

NAÍRA RUIZ LENHARO

**Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores
moleculares de angiogênese na próstata de ratos**

BAURU

2020

NAÍRA RUIZ LENHARO

**Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores
moleculares de angiogênese na próstata de ratos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto Foresti

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Pereira

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

BAURU

2020

L566i Lenharo, Náira Ruiz
Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos / Náira Ruiz
Lenharo. -- Bauru, 2020
67 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Fabio Porto Foresti
Coorientador: Sergio Pereira

1. Pesticidas. 2. Neovascularização. 3. Aparelho genital masculino. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

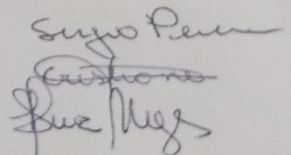
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NAÍRA RUIZ LENHARO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 11 dias do mês de março do ano de 2020, às 14:30 horas, no(a) Laboratório de Lupas - Departamento de Ciências Biológicas/FC, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. SERGIO PEREIRA do(a) Departamento Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, Profa. Dra. CRISTIANE FIGUEIREDO PINHO do(a) UNINOVE, Prof. Dr. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES do(a) Instituto Adolfo Lutz / Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NAÍRA RUIZ LENHARO, intitulada **Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. SERGIO PEREIRA

Profa. Dra. CRISTIANE FIGUEIREDO PINHO

Prof. Dr. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES



AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao meu orientador Fabio Foresti e ao meu coorientador Sergio Pereira por todo o apoio e orientação, sempre atencioso e acreditando no meu potencial.

À minha família, que sempre depositou muita confiança em mim e nas minhas realizações. Em especial aos meus pais, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim.

Ao Raphael, por estar sempre ao meu lado, me acompanhando em todos os passos, me ajudando sempre que preciso, me tranquilizando e comemorando as conquistas comigo.

Aos meus colegas do LADE (Laboratório de análise de desreguladores endócrinos), Fernanda, Giovanna, Henrique, Brayan, Letícia, Natália, Thalissa, Eleonora, pois sem eles esse trabalho não teria se concretizado. Um agradecimento especial à Fernanda, pela amizade e disposição em me ajudar a qualquer momento, e à Giovanna, por todos os momentos em que a gente se ajudou e por ter se tornado uma grande amiga. Também agradeço ao Aislan, do Laboratório de fisiopatologia do pâncreas, pela paciência em nos mostrar tudo o que sabia e pelas diversas tentativas de nos ajudar.

Aos meus professores da Graduação e Pós-Graduação, que me ensinaram tudo o que sei para que eu chegasse até aqui.

LENHARO, Naíra Ruiz. **Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos**. 2020. 67 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, 2020.

RESUMO

Os pesticidas organofosforados, como por exemplo o diclorvós (DDVP), são amplamente utilizados na atualidade, apesar de existirem muitos estudos que comprovem a sua atuação como desreguladores endócrinos. Esses desreguladores são capazes de interferir na homeostase mantida pelos hormônios e podem estar ligados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas no sistema genital masculino, como o câncer de próstata, que representa a segunda maior incidência de neoplasias no sexo masculino no mundo. A progressão dessas lesões pode se dar através do processo de angiogênese e depende do equilíbrio local nas atividades de fatores proangiogênicos e antiangiogênicos. Um dos fatores antiangiogênicos mais bem estudados é a endostatina, inibidor endógeno da angiogênese, enquanto que o fator proangiogênico mais importante é o VEGF, juntamente com o seu receptor Flk-1. A angiogênese pode ser induzida pela hipóxia que ocorre no ambiente tumoral devido à disponibilidade limitada de oxigênio entre as células proliferativas. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a morfologia e os marcadores moleculares envolvidos no processo de angiogênese (HIF-1 α , VEGF, Flk-1 e endostatina) na próstata de ratos para avaliar a influência do praguicida diclorvós, associado ou não à indução química por N-metil-N-nitrosourea (MNU). Foram utilizados 32 ratos da linhagem Fischer 344, com idade de 90 dias. Os ratos foram separados em quatro grupos experimentais: Controle, DDVP, MNU, MNU+DDVP. Foram feitas análises histopatológica, morfométrico-estereológica, imuno-histoquímica e de *Western Blotting* da próstata ventral dos ratos. Verificou-se o surgimento de lesões, como hiperplasia epitelial, atrofia, inflamação, atipia celular com inclusões citoplasmáticas e metaplasia com hiperplasia estromal. Houve aumento na incidência de hiperplasia epitelial nos grupos MNU e MNU+DDVP e aumento no volume relativo do epitélio da próstata no grupo MNU+DDVP em relação ao grupo Controle. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao índice de densitometria óptica de proteínas angiogênicas. Os resultados obtidos revelam que o DDVP, associado ao MNU, promoveu o desenvolvimento de lesões e alterou aspectos morfológicos da próstata ventral de ratos, mas não alterou a expressão de marcadores moleculares de angiogênese.

Palavras-chaves: Angiogênese. Diclorvós. Endostatina. HIF-1. Próstata. VEGF.

LENHARO, Naíra Ruiz. **Influence of the pesticide dichlorvos on molecular markers of angiogenesis in the rat prostate**. 2020. 67 p. Dissertation (Masters in Biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Bauru, 2020.

ABSTRACT

Organophosphate pesticides, such as dichlorvos (DDVP), are widely used, although there are many studies that prove their role as endocrine disruptors. These disruptors are capable of interfering with hormone-maintained homeostasis and may be linked to the development of neoplastic lesions in the male genital system, such as prostate cancer, which represents the world's second highest incidence of male neoplasia. The progression of these lesions may occur through the angiogenesis process and depends on the local balance in the activities of proangiogenic and antiangiogenic factors. One of the most studied antiangiogenic factors is endostatin, an endogenous inhibitor of angiogenesis, while the most important proangiogenic factor is VEGF, and its receptor Flk-1. Angiogenesis may be induced by hypoxia that occurs in the tumor environment due to limited oxygen availability among proliferating cells. Thus, the present study aimed to evaluate the morphology and analyze the molecular markers involved in angiogenesis process (HIF-1 α , VEGF, Flk-1 and endostatin) in the prostate of rats to assess the influence of the pesticide dichlorvos, associated or not with chemical induction by MNU. 32 Fischer 344 rats, aged 90 days, were used. The rats were separated into four experimental groups: Control, DDVP, MNU, MNU + DDVP. Histopathological, morphometric-stereological, immunohistochemical and Western Blotting analyzes of the ventral prostate of rats were performed. Lesions appeared, such as epithelial hyperplasia, atrophy, inflammation, cell atypia with cytoplasmic inclusions and metaplasia with stromal hyperplasia. There was an increase in the incidence of epithelial hyperplasia in the MNU and MNU + DDVP groups and an increase in the relative volume of the prostate epithelium in the MNU + DDVP group compared to the Control group. There were no significant differences between the groups regarding the optical densitometry index of angiogenic proteins. The results obtained reveal that DDVP, associated with MNU, promoted the development of lesions and altered morphological aspects of the ventral prostate of rats, but did not alter the expression of molecular markers of angiogenesis.

Keywords: Angiogenesis. Dichlorvos. Endostatin. HIF-1. Prostate. VEGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das zonas da próstata humana em corte sagital (A) e transversal (B)..	15
Figura 2. Lobos da próstata de roedores. AP = próstata anterior; DLP = próstata dorsolateral; VP = próstata ventral..	16
Figura 3. Diagrama de uma seção transversal de um ducto prostático de roedor com indicações dos tipos de células que compõem o epitélio dessa região.....	17
Figura 4. Regiões da próstata de rato.....	18
Figura 5. Estimativa de casos e mortes para os 10 cânceres mais comuns em 2018 para homens.	20
Figura 6. Estimativa da incidência de câncer no Brasil para o ano de 2020.	20
Figura 7. Diagrama dos Grupos Experimentais.....	40
Figura 8. Visão panorâmica de cortes histológicos da próstata ventral dos grupos experimentais, corados com hematoxilina e eosina.	44
Figura 9. Cortes histológicos da próstata ventral de ratos corados por hematoxilina e eosina para a representação da análise histopatológica.....	45
Figura 10. Cortes histológicos da próstata ventral de ratos corados por hematoxilina e eosina para a representação da análise histopatológica.....	46
Figura 11. Incidência de hiperplasia epitelial por grupo. Análise estatística baseada no teste de Fisher (* $p = 0,0150$ e ** $p = 0,0070$).	47
Figura 12. Número de células epiteliais luminiais por área ($10.000 \mu\text{m}^2$). Os valores representam média \pm erro padrão. Análise estatística baseada no teste de Tukey (* $p < 0,05$ e *** $p \leq 0.001$).	49
Figura 13. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-HIF-1 α em objetiva de 40x.	50

Figura 14. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-VEGF em objetiva de 40x.....	51
Figura 15. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-Flk-1 em objetiva de 40x..	52
Figura 16. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-endostatina em objetiva de 40x.....	53
Figura 17. Perfil representativo de <i>Western Blotting</i> para A = β -actina. B = HIF. C = VEGF. D = Flk-1. E = Endostatina.....	54
Figura 18. Índice de densitometria óptica (IOD) para HIF-1 α , VEGF, Flk-1 e endostatina. Análises estatísticas baseadas no teste de Tukey.....	55
Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso corpóreo dos animais (PC), peso da próstata ventral (PV) e peso relativo (PR) ($p > 0,05$).	43
Tabela 2. Média e desvio-padrão do consumo médio semanal de ração por grupo ($p > 0,05$).	43
Tabela 3. Incidência das lesões prostáticas por grupo.....	47
Tabela 4. Média e desvio padrão dos volumes relativos (VR) do estroma, epitélio e lúmen da próstata.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AChe	Acetilcolinesterase
AR	Receptor de andrógeno
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DDVP	2,2-diclorovinil dimetil fosfato
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos
Flk-1	<i>Fetal liver kinase 1</i>
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>
Flt-4	<i>Fms-like tyrosine kinase 4</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HIF-1	Fator de transcrição induzível por hipóxia
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LOAEL	<i>lowest observed adverse effect level</i>
LH	Hormônio luteinizante
MNU	N-metil-N-nitrosourea
PIGF	Fator de crescimento placentário
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 JUSTIFICATIVA.....	25
1.3 OBJETIVOS.....	25
1.4 REFERÊNCIAS	26
2. CAPÍTULO 1	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.3 RESULTADOS	43
2.4 DISCUSSÃO.....	56
2.5 CONCLUSÃO	58
2.6 REFERÊNCIAS	59
3. ANEXO.....	64
3.1 ANEXO 1	64
3.2 ANEXO 2	65
3.3 ANEXO 3	66

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos e agrotóxicos

Muitos poluentes ambientais derivados de fontes industriais, agrícolas e de consumo doméstico como drogas, pesticidas, aditivos plásticos, poluentes orgânicos ou, até mesmo, alguns compostos vegetais naturais, são substâncias químicas exógenas estruturalmente semelhantes a muitos hormônios, que têm efeitos em concentrações extremamente baixas e podem alterar a homeostase mantida pelos hormônios naturais, sendo chamados de desreguladores endócrinos (KUO *et al.*, 2012). Estes desreguladores são capazes de interferir na produção, liberação, transporte, ligação a receptores, ação ou eliminação de hormônios humanos naturais (QUAGLIARIELLO *et al.*, 2017). Quando interagem com os receptores hormonais de estrógeno ou de andrógeno, competem com os hormônios próprios do organismo, como o estradiol e a dihidrotestosterona. Dessa forma, modificam a sua resposta natural, mimetizando ou bloqueando a ação do hormônio (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Muitas das anormalidades do sistema genital masculino podem ser consequências da presença aumentada dessas substâncias no ambiente durante as últimas décadas (MAIN *et al.*, 2010). Entre elas, a redução da fertilidade e a disfunção erétil, tumores testiculares e da próstata e desenvolvimento sexual anormal (SCHUG *et al.*, 2011; SIKKA e WANG, 2008).

Um exemplo muito importante de desreguladores endócrinos são os agrotóxicos, extensamente utilizados em todo o mundo e com um destaque para o Brasil, que é o maior consumidor mundial de agrotóxicos em números absolutos desde 2008, segundo o Ministério do Meio Ambiente e o Dossiê Abrasco (2015). A agricultura brasileira usou 539,9 mil toneladas de pesticidas em 2017, de acordo com os dados mais recentes do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Ibama) e o consumo médio de agrotóxicos vem aumentando em relação à área plantada (Dossiê Abrasco 2015), o que gera preocupação por conta de problemas de contaminação ambiental e, conseqüentemente, para a saúde humana, seja pela exposição direta de trabalhadores aos produtos ou pela contaminação dos alimentos e da água.

Quando um agrotóxico é aplicado, apresenta um grande potencial de atingir o ar, o solo e as águas, devido à ação dos ventos e à água das chuvas, que promovem a absorção, retenção, deriva, volatilização, lavagem das folhas tratadas, escoamento

superficial, lixiviação e erosão (RATHORE e NOLLET, 2012; PIGNATI *et al.*, 2007). Durante o período em que permanecem no meio ambiente, podem sofrer transformações físicas, químicas ou biológicas, alterando a sua estrutura molecular (Dossiê Abrasco, 2015), podendo gerar a formação de subprodutos com propriedades distintas do produto inicial e cujos danos à saúde ou ao meio ambiente ainda se desconhece.

Além disso, também pouco se sabe sobre a exposição múltipla (combinação de vários agrotóxicos e outras substâncias), visto que os estudos, normalmente, analisam a exposição a um único princípio ativo, diferindo da realidade do cotidiano das pessoas. A pesquisa de Khayat e colaboradores (2013) sobre a exposição de trabalhadores rurais a pesticidas demonstrou a importância e a falta de estudo sobre essa multiexposição. Na pesquisa, foi observado que, a longo prazo, os pesticidas podem atuar como agentes mutagênicos. Porém, não foi possível determinar o efeito de um composto específico no genoma dos trabalhadores, pois foram expostos a produtos distintos, mesmo que nenhum deles fosse classificado como carcinogênico pela EPA (Environmental Protection Agency, USA).

Nos humanos, os pesticidas podem entrar no organismo através das vias dérmicas, orais, oculares e respiratórias (KIM *et al.*, 2016) e podem estar relacionados a vários problemas de saúde, incluindo desregulação hormonal, alergias, hipersensibilidade, problemas respiratórios, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, malformações congênitas (KIM *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2010), estresse oxidativo (RASTOGI *et al.*, 2009), infertilidade (KOIFMAN *et al.*, 2002), e podem, até mesmo, causar dano no DNA, atuando como agentes mutagênicos a longo prazo e levando a aumentos na incidência de câncer (KHAYAT *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2016; KOIFMAN *et al.*, 2002).

Pesticidas organofosforados e Diclorvós

Dentre os diversos tipos de pesticidas, os organofosforados representam um grupo diverso de substâncias químicas extremamente tóxicas e com alta taxa de mortalidade (VANOVA *et al.*, 2018). São agrotóxicos inseticidas formados por ésteres fosfóricos compostos por um átomo de fósforo pentavalente, derivado do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico (OPAS/OMS, 1996) e são amplamente utilizados em culturas agrícolas, indústrias e ambientes domésticos devido a sua alta eficiência (OYA *et al.*, 2017; SALEM *et al.*, 2015).

Os seus sintomas de intoxicação aguda incluem fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares, convulsões e efeitos neurotóxicos retardados (OPAS/OMS, 1996). A longo prazo, também podem causar efeitos adversos em vários órgãos de mamíferos, incluindo o fígado (KALENDER *et al.*, 2005; OGUTCU *et al.*, 2008), coração (OGUTCU *et al.*, 2006) e rim (KALENDER *et al.*, 2007), além de interferirem com o sistema genital masculino (UZUNHISARCIKLI *et al.*, 2007).

Um exemplo de pesticida organofosforado é o Diclorvós (2,2-diclorovinil dimetil fosfato), comumente chamado de DDVP. É muito utilizado no controle de insetos em locais agrícolas, industriais, armazéns de alimentos, residências, no controle de parasitas na criação de gado, de animais domésticos e de vetores de doenças urbanas (OLIVEIRA e MACHADO, 2004; PATIL e GOGATE, 2014).

No ambiente, ele se degenera rapidamente por processos bióticos e abióticos em metabólitos, incluindo o dimetilfosfato e o dicloroacetaldeído (ATSDR, 1997). É facilmente absorvido por inalação, ingestão ou absorção cutânea e é metabolizado, principalmente, no fígado (APVMA, 2008). É considerado um inseticida altamente tóxico (classe toxicológica II) pela Anvisa (ANVISA, 2003), mas continua tendo um alto uso devido ao seu custo-benefício e sua eficiência no controle de pragas.

