona (DHT) e estradiol (E₂). Além disso, o BPA pode estimular a expressão gênica ou ativar diretamente os receptores de andrógeno, de estrógeno (ER) e os receptores de fator de crescimento (GFR) (adaptado de Di Donato et al 2017).

1.6 O gerbilo da Mongólia

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), também conhecido como esquilo da Mongólia, é um pequeno roedor da família Muridae (Fig 5 A). Esta espécie de gerbilo é frequentemente utilizada como modelo de estudo da próstata devido ao fato de que ela desenvolve neoplasias de forma espontânea, especialmente no trato genital, tanto em fêmeas (ADAMS; NORRIS, 1973; RUIZ et al., 2023) quanto em machos (CUSTÓDIO et al., 2004; CAMPOS et al., 2008). A incidência dessas neoplasias pode variar entre 20% e 26,8 % (CAMPOS et al., 2008). Essa característica torna o gerbilo da Mongólia uma escolha valiosa para estudos, uma vez que permite evitar o uso de agentes carcinogênicos nos indivíduos, tornando as condições experimentais mais próximas das encontradas na natureza.

A próstata do gerbilo, assim como a de outros roedores, é composta por quatro pares de lobos: o lobo anterior, dorsal, dorsolateral e ventral, que se encontram dispostos ao redor da uretra (Fig 5 B). As células secretoras dos diferentes lobos também diferem em termos de ultraestrutura, aparência da secreção e organização do estroma, como

observado por ROCHEL et al. (2007). O lobo ventral é frequentemente escolhido como alvo de estudos da próstata devido à sua maior sensibilidade a tratamentos hormonais, como os utilizados em estudos de castração cirúrgica ou química (GÓES et al., 2007).

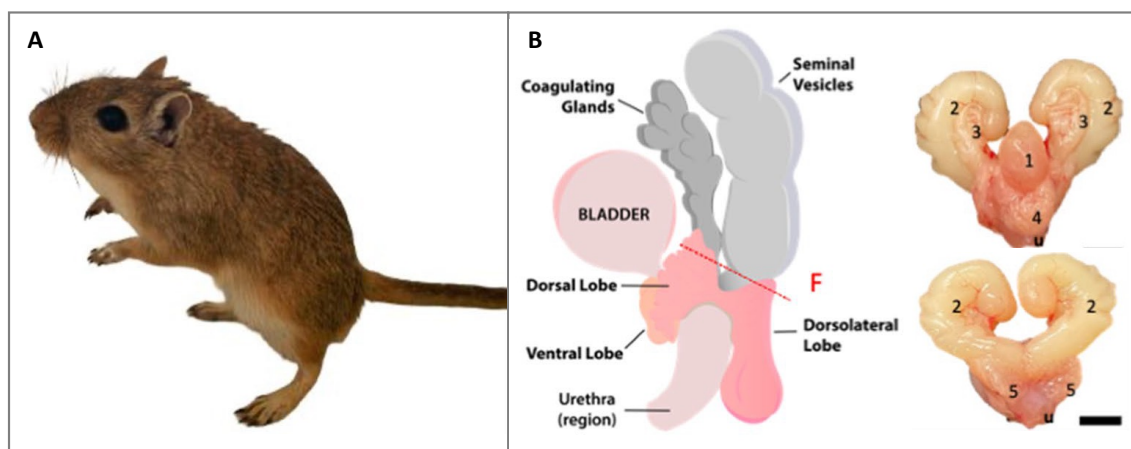


Figura 5. A: Gerbilo da Mongólia. B) Complexo prostático do Gerbilo da Mongólia adulto, 1- bexiga, 2- vesícula seminal, 3- lobo anterior, 4- lobo ventral, 5- lobo dorsolateral (Ruiz et al.; 2023 adaptado).

2. OBJETIVOS

Neste estudo, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da exposição ao BPA durante a gestação e a lactação, utilizando tanto baixas quanto altas doses do composto, sobre o lobo prostático ventral de gerbilos, bem como seu impacto na motilidade dos espermatozoides e na incidência de lesões na próstata em indivíduos na idade adulta e na senescência.

3. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram apresentados sobre a forma manuscrito submetido à “Environmental Toxicology”.

Artigo:

Bisphenol-A exposure during gestation and lactation impairs sperm motility, increase in prostatic lesion and alters hormonal signaling of gerbil ventral prostate in adulthood and senescence.

Simone Jacovaci Colleta¹, Luiz Henrique Alves Guerra¹, Thalles Fernando Rocha Ruiz², Vanessa Reame¹, Rejane Maira Góes^{1,2}, Patricia Simone Leite Vilamaior¹, Sebastião Roberto Taboga^{1,2}.

¹ *Department of Biological Sciences, São Paulo State University – UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto, SP, Brazil.*

² *Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.*

*Corresponding Author: Dr. Sebastião Roberto Taboga (e-mail: sebastiao.taboga@unesp.br), Departamento de Biologia – IBILCE, UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, Zip Code:15054-000, Tel: +55 17 32212386; Fax: +55 17 32212390.

Funding statement: This study was financed by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Process 2020/00160-1; 2020/01240-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) - Finance Code 001; National Council for Scientific and Technological Development (Process number: 302938/2020-6).

Ethics approval statement: (Ethical protocols- CEUA: n°218/219).

Data availability statement: The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

In recent years various environmental chemicals have been shown to disrupt endocrine regulation. Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor that exhibit estrogenic active and acts as on reproductive system. This experiment aimed to test whether Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) exposure to BPA, on gestational to lactation period, could cause impacts on sperm motility and ventral prostate lobe at adulthood and senescence. For this, pregnant gerbils were gavage every day, from pregnancy 8th day until lactation end, according to 4 experimental groups: control (C) gavage free; oil control (OC) gavage vehicle; low dose (LBPA) (50 µg/kg BPA) and high dose (HBPA) (5000 µg/kg BPA). The male offspring were allocated in isolators until 90 days (adult subgroup) or 1 year (senile subgroup) and then euthanized. Exposure to BPA cause an increase in the body weight at senescence, but did not alter ventral prostate lobe and prostatic complex weight. BPA had negative effect on sperm motility and increase the incidence of premalignant prostate lesion. At adult animals, LBPA and HPBA group showed reduction in testosterone levels when compared to C group and in these animals occurs reduction on androgen receptor expression. BPA also alter the expression of estrogen receptor. The expression of aromatase did not change, but the 5 α -Reductase had increase at senile LBPA subgroup. Our data indicate that perinatally exposure to BPA is able to promote changes on hormonal signaling in the prostate, and these hormonal changes are probably related to impairment of sperm motility and increase the incidence of premalignant prostate lesion.

Keywords: Bisphenol A. Gerbil. Ventral prostate lobe. Sperm motility. Prostate lesion.

Introduction

Compounds capable of modify the actions of endogenous hormones are called endocrine-disrupting chemicals (EDCs). The Bisphenol A (BPA) has been identified as an EDCs and is one of the highest-volume chemicals produced in the world (1). BPA is used in the manufacture of polycarbonate plastics, epoxy resins used to line metal cans, and many plastics objects, BPA molecules can migrate from cans or plastic bottles into food or water (2). The main ways of exposure to BPA are through contaminated food and water or skin contact (3). BPA binds to the estradiol receptor alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) and acts as an endocrine disruptor in organisms (4). Therefore, this substance can affect body systems regulated by hormones and can also cause metabolic disorders (5). Evidence indicates that male and female reproductive system and fertility are targets of BPA, causing a negative impact (6).

The prostate is the major accessory gland of male reproductive system, and its function is essential for fertility. The prostatic epithelium secretes a fluid responsible for stimulate molecular pathways involved in ejaculation, activate and capacitate of spermatozoa (7). Therefore, prostatic disorders can affect male fertility by spermatozoa not effective function (7).

Prostate development and growth are primarily controlled by steroid hormones. Among them, androgens are essential for prostate development and homeostasis, they promote the survival of prostate cells, preventing cell apoptosis, and stimulate the production of proliferation factors for epithelial cells (8). The action of these hormones occurs when they bind to the androgen receptor (AR), causing its activation. 5 α -dihydrotestosterone (DHT), synthesized from circulating testosterone (T) through the action of the enzyme 5 α -reductase, is the most powerful androgen in prostate (9).

While the prostate is primarily regulated by the action of androgens, estrogens also play an important role in prostate development and differentiation. Estrogens exert their influence through prostatic $ER\alpha$ and $ER\beta$ receptors. Among males, the 17 β -Estradiol (E_2) is considered the most effective estrogen (10). BPA have a high affinity to ERs, thus can increase prostate susceptibility to dysplasia and diseases. Experimental studies have demonstrated that exposure to BPA, especially during gestational and/or lactational stages, can cause alterations in the signaling of steroid hormones in the prostate, predisposing this gland to aging diseases (11–13).

Prostatic proliferative disorders and age-related disease of the male reproductive system are correlated with alterations in hormonal signaling (7). In middle age, the decline

in T levels begins (10). Prostate diseases are primarily sustained by androgen hormonal signaling, so a decrease in prostatic diseases would be expected. However, the opposite is observed, as there is an increase in the incidence of prostate cancer and lesions with age (14). In contrast to the decline of T levels, estradiol levels increase, leading to a significant rise in the ratio of estrogens to androgens (15). Consequently, estrogen likely plays a crucial role in the development of prostatic diseases with aging (10). Due to its estrogenic activity, exposure to BPA could increase susceptibility to prostate dysplasia and age-related carcinogenesis.

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), a small rodent, has been used as an excellent model for study carcinogenesis development in diverse organs and systems. These animals show a predisposition, especially in steroid-responsive organs, to develop spontaneous proliferative lesions (16). These features make the gerbil useful model to investigate whether BPA exposure can stimulate or intensify the development of prostate diseases.