Os efeitos toxicológicos primários do DDVP incluem a neurotoxicidade através da inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima necessária para a transmissão do impulso através da sinapse colinérgica (KOBAYASHI *et al.*, 1986). Efeitos no sistema genital e endócrino também foram observados, como no trabalho de Okamura *et al.* (2005) que constatou a diminuição na motilidade espermática de ratos após injeção subcutânea de DDVP. Dirican e colaboradores (2012) apontaram um aumento na contagem de espermatozoides anormais e diminuição nos níveis de testosterona em ratos após ingestão desse pesticida, resultado que foi explicado pelos autores pela propriedade antagônica do diclorvós nos receptores de andrógenos (AR) e que causou uma supressão na secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Andersen *et al.* (2002) também observaram uma atividade antiandrogênica, mesmo sendo um fraco antagonista de AR em uma linhagem celular de câncer de mama. Diferentemente dos trabalhos citados anteriormente, Tavassoli *et al.* (2007) observaram um papel agonista de AR do diclorvós na presença de quantidades primárias de andrógeno em células cancerosas da próstata humana.

Essa diferença contrastante de resultados foi representada na pesquisa de Fedoruk (2005), na qual o autor relata que o pesticida exibe uma atividade antagonista

de fraca a forte em concentrações mais altas e atividade agonista fraca em concentrações mais baixas, sendo possível que esse composto interaja com o mecanismo de transcrição de hormônios endógenos e de genes, aumentando a atividade em concentrações mais baixas, mas inibindo a ativação transcricional normal em concentrações mais altas.

Outros estudos demonstram, ainda, que o DDVP induz a citotoxicidade em diferentes linhagens de células de mamíferos (LIN *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 2007; YAMANO, 1996). Ele também apresenta efeitos genotóxicos ao causar danos significativos no DNA das células através da indução do estresse oxidativo, como nos exemplos de peroxidação lipídica com geração de espécies reativas de oxigênio em células do endométrio de ratos (ORAL *et al.*, 2006), de geração de radicais livres e alteração do sistema de defesa antioxidante celular em eritrócitos humanos (EROGLU *et al.*, 2013) e de aumento do estresse oxidativo acompanhado pela disfunção mitocondrial e fragmentação do DNA em uma linhagem celular de carcinoma do cólon humano (SALEM *et al.*, 2015). Segundo esses estudos, o DDVP pode ser considerado um agente mutagênico e carcinogênico para seres humanos. Estudos anteriores também sugerem uma relação entre o pesticida e o câncer de próstata (MILLS e YANG, 2003).

Próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino responsável pela secreção e armazenamento de proteínas e íons que compõem o líquido seminal (HAYWARD e CUNHA, 2000), fornecendo nutrição para os espermatozoides e protegendo-os contra patógenos microbianos (SHABSIGH *et al.*, 1999).

No humano adulto, a próstata é compacta e sem lobos distintos (CUNHA *et al.*, 2004). É aproximadamente do tamanho e forma de uma noz, localiza-se ao redor da uretra e inferiormente à bexiga urinária e está organizada em três regiões distintas: zona central, zona de transição e zona periférica (Figura 1) (MCNEAL, 1983; ROY-BURMAN *et al.*, 2004). Nos roedores, ela é constituída por quatro pares de lobos denominados ventral, lateral, dorsal e anterior (ou glândula coaguladora) e circundam a uretra na base da bexiga urinária (Figura 2) (CUNHA *et al.*, 2004; HAYASHI *et al.*, 1991; MARKER *et al.*, 2003). Frequentemente, os lobos lateral e dorsal são considerados em conjunto, denominado lobo dorsolateral. Os lobos têm características histológicas distintas, com extenso dobramento epitelial na próstata

anterior, pouco dobramento na próstata ventral, e quantidade intermediária de dobramento epitelial na próstata dorsolateral (MARKER *et al.*, 2003; ROY-BURMAN *et al.*, 2004).

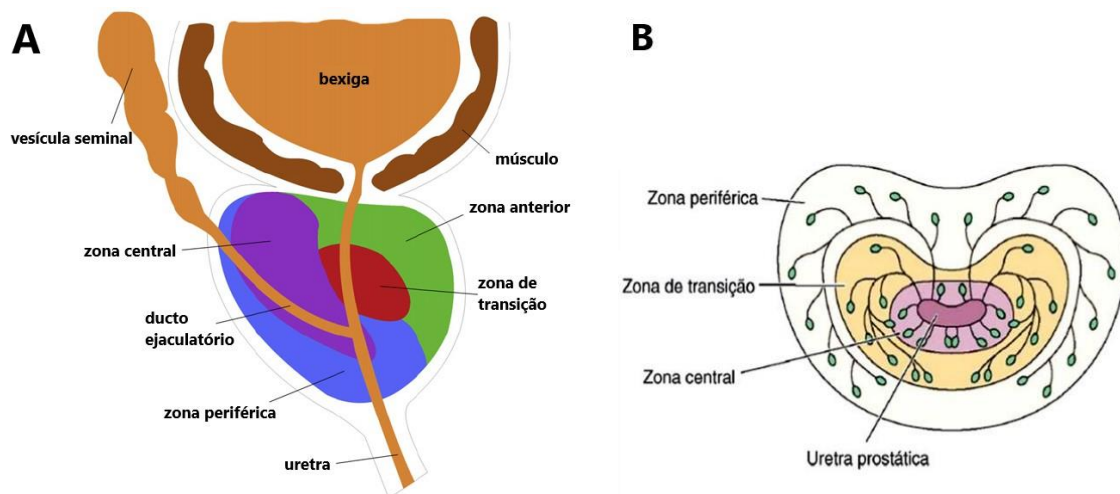


Figura 1. Representação esquemática das zonas da próstata humana em corte sagital (A) e transversal (B). Fonte: Adaptado de FRANZ *et al.*, 2013; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008.

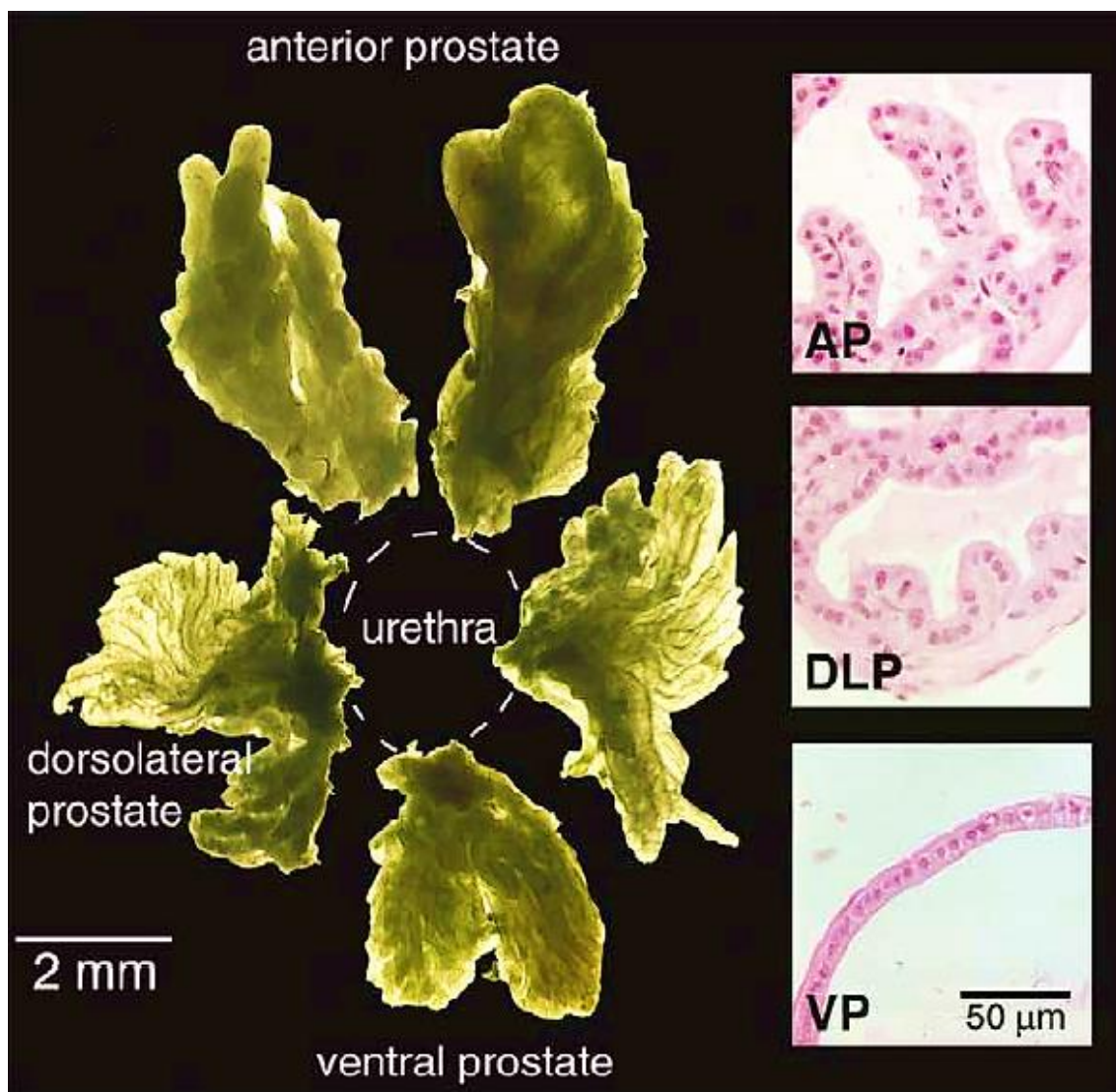


Figura 2. Lobos da próstata de roedores. AP = próstata anterior; DLP = próstata dorsolateral; VP = próstata ventral. Fonte: MARKER *et al.*, 2003.

De modo geral, os lobos prostáticos são formados por estruturas túbulo-alveolares, com epitélio colunar simples, um pequeno núcleo localizado perto da base da célula epitelial e o citoplasma ligeiramente basófilo (HAYWARD e CUNHA, 2000; ICHIHARA *et al.*, 1978). As células que compõem o epitélio prostático adulto são as basais, luminais secretoras, neuroendócrinas e *stem cells*, que podem ser distinguidas por seus padrões de expressão de marcadores de diferenciação (Figura 3) (MARKER *et al.*, 2003, WANG *et al.*, 2001). Na próstata humana, as células epiteliais basais formam uma camada quase contínua entre as células secretoras e a membrana basal, enquanto na próstata de ratos poucas células basais estão dispersas formando uma camada descontínua ao redor dos ductos (MARKER *et al.*, 2003).

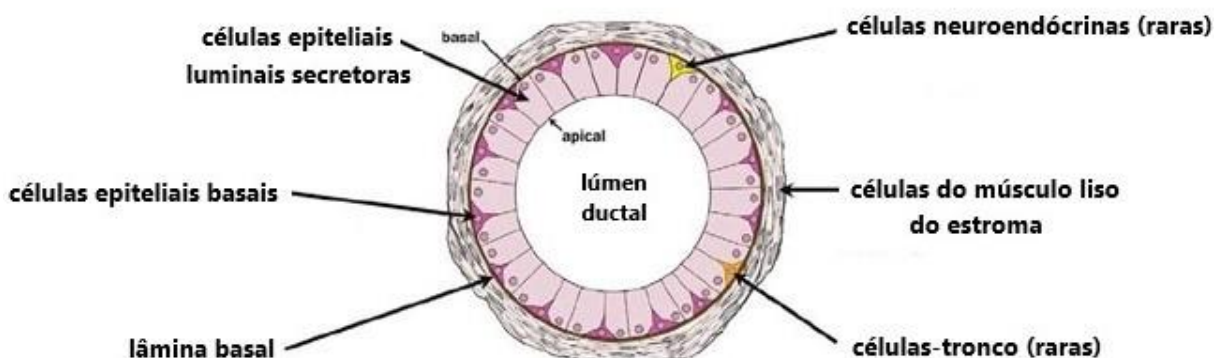


Figura 3. Diagrama de uma seção transversal de um ducto prostático de roedor com indicações dos tipos de células que compõem o epitélio dessa região. Fonte: adaptado de MARKER *et al.*, 2003.

O epitélio é envolto por estroma fibromuscular denso e essa camada estromal é muito mais espessa na próstata humana, quando comparada com a do rato (HAYWARD e CUNHA, 2000). Embora presente, principalmente, músculo liso, essa camada também contém outros componentes, como fibroblastos, linfócitos, células neuronais, endoteliais e linfáticas, além de matriz extracelular (MARKER *et al.*, 2003) composta por uma rede de proteoglicanos, glicoproteínas adesivas e proteínas fibrilares, como colágeno e fibras elásticas, que proporciona resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, além de ser um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (LIN e BISSEL, 1993; TAIPALE e KESKI-OJA, 1997; TUXHORN *et al.*, 2001). O epitélio e o estroma são separados pela membrana basal, uma camada fina e contínua composta por laminina, colágeno tipo IV e pelo proteoglicano de heparan sulfato (JORCYK *et al.*, 1998).

De acordo com as características histológicas e funcionais da próstata normal de rato, as células epiteliais que revestem o sistema ductal podem ser divididas em três regiões morfológica e funcionalmente distintas: proximal, intermediária e distal em relação à uretra. A região distal é caracterizada por epitélio colunar alto, muitos núcleos apicais e alta atividade mitótica. A região intermediária exibe epitélio colunar alto com núcleos localizados na base e citoplasma apical claro, característico de células ativamente secretoras. As células epiteliais da região proximal apresentam morfologia cuboide baixa e muitas células estão sofrendo morte celular programada, com corpos apoptóticos frequentemente visíveis (Figura 4) (LEE *et al.*, 1990).

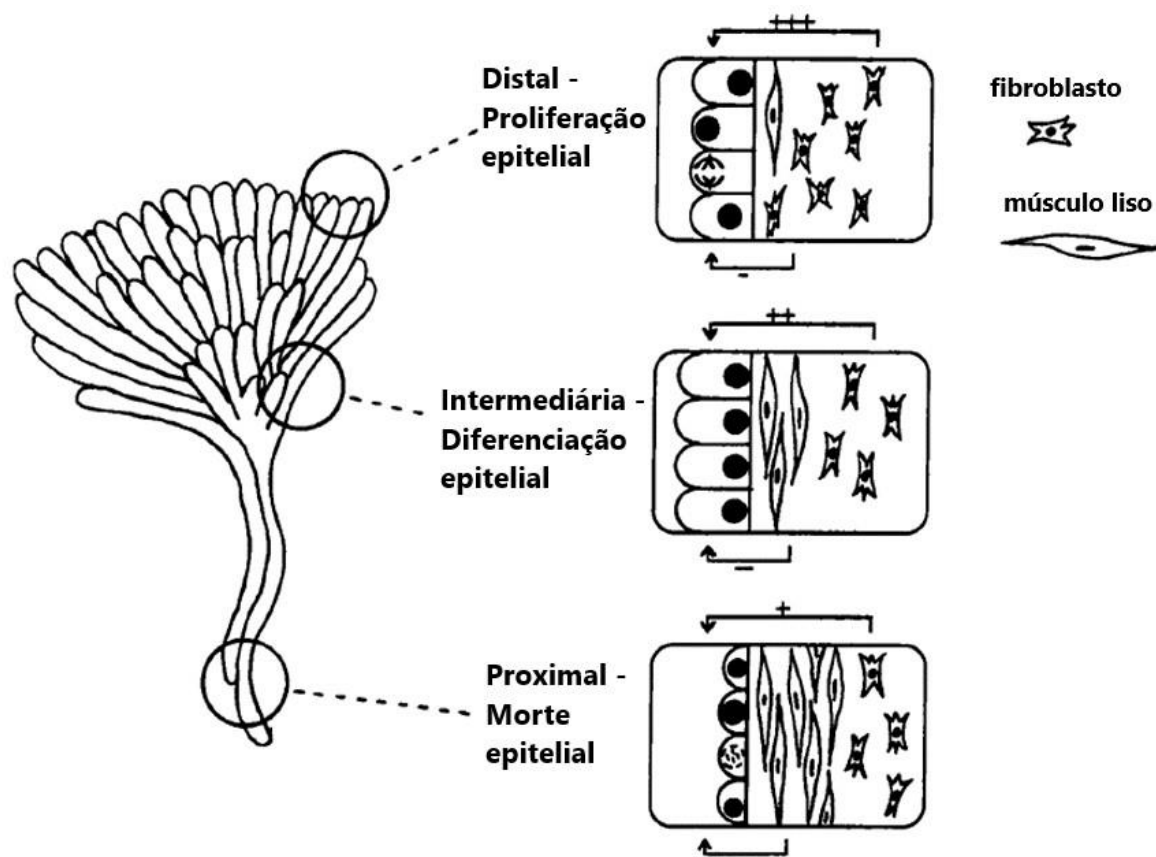


Figura 4. Regiões da próstata de rato. Fonte: adaptado de NEMETH e LEE, 1996.

Apesar de algumas diferenças morfológicas e histológicas entre as próstatas de humanos e de ratos, observações comparativas do desenvolvimento prostático demonstram que a morfogênese ocorre de maneira análoga em roedores e humanos (MARKER *et al.*, 2003). Dessa maneira, a próstata de roedores tem sido utilizada como modelo biológico para estudos da fisiopatologia da próstata humana. Nos estudos de carcinogênese prostática, o lobo ventral dos ratos, mesmo não tendo homologia com a próstata humana, é o mais utilizado por ser o mais responsivo aos andrógenos (HAYASHI *et al.*, 1991).

O crescimento normal, a diferenciação, a proliferação e a manutenção da funcionalidade das células prostáticas são dependentes de níveis constantes de andrógenos circulantes (KYPRIANOU *et al.*, 1996). O eixo hipotálamo-hipófise-gônada regula a síntese de andrógenos. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a adeno-hipófise a produzir o hormônio luteinizante (LH), o qual se liga a receptores nas células de Leydig dos testículos e

estimula essas células a produzirem testosterona e, também, uma pequena quantidade de estradiol (SHARIFI e AUCHUS, 2012).

Muitos trabalhos sugerem que os hormônios esteroides (andrógenos e estrógenos), quando desregulados, desempenham um papel no surgimento de lesões neoplásicas e desenvolvimento do câncer de próstata (STANFORD *et al.*, 2002). O processo de carcinogênese prostática também pode ser iniciado por dano genético ao epitélio do órgão e pode gerar atipia nuclear, destruição dos limites dos tecidos, alterações estromais, angiogênese e destruição de órgãos distantes pelas células metastáticas (CUNHA *et al.*, 2004). Além disso, a interação entre o microambiente estromal e as células epiteliais é responsável pelo controle, diferenciação, manutenção e outros aspectos fisiológicos da próstata (NEMETH e LEE, 1996). Dessa forma, o desequilíbrio nessa interação pode gerar a formação e progressão de neoplasias (CUNHA *et al.*, 1992).

Câncer de próstata

No mundo, o câncer de próstata é o segundo câncer mais comum em homens. Estima-se que 1,3 milhão de casos de câncer de próstata foram diagnosticados mundialmente em 2018, representando 13,5% dos cânceres diagnosticados em homens (Figura 5A) e apresentando 359.000 mortes associadas, sendo a quinta principal causa de morte por câncer em homens (Figura 5B) (GLOBOCAN, 2018).

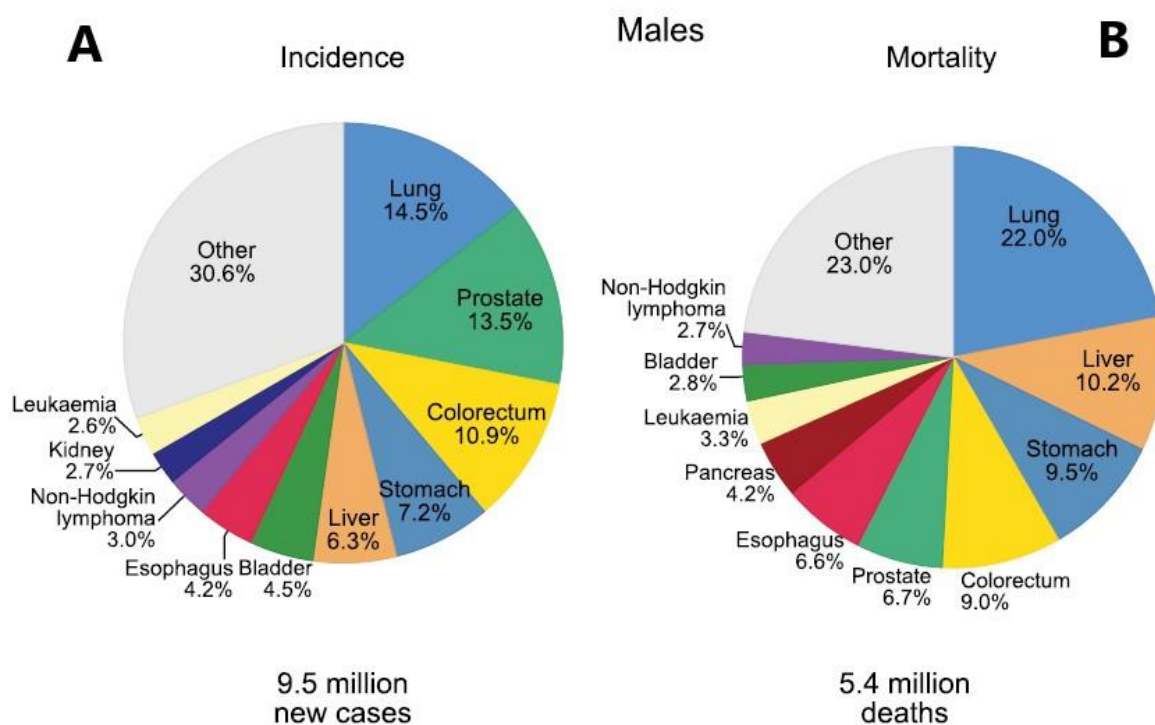


Figura 5. Estimativa de casos e mortes para os 10 cânceres mais comuns em 2018 para homens. Os cânceres de pele não-melanoma estão incluídos na categoria “outros”. Fonte: GLOBOCAN (2018).

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens (atrás apenas do câncer de pele não-melanoma), com uma estimativa de 65.840 novos casos em 2020 (INCA, 2020) (Figura 6).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 6. Estimativa da incidência de câncer no Brasil para o ano de 2020. Fonte: INCA (2020).

Modelo de estudo do câncer de próstata

Para o estudo da complexidade das neoplasias, os modelos animais são uma ferramenta muito importante. Através deles, é possível demonstrar que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, como a iniciação (fixação irreversível de uma alteração genética), a promoção (expansão da população de células tumorais) e a progressão (transição para um tumor maligno invasivo) (HICKS, 1980).

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas através do tratamento com carcinógenos químicos conhecidos como, por exemplo, o N-metil-N-nitrosourea (MNU). Diversas linhagens de ratos são utilizadas em ensaios de carcinogênese com esse carcinógeno e dentre as mais frequentes estão Wistar, Sprague-Dawley e Fischer 344. O uso de animais heterogênicos garante a heterogeneidade dos tumores, enquanto animais isogênicos desenvolvem tumores idênticos no mesmo estágio de crescimento (FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2015).

O MNU é um agente alquilante que causa metilação persistente do DNA (BERANEK, 1990) e sua ação é direta, uma vez que não requer ativação metabólica (FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2015). É um composto genotóxico que pode atuar como iniciador ou como promotor (HICKS, 1980) e induzir inúmeros cânceres em roedores, como o de bexiga (HICKS e WAKEFIELD, 1972; STEINBERG *et al.*, 1990), de tireoide (OHSHIMA e WARD, 1984), de mama (FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2015; ZARBL *et al.*, 1985) e de próstata (ARUNKUMAR *et al.*, 2006; BOSLAND e PRINSEN, 1990).

A combinação de MNU com a administração de testosterona, modelo desenvolvido por Bosland (1992), é uma ferramenta ainda mais eficiente para estudos de carcinogênese prostática, visto que promove alta incidência de lesões proliferativas como Hiperplasia, Displasia e Neoplasia Intraepitelial Prostática (ARUNKUMAR *et al.*, 2006). Segundo Pollard e colaboradores (1989), as células tumorais iniciadas na glândula prostática de ratos apenas por MNU permaneceram dormentes durante o período de tempo do experimento até serem ativadas pela administração de testosterona, designando assim MNU como iniciador de tumor e testosterona como promotora de tumor (POLLARD, 1989).

Angiogênese e as proteínas envolvidas

Para que ocorra a progressão do tumor, ele necessita do fornecimento constante de nutrientes e oxigênio e de um meio eficaz de remover os produtos

residuais através de uma nova vasculatura. O desenvolvimento de uma nova rede vascular, também conhecida como angiogênese, é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, processo controlado por fatores angiogênicos (CHARLESWORTH e HARRIS, 2006; PALMA *et al.*, 2017; VEIKKOLA e ALITALO, 1999) e que depende de várias etapas, como a degradação da membrana basal, proliferação e migração de células endoteliais e formação de túbulos capilares (WEGIEL *et al.*, 2010). A angiogênese é um componente importante de processos fisiológicos, como o desenvolvimento fetal, a cicatrização de feridas e o ciclo reprodutivo feminino, mas também é pré-requisito para o crescimento avançado de tumores e progressão para estado metastático (CHARLESWORTH e HARRIS, 2006).

A regulação da angiogênese é complexa, pois envolve equilíbrio local nas atividades de fatores proangiogênicos e antiangiogênicos. Os tumores que se tornam neovascularizados, frequentemente, expressam níveis aumentados de proteínas proangiogênicas, em relação às antiangiogênicas (FOLKMAN, 2002). Essas proteínas são liberadas pelas células tumorais ou estromais e atuam nas células endoteliais daquele microambiente, demonstrando a importância das interações entre carcinoma e estroma durante a progressão do câncer (TUXHORN *et al.*, 2001, WEGIEL *et al.*, 2010).

Um dos fatores antiangiogênicos mais bem estudados é a endostatina, o inibidor endógeno da angiogênese. É uma proteína de 20 kDa gerada pela proteólise do domínio C-terminal do colágeno XVIII, uma proteoglicana de matriz distribuída dentro das membranas basais epiteliais e endoteliais (MURAGAKI *et al.*, 1995). Estudos evidenciam que a endostatina possui atividade específica em células endoteliais (DHANABAL *et al.*, 1999a; O'REILLY *et al.*, 1997), inibindo a proliferação dessas células, mas não apresentando efeito sobre células tumorais ou tipos de células não endoteliais (DKHISSI *et al.*, 2003) e sendo, portanto, um potente inibidor da angiogênese. A atividade antiangiogênica da endostatina é um processo complexo que resulta na inibição da adesão, migração e proliferação de células endoteliais e na indução de apoptose (DHANABAL *et al.*, 1999b). Estudos anteriores *in vivo*, usando endostatina recombinante ou terapia de transferência gênica, mostraram que a endostatina inibe o crescimento de tumores primários ao prevenir a neovascularização e o crescimento de metástases (DHANABAL *et al.*, 1999a; O'REILLY *et al.*, 1997).

Uma das proteínas proangiogênicas mais potentes e bem caracterizadas é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esta é uma glicoproteína dimérica de 36-46 kDa com duas subunidades idênticas ligadas por ponte dissulfeto (O'BRIEN e HARRIS, 1995) e que tem sido implicada em várias etapas ao longo do processo de angiogênese, como mitogênese, migração, diferenciação e permeabilidade vascular, além de atuar como fator de sobrevivência de células endoteliais (HICKLIN e ELLIS 2005, HROUDA *et al.*, 2003). Produzido por uma grande variedade de tipos celulares, o VEGF tem cinco isoformas diferentes (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E) que são geradas por splicing alternativo de um único gene (DELONGCHAMPS *et al.*, 2006). A maioria das pesquisas tem se concentrado no VEGF-A, que é considerado a forma mais importante nos tecidos tumorais e promove a sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração e formação de tubo de células endoteliais (SALVEN *et al.*, 1998; TAKAHASHI e SHIBUYA 2005; WEGIEL *et al.*, 2010), além de aumentar a permeabilidade vascular (KECK *et al.* 1989). Na próstata, o VEGF-A é expresso em células epiteliais e endoteliais (FERRER *et al.*, 1997) e essa expressão é aumentada no câncer de próstata metastático em relação ao tecido normal (FERRER *et al.*, 1997; HROUDA *et al.*, 2003).

Existem três receptores de tirosina quinase de VEGF, que são encontrados na superfície das células endoteliais: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4). O VEGF-A pode se ligar aos dois primeiros (DELONGCHAMPS *et al.*, 2006), porém somente a ligação ao VEGFR-2 pode induzir proliferação e diferenciação de células endoteliais (FERRARA, 2004). O VEGFR-2 é um receptor de 200–230 kDa (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005) e principal mediador dos efeitos mitogênicos, angiogênicos e de aumento da permeabilidade do VEGF-A. Ele é altamente expresso em progenitores endoteliais vasculares na embriogênese. Durante os estágios posteriores do desenvolvimento vascular, sua expressão diminui, tornando-se aumentada em condições de angiogênese patológica, como em tumores (MATSUMOTO e CLAESSEON-WELSH, 2001).

A expressão de proteínas proangiogênicas pode ser induzida por vários fatores, incluindo hipóxia, ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, estresse mecânico, citocinas inflamatórias (CARMELIET e JAIN, 2000) e pelas espécies reativas de oxigênio (ARBISER, *et al.*, 2002). No caso do VEGF, a indução ocorre principalmente pela hipóxia (WEGIEL *et al.*, 2010).

Todos os tecidos dependem de uma entrega adequada de oxigênio e nutrientes, mas, dentro dos tumores, essa disponibilidade é limitada pela competição entre células altamente proliferativas (LV *et al.*, 2017). Quando o oxigênio não é suficientemente suprido, vários genes são induzidos pelo fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1) e muitos desses genes são responsáveis pela promoção de processos como proliferação celular, metabolismo da glicose, regulação do pH e angiogênese (CHARLESWORTH e HARRIS, 2006).

O HIF-1 é uma proteína heterodimérica composta de uma subunidade α dependente do oxigênio (HIF-1 α) e uma subunidade β independente de oxigênio (HIF-1 β) (WANG *et al.*, 1995; WANG e SEMENZA, 1993). Sob condições normóxicas, HIF-1 α é dificilmente detectável, pois é rapidamente degradado. A subunidade α é submetida à prolil hidroxilação dependente de oxigênio e, em seguida, a proteína von Hippel-Lindau (VHL), produto proteico do gene supressor de tumor von Hippel Lindau, liga e ubiquitina a subunidade. O HIF-1 α ubiquitinado é então direcionado à destruição proteossomal (JUN *et al.*, 2017).

Sob condições de hipóxia, o HIF-1 α é estabilizado, permitindo que se acumule até atingir níveis suficientes para que seja translocado para o núcleo. Após a translocação, ocorre a dimerização com HIF-1 β e esse complexo liga-se ao promotor de VEGF, levando ao aumento da transcrição desse fator (ELSBERGER *et al.*, 2011; HICKLIN e ELLIS 2005). O HIF, portanto, induz diretamente a produção do VEGF, principalmente do VEGF-A (MAYNARD e OHH, 2007), nas células hipóxicas cancerosas, e este, ao ser secretado, se liga ao seu receptor (VEGFR-2) expresso nas células endoteliais dos vasos sanguíneos vizinhos, atuando como o principal regulador da angiogênese e induzindo subsequente ativação de outros fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento placentário (PIGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) (FORSYTHE *et al.*, 1996). Desse modo, o HIF promove a angiogênese de maneira direta e indireta.

O HIF-1 também demonstrou regular a expressão de genes que codificam transportadores de glicose e enzimas glicolíticas, desviando o metabolismo energético das células cancerosas em relação aos tecidos normais (HIROTA e SEMENZA, 2006). Essas mudanças moleculares permitem que as células se adaptem ao estresse, reduzindo o consumo de oxigênio através de uma mudança da fosforilação oxidativa para a glicólise aeróbica e reduzindo a demanda de energia para processos celulares (LV *et al.*, 2017). Esse fenômeno foi denominado Efeito Warburg, de acordo com seu

descobridor. Como consequência, as células tumorais são protegidas do dano causado pelas espécies reativas de oxigênio gerado pela cadeia transportadora de elétrons em condição hipóxica (WARBURG, 1956). A análise imunohistoquímica de biópsias de tumores humanos revelou a superexpressão de HIF-1 α no câncer de próstata em comparação com o epitélio prostático normal (TALKS *et al.*, 2000; ZHONG *et al.*, 1999). Zhong e colaboradores (2004) sugerem que a regulação positiva desse fator é um evento precoce na carcinogênese, que ocorre antes das evidências histológicas de angiogênese e invasão celular, indicando que o HIF-1 α possa ser um biomarcador para lesões prostáticas pré-malignas.