In this study we assessed the effects of BPA exposure, both in low and high doses, during the gestational and lactational periods, on hormonal signaling, morphology and prostate lesion, as well as on sperm viability in adulthood and senescence.

Materials and Methods

Animal Maintenance

The Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) used in this study were obtained from the Animal Breeding Center at São Paulo State University, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (UNESP- IBILCE) in São José do Rio Preto, Brazil. The animals were housed in polypropylene cages and BPA-free isolators and water bottles (Alesco, Monte Mor, SP, Brazil) were used to minimized exposure to environmental endocrine disruptors. We allowed the gerbils free access to food and water. The room temperature was maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12h:12h light:dark cycle. The Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation at the Institute approved all animal practices (218/219 CEUA/UNESP).

BPA Exposure

Gerbil females at three months of age were housed with fertile males of the same age. The first litter was discarded to determine the timing of the second pregnancy. Pregnant gerbils were randomly divided into control and BPA groups and received oral

administration (by gavage) every day from the 8th day pregnancy until the end of lactation. They were given 0,1 mL of corn oil which contained either 50 µg/kg (BPA low dose group - LBPA) or 5000 µg/kg (BPA high dose group - HBPA). The oil control group (OC) received only corn oil. Gerbils in the Intact control group (IC) were not subjected to gavage. The experimental design is illustrated in Figure 1."

The 50 µg/kg/day dose is considered a safe dosage according to EFSA (European food safety authority) and US EPA (United States Environmental Protection Agency) (17,18), while the 5000 µg/kg/day dose is 100 times higher than the safe daily dose. Pups were separated from their mothers on pos natal day 21, with two gerbils housed per cage.

Sample Collection

On postnatal day 90 or 1 year after birth (adult subgroup or senile subgroup, respectively), male gerbils were euthanized by decapitation after anesthesia with 3.0% isoflurane vaporized with oxygen (N=5). Body weight was recorded before the euthanasia process. Blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at 2000 rpm for 20 minutes. Serum was stored at -80°C until hormone analysis time. The entire prostatic complex was removed and weighed. Subsequently, the ventral prostatic lobe was isolated, weighed, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, and embedded in paraffin. For histological and immunolabeling analyses, 4 µm thick histological sections were prepared. Hematoxylin and eosin (HE) staining was employed for stereology analysis, while periodic acid-Schiff (PAS) staining was used for the analysis of mucin-secreting lesions.

Hormone Analysis

Serum levels of testosterone (T, sensitivity 0.12 ng/mL) and estradiol-17β (E2, sensitivity 10.6 pg/mL) were measured using ELISA (T: EIA1559, E2: RE52041 and Cortisol RE52061, IBL International GmbH), following the manufacturer's instructions.

Sperm Motility Analysis

Immediately after euthanasia sperm motility was assessed. The cauda epididymis was perforated with a needle to obtain sperm in 1.0 mL of modified HTF at 37 °C (Human Tubal Fluid, Irvine Scientific, CA, USA). Then, 10 µL of this sperm solution in HTF was pipetted onto a Makler counting chamber. Sperm motility was estimated under a phase-contrast microscope (Olympus BX60, Olympus Corporation, Japan) at 200×

magnification through visual count (100 spermatozoa per animal). Spermatozoa were classified as motile with progressive movement, motile without progressive movement, or immotile.

Histopathological Analysis

Lesions on ventral prostatic lobe were evaluated and quantified. Histological sections stained with PAS were digitized with a BX61VS camera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) coupled to an Olympus VS120® Virtual Microscopy Slide Scanning System (VS120-S5), and analyzed with Image Pro-Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Inc., MD, USA). The classification of prostate lesions was carried out according to previously established criteria (19, 20), which were applied to the Mongolian gerbil (21). The total area of one histological section was analyzed, the quantification of prostatic lesion was calculated by dividing the number of each type of lesion by total number of acini analyzed in animals and expressed as a percentage. The different classifications of prostatic lesions were performed as follows: (1) Typical tissue; (2) Prostate hyperplasia; (3) Mucinous metaplasia; (4) Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (LGPIN); (5) High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN). Examples of prostate lesion are shown in figure 2.

Stereology

To quantify the relative frequency (%) of the ventral lobe prostate compartments (epithelium, lumen, and stroma), stereological analysis of HE-stained histological sections was carried out. Following the method detailed in Huttunen et al., 1981 (23), the relative frequency was calculated using the M130 multipoint test system applied to the prostate (22). Five microscopic fields per animal (25 fields per group) were digitized at 200× magnification. Then, the points coincident with each tissue compartment were counted and expressed as a percentage of the total points.

Immunolabeling Analysis

Expressions of α -actin, AR, ER- α , ER- β , aromatase and 5 α -reductase were determined by immunolabeling on histological sections of ventral gerbil prostate lobe. After deparaffinization and rehydration in a gradient of xylene, alcohol, and water antigenic retrieval was performed in citrate buffer at 98°C for 40 minutes. Then, sections were blocked for peroxidase activity using 5% H₂O₂ in methanol for 20 minutes.

Nonspecific proteins were blocked using 5% skimmed milk for 30 minutes. The sections were incubated overnight at 4 °C with their respective antibody: anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (mouse monoclonal, dilution 1:100, sc-32251, Santa Cruz Biotechnology); anti-AR (rabbit polyclonal, dilution 1:50, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); anti-ER α (mouse monoclonal, dilution 1:50, sc-8005, Santa Cruz Biotechnology); anti-ER β (rabbit polyclonal, dilution 1:50, PA1-310B, Invitrogen, ThermoFisher); anti-aromatase (rabbit polyclonal, dilution 1:50, EAB64300); anti-5 α -reductase (rabbit polyclonal, dilution 1:50, sc-20659, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Then, secondary antibodies were applied for 45 minutes at 37°C. Positive staining was detected using diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen (Novolink Max DAB, RE7270-CE, Leica Biosystems, Buffalo Grove IL, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin. The assessment of positive staining was conducted using QuPath software. The total area of one histological section was considered for quantification. All cells were analyzed and classified as either negative or positive staining cells, and the result was expressed as a percentage. To quantify the disruption of the muscle layer in muscle stroma, these regions were counted, and the value was divided by histological section area, expressed as the number of ruptures per square millimeter (number of ruptures/mm²)."

Statistical Analysis

The results are presented in mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Data analysis included parametric tests (ANOVA) and nonparametric tests (Kruskal–Wallis) to assess group differences, followed by Tukey's multiple comparison test for parametric data and Dunn's multiple comparison test for nonparametric data. Statistical significance was determined when $p < 0.05$.

Results

BPA cause increase in body weight in senescence.

BPA exposure during gestation and lactation did not result in any significant alterations in body weight among the adult subgroup. However, in senescent subgroup, the HBPA group exhibited an increase in body weight in relation to C group (as shown in Table 1). Additionally, BPA exposure did not lead to any changes in the prostatic complex, ventral prostate lobe, or relative ventral prostate weight of the offspring.

BPA (Bisphenol A) induced changes in testosterone levels.

In adult animals, the OC, LBPA and HPBA groups exhibited a decrease in T levels when compared to the C groups (Fig. 3 a). In senile animals, no significant alterations were observed in T levels among the groups (Fig. 3 b). Regarding E2, in both adult and senile animals, no significant changes were observed in serum levels among the groups (Fig. 3 c and d).

BPA impairs the Sperm Motility

BPA exposure during gestation and lactation had an adverse effect on sperm motility. In adult animals, the HBPA group exhibited a decrease in the percentage of spermatozoa with progressive movement compared to the C and OC groups, along with an increase in the percentage of immotile spermatozoa compared to the C, OC, and LBPA groups (Fig. 4 a). In senile animals, the HBPA group also exhibit a reduction in the percentage of spermatozoa with progressive movement and an increase in the percentage of immotile spermatozoa compared to the C group (Fig. 4 b).

Mucinic-like cells were identified in the ventral prostate of gerbils.

The morphological characteristics of the ventral lobe prostate in gerbils, as observed in this study, were consistent with those previously described in previous studies (24, 25). The ventral lobe prostate typically exhibited a simple acinar epithelium that varied from cubic to prismatic form. Within the prostatic stroma, fibroblast cells were observed, surrounded by collagen, while the smooth muscle layer consisted of muscular cells and collagen fibers concentrically arranged surrounding the acinar epithelium. The luminal compartment contained seminal fluid. (Fig. 2 a). Nevertheless, in adult animals, we observed features not commonly found in the male ventral gerbil prostate. We identified mucinic-like cells in prostate, which we associated with mucus/mucin-producing cells, we called them as mucinous metaplasia (MM) (Fig. 2 e and f). To confirm the presence of these MM regions, we conducted PAS staining, revealing that these cells tested positive for PAS. MM regions were consistently observed in all experimental groups, not only in non-lesioned prostates but also occasionally in association with prostatic lesions.

Another noteworthy observation in the morphological analysis was the presence of ruptured muscle layers within muscle stroma regions (Fig 5 a-d). To assess these

regions, we performed immunolabeling for α -actin and conducted quantification. However, there were no significant differences observed between the experimental groups. The data for α -actin quantification are presented in Figure 5 e-h.

The stereological analyses revealed that the proportion of prostatic compartments did not change in either adult or senile animals (Table II).

BPA caused increase in premalignant prostatic lesions at adulthood.

All experimental groups exhibited prostatic lesions. However, in adult animals, both the LBPA and HBPA groups showed a higher percentage of premalignant prostatic lesions (LPIN+HPIN) compared to the control (C) group (Fig 6 a). In senile animals, no differences in prostate lesions were observed (Fig. 6 b).

BPA exposure resulted in a decrease in AR expression.