Os fatores proangiogênicos e antiangiogênicos e as vias de indução desses fatores são importantes para a progressão das lesões neoplásicas e, portanto, seus estudos auxiliam na compreensão da carcinogênese prostática.

1.2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos em números absolutos e muitas dessas substâncias podem atuar como desreguladores endócrinos, alterando a homeostase mantida pelos hormônios e promovendo o surgimento de doenças no sistema genital masculino. Dentre essas doenças está o câncer de próstata, que representa o segundo câncer mais comum em homens no Brasil e no mundo. Existem evidências de que o pesticida diclorvós atua como um desregulador endócrino, podendo causar ou agravar patologias prostáticas. Então, como os desreguladores endócrinos podem promover o desenvolvimento e progressão de lesões neoplásicas e, também, como a angiogênese é um dos passos mais importantes na progressão de um tumor, estudar a expressão dos marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos, em um modelo de carcinogênese experimental, torna-se essencial para a compreensão da influência do diclorvós sobre a carcinogênese nesse órgão.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência do praguicida DDVP sobre marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos após indução química por MNU.

Objetivos Específicos

Classificar as lesões prostáticas, imunolocalizar e quantificar, por *Western Blotting*, marcadores moleculares envolvidos no processo de angiogênese (VEGF, VEGF-R, HIF-1 α e endostatina) na próstata de ratos.

1.4 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Regulamento Técnico**: Relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos e preservantes de madeira. 2003. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B4882-2-0%5D.PDF>. Acesso em: 7 fev. 2020.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for Dichlorvos**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1997.

ANDERSEN, H. R. *et al.* Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 179, n. 1, p. 1-12, 2002.

ARBISER, J. L.; PETROS, J.; KLAFTER, R. *et al.* Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 715-720, 2002.

ARUNKUMAR, A. *et al.* Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by diallyl disulfide, an organosulfur compound of garlic. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 375-379, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde/ Organização: Rio de Janeiro/São Paulo: Expressão Popular, 2015.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY (APVMA). **"DICHLORVOS - Toxicology Assessment**: The reconsideration of approvals of the active constituent, registrations of products containing dichlorvos and approvals of their associated labels." Austrália: Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2008.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.231, p.11–30, 1990.

BOSLAND, M. C. Animal models for the study of prostate carcinogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 50, n. S16H, p. 89-98, 1992.

BOSLAND, M. C. *et al.* Characterization of adenocarcinomas of the dorsolateral prostate induced in Wistar rats by N-methyl-N-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenz (a)

anthracene, and 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, following sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. **Cancer research**, v. 50, n. 3, p. 700-709, 1990.

BOSLAND, M. C.; PRINSEN, M. K. Induction of dorsolateral prostate adenocarcinomas and other accessory sex gland lesions in male Wistar rats by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, and 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl after sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. **Cancer Research**, v. 50, n. 3, p. 691-699, 1990.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249, 2000.

CHARLESWORTH, P. J. S.; HARRIS, A. L. Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies. **Nature Reviews Urology**, v. 3, n. 3, p. 157, 2006.

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, 2004.

CUNHA, G. R. *et al.* Normal and abnormal development of the male urogenital tract: role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 6, p. 465-475, 1992.

CUNHA, G. R. *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine reviews**, v. 8, n. 3, p. 338-362, 1987.

DELONGCHAMPS, N. B.; PEYROMAURE, M.; DINH-XUAN, A. T. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. **Urology**, v. 68, n. 2, p. 244-248, 2006.

DHANABAL, M. *et al.* Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 189-197, 1999a.

DHANABAL, M. *et al.* Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 17, p. 11721-11726, 1999b.

DIRICAN, E. K.; KALENDER, Y. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 821-830, 2012.

DKHISSI, F. *et al.* Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. **Human Gene Therapy**, v. 14, n. 10, p. 997-1008, 2003.

ELSBERGER, B. *et al.* Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha in matched hormone naive and castrate resistant prostate cancer specimens. **Cancer Biomarkers**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **DDVP**: Risk Assessment Issues for the FIFRA Science Advisory Panel, 1998.

ERGÜN, S. *et al.* Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. **Angiogenesis**, v. 4, n. 3, p. 193-206, 2001.

EROGLU, S. *et al.* Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 33-38, 2013.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. *et al.* N-Methyl-N-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9095-9117, 2015.

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

FEDORUK, M. N. **The modulation of androgen action in prostate cancer by exogenous chemicals, efflux transporter P-glycoprotein and Y-box binding protein-1**. 2005. Tese de Doutorado. University of British Columbia, Vancouver, 2005.

FELBOR, Ute *et al.* Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. **The EMBO journal**, v. 19, n. 6, p. 1187-1194, 2000.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRER, F. A. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. **The Journal of Urology**, v. 157, p. 2329–2333, 1997.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 15-18, 2002.

FORSYTHE, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4604-4613, 1996.

FRANZ, M.-C. *et al.* Zinc transporters in prostate cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 735-741, 2013.

GEORGE, D. J. *et al.* Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1932-1936, 2001.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 695-706, 2007.

GONÇALVES, B. F. *et al.* A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **The Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202-1213, 2013.

HAYASHI, N. *et al.* Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 2, p. 308-321, 1991.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiologic Clinics of North America**, v.38, n.1, p.1-14, 2000.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.

HICKS, R. M. Multistage carcinogenesis in the urinary bladder. **British Medical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 39-46, 1980.

HICKS, R. M.; WAKEFIELD, J. S. J. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea I. Histology. **Chemico-biological Interactions**, v. 5, n. 2, p. 139-152, 1972.

HIROTA, K.; SEMENZA, G. L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 59, n. 1, p. 15-26, 2006.

HROUDA, D.; NICOL, D.; GARDINER, R. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 347-355, 2003.

ICHIHARA, I.; KALLIO, M.; PELLINIEMI, L. J. Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. **Cell Tissue Research**, v. 192, p. 381-390, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 7 out. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2020.

JIA, Y. *et al.* Effects of endostatin on expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and neovascularization in colonic carcinoma implanted in nude mice. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 10, n. 22, p. 3361, 2004.

JORCYK, C. L. *et al.* Development and characterization of a mouse prostate adenocarcinoma cell line: ductal formation determined by extracellular matrix. **The Prostate**, v. 34, n. 1, p. 10-22, 1998.

JUN, J. C. *et al.* Hypoxia-inducible factors and cancer. **Current sleep medicine reports**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2017.

JUNQUEIRA; CARNEIRO. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 524, 2008.

KALENDER, S. *et al.* Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 213–8, 2007.

KALENDER, S. *et al.* Diazinoninduced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. **Toxicology**, v. 211, p. 197–206, 2005.

KECK, P. J. *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1309-1312, 1989.

KHAYAT, C. B. *et al.* Assessment of DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from Central Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 10, p. 7334-7340, 2013.

KIM, K.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2016.

KIM, Y. *et al.* Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 31, p. 27872-27879, 2002.

KIMBRO, K. S.; SIMONS, J. W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 13, n. 3, p. 739-749, 2006.

KOBAYASHI, H.; YUYAMA, A.; CHIBA, K. Cholinergic system of brain tissue in rats poisoned with the organophosphate, O, O-dimethyl O-(2, 2-dichlorovinyl) phosphate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 32-39, 1986.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 435-445, 2002.

KREMER, C. *et al.* Up-regulation of Flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. **Cancer research**, v. 57, n. 17, p. 3852-3859, 1997.

KUMAR, S. V. *et al.* Current review on organophosphorus poisoning. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n. 4, p. 199-215, 2010.

KUO, C. H. *et al.* Immunomodulatory effects of environmental endocrinedisrupting chemicals. **Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 37-42, 2012.

KYPRIANOU, N.; TU, H.; JACOBS, S. C. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. **Human Pathology**, v. 27, p. 668-75, 1996.

LEE, C. *et al.* Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. **Biology of Reproduction**. v. 43, p.1079-86, 1990.

LIN, S. Y. *et al.* Cytotoxicity, sister-chromatid exchange, chromosome aberration and transformation induced by 2, 2-dichlorovinyl-O, O-dimethyl phosphate. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 206, n. 4, p. 439-445, 1988.

LIN, C. Q.; BISSELL, M. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 9, p. 737-743, 1993.

LV, X. *et al.* The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. **Genes & Diseases**, v. 4, n. 1, p. 19-24, 2017.

MABJEESH, N. J.; AMIR, S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. **Histology and histopathology**, v. 22, p. 559-572, 2007.

MAIN, K. M. *et al.* Genital anomalies in boys and the environment. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 279-289, 2010.

MARKER, P. C. *et al.* Hormonal, cellular and molecular control of prostate developmental. **Developmental Biology**, v. 253, p. 165-74, 2003.

MATSUMOTO, T.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Sciences's Stke**, v. 2001, n. 112, p. re21-re21, 2001.

MAYNARD, M. A.; OHH, M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 16, p. 2170-2180, 2007.

MCNEAL, J. E. The prostate gland: morphology and pathobiology. **Monographs in Urology**, v. 4, p. 3-37, 1983.

MILLS, P. K.; YANG, R. Prostate cancer risk in California farm workers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, n. 3, p. 249-258, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quantidade de Agrotóxico Comercializado por Classe de Periculosidade Ambiental. Disponível em:** <http://www.mma.gov.br/component/k2/item/11294-quantidade-de-agrotoxico>. Acesso em: 7 out. 2019.

MURAGAKI, Y. *et al.* Mouse Col18a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 19, p. 8763-8767, 1995.

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

O'BRIEN, T. S.; HARRIS, A. L. Angiogenesis in urological malignancy. **British Journal of Urology**, v. 76, n. 6, p. 675-682, 1995.

OGUTCU, A.; SULUDERE, Z.; KALENDER, Y. Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 355-61, 2008.

OGUTCU, A. *et al.* The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 93-8, 2006.

OHSHIMA, M.; WARD, J. M. Promotion of N-methyl-N-nitrosourea-induced thyroid tumors by iodine deficiency in F344/NCr rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 73, n. 1, p. 289-296, 1984.

OKAMURA, A. *et al.* A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in Wistar rats. **Toxicology**, v. 213, n. 1-2, p. 129-137, 2005.

OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO, S. A. S. Quantificação do pesticida Diclorvós por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 911-915, 2004.

OPAS/OMS – ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Representação do Brasil. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>. Acesso em: 7 out. 2019.

ORAL, B. *et al.* Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 783-790, 2006.

O'REILLY, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 277-285, 1997.

OYA, N.; ITO, Y.; KAMIJIMA, M. Organophosphorus insecticide dichlorvos inhibits fatty acid amide hydrolase in the male reproductive organs of rats. **Fundamental Toxicological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 201-205, 2017.

PALMA, M. de; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457, 2017.

PATEL, S. *et al.* In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1409-1418, 2007.

PATIL, P. N.; GOGATE, P. R. Degradation of dichlorvos using hybrid advanced oxidation processes based on ultrasound. **Journal of Water Process Engineering**, v. 8, p. e58-e65, 2015.

PIGNATI, WA; MACHADO, JMH; CABRAL, JF. Acidente rural ampliado: o caso das 'chuvas' de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 12, n. 1, p. 105-14, 2007.

PINHO, C. F. **Papel modulador do Raloxifeno durante a carcinogênese prostática em ratos**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2019.

POLLARD, M.; LUCKERT, P. H.; SNYDER, D. L. The promotional effect of testosterone on induction of prostate-cancer in MNU-sensitized LW rats. **Cancer Letters**, v. 45, n. 3, p. 209-212, 1989.

QUAGLIARIELLO, V. *et al.* Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30606-30616, 2017.

RASTOGI, S. K. *et al.* A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 13, n. 3, p. 131, 2009.

RATHORE H. S.; NOLLET, L. M. L. **Pesticides**: evaluation of environmental pollution. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

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

SALEM, I. B. *et al.* Dichlorvos-induced toxicity in HCT116 cells: Involvement of oxidative stress and apoptosis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 62-66, 2015.

SALVEN, P. *et al.* Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. **American Journal of Pathology**, v. 153, p. 103-108, 1998.

SCHUG, T. T. *et al.* Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 127, n. 3-5, p. 204-215, 2011.

SHABSIGH, A. *et al.* Vascular anatomy of the rat ventral prostate. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 256, n. 4, p. 403-411, 1999.

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, 2004.

SHARIFI, N.; AUCHUS, R. J. Steroid biosynthesis and prostate cancer. **Steroids**, v. 77, n. 7, p. 719-726, 2012.

SHEN, B. *et al.* Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29979-29985, 1998.

SIKKA, S. C.; WANG, R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. **Asian Journal of Andrology**, v.10, n.1, p.134-145, 2008.
STANFORD, L. J. *et al.* A polymorphism in the CYP17 gene and risk of prostate cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, p. 243–247, 2002.

STEINBERG, G. D. *et al.* Characterization of an N-methyl-N-nitrosourea-induced autochthonous rat bladder cancer model. **Cancer Research**, v. 50, n. 20, p. 6668-6674, 1990.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 177-183, 2009.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 1, p. 51-59, 1997.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 109, n. 3, p. 227-241, 2005.

TALKS, K. L. *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 411-421, 2000.

TAVASSOLI, P. *et al.* Rapid, non-destructive, cell-based screening assays for agents that modulate growth, death, and androgen receptor activation in prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 67, n. 4, p. 416-426, 2007.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **The Journal of Urology**, v. 166, n. 6, p. 2472-2483, 2001.

UZUNHISARCIKLI, M. *et al.* Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 115–22, 2007.

VANOVA, N. *et al.* Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 1058-1070, 2018.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 211-220, 1999.

WANG, Y. *et al.* Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v. 68, n. 4-5, p. 270-279, 2001.

WANG, G. L. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5510-5514, 1995.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 9, p. 4304-4308, 1993.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WEGIEL, B. *et al.* Molecular pathways in the progression of hormone-independent and metastatic prostate cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 10, n. 4, p. 392-401, 2010.

YAMANO, T. Dissociation of DDVP-induced DNA strand breaks from oxidative damage in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 108, n. 1-2, p. 49-56, 1996.

ZARBL, H. *et al.* Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. **Nature**, v. 315, n. 6018, p. 382, 1985.

ZHONG, H. *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. **Cancer Research**, v. 59, n. 22, p. 5830-5835, 1999.

ZHONG, H.; SEMENZA, G. L.; SIMONS, J. W.; MARZO, A. M. de. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is an early event in prostate carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 2, p. 88-93, 2004.

2. CAPÍTULO 1

DICLORVÓS ASSOCIADO À INDUÇÃO QUÍMICA POR MNU PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, MAS NÃO ALTERA A REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NA PRÓSTATA DE RATOS

RESUMO

Objetivo: Este estudo buscou avaliar a influência do praguicida DDVP sobre os padrões morfológicos e os marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos após indução química por MNU.

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

Resultados: Verificou-se o surgimento de lesões, como hiperplasia epitelial, atrofia, inflamação, atipia celular com inclusões citoplasmáticas e metaplasia com hiperplasia estromal. Houve aumento na incidência de hiperplasia epitelial nos grupos MNU e MNU+DDVP e aumento no volume relativo do epitélio da próstata no grupo MNU+DDVP. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao índice de densitometria óptica de proteínas angiogênicas.

Conclusão: O DDVP, associado ao MNU, promoveu o desenvolvimento de lesões e alterou aspectos morfológicos da próstata ventral de ratos, mas não alterou a expressão de marcadores moleculares de angiogênese.

Palavras-chaves: Angiogênese. Diclorvós. Endostatina. HIF-1. Próstata. VEGF.

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos em números absolutos desde 2008, segundo o Ministério do Meio Ambiente e o Dossiê Abrasco (2015). A agricultura brasileira usou 539,9 mil toneladas de pesticidas em 2017, de acordo com

os dados mais recentes do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Ibama), e o consumo médio de agrotóxicos vem aumentando em relação à área plantada (Dossiê Abrasco 2015), o que gera preocupação por conta de problemas de contaminação ambiental e, conseqüentemente, para a saúde humana.

Os pesticidas, assim como outros poluentes ambientais derivados de fontes industriais, agrícolas e de consumo doméstico são substâncias químicas exógenas estruturalmente semelhantes a muitos hormônios e podem alterar a homeostase mantida pelos hormônios naturais, sendo chamados de desreguladores endócrinos (KUO *et al.*, 2012). Muitas das anormalidades do sistema genital masculino podem ser consequência da presença aumentada dessas substâncias no ambiente durante as últimas décadas (MAIN *et al.*, 2010).

Dentre os diversos tipos de pesticidas, os organofosforados representam um grupo diverso de substâncias químicas extremamente tóxicas e com alta taxa de mortalidade (VANOVA *et al.*, 2018). Um exemplo é o Diclorvós (2,2-diclorovinil dimetil fosfato), comumente chamado de DDVP, considerado um inseticida altamente tóxico (classe toxicológica II) pela Anvisa (ANVISA, 2003), mas continua tendo um alto uso devido ao seu custo-benefício e sua eficiência no controle de pragas.