During gestation and lactation, BPA exposure led to a significant decrease in AR expression in adult animals. The LBPA and HBPA groups exhibited approximately 60% and 80% reductions, respectively, in AR expression compared to the control (C) group. The OC group exhibited a reduction in AR expression in relation to C group (Fig. 7 a-d and 9 a). In senile animals, no difference was observed among the groups (Fig. 8 a-d and 9 b).

BPA also influenced the expression of ER α and ER β .

In adult animals, the LBPA group exhibited an increase in ER- α expression compared to both the control (C) and OC groups (Fig 7 e-h and 9 c). However, there was no significant difference observed in ER- β expression (Fig. 7 i-l and 9 e). In senile animals, ER- α expression remained unchanged (Fig. 8 e-h and fig 9 d), but the HBPA group showed a decrease in ER- β expression compared to the control group (Fig 8 i-l and fig 9 f).

BPA cause alteration in 5 α -reductase.

BPA exposure during gestation and lactation did not result in any changes in the expression of aromatase in either adult or senile animals (Fig 7 m-p and fig 9g). Regarding 5 α -reductase, in adult animals, the HBPA group exhibited a decrease compared to the LBPA group (Fig 7 q-t and 9 i). In senile animals, the LBPA group

showed an increase in 5 α -reductase expression compared to the C group (Fig 8 q-t and 9 j).

Discussion

The data from this study indicate that exposure to BPA from gestation to lactation impairs sperm motility, predisposes to the development of premalignant prostatic lesion in adulthood, and alters hormonal signaling in the prostate during both adulthood and senescence.

Exposure to high doses of BPA in gerbils from gestation to lactation resulted in increased body weight during senescence. This observation is consistent with previous studies that have linked BPA exposure to increased body weight (26–28). The estrogenic actions of BPA have been suggested to cause metabolic disruptions, including alterations in food intake, body weight, body fat distribution, glucose and insulin control, thereby increasing the predisposition to obesity (29). Our findings also indicate that BPA can affect testosterone levels. It is well-known that reductions in androgens levels can lead to an increase in body weight. This suggests that the increased body weight observed in animals exposed to BPA may be a result of changes in androgen hormone signaling.

Androgens and estrogens play pivotal roles in regulating both physiological and pathological processes in the prostate. Previous rodent studies involving BPA exposure during the prepubertal and pubertal periods have reported decreased T levels (30,31). Our data align with these findings, demonstrating that gerbil exposure to BPA during gestation and lactation perturbed testosterone levels. Despite BPA's known estrogenic action, we did not observe any significant changes in serum estradiol levels among the experimental groups.

Maternal exposure to BPA during early developmental stages can influence the quality of spermatogenesis in the offspring's adult life (32). While the exact mechanism by which BPA impairs spermatogenesis remains incompletely understood, it is known that prostatic secretion plays a crucial role in sperm activity (7). Our findings have demonstrated that BPA can disrupt prostatic homeostasis, which may contribute to impairments in spermatozoa.

In a prior study involving Pten knockout mice (Pb-Cre4/Ptenf/f), several areas with mucin-like cell presence were identified in tumor and lesion prostate tissue, a feature absent in healthy prostate tissue (33). Consequently, the presence of mucinous metaplasia was associated with prostate cancer (33). In our study, we observed the presence of

mucinous metaplasia in all adult animals, both in non-lesion prostate tissue and in association with lesions. This observation marks the first time that our research group has encountered this type of alteration in the prostate. As such, further investigations will be necessary to better understand the significance and implications of this cell type.

In a study by Montico et al., (2015) (34), changes in α -actin expression were observed in relation to androgen ablation, and in aging mice, α -actin increased in the dorsolateral prostate, suggesting a connection between aging, stromal reaction, and prostate neoplasia. Silva et al., (2018) (35) demonstrated that α -actin expression increases in the proliferative prostate. Despite the reduction in serum testosterone levels and the increase in premalignant lesions observed in the BPA-exposed groups, in our study exposure to BPA had no influence on the immunoexpression of α -actin.

Prostate tumor progression results from a multistage process that initially leads to the formation of premalignant lesion (LPIN or/and HPIN), primarily regulated by androgens. Both normal and cancer cells depend on the expression of androgen and estrogen receptors for their maintenance, and both are commonly suppressed in response to androgen deprivation (33). The animals in the LBPA and HPBA groups exhibited an increase in the percentage of prostatic lesions, alongside a decrease in testosterone levels and AR expression. These findings suggest that the progression of lesions in these groups represents an androgen-independent differentiation process.

Gerbil exposure to BPA during gestation and lactation disrupted AR expression. Previous studies have shown that BPA functions as an AR antagonist (31, 32). The mechanism by which BPA acts as an AR antagonist remains unresolved. BPA can interfere at multiple steps in the activation cascade of AR, including receptor binding or activation, increasing receptor stabilization, or nuclear translocation. (37).

Bhandari et al. (2019) (38) demonstrated that exposure of developing mouse embryos to BPA can altered expression of ER- α and ER- β in mesenchymal cells in developing urogenital sinus of fetal male mice. In the present study, we also observed changes in ER expression in adult and senile animals exposed to BPA. This data is noteworthy since BPA exhibits effects similar to endogenous 17- β -estradiol (39) and is capable of binding to estrogen receptors, thereby impairing endogenous estrogen binding (40).

5 α -Reductase and aromatase, respectively, are crucial enzymes in the biogenesis of dihydrotestosterone and estradiol (9). In their study, Castro et al. (2013) (9) observed lower protein levels of 5 α -reductase and an increased aromatase expression in adult male

rodent adults exposed to BPA, concomitant with decreased testosterone levels. In addition to demonstrating a decrease in testosterone levels, our results also indicate that BPA interferes with the activity of 5 α -reductase. Exposure to BPA during pregnancy impacts 5 α -reductase activity, leading to alterations in testosterone synthesis in rats. (41).

Another intriguing aspect uncovered in our study was the influence of prostate aging on the effects of BPA. We observed that only senile animals exposed to a low dose of BPA displayed an increase in 5 α -Reductase activity. This observation suggests that the effects seen in adulthood may differ from those observed in old age. While previous research has demonstrated that BPA can decrease aromatase activity in Leydig cells (42), our data showed no changes in aromatase levels within the prostate.

Conclusions

Our data demonstrated that BPA increases predisposition to lesions, induces changes in hormonal signaling in the prostate during adulthood, and impairs sperm motility. These animals exhibited changes in androgen signaling. Therefore, there is likely a correlation between sperm impairments and the decrease in androgen signaling in the prostate.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Luiz Roberto Falleiros Júnior for his valuable technical support. This study received financial support from: the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP – Process 2020/00160-1; 2020/01240-9), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) - Finance Code 001; National Council for Scientific and Technological Development (Process number: 302938/2020-6).

References

1. Malaisé Y, Lencina C, Cartier C, Olier M, Ménard S, Guzylack-Piriou L. Perinatal oral exposure to low doses of bisphenol A, S or F impairs immune functions at intestinal and systemic levels in female offspring mice. *Environmental Health*. 2020 Dec 31;19(1):93.
2. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W V. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. 2007 Aug;24(2):139–77.
3. Rodprasert W, Toppari J, Virtanen HE. Environmental toxicants and male fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2023 Feb;86:102298.
4. Ďurovcová I, Kyzek S, Fabová J, Makuková J, Gálová E, Ševčovičová A. Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environmental Pollution*. 2022 Aug;306:119346.

5. Molina-López AM, Bujalance-Reyes F, Urbano MT, Lora-Benítez A, Ayala-Soldado N, Moyano-Salvago R. Analysis of Blood Biochemistry and Pituitary-Gonadal Histology after Chronic Exposure to Bisphenol-A of Mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 26;19(21):13894.
6. Di Donato M, Cernera G, Giovannelli P, Galasso G, Bilancio A, Migliaccio A, et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Dec;457:35–42.
7. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*. 2016 Jul 1;13(7):379–86.
8. Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008 Jul;76(6):641–59.
9. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 α -Reductase Isozymes in Rat Prostate. *PLoS One*. 2013 Feb 6;8(2).
10. Cannarella R, Condorelli RA, Barbagallo F, La Vignera S, Calogero AE. Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Feb 22;12.
11. Lima RF de, Rodriguez DAO, Campos MS, Biancardi MF, Santos IFFR dos, Oliveira WD de, et al. Bisphenol-A promotes antiproliferative effects during neonatal prostate development in male and female gerbils. *Reproductive Toxicology*. 2015 Dec;58:238–45.
12. Rodríguez DAO, de Lima RF, Campos MS, Costa JR, Biancardi MF, Marques MR, et al. Intrauterine exposure to bisphenol A promotes different effects in both neonatal and adult prostate of male and female gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Environ Toxicol*. 2016 Dec;31(12):1740–50.
13. Cavalleri Sousa T, de Oliveira CB, Silva Ricardo ML, Musa de Aquino A, Scarano WR, Cruz Veras AS, et al. Prostate histological investigation in rats exposed to bisphenol a and phytochemicals during the perinatal period and subjected to hormonal stimulus in adulthood. *Int J Environ Health Res*. 2022 Nov 1;1–12.
14. Fiard G, Stavrínides V, Chambers ES, Heavey S, Freeman A, Ball R, et al. Cellular senescence as a possible link between prostate diseases of the ageing male. Vol. 18, *Nature Reviews Urology*. Nature Research; 2021. p. 597–610.
15. Bélanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Oct;79(4):1086–90.
16. Ruiz TFR, Vilamaior PSL, Grigio V, Colleta SJ, Zucão MI, de Campos SGP, et al. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Biology. *Reproductive Sciences*. 2023 Jan 25;
17. EFSA. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*. 2015 Jan;13(1):3978.
18. Soriano S, Gil-Rivera M, Marroqui L, Alonso-Magdalena P, Fuentes E, Gustafsson JA, et al. Bisphenol A Regulates Sodium Ramp Currents in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons and Increases Nociception. *Sci Rep*. 2019 Jul 16;9(1):10306.
19. Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W, Schultz DS. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*. 1993 Mar;24(3):298–310.
20. Shappell SB, Thomas G V., Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2270–305.
21. Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, et al. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils:

- Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp Mol Pathol*. 2010 Feb;88(1):96–106.
22. Weibel Er. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131—155.
 23. Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat*. 1981;132(Pt 3):357–70.
 24. Pegorin De Campos SG, Zanetoni C, Góes RM, Taboga SR. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2006;288(7):723–33.
 25. Rochel-Maia SS, Santos FCA, Alonso-Magdalena P, Góes RM, Vilamaior PSL, Warner M, et al. Estrogen receptors alpha and beta in male and female gerbil prostates. *Biol Reprod*. 2013 Jan;88(1).
 26. Patisaul HB, Bateman HL. Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ER β agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Horm Behav*. 2008;53(4):580–8.
 27. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*. 2001;109(7):675–80.
 28. Taylor JA, Sommerfeld-Sager JM, Meng CX, Nagel SC, Shioda T, Vom Saal FS. Reduced body weight at weaning followed by increased post-weaning growth rate interacts with part-per-trillion fetal serum concentrations of bisphenol A (BPA) to impair glucose tolerance in male mice. *PLoS One*. 2018 Dec 1;13(12).
 29. Le Magueresse-Battistoni B, Vidal H, Naville D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Oct 2;9.
 30. Takao T, Nanamiya W, Nagano I, Asaba K, Kawabata K, Hashimoto K. Exposure with the environmental estrogen bisphenol a disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sci*. 1999 Oct;65(22):2351–7.
 31. Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse Effects of Environmental Toxicants, Octylphenol and Bisphenol A, on Male Reproductive Functions in Pubertal Rats. *Endocrine*. 2004;25(2):163–72.
 32. Castellini C, Totaro M, Parisi A, D'Andrea S, Lucente L, Cordeschi G, et al. Bisphenol A and Male Fertility: Myths and Realities. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11(June):1–10.
 33. Santos NJ, Ximenes PP, Constantino FB, Carvalho HF, Felisbino SL. Mucinous metaplasia in Pten conditional knockout mice and mucin family genes as prognostic markers for prostate cancer. *Life Sci*. 2022 Mar 15;293.
 34. Montico F, Kido LA, San Martin R, Rowley DR, Cagnon VHA. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *Prostate*. 2015 Oct 1;75(14):1643–61.
 35. Silva RS, Kido LA, Montico F, Vendramini-Costa DB, Pilli RA, Cagnon VHA. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamine treatments in TRAMP mice. *Cell Biol Int*. 2018 Aug 1;42(8):1006–20.
 36. Wang H, Ding Z, Shi QM, Ge X, Wang HX, Li MX, et al. Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*. 2017 Jul;387:10–6.
 37. Huang X, Cang X, Liu J. Molecular mechanism of Bisphenol A on androgen receptor antagonism. *Toxicology in Vitro*. 2019 Dec;61:104621.

38. Bhandari RK, Taylor JA, Sommerfeld-Sager J, Tillitt DE, Ricke WA, Vom Saal FS. Estrogen receptor 1 expression and methylation of Esr1 promoter in mouse fetal prostate mesenchymal cells induced by gestational exposure to bisphenol A or ethinylestradiol. *Environ Epigenet*. 2019 Jul 1;5(3).
39. Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Mar;37(2):738–58.
40. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*. 2007 Aug;24(2):178–98.
41. Castro B, Sánchez P, Torres JM, Ortega E. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the intraprostatic levels of aromatase and 5 α -reductase isozymes in juvenile rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2018 May;115:20–5.
42. Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. *Endocrinology*. 2004 Feb 1;145(2):592–603.

Table I: Analysis of biometrical measurements of body weight, total prostate weight, and ventral prostate weight

Adult group	Experimental groups (N=5)			
	C	OC	LBPA	HBPA
Body weight (g)	72.67 ± 4.50	71.67 ± 4.63	77.67 ± 4.46	78.33 ± 5.99
Prostatic complex weight (g)	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.10	0.78 ± 0.09	0.77 ± 0.09
Prostatic complex relative weight (×10 ⁻³)	9.52 ± 0.62	9.88 ± 0.97	10.11 ± 1.13	9.84 ± 0.66
Ventral lobe weight (g) (×10 ⁻³)	14.83 ± 4.54	14.00 ± 3.69	16.00 ± 3.58	13.00 ± 3.80
Ventral lobe relative weight (×10 ⁻³)	0.21 ± 0.07	0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.05
Senile group	C	OC	LBPA	HBPA
Body weight (g)	91.33 ± 14.79 ^a	106.70 ± 13.49 ^{a, b}	109.00 ± 2.45 ^{a, b}	117.30 ± 14.90 ^b
Prostatic complex weight (g)	1.04 ± 0.11	1.10 ± 0.06	0.99 ± 0.05	1.14 ± 0.17
Prostatic complex relative weight (×10 ⁻³)	11.59 ± 2.22	10.39 ± 0.77	9.08 ± 0.27	9.76 ± 1.34
Ventral lobe weight (g) (×10 ⁻³)	30.67 ± 8.31	36.67 ± 19.56	32.83 ± 5.23	32.83 ± 13.56
Ventral lobe relative weight (×10 ⁻⁴)	0.33 ± 0.06	0.34 ± 0.14	0.30 ± 0.05	0.27 ± 0.08

Data expressed in mean ± SD.

^{a, b} Superscript letters indicate statistically significant differences among the experimental groups ($p \leq 0.05$).

Table II: Stereological Parameters of the Ventral Lobe Prostate in Mongolian Gerbils.

Stereological data (%)		Experimental groups (N=5)			
Adult group	C	OC	LBPA	HBPA	
Epithelium	22.13 ± 4.01	26.82 ± 9.30	29.92 ± 6.77	27.58 ± 3.68	
Stroma	31.44 ± 4.50	27.49 ± 4.68	26.63 ± 4.90	28.34 ± 6.56	
Lumen	46.43 ± 3.84	45.69 ± 8.12	43.46 ± 10.10	44.08 ± 8.93	
Senile group	C	OC	LBPA	HBPA	
Epithelium	16.79 ± 6.67	20.59 ± 2.91	17.05 ± 3.88	21.74 ± 5.89	
Stroma	20.51 ± 4.80	24.41 ± 2.06	27.74 ± 8.46	20.97 ± 5.82	
Lumen	62.71 ± 7.60	55.00 ± 3.67	55.21 ± 10.17	57.28 ± 4.89	

Data expressed in mean ± SD.

There were no statistically significant differences observed among the experimental groups ($p \leq 0.05$).

Figure legends

Figure 1. Pregnant females were administered orally (by gavage) with 0.1 mL of corn oil daily, starting from the 8th day of gestation and continuing through the end of lactation. The corn oil contained the following: 50 $\mu\text{g/kg}$ body weight (BPA low dose group - LBPA) or 5000 $\mu\text{g/kg}$ body weight (BPA high dose group - HBPA); Corn oil alone (corn oil vehicle control group - OC). Additionally, there was an control group (C) of gerbils that were not subjected to gavage. At pos natal day 90 or 1 year after born (adult subgroup or senile subgroup, respective), male gerbils were euthanized.

Figure 2. Histological Micrographs of Lesions in the Ventral Prostate Lobe of Gerbils. A and B) Typical tissue. The prostate exhibits a simple epithelium composed of cubic cells. C and D) Epithelial hyperplasia with epithelial stratification. E and F) Mucinous metaplasia (indicated by the dotted line). G and H) Low-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (LGPIN) (indicated by the asterisk). Epithelial stratification is evident, along with atypical nuclei. I and J) High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN). Epithelial stratification with a cribriform pattern (indicated by black arrows). PAS Stain. Scale bar = 20 μm .

Figure 3. Serum Concentrations of Testosterone (T) and Estradiol (E2), presented as the mean $\pm$ SD. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$)

Figure 4. Sperm Motility Data presented as mean $\pm$ SD. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$).

Figure 5. Histological Micrographs of ventral gerbil prostate showing the smooth muscle layer in A) HE stains. B) immunofluorescence in green stain indicate the α -actin, blue indicate the nucleus. C and D) Immunolabeling for α -actin, brown stain indicates immunoreactive stroma cells. Gray arrows highlight discontinuities in the smooth muscle layer. Scale bars: 20 μm . E and F) Quantification of α -actin expression in adult (E) and senile (F) animals. G and H) Quantification of disruptions in the α -actin layer relative to histological section area. Mean values $\pm$ SD are presented

Figure 6. Quantification of Prostatic Lesions in the Ventral Lobe of Gerbils. Values presented as mean $\pm$ SD. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$).

Figure 7. Immunohistochemistry for AR (a-d), ER- α (e-h), ER- β (i-l), aromatase (m-p) and 5 α -reductase (q-t) in the ventral prostatic lobes of adult Mongolian gerbils. Black arrows denote nuclear immunoreactivity, while gray arrows indicate cytoplasmic immunoreactivity. Positive immunoreaction is represented by brown staining.

Figure 8. Immunohistochemistry for AR (a-d), ER- α (e-h), ER- β (i-l), aromatase (m-p) and 5 α -reductase (q-t) in the ventral prostatic lobes of senile Mongolian gerbils. Black arrows denote nuclear immunoreactivity, while gray arrows indicate cytoplasmic immunoreactivity. Positive immunoreaction is represented by brown staining.

Figure 9. Quantification of immunohistochemistry for AR (a- adult, b-senile), ER- α (c-adult, d- senile), ER- β (e-adult, f-senile), aromatase (g-adult, h-senile) and 5 α -reductase (i-adult, j-senile) in the ventral prostatic lobes of Mongolian gerbils. Values presented as mean $\pm$ SD. * Indicates a significant difference ($p < 0.05$).

Figure 1.

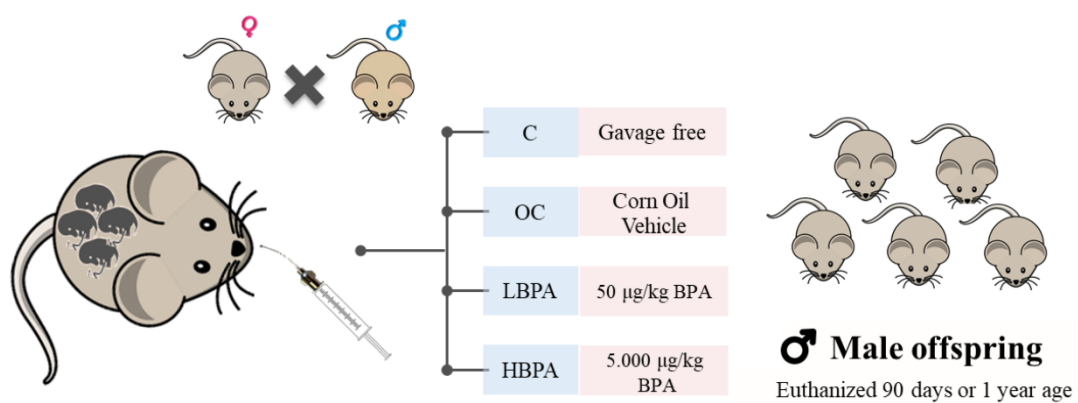


Figure 2.

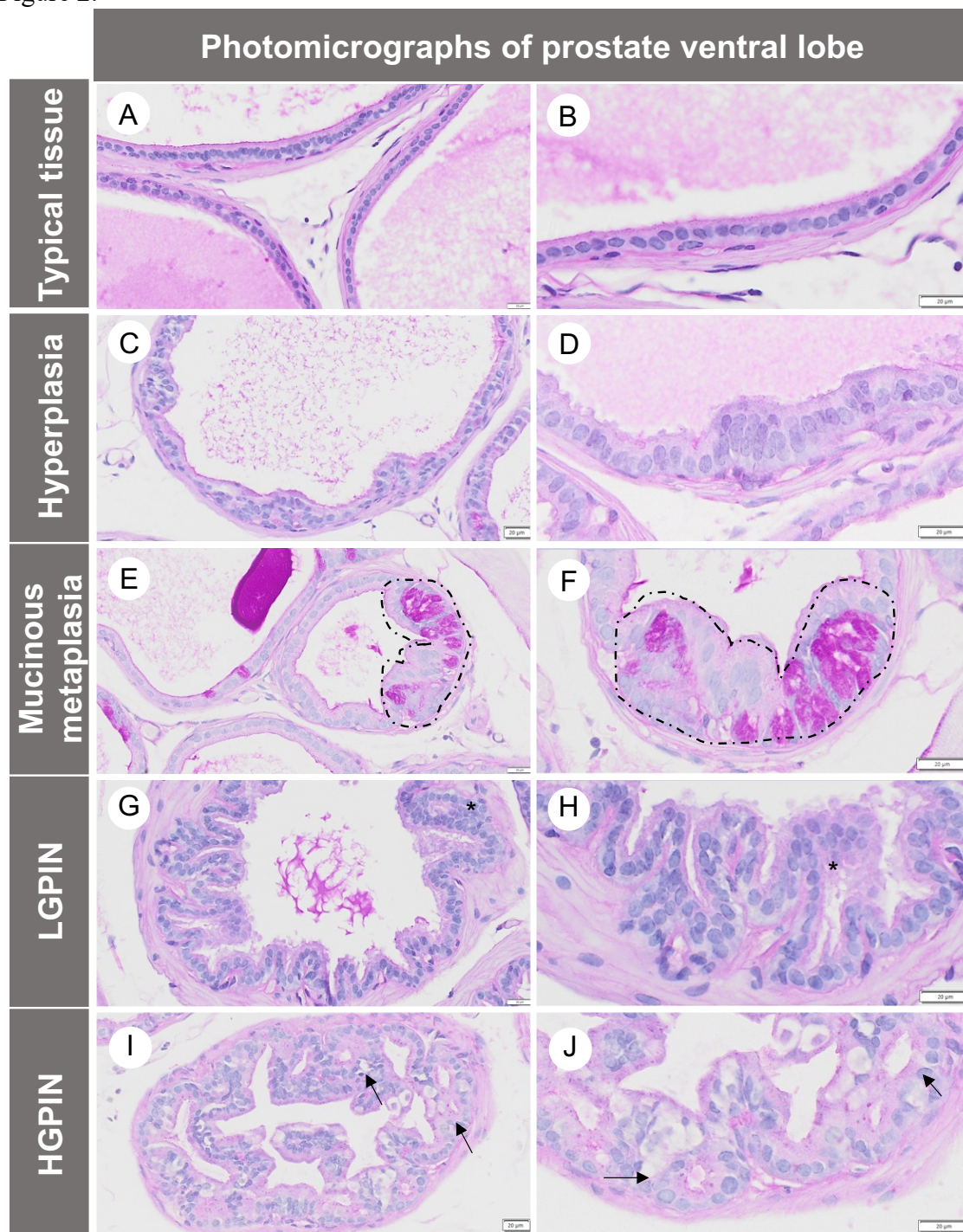


Figure 3.

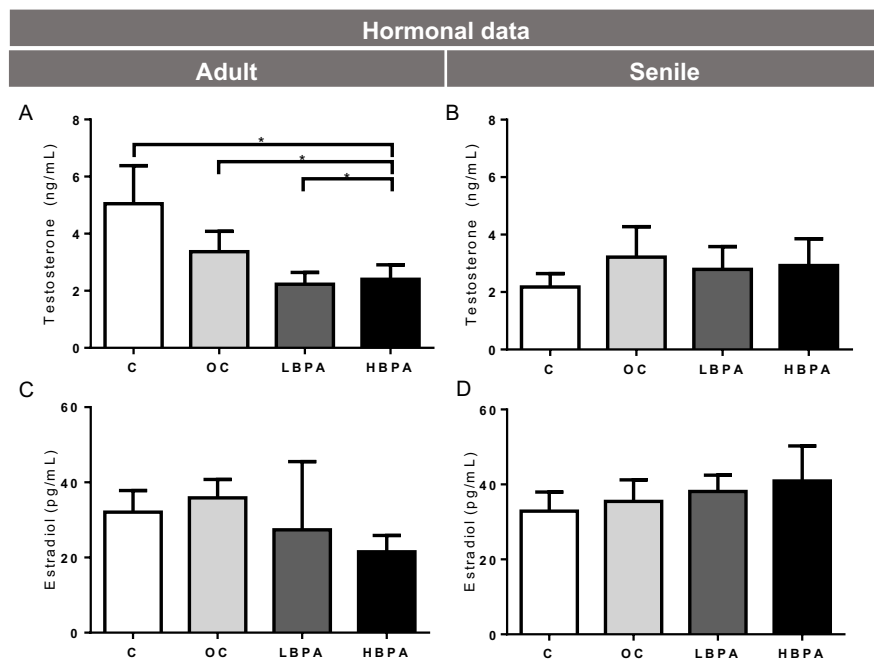


Figure 4.

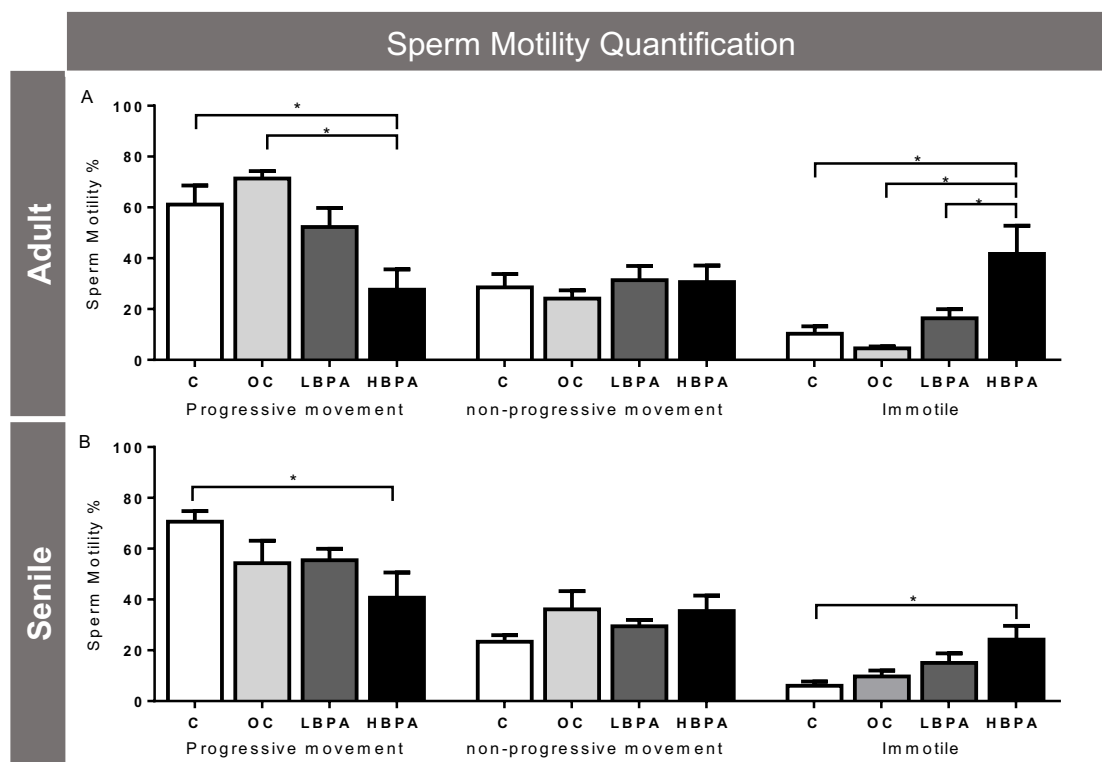


Figure 5.