Alguns autores observaram efeitos no sistema genital e endócrino causados pelo DDVP, como a interferência nos receptores de andrógenos (AR) (ANDERSEN *et al.*, 2002; DIRICAN *et al.*, 2012; FEDORUK, 2005; TAVASSOLI *et al.*, 2007) e ação citotóxica e genotóxica em diferentes linhagens de células de mamíferos (LIN *et al.*, 1988; ORAL *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2007; SALEM *et al.*, 2015; YAMANO, 1996), podendo ser considerado um agente mutagênico e carcinogênico para seres humanos. Estudos anteriores também sugerem uma relação entre o pesticida e o câncer de próstata (MILLS e YANG, 2003).

No Brasil e no mundo, o câncer de próstata é o segundo câncer mais comum em homens. Estima-se que 1,3 milhão de casos de câncer de próstata foram diagnosticados mundialmente em 2018, representando 13,5% dos cânceres diagnosticados em homens e apresentando 359.000 mortes associadas (GLOBOCAN, 2018; INCA, 2020).

Para a progressão de um tumor, é necessário o fornecimento constante de nutrientes e oxigênio e de um meio eficaz de remover os produtos residuais através da formação de novos vasos sanguíneos, processo chamado de angiogênese (CHARLESWORTH e HARRIS, 2006; PALMA *et al.*, 2017; VEIKKOLA e ALITALO,

1999). A regulação da angiogênese envolve equilíbrio local nas atividades de fatores proangiogênicos e antiangiogênicos. Os tumores que se tornam neovascularizados, frequentemente, expressam níveis aumentados de proteínas proangiogênicas, em relação às antiangiogênicas (FOLKMAN, 2002).

A endostatina é um fator antiangiogênico com atividade específica em células endoteliais (DHANABAL *et al.*, 1999a; O'REILLY *et al.*, 1997), inibindo a proliferação dessas células, mas não apresentando efeito sobre células tumorais ou tipos de células não endoteliais (DKHISSI *et al.*, 2003) e sendo, portanto, um potente inibidor da angiogênese.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína proangiogênica, com cinco isoformas diferentes (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E), que tem sido implicada em várias etapas ao longo do processo de angiogênese (HICKLIN e ELLIS 2005, HROUDA *et al.*, 2003). Na próstata, o VEGF-A é expresso em células epiteliais e endoteliais (FERRER *et al.*, 1997) e essa expressão é aumentada no câncer de próstata metastático em relação ao tecido normal (FERRER *et al.*, 1997; HROUDA *et al.*, 2003).

O receptor de VEGF 2 (Flk-1) é o principal mediador dos efeitos mitogênicos, angiogênicos e de aumento da permeabilidade do VEGF-A (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005). Sua expressão torna-se aumentada em condições de angiogênese patológica, como em tumores (MATSUMOTO e CLAEISSON-WELSH, 2001).

A expressão de proteínas proangiogênicas pode ser induzida por vários fatores, incluindo hipóxia. Quando o oxigênio não é suficientemente suprido pela competição entre células altamente proliferativas dos tumores, vários genes são induzidos pelo fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1) e muitos desses genes são responsáveis pela promoção da angiogênese (CHARLESWORTH e HARRIS, 2006). O HIF-1 α pode ser um biomarcador para lesões prostáticas pré-malignas, pois este é regulado positivamente em eventos precoces da carcinogênese (ZHONG *et al.*, 2004).

Os fatores proangiogênicos e antiangiogênicos e as vias de indução desses fatores são importantes para a progressão das lesões neoplásicas e, portanto, seus estudos auxiliam na compreensão da carcinogênese prostática. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do praguicida DDVP sobre marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos após indução química por MNU.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Modelo animal

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

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

Grupos experimentais

Foram formados, aleatoriamente, 4 grupos experimentais com 8 animais em cada: Controle; DDVP; MNU; MNU+DDVP. Os animais de todos os grupos foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (50mg/kg intra-peritonal) e Cloridrato de cetamina 10% (50mg/kg, intra-peritonal) antes da realização do procedimento cirúrgico (Figura 7).

Aos 90 dias de idade, foi realizada uma incisão suprapúbica para a inoculação de MNU ou de citrato de sódio na cápsula da próstata ventral dos ratos. Nos animais dos grupos Controle e DDVP, a inoculação foi de citrato de sódio 1M, pH 6,8 (dilúente do MNU) para a simulação da indução com o MNU. Nos animais dos grupos MNU e MNU+DDVP, a inoculação foi de MNU na dose de 15 mg/Kg dissolvida em citrato de sódio (1M pH 6,8) para indução química. Após o procedimento cirúrgico os animais de todos os grupos experimentais receberam Paracetamol (200mg/kg) diluídos na água do bebedouro durante 5 dias para analgesia (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

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

Durante todo o experimento, os animais dos grupos Controle e MNU receberam ração basal sem o pesticida. Os animais dos grupos DDVP e MNU+DDVP receberam ração basal sem o pesticida até os 120 dias de idade, período em que foi realizada a indução de lesões (inoculação de MNU e administração de Cipionato de testosterona). A partir 120 dias de idade até o momento da eutanásia, os animais destes grupos passaram a receber ração basal enriquecida com 10 mg/Kg de DDVP, concentração

correspondente ao LOAEL (lowest observed adverse effect level), de acordo com a Environmental Protection Agency (EPA, 1998).

Todos os protocolos seguiram os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a regulamentação estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo 1).

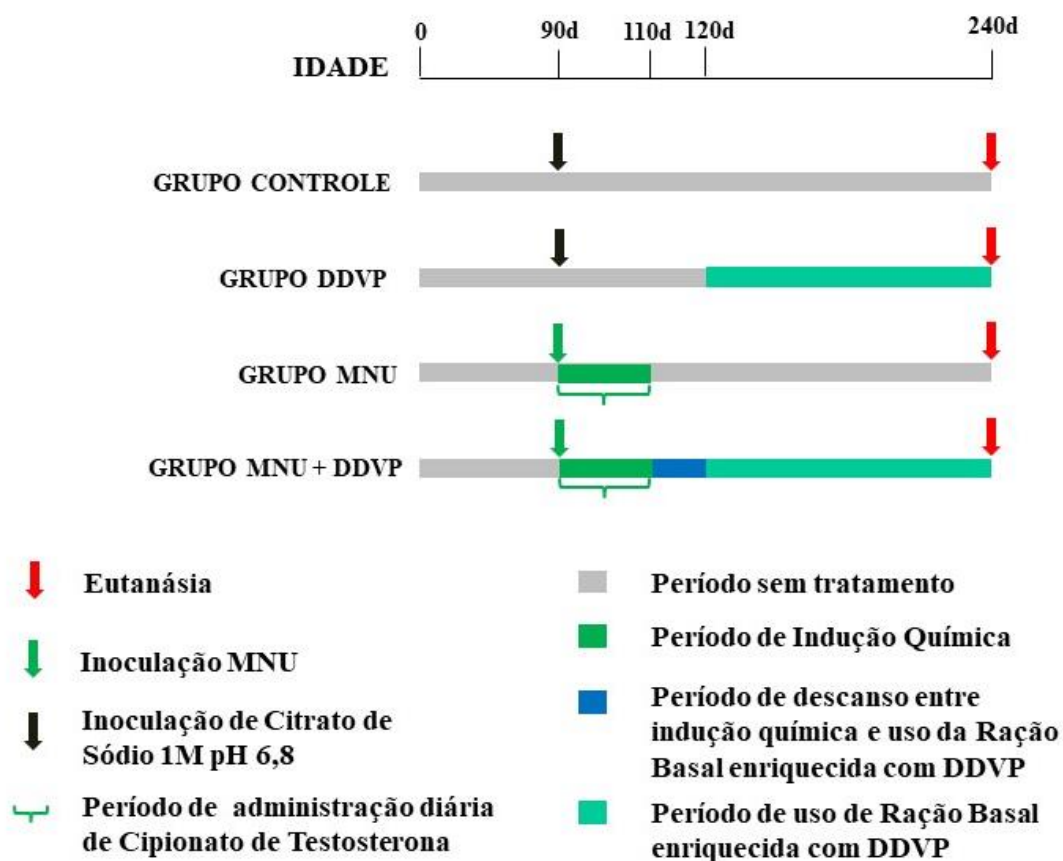


Figura 7. Diagrama dos Grupos Experimentais.

Coleta do material biológico

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

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

Avaliação dos dados biométricos

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

Análise histopatológica

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

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

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

Análise morfométrico-estereológica

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

Também foi realizada a contagem de células epiteliais luminais a partir de 10 imagens aleatórias da próstata de cada animal e a distribuição desses valores por uma área de 10.000 μm^2 da próstata.

Análise imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, os cortes histológicos também foram desparafinizados e a técnica foi padronizada de acordo com o protocolo do fabricante para cada anticorpo: HIF-1 α (1:1000), VEGF (1:400), Flk-1 (1:400), endostatina (1:250). O protocolo da imuno-histoquímica se encontra no Anexo 2.

Análise de *Western Blotting*

Para as análises de *Western Blotting*, foi feita a extração das proteínas seguida de quantificação pelo micrométodo de Bradford. Foi feita eletroforese para separação das proteínas de acordo com o peso molecular e estas foram eletrotransferidas para uma membrana imobilizadora de PVDF para incubação com os anticorpos primários e secundários correspondentes a cada antígeno pesquisado (HIF-1 α , VEGF, Flk-1, endostatina) e à proteína usada como marcador celular endógeno (β -actina).

Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas e inseridas no fotodocumentador (G:BOX, Syngene) e a reação foi revelada utilizando substrato quimioluminescente. A análise dos resultados foi feita através da verificação da reação positiva ou ausência das bandas, seguida de fotodocumentação da membrana. A intensidade da banda foi quantificada através do índice de densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de β -actina (marcador celular endógeno) realizado no software GeneSys (GeneTool, Syngene). O protocolo de *Western Blotting* se encontra no Anexo 3.

Análise estatística

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

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

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

2.3 RESULTADOS

Análise de dados biométricos

Na análise do peso corpóreo dos animais, peso da próstata ventral e peso relativo, não houve diferenças estatisticamente significativas. Os valores de média e desvio padrão para peso corpóreo e peso da próstata ventral por grupo, assim como peso relativo entre peso da próstata e peso do animal se encontram nas tabelas abaixo.

Tabela 1. Média e desvio-padrão do peso corpóreo dos animais (PC), peso da próstata ventral (PV) e peso relativo (PR) ($p > 0,05$).

	Controle	DDVP	MNU	MNU+DDVP
PC	364,00 ± 24,74	366,50 ± 23,81	363,62 ± 31,35	363,75 ± 12,97
PV	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,04
PR	5,79 ± 0,83	6,27 ± 1,44	7,48 ± 1,34	7,28 ± 1,40

Nos valores de consumo médio semanal de ração também não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 2. Média e desvio-padrão do consumo semanal de ração por grupo ($p > 0,05$).

	Controle	DDVP	MNU	MNU+DDVP
MÉDIA CONSUMO	123,55 ± 8,66	119,83 ± 9,15	124,60 ± 0,45	122,51 ± 6,27

Análise histopatológica

A análise do lobo ventral do grupo Controle mostrou arquitetura glandular típica de uma próstata ventral adulta normal. Os ácinos apresentaram epitélio simples cilíndrico baixo, com polaridade nuclear basal, e estroma fibromuscular vascularizado (Figura 8 – A). O grupo DDVP apresentou, em grande parte, arquitetura glandular de uma próstata ventral normal, porém com algumas regiões de ácinos pregueados (Figura 8 – B). Os animais dos grupos induzidos (MNU e MNU+DDVP) apresentaram ácinos mais pregueados, com regiões de epitélio cilíndrico e regiões estratificadas (Figura 8 – C e D).

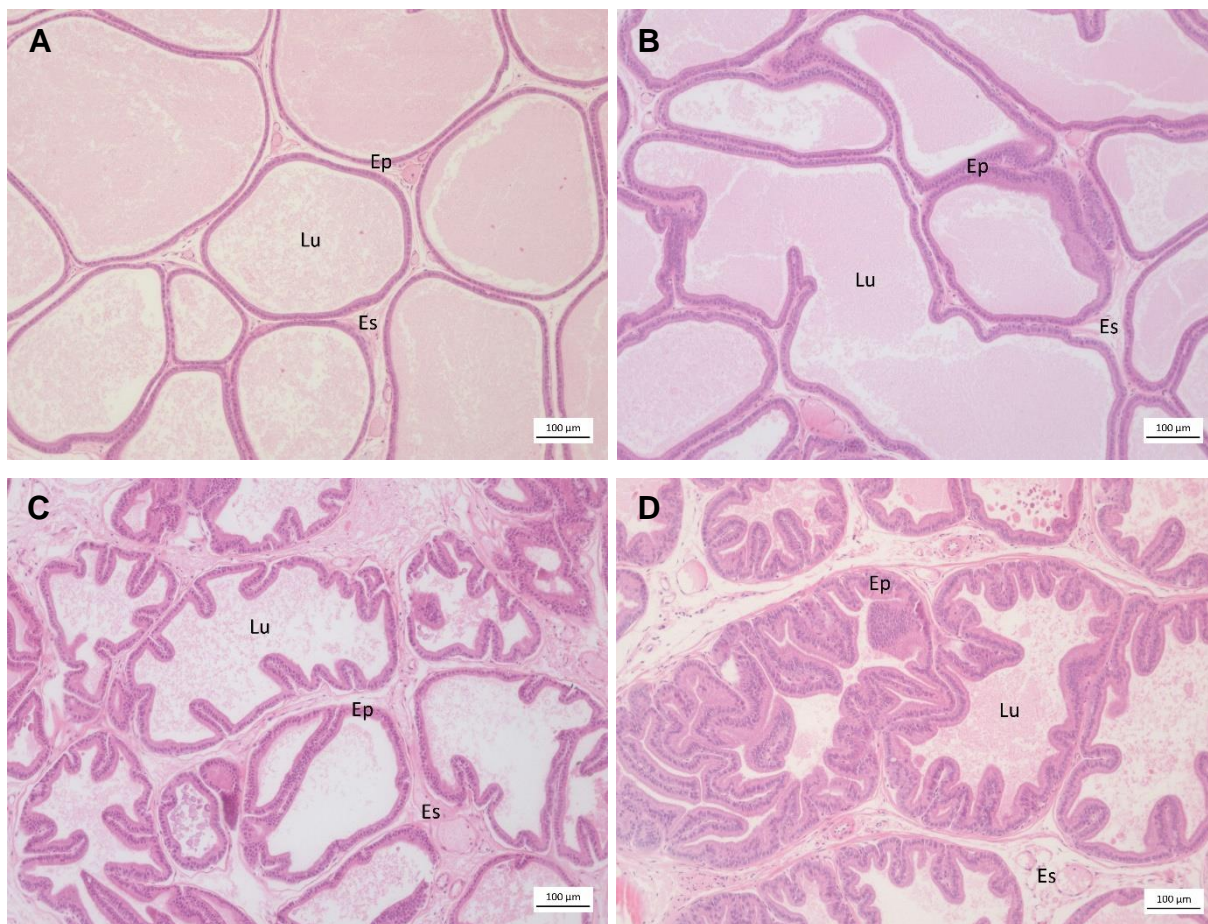


Figura 8. Visão panorâmica de cortes histológicos da próstata ventral dos grupos experimentais, corados com hematoxilina e eosina. (A) Grupo Controle. (B) Grupo DDVP. (C) Grupo MNU. (D) Grupo MNU+DDVP. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma.

Foram encontradas algumas alterações no epitélio e estroma de todos os grupos experimentais: hiperplasia epitelial (Figura 9 – A e B), atrofia (Figura 9 – C e D), focos inflamatórios periacinares (Figura 9 – E e F), atipia celular com presença de inclusões citoplasmáticas (Figura 10 – A e B) e metaplasia com hiperplasia estromal (Figura 10 – C a F). A incidência de cada tipo de lesão para cada grupo se encontra na tabela 3.

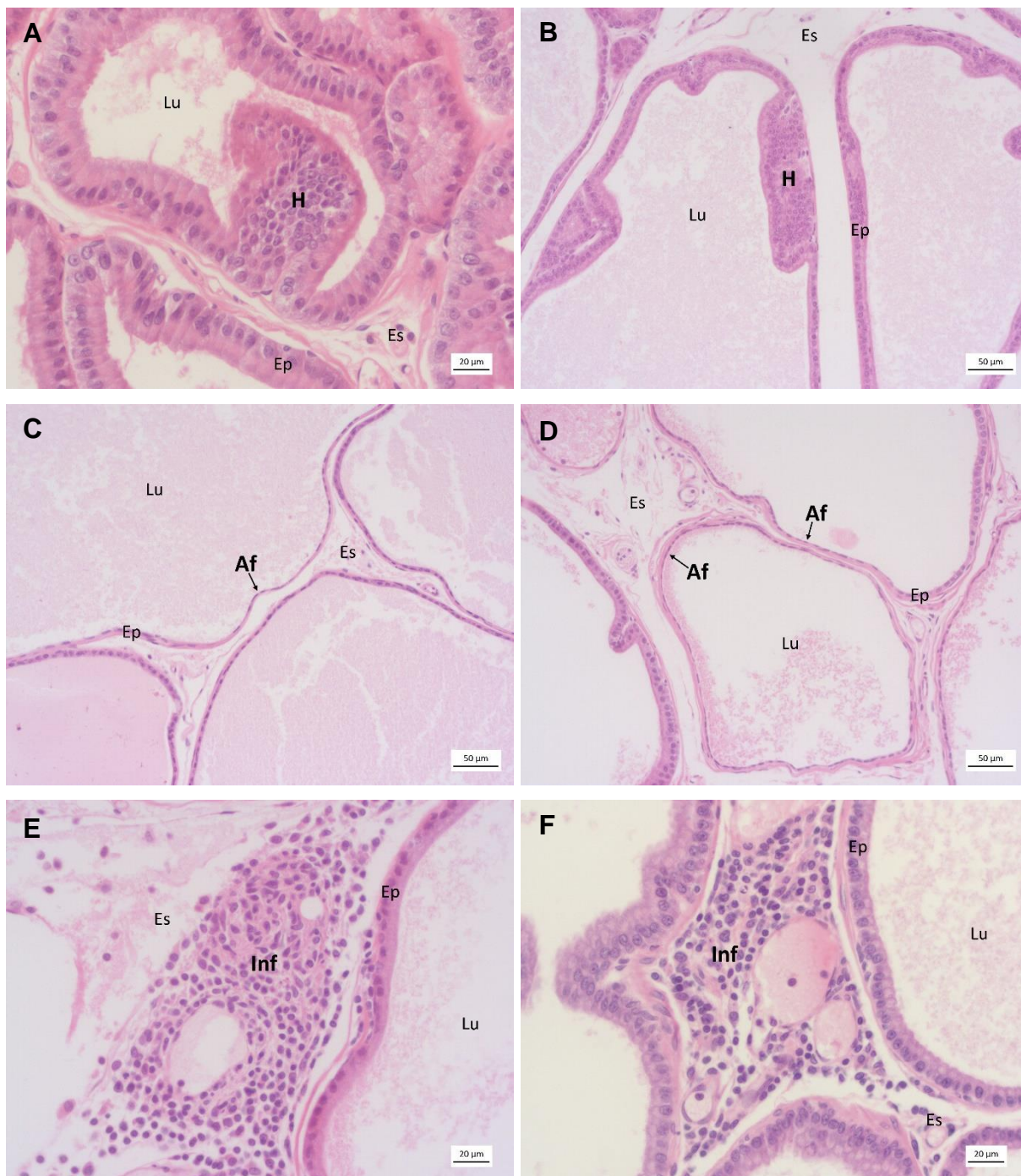


Figura 9. Cortes histológicos da próstata ventral de ratos corados por hematoxilina e eosina para a representação da análise histopatológica. (A e B) regiões com hiperplasia epitelial. (C e D) regiões com atrofia. (E e F) regiões com inflamação periácinar. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma, H = hiperplasia, Af = atrofia, inf = foco inflamatório.

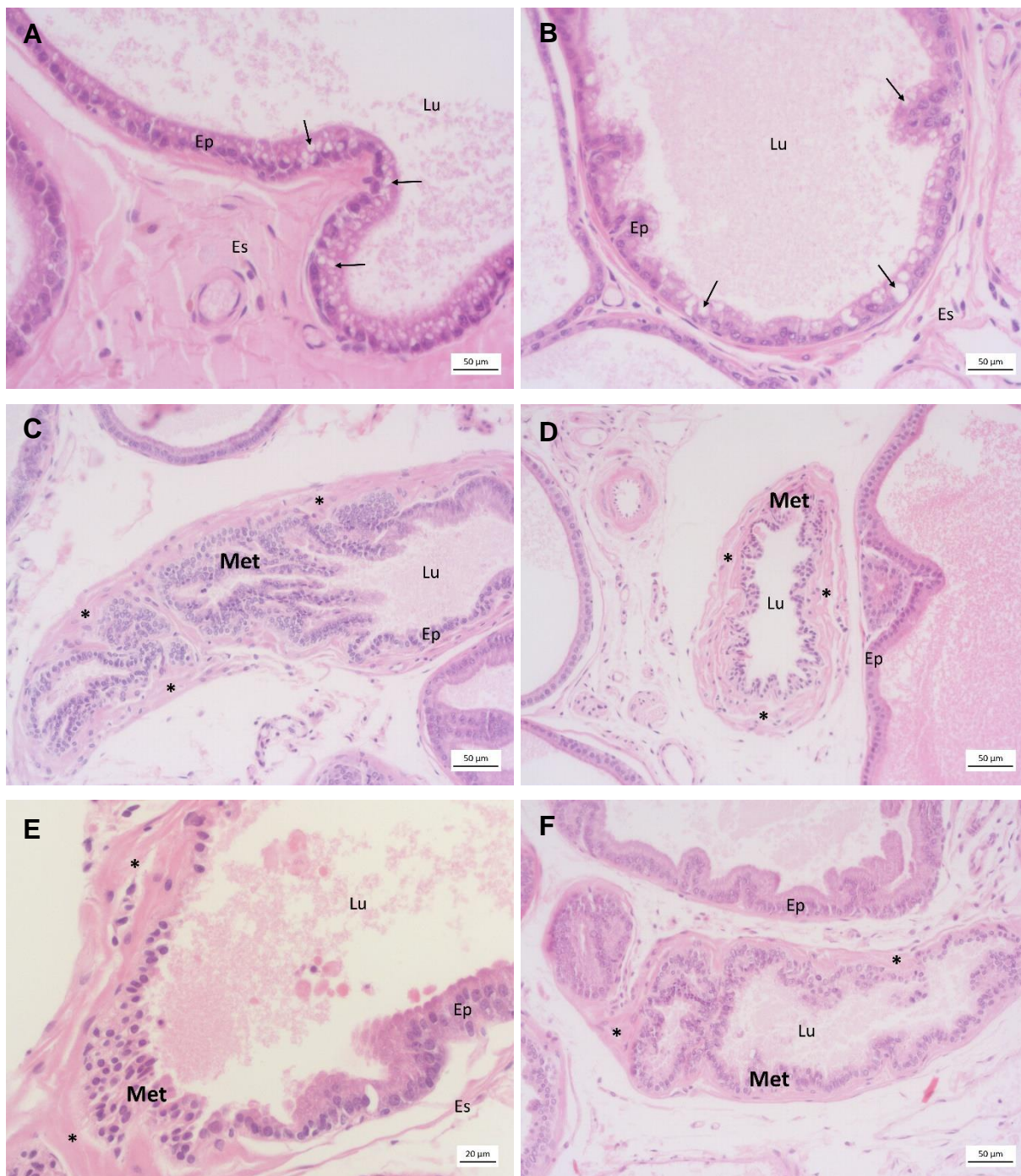


Figura 10. Cortes histológicas da próstata ventral de ratos corados por hematoxilina e eosina para a representação da análise histopatológica. (A e B) setas apontam para inclusões citoplasmáticas. (C, D, E e F) metaplasia com hiperplasia estromal. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma, Met = metaplasia, (*) hiperplasia estromal.

Tabela 3. Incidência das lesões prostáticas por grupo.

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

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente em relação à hiperplasia epitelial. Através do gráfico da Figura 11 é possível verificar um aumento na incidência de hiperplasia epitelial nos grupos induzidos (MNU e MNU+DDVP), nos quais 100% dos animais apresentam essa lesão, demonstrando uma relação entre esse tipo de lesão e a indução química.

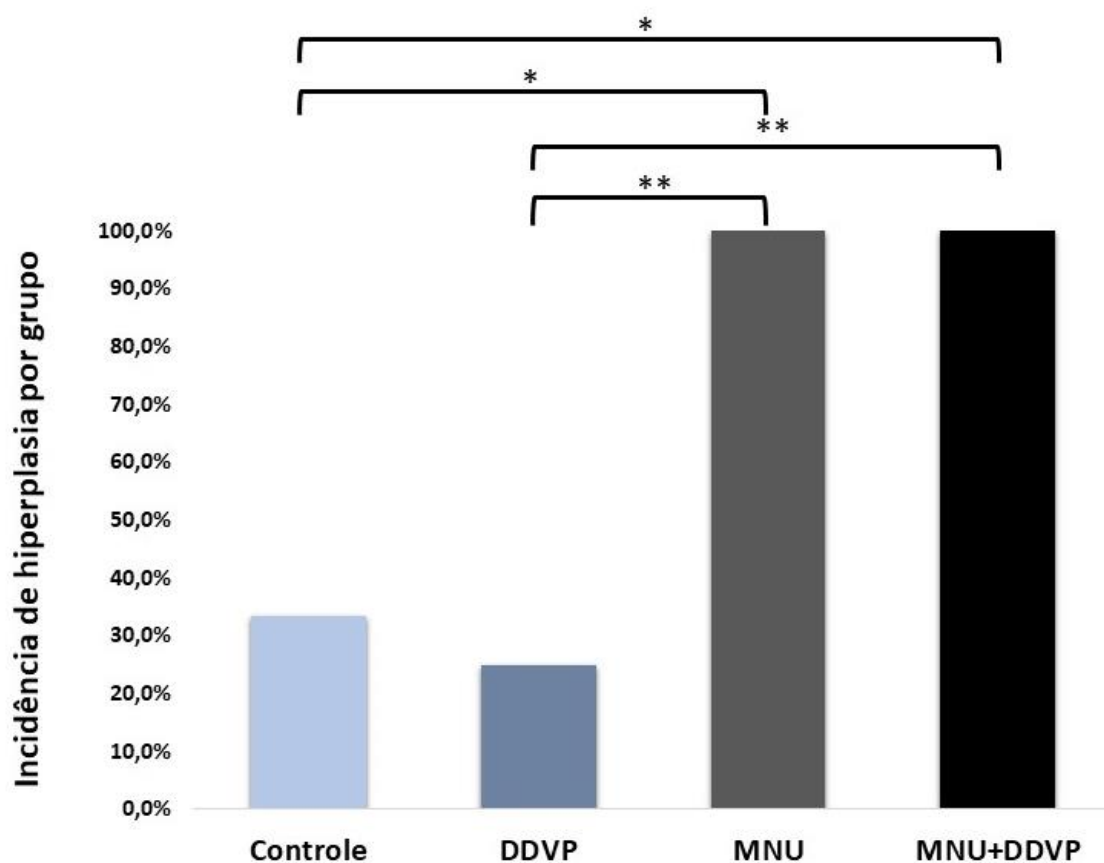


Figura 11. Incidência de hiperplasia epitelial por grupo. Análise estatística baseada no teste de Fisher (* $p = 0,0150$ e ** $p = 0,0070$).

Análise Morfométrico-Estereológica

A análise dos volumes relativos do estroma, epitélio e lúmen encontrou diferença significativa entre os grupos, em relação ao epitélio. O grupo MNU+DDVP apresenta um volume relativo do epitélio significativamente maior em relação ao grupo Controle. Os dados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Média e desvio padrão dos volumes relativos (VR) do estroma, epitélio e lúmen da próstata.

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

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

A contagem do número de células epiteliais luminiais por 10.000 μm^2 de área para cada grupo revela diferenças significativas entre os grupos não induzidos (Controle e DDVP) e os grupos induzidos por MNU (MNU e MNU+DDVP), demonstrando que o modelo de indução foi responsável pelo aumento no número de células nesses grupos (Figura 12).

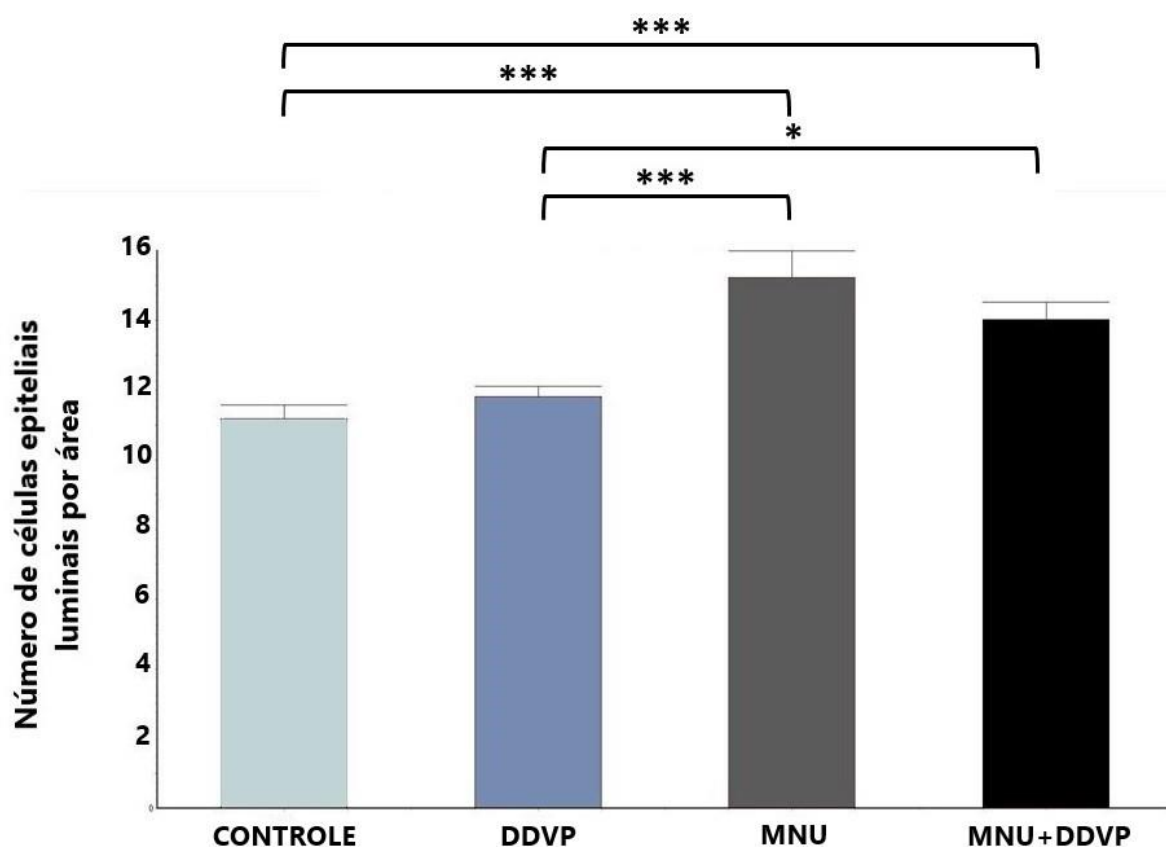


Figura 12. Número de células epiteliais luminais por área (10.000 μm²). Os valores representam média ± erro padrão. Análise estatística baseada no teste de Tukey (* p < 0,05 e *** p ≤ 0.001).

Análise imuno-histoquímica

HIF-1α

A análise imuno-histoquímica do HIF-1α revelou uma marcação na região do Complexo de Golgi das células epiteliais luminais de todos os grupos experimentais (Figura 13).