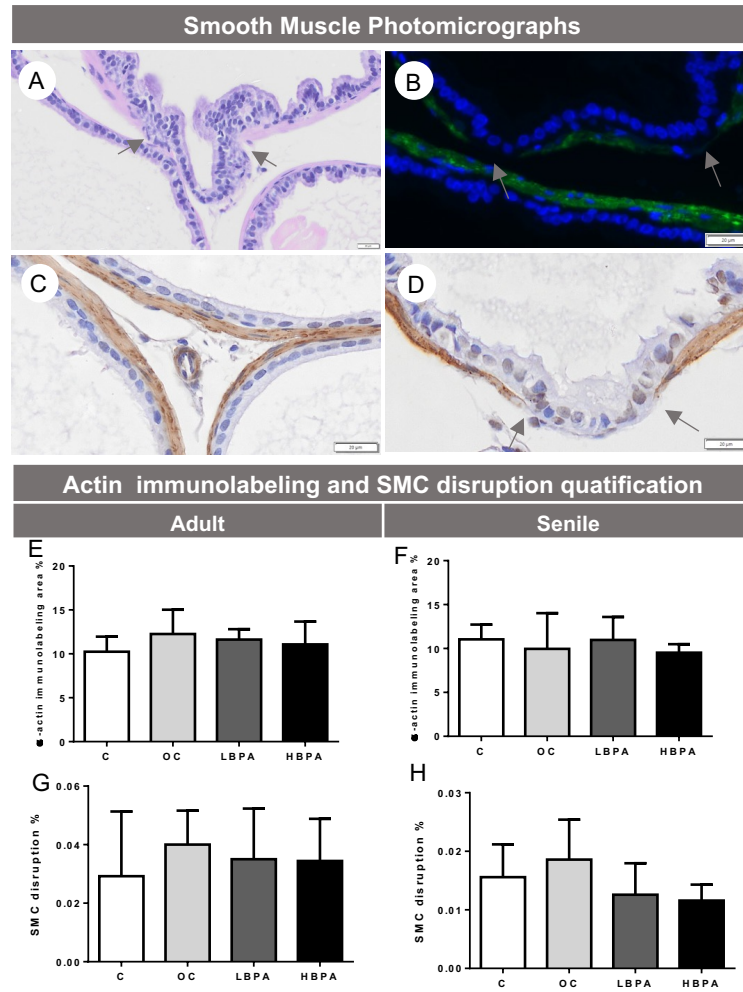


Figure 6.

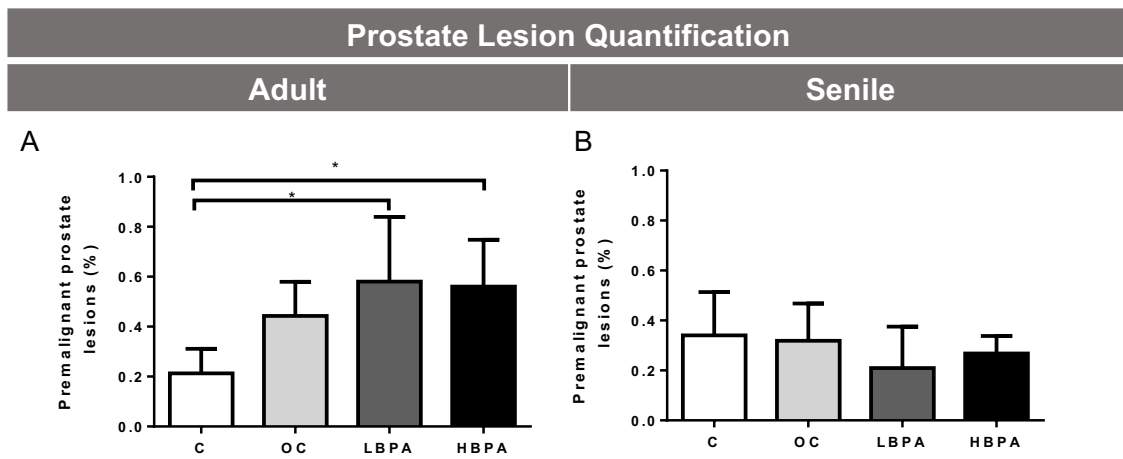


Figure 7

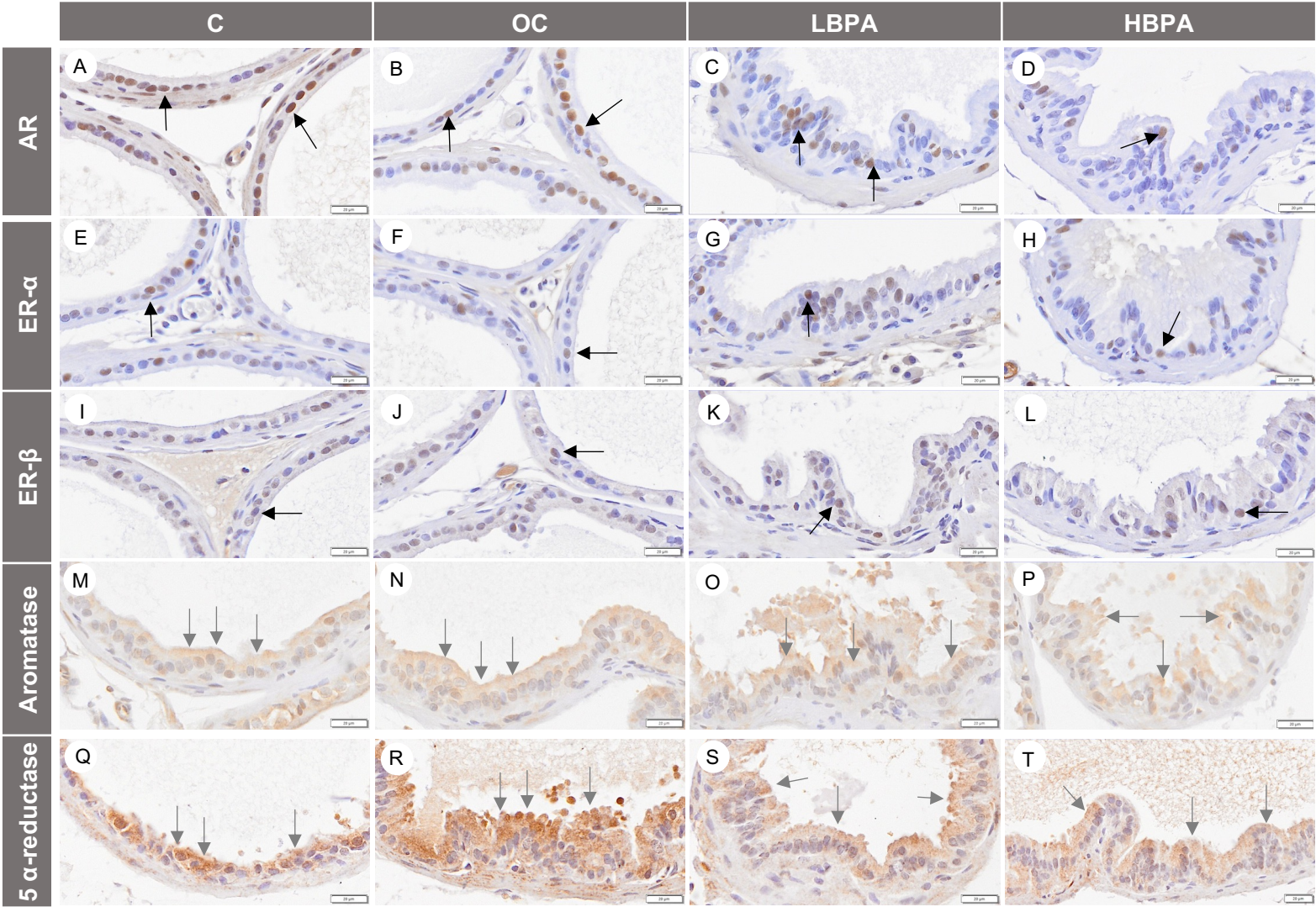


Figure 8.

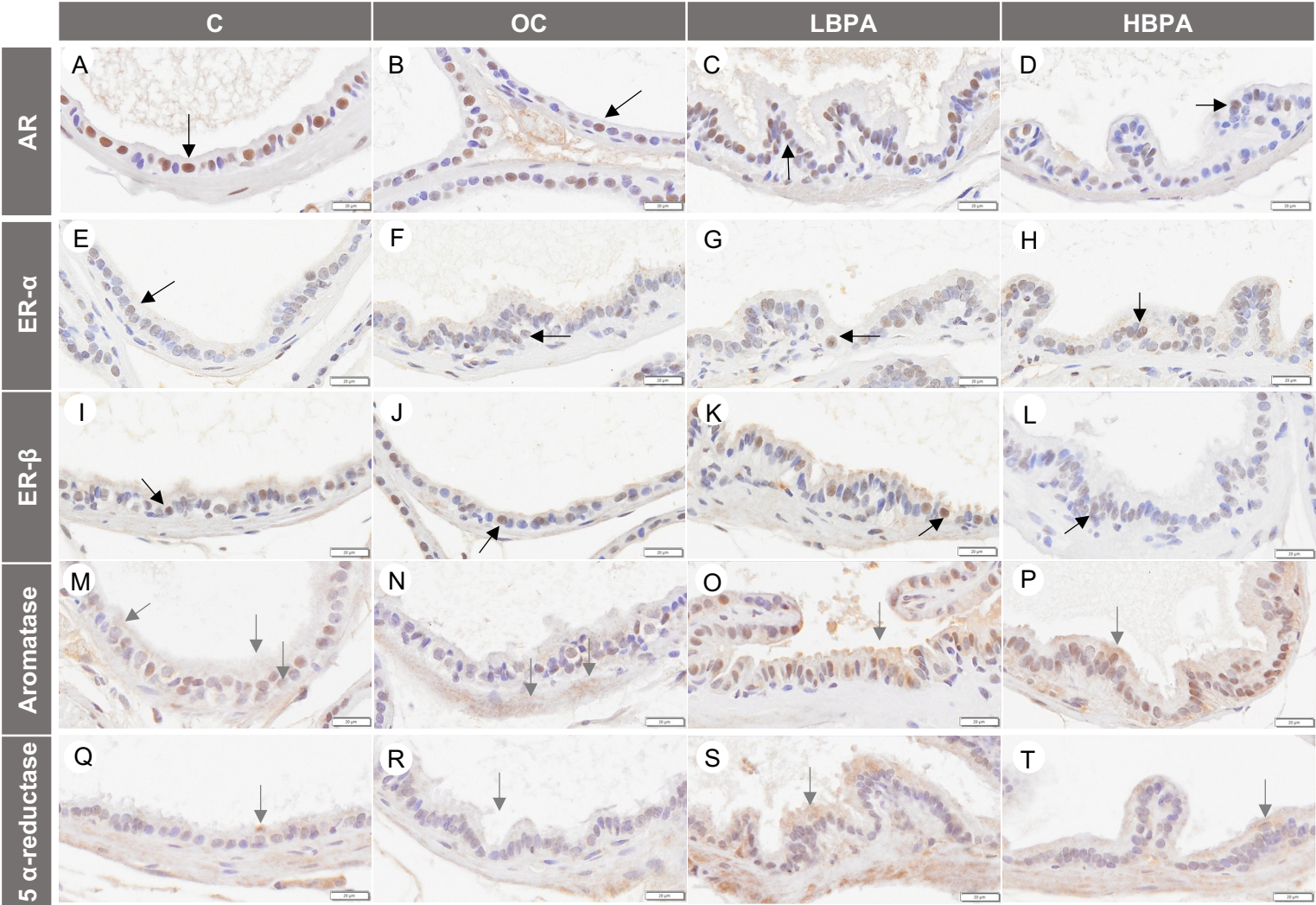
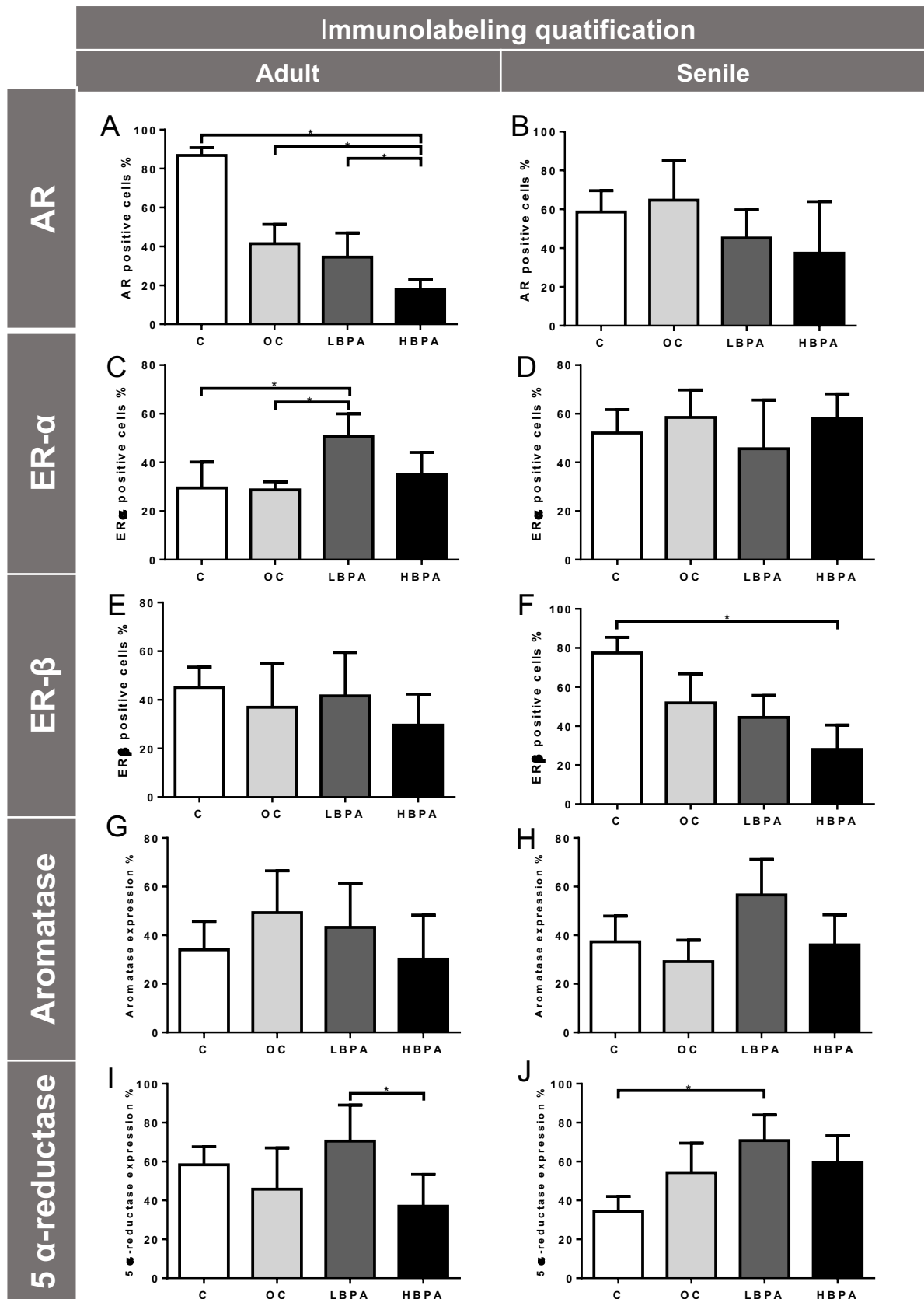


Figure 9.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A presente tese evidenciou que a exposição ao BPA durante a gestação e lactação apresenta consequências na vida adulta e senil. Avaliamos as consequências de alguns parâmetros reprodutivos, como motilidade de espermatozoides e alterações na próstata. O BPA causou alterações na sinalização hormonal, tanto nos níveis séricos quanto na expressão de receptores hormonais, como AR e ERs. Essas alterações provavelmente estão envolvidas na diminuição da motilidade de espermatozoides e no aumento de lesões prostáticas pré-malignas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; CHAKRABORTY, P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, n. 8, p. 1–10, 2019.
- ADAMS, C. E.; NORRIS, M. L. Observations on reproduction in the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Journal of reproduction and fertility*, v. 33, n. 1, p. 185–188, 1973.
- AKINGBEMI, B. T. et al. Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol A Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, v. 145, n. 2, p. 592–603, 1 fev. 2004.
- AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein Secretion and Secretory Processes in Male Accessory Sex Glands. Em: [s.l.: s.n.]. p. 127–231.
- BANERJEE, P. P.; BANERJEE, S.; BROWN, T. R. Increased Androgen Receptor Expression Correlates with Development of Age-Dependent, Lobe-Specific Spontaneous Hyperplasia of the Brown Norway Rat Prostate. *Endocrinology*, v. 142, n. 9, p. 4066–4075, set. 2001.
- BÉLANGER, A. et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 79, n. 4, p. 1086–1090, out. 1994.
- BERMAN, D. M.; RODRIGUEZ, R.; VELTRI, R. W. Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate. Em: *Campbell-Walsh Urology*. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 2533-2569.e11.
- BHANDARI, R. K. et al. Estrogen receptor 1 expression and methylation of *Esr1* promoter in mouse fetal prostate mesenchymal cells induced by gestational exposure to bisphenol A or ethinylestradiol. *Environmental Epigenetics*, v. 5, n. 3, 1 jul. 2019.
- BOSTWICK, D. G. et al. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Human Pathology*, v. 24, n. 3, p. 298–310, mar. 1993.
- CAMPOS, S. G. P. et al. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 89, n. 1, p. 13–24, 2008.
- CANNARELLA, R. et al. Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 22 fev. 2021.
- CARRUBA, G. Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 102, n. 4, p. 899–911, 1 nov. 2007.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*, v. 61, n. 4, p. 2–7, abr. 2003.
- CASTELLINI, C. et al. Bisphenol A and Male Fertility: Myths and Realities. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, n. June, p. 1–10, 2020.

CASTRO, B. et al. Bisphenol A Exposure during Adulthood Alters Expression of Aromatase and 5 α -Reductase Isozymes in Rat Prostate. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 6 fev. 2013.

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

CAVALLERI SOUSA, T. et al. Prostate histological investigation in rats exposed to bisphenol a and phytochemicals during the perinatal period and subjected to hormonal stimulus in adulthood. *International Journal of Environmental Health Research*, p. 1–12, 1 nov. 2022.

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

CUSTÓDIO, A. M. G.; GÓES, R. M.; TABOGA, S. R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: Comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biology International*, v. 28, n. 5, p. 335–344, 2004.

DI DONATO, M. et al. Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 457, p. 35–42, dez. 2017.

ĐUROVCOVÁ, I. et al. Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environmental Pollution*, v. 306, p. 119346, ago. 2022.

EFSA. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, v. 13, n. 1, p. 3978, jan. 2015.

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1155, n. 1, p. 174–186, fev. 2009.