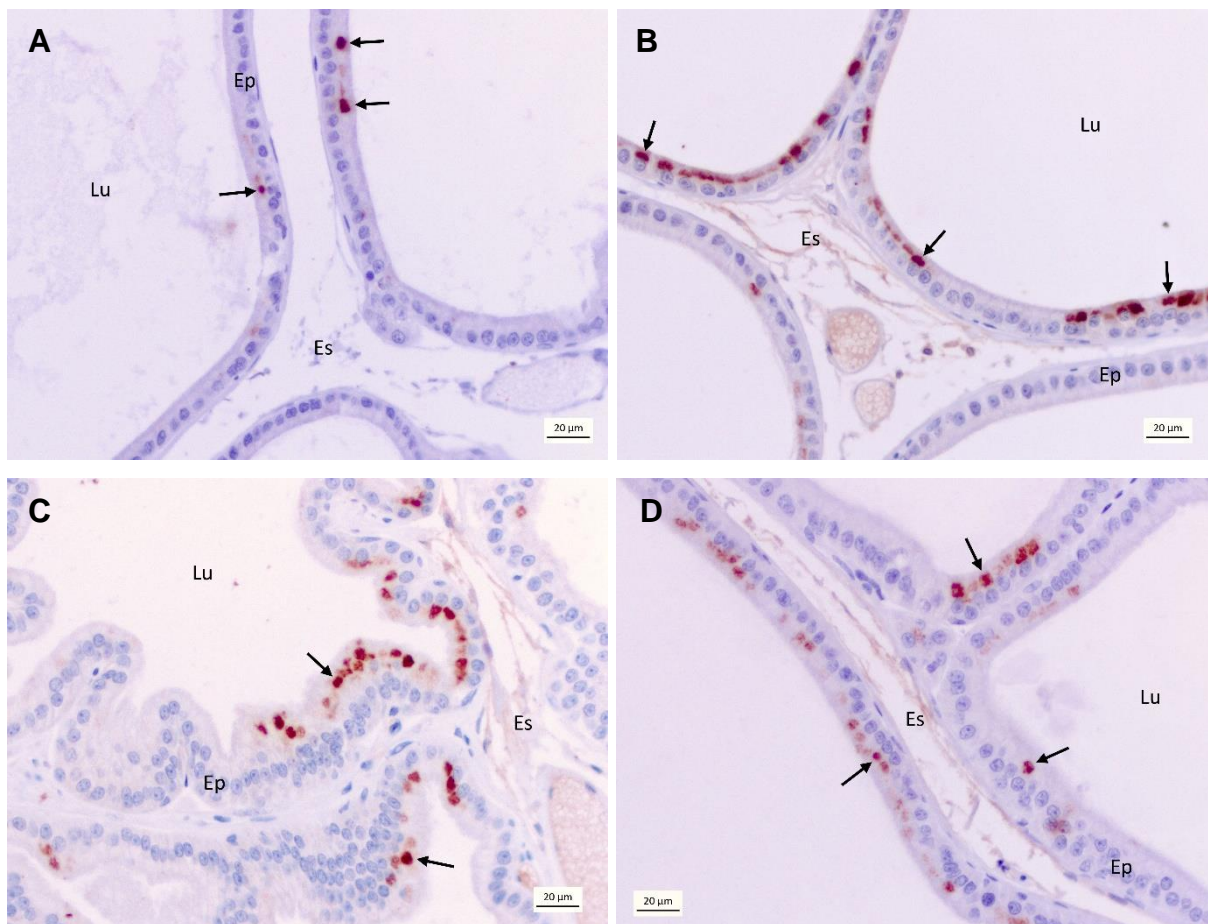


Figura 13. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-HIF-1 α em objetiva de 40x. **(A)** Grupo Controle. **(B)** Grupo DDVP. **(C)** Grupo MNU. **(D)** Grupo MNU+DDVP. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma. Seta sólida = marcação na região do complexo de Golgi de células epiteliais luminiais.

VEGF

Na análise imuno-histoquímica do VEGF detectou-se uma marcação nas células endoteliais e no citoplasma das células epiteliais luminiais de todos os grupos experimentais, principalmente na região apical dessas células (Figura 14).

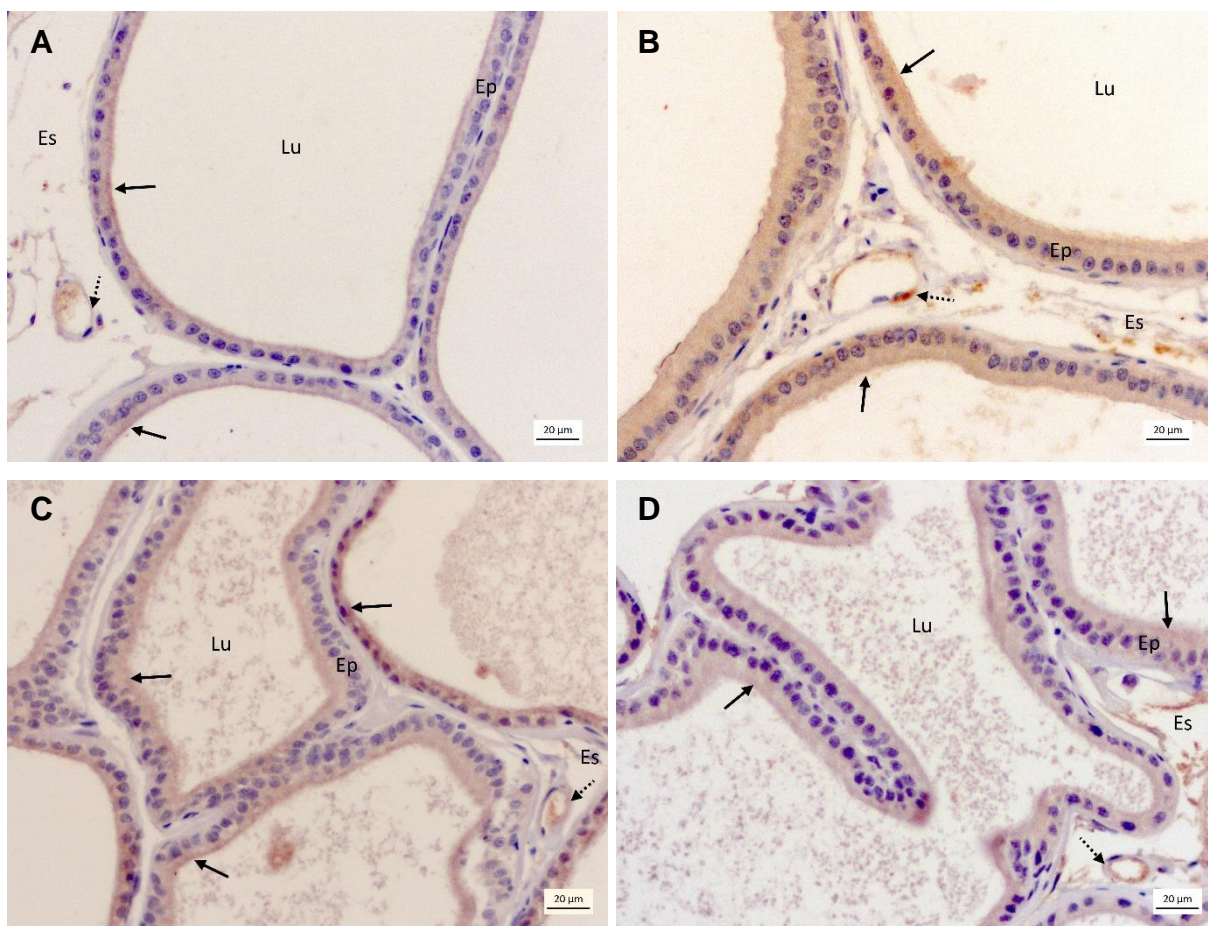


Figura 14. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-VEGF em objetiva de 40x. **(A)** Grupo Controle. **(B)** Grupo DDVP. **(C)** Grupo MNU. **(D)** Grupo MNU+DDVP. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma. Seta sólida = marcação no citoplasma das células epiteliais luminiais. Seta pontilhada = marcação nas células endoteliais.

Flk-1

Na análise imuno-histoquímica do Flk-1 (receptor do VEGF) detectou-se uma marcação nas células endoteliais do estroma e no citoplasma das células epiteliais luminiais de todos os grupos experimentais, principalmente na região apical dessas células (Figura 15).

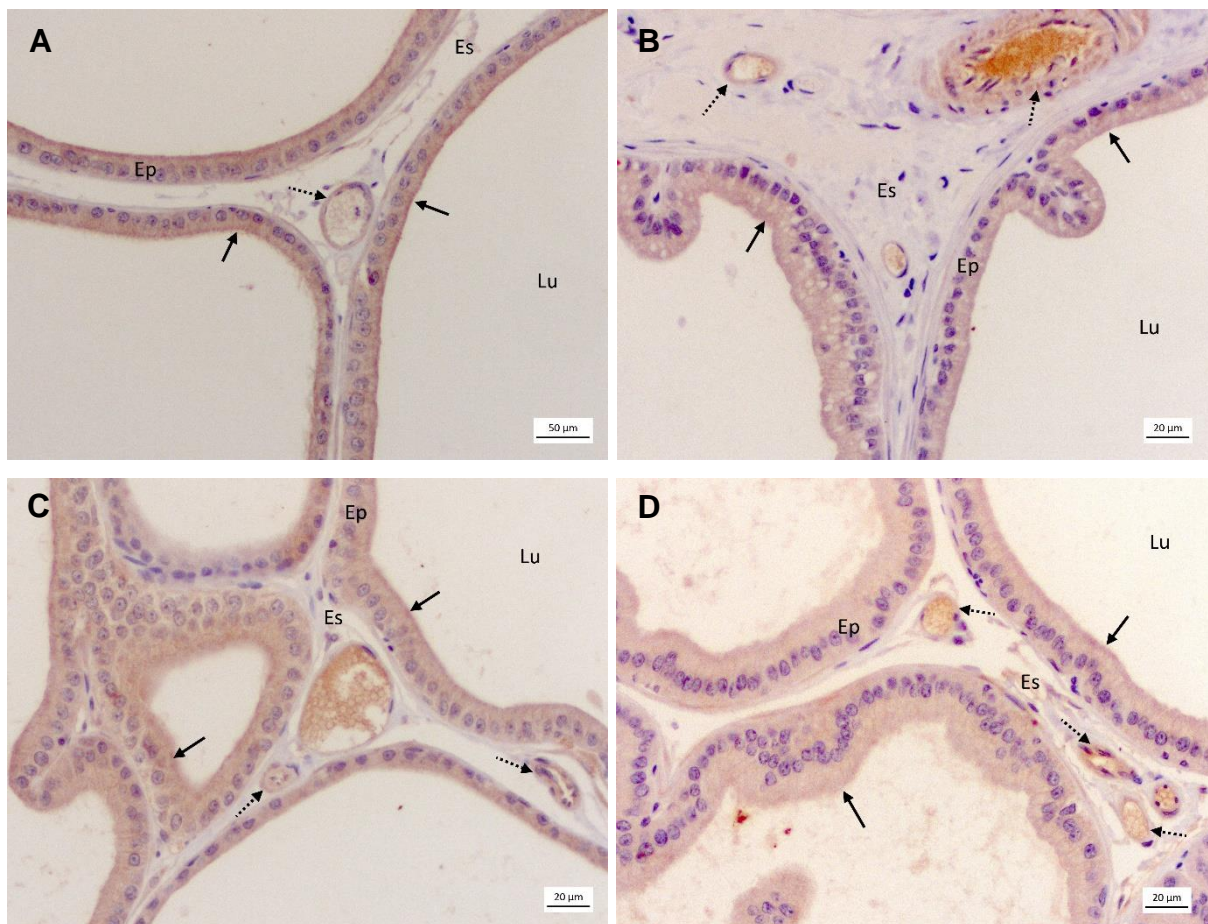


Figura 15. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-Flk-1 em objetiva de 40x. **(A)** Grupo Controle. **(B)** Grupo DDVP. **(C)** Grupo MNU. **(D)** Grupo MNU+DDVP. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma. Seta sólida = marcação no citoplasma de células epiteliais luminiais. Seta pontilhada = marcação em células endoteliais.

Endostatina

Na análise imuno-histoquímica da endostatina detectou-se uma marcação nas células endoteliais do estroma e no citoplasma das células epiteliais luminiais de todos os grupos experimentais, principalmente na região apical dessas células (Figura 16).

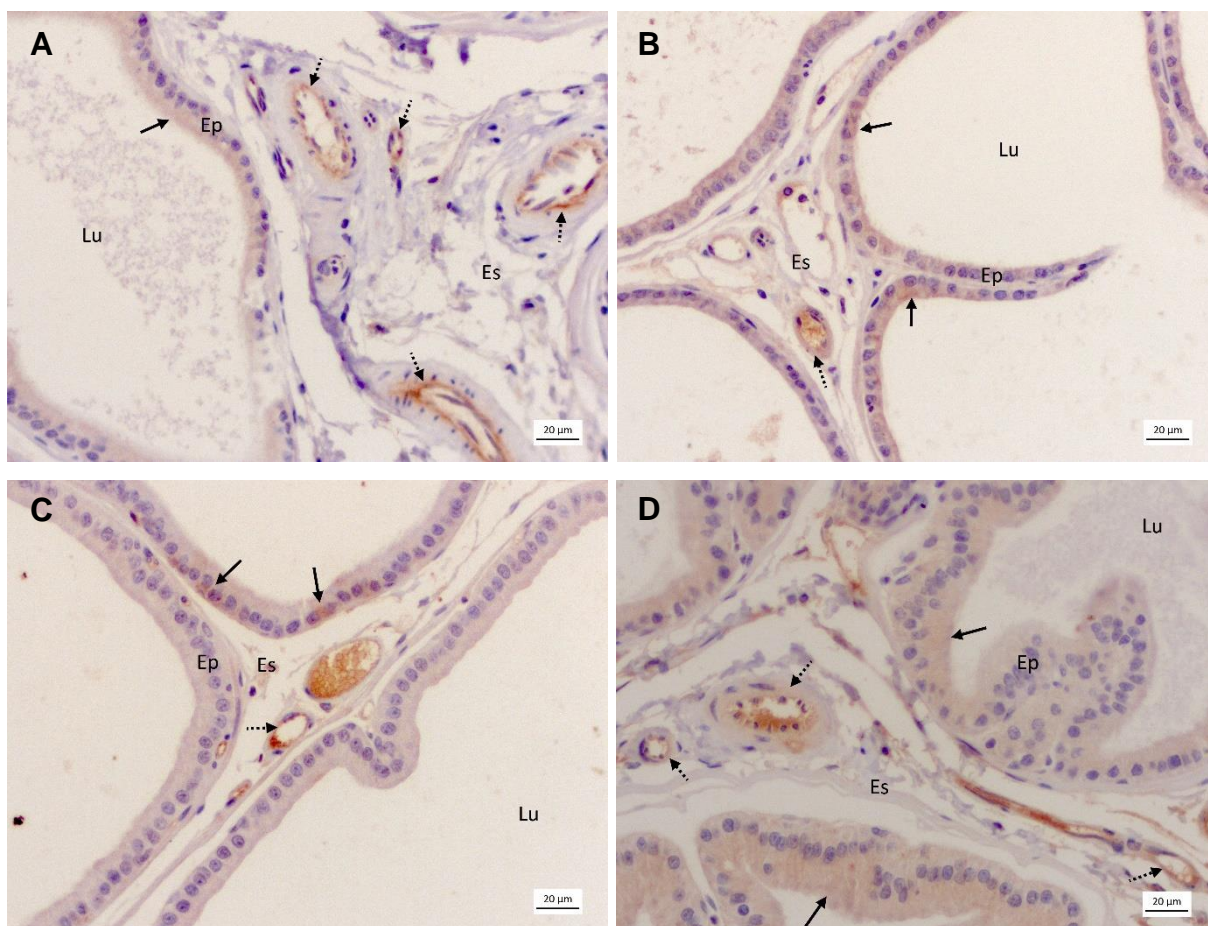


Figura 16. Fotomicrografias da próstata ventral de rato com reação imuno-histoquímica anti-endostatina em objetiva de 40x. (A) Grupo Controle. (B) Grupo DDVP. (C) Grupo MNU. (D) Grupo MNU+DDVP. Lu = lúmen, Ep = epitélio, Es = estroma. Seta sólida = marcação no citoplasma de células epiteliais luminiais. Seta pontilhada = marcação em células endoteliais.

Análise de *Western Blotting*

Nos dados referentes aos perfis representativos de *Western Blotting* nas amostras de próstata ventral observou-se uma banda de 42 kDa para β -actina e uma banda de 96 kDa para HIF-1 α . Para VEGF, observou-se uma banda de 21 kDa, que representa a proteína em sua forma monomérica. Para Flk-1, observou-se uma banda de 150 kDa, que representa a proteína imatura e para a endostatina, uma banda de 22 kDa (Figura 17).

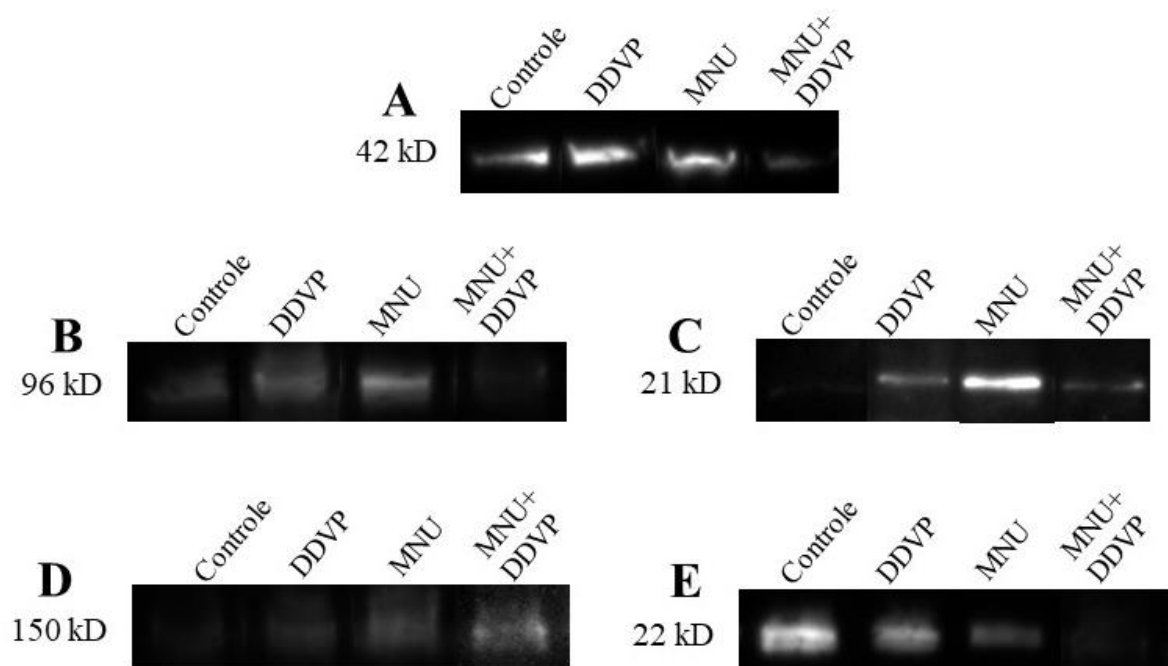


Figura 17. Perfil representativo de *Western Blotting* para A = β -actina. B = HIF. C = VEGF. D = Flk-1. E = Endostatina.

Índice de densitometria óptica (IOD)

O índice de densitometria óptica (IOD) relativo à intensidade de β -actina não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para nenhuma das proteínas analisadas (Figura 18).

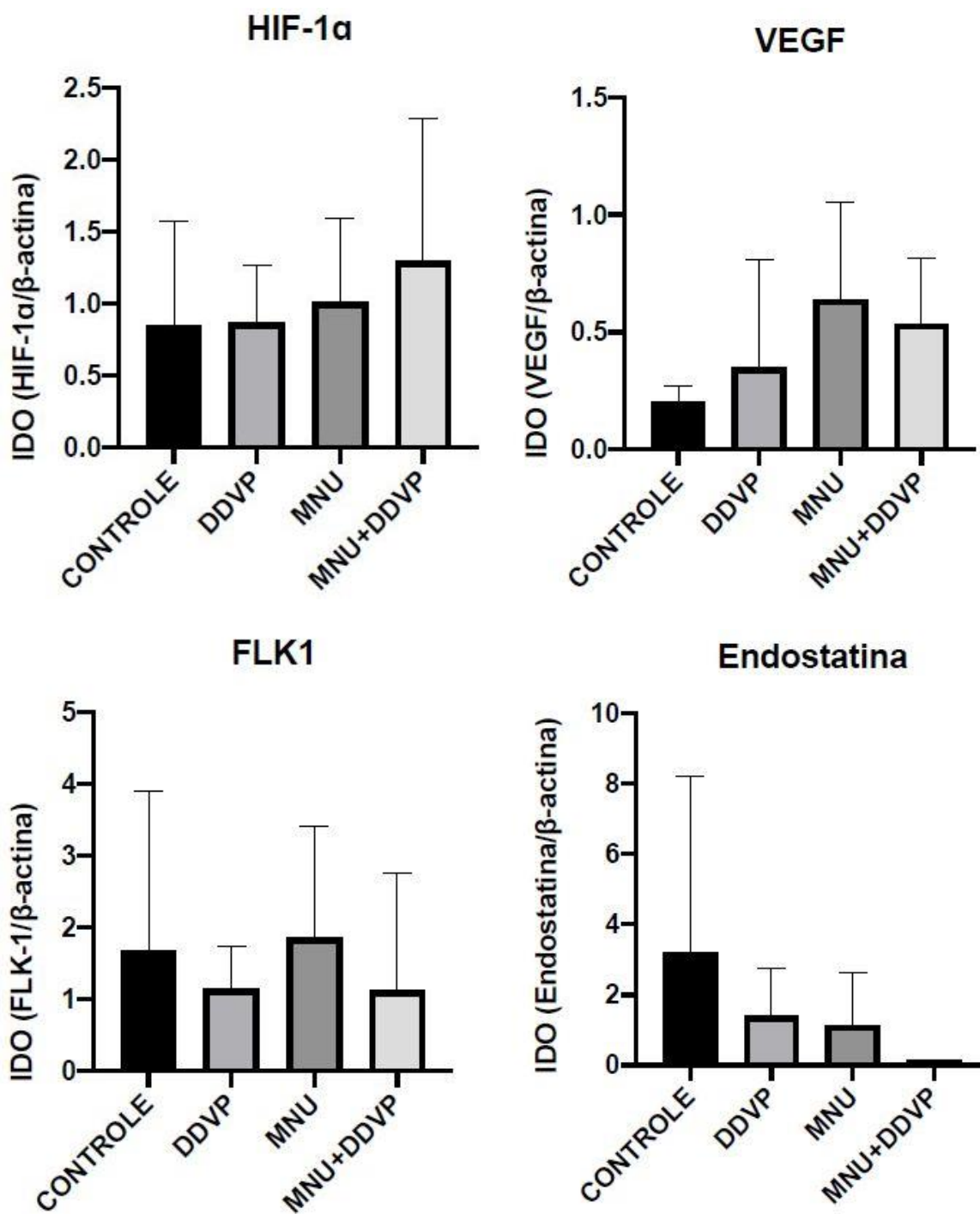


Figura 18. Índice de densitometria óptica (IOD) para HIF-1 α , VEGF, Flk-1 e endostatina. Análises estatísticas baseadas no teste de Tukey.

2.4 DISCUSSÃO

A avaliação dos dados biométricos como peso corpóreo, peso da próstata, peso relativo e consumo médio semanal de ração não apresentou diferenças entre os grupos experimentais, podendo estar relacionado à ausência de lesões graves em todos os grupos.

O protocolo de indução, com inoculação intraprostática de MNU e administração de testosterona por 20 dias, foi responsável pelo surgimento de lesões como hiperplasia, atrofia, inflamação e metaplasia na próstata ventral de ratos, porém não foi capaz de gerar lesões malignas. Arunkumar e colaboradores (2006) e Pinho (2019) também usaram protocolos de carcinogênese com combinação de MNU e testosterona, porém obtiveram lesões pré-malignas, como displasia e neoplasia intraepitelial prostática, ou malignas, como adenocarcinoma. Essa diferença pode ter ocorrido devido à maior concentração de MNU administrada ou, no caso de Pinho (2019), pela utilização de um copolímero para liberação gradual do carcinógeno.

A maior incidência de hiperplasia epitelial ocorreu nos grupos MNU e MNU+DDVP, com 100% dos animais apresentando essa lesão nos grupos, sendo possível estabelecer uma relação entre a indução química e o aumento da população celular no epitélio.

A contagem de células epiteliais luminais demonstrou aumento significativo no número de células dos grupos induzidos em relação aos não induzidos, corroborando com os achados de incidência de hiperplasia epitelial. A análise morfométrico-estereológica evidenciou maior volume relativo do epitélio no grupo MNU+DDVP, indicando que a associação entre MNU e DDVP foi responsável pelo aumento no volume desse compartimento prostático. A indução química, bem como a associação entre indução e pesticida promoveram a proliferação celular do epitélio prostático.

A testosterona, administrada na etapa de indução química, tem ação promotora e está associada ao aumento da proliferação celular durante a fase inicial da carcinogênese prostática (BOSLAND e PRINSEN, 1990) e o DDVP, que é um desregulador endócrino, em doses baixas, pode apresentar ação agonista nos receptores de andrógeno da próstata (FEDORUK, 2005). Como os andrógenos, ao se ligarem aos receptores AR, estimulam a proliferação e diferenciação das células epiteliais da próstata (CUNHA *et. al*, 1987), o DDVP pode ter alterado a regulação celular nesse órgão.

Em lesões de neoplasia intraepitelial de alto grau ou carcinoma da próstata, foi detectado aumento progressivo na expressão do HIF-1 α em relação ao epitélio normal (KIMBRO e SIMONS, 2006; MABJEESH e AMIR, 2007). No presente trabalho, não foi observado aumento significativo, visto que não foram obtidas lesões pré-malignas e malignas. Outra diferença é a imunolocalização desse fator de transcrição. Mabeesh e Amir (2007) detectaram-no no núcleo das células, enquanto a marcação da proteína no presente experimento ocorreu somente no citoplasma, na região do Complexo de Golgi. Isso demonstra que a proteína ainda não foi ativada. Ela é ativada no núcleo, onde exerce a sua função de regular a transcrição de genes (ELSBERGER *et al.*, 2011).

Segundo Zhong *et al.* (2004), a regulação positiva do HIF-1 α ocorre no estágio inicial da tumorigênese, em lesões pré-malignas da próstata, antes da evidência histológica de angiogênese ou invasão. Esse fator poderia explicar a ausência de diferenças significativas na expressão do VEGF e do Flk-1 entre os grupos experimentais, visto que não houve aumento da expressão e ativação do HIF-1 α .

A expressão do VEGF se correlaciona com a progressão do tumor (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005) e com um mau prognóstico no câncer de próstata (GEORGE *et al.*, 2001) e a expressão do Flk-1 está relacionada com a do VEGF, pois a superexpressão do VEGF regula positivamente a do Flk-1 em células endoteliais (KREMER *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 1998).

A imunolocalização do VEGF em células epiteliais e endoteliais corresponde aos achados de Ferrer *et al.* (1997; 1998) e Pallares *et al.* (2006). Da mesma forma, a imunolocalização do Flk-1 também ocorreu em células epiteliais e endoteliais, corroborando com o encontrado em outros estudos (PALLARES *et al.*, 2006).

A endostatina tem atuação direta nas células endoteliais, apresentando marcação nessas células, o que corrobora com os achados de Ergun e colaboradores (2001). Segundo Sund e Kalluri (2009), essa proteína também pode ser marcada nas lâminas basais por ser um fragmento do domínio C-terminal do colágeno XVIII, que faz parte das membranas basais epiteliais e endoteliais e é nessa região que ocorre a proteólise do colágeno, liberando a porção referente à endostatina (FELBOR *et al.*, 2000). A marcação encontrada também nas células epiteliais luminiais pode revelar a ligação do anticorpo ao fragmento ainda ligado ao colágeno XVIII que está sendo produzido na célula.

É esperado que a endostatina diminua com o desenvolvimento de lesões malignas, pois nos estágios avançados de carcinogênese há uma diminuição dos fatores antiangiogênicos ao mesmo tempo que aumentam os fatores proangiogênicos (FOLKMAN, 2002). Apesar de ter ocorrido uma diminuição no índice de densitometria óptica da endostatina nos grupos induzidos em relação ao grupo Controle, essa diferença não foi significativa.

O microambiente prostático é muito importante no processo carcinogênico (BIANCHI-FRIAS *et al.*, 2019). A interação entre o microambiente estromal e as células epiteliais é responsável pela manutenção dos aspectos fisiológicos da próstata (NEMETH e LEE, 1996) e o desequilíbrio nessa interação pode gerar a formação de neoplasias e a invasão (CUNHA *et al.*, 1992). Assim, o estudo de fatores envolvidos nessa interação, como os fatores angiogênicos, são importantes na compreensão da carcinogênese.

Devido ao fato deste experimento ter alcançado apenas uma etapa inicial de carcinogênese, ainda não houve um aumento significativo nos fatores proangiogênicos e uma diminuição nos fatores antiangiogênicos.

Dessa forma, a associação entre o MNU e o DDVP alterou a morfologia da próstata, mas não alterou a expressão das proteínas angiogênicas estudadas.

2.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelam que o DDVP, associado ao MNU, promoveu o desenvolvimento de lesões e alterou aspectos morfológicos da próstata ventral de ratos, mas não alterou a expressão de marcadores moleculares de angiogênese.

2.6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Regulamento Técnico**: Relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos e preservantes de madeira. 2003. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B4882-2-0%5D.PDF>. Acesso em: 7 fev. 2020.

ANDERSEN, H. R. *et al.* Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 179, n. 1, p. 1-12, 2002.

ARUNKUMAR, A. *et al.* Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by diallyl disulfide, an organosulfur compound of garlic. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 375-379, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde/ Organização: Rio de Janeiro/São Paulo: Expressão Popular, 2015.

BIANCHI-FRIAS D. *et al.* The Aged Microenvironment Influences the Tumorigenic Potential of Malignant Prostate Epithelial Cells. **Mol Cancer Res.** V. 17, n. 1, p. 321-331, 2019.

BOSLAND, M. C. *et al.* Characterization of adenocarcinomas of the dorsolateral prostate induced in Wistar rats by N-methyl-N-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, and 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, following sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. **Cancer research**, v. 50, n. 3, p. 700-709, 1990.

BOSLAND, M. C.; PRINSEN, M. K. Induction of dorsolateral prostate adenocarcinomas and other accessory sex gland lesions in male Wistar rats by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene, and 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl after sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. **Cancer Research**, v. 50, n. 3, p. 691-699, 1990.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CHARLESWORTH, P. J. S.; HARRIS, A. L. Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies. **Nature Reviews Urology**, v. 3, n. 3, p. 157, 2006.

CUNHA, G. R. *et al.* Normal and abnormal development of the male urogenital tract: role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 6, p. 465-475, 1992.

DHANABAL, M. *et al.* Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 189-197, 1999a.

DIRICAN, E. K.; KALENDER, Y. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 821-830, 2012.

DKHISSI, F. *et al.* Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. **Human Gene Therapy**, v. 14, n. 10, p. 997-1008, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **DDVP**: Risk Assessment Issues for the FIFRA Science Advisory Panel, 1998.

ERGÜN, S. *et al.* Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. **Angiogenesis**, v. 4, n. 3, p. 193-206, 2001.

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

FEDORUK, M. N. **The modulation of androgen action in prostate cancer by exogenous chemicals, efflux transporter P-glycoprotein and Y-box binding protein-1**. 2005. Tese de Doutorado. University of British Columbia, Vancouver, 2005.

FELBOR, Ute *et al.* Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. **The EMBO journal**, v. 19, n. 6, p. 1187-1194, 2000.

FERRER, F. A. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: in situ and in vitro expression of VEGF by human prostate cancer cells. **The Journal of Urology**, v. 157, p. 2329–2333, 1997.

FERRER, F. A. *et al.* Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. **Urology**, v. 51, n. 1, p. 161-167, 1998.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 15-18, 2002.

GEORGE, D. J. *et al.* Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1932-1936, 2001.

GONÇALVES, B. F. *et al.* A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **The Prostate**, v. 73, n. 11, p. 1202-1213, 2013.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2005.

HROUDA, D.; NICOL, D.; GARDINER, R. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 347-355, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 7 out. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2020.

KIMBRO, K. S.; SIMONS, J. W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 13, n. 3, p. 739-749, 2006.

KREMER, C. *et al.* Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. **Cancer research**, v. 57, n. 17, p. 3852-3859, 1997.

KUO, C. H. *et al.* Immunomodulatory effects of environmental endocrinedisrupting chemicals. **Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 37-42, 2012.

LIN, S. Y. *et al.* Cytotoxicity, sister-chromatid exchange, chromosome aberration and transformation induced by 2, 2-dichlorovinyl-O, O-dimethyl phosphate. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 206, n. 4, p. 439-445, 1988.

MABJEESH, N. J.; AMIR, S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. **Histology and histopathology**, v. 22, p. 559-572, 2007.

MAIN, K. M. *et al.* Genital anomalies in boys and the environment. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 279-289, 2010.

MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Sciences's Stke**, v. 2001, n. 112, p. re21-re21, 2001.

MILLS, P. K.; YANG, R. Prostate cancer risk in California farm workers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, n. 3, p. 249-258, 2003.

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

ORAL, B. *et al.* Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 783-790, 2006.

O'REILLY, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 277-285, 1997.

PALLARES, J. *et al.* Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. **Histology and histopathology**, v. 21, p. 857-865, 2006.

PALMA, M. de; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457, 2017.

PATEL, S. *