FIARD, G. et al. Cellular senescence as a possible link between prostate diseases of the ageing male. *Nature Reviews Urology* *Nature Research*, , 1 out. 2021.

GÓES, R. M. et al. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron (Oxford, England : 1993)*, v. 38, n. 3, p. 231–236, 2007.

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

GORE, A. C. et al. Introdução aos disruptores endócrinos (DEs). *Endocrine Society*, p. 76, 2014.

HÄRKÖNEN, P. L.; MÄKELÄ, S. I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 92, n. 4, p. 297–305, nov. 2004.

HERATH, C. B. et al. Adverse Effects of Environmental Toxicants, Octylphenol and Bisphenol A, on Male Reproductive Functions in Pubertal Rats. *Endocrine*, v. 25, n. 2, p. 163–172, 2004.

HO, S. M. Estrogens and anti-estrogens: Key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004.

HUANG, X.; CANG, X.; LIU, J. Molecular mechanism of Bisphenol A on androgen receptor antagonism. *Toxicology in Vitro*, v. 61, p. 104621, dez. 2019.

HUTTUNEN, E.; ROMPPANEN, T.; HELMINEN, H. J. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *Journal of anatomy*, v. 132, n. Pt 3, p. 357–70, 1981.

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

KING, K. J.; NICHOLSON, H. D.; ASSINDER, S. J. Effect of increasing ratio of estrogen:androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. *Prostate*, v. 66, n. 1, p. 105–114, 1 jan. 2006.

LASSEN, T. H. et al. Urinary bisphenol a levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality. *Environmental Health Perspectives*, v. 122, n. 5, p. 478–484, 2014.

LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B.; VIDAL, H.; NAVILLE, D. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, 2 out. 2018.

LI, D.; SUH, S. Health risks of chemicals in consumer products: A review. *Environment International* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2019.

LIMA, R. F. DE et al. Bisphenol-A promotes antiproliferative effects during neonatal prostate development in male and female gerbils. *Reproductive Toxicology*, v. 58, p. 238–245, dez. 2015.

LIU, X. et al. Exposure to bisphenol-A and reproductive hormones among male adults. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 2, p. 934–941, 1 mar. 2015.

LUU-THE, V.; LABRIE, F. The Intracrine Sex Steroid Biosynthesis Pathways. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 177–192.

MALAISÉ, Y. et al. Perinatal oral exposure to low doses of bisphenol A, S or F impairs immune functions at intestinal and systemic levels in female offspring mice. *Environmental Health*, v. 19, n. 1, p. 93, 31 dez. 2020.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, v. 253, n. 2, p. 165–174, jan. 2003.

MICHAŁOWICZ, J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, n. 2, p. 738–758, mar. 2014.

MOLINA-LÓPEZ, A. M. et al. Analysis of Blood Biochemistry and Pituitary-Gonadal Histology after Chronic Exposure to Bisphenol-A of Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 21, p. 13894, 26 out. 2022.

MONTICO, F. et al. Reactive stroma in the prostate during late life: The role of microvasculature and antiangiogenic therapy influences. *Prostate*, v. 75, n. 14, p. 1643–1661, 1 out. 2015.

NICHOLSON, T. M.; RICKE, W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, present and future. *Differentiation*, v. 82, n. 4–5, p. 184–199, 2011.

PATISAUL, H. B.; BATEMAN, H. L. Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ER β agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Hormones and Behavior*, v. 53, n. 4, p. 580–588, 2008.

PEGORIN DE CAMPOS, S. G. et al. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 288, n. 7, p. 723–733, 2006.

PERNAR, C. H. et al. The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 12, 2018.

PREZIOSO, D. et al. Estrogens and aspects of prostate disease. *International Journal of Urology*, v. 14, n. 1, p. 1–16, jan. 2007.

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

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, v. 76, n. 6, p. 641–659, jul. 2008.

RICKE, W. A. et al. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 5, p. 1512–1520, 30 maio 2008.

RISBRIDGER, G. P.; ELLEM, S. J.; MCPHERSON, S. J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 39, n. 3, p. 183–188, set. 2007.

ROCHEL, S. S. et al. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, v. 290, n. 10, p. 1233–1247, out. 2007.

ROCHEL-MAIA, S. S. et al. Estrogen receptors alpha and beta in male and female gerbil prostates. *Biology of Reproduction*, v. 88, n. 1, jan. 2013a.

ROCHEL-MAIA, S. S. et al. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Male and Female Gerbil Prostates1. *Biology of Reproduction*, v. 88, n. 1, 1 jan. 2013b.

ROCHESTER, J. R. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, dez. 2013.

RODPRASERT, W.; TOPPARI, J.; VIRTANEN, H. E. Environmental toxicants and male fertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 86, p. 102298, fev. 2023.

RODRÍGUEZ, D. A. O. et al. Intrauterine exposure to bisphenol A promotes different effects in both neonatal and adult prostate of male and female gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Environmental Toxicology*, v. 31, n. 12, p. 1740–1750, dez. 2016.

RODRÍGUEZ, R. et al. Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. *The Prostate*, v. 57, n. 2, p. 176–185, 1 out. 2003.

ROSS, MICHAEL H; PAWLINA, W. *Histologia: Texto e Atlas em Correlação com Biologia Celular e Molecular*. [s.l: s.n.].

RUBIN, B. S. et al. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 7, p. 675–680, 2001.

RUBIN, B. S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, n. 1–2, p. 27–34, out. 2011.

RUIZ, T. F. R. et al. The Mongolian Gerbil as a Useful Experimental Model in Reproductive Biology. *Reproductive Sciences*, 25 jan. 2023.

RUMPOLD, H. et al. The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. *Experimental Gerontology*, v. 37, n. 8–9, p. 1001–1004, ago. 2002.

SANTOS, N. J. et al. Mucinous metaplasia in Pten conditional knockout mice and mucin family genes as prognostic markers for prostate cancer. *Life Sciences*, v. 293, 15 mar. 2022.

SCINICARIELLO, F.; BUSER, M. C. Serum testosterone concentrations and urinary bisphenol a, benzophenone-3, triclosan, and paraben levels in male and female children and adolescents: NHANES 2011–2012. *Environmental Health Perspectives*, v. 124, n. 12, p. 1898–1904, 1 dez. 2016.

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 Research*, v. 64, n. 6, p. 2270–2305, 15 mar. 2004.

SILVA, R. S. et al. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamine treatments in TRAMP mice. *Cell Biology International*, v. 42, n. 8, p. 1006–1020, 1 ago. 2018.

SILVERTHORN, D. U. *Fisiologia Humana Silverthorn*. [s.l: s.n.].

SKINNER, M. K.; MANIKKAM, M.; GUERRERO-BOSAGNA, C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reproductive Toxicology*, v. 31, n. 3, p. 337–343, 2011.

SORIANO, S. et al. Bisphenol A Regulates Sodium Ramp Currents in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons and Increases Nociception. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 10306, 16 jul. 2019.

TAKAO, T. et al. Exposure with the environmental estrogen bisphenol a disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sciences*, v. 65, n. 22, p. 2351–2357, out. 1999.

TAPLIN, M. E.; HO, S.-M. The Endocrinology of Prostate Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, n. 8, p. 3467–3477, ago. 2001.

TAYLOR, J. A. et al. Reduced body weight at weaning followed by increased post-weaning growth rate interacts with part-per-trillion fetal serum concentrations of bisphenol A (BPA) to impair glucose tolerance in male mice. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, 1 dez. 2018.

TEILMANN, G. et al. Putative effects of endocrine disruptors on pubertal development in the human. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 16, n. 1, p. 105–121, 2002.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of urology*, v. 166, n. 6, p. 2472–83, dez. 2001.

ÜNÜVAR, T.; BÜYÜKGEBİZ, A. Fetal and neonatal endocrine disruptors. *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, v. 4, n. 2, p. 51–60, 2012.

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

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, v. 13, n. 7, p. 379–386, 1 jul. 2016.

WANG, H. et al. Anti-androgenic mechanisms of Bisphenol A involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology*, v. 387, p. 10–16, jul. 2017.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 12, p. 131–155, 1963.

WEIHUA, Z. et al. A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 11, p. 6330–6335, 22 maio 2001.

WETHERILL, Y. B. et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 178–198, ago. 2007.

ZHU, Y.-S. Receptor Isoform and Ligand-Specific Modulation of Dihydrotestosterone-Induced Prostate Specific Antigen Gene Expression and Prostate Tumor Cell Growth by Estrogens. *Journal of Andrology*, v. 26, n. 4, p. 500–508, 1 jul. 2005.

ZHU, Y.-S.; SUN, G.-H. 5α -Reductase Isozymes in the Prostate. *Journal of medical sciences (Taipei, Taiwan)*, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2005.

ZHUANG, W. et al. Association of Serum Bisphenol-A Concentration and Male Reproductive Function among Exposed Workers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 68, n. 1, p. 38–45, 3 jan. 2015.

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição materna ao bisfenol A sobre a próstata de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) adultos e senescentes", registrada com o nº. 218/2019 - CEUA, sob a responsabilidade do Professor Doutor Sebastião Roberto Taboga, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em 27 de fevereiro de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2020 a 01/04/2023
Espécie/linhagem/Raça	<i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	150
Peso/Idade	70 g/ 03 meses e 01 ano
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP/Campus São José do Rio Preto - SP.

São José do Rio Preto, 02 de março de 2020.


Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas
Presidente da CEUA

Observações:

- 1) O Relatório Final deverá ser encaminhado em Formulário próprio à CEUA no prazo de até 30 (trinta) dias após o término da pesquisa;
- 2) Qualquer alteração na pesquisa deverá ser encaminhada à CEUA para apreciação.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel: (17) 3221-2480 / 3221-2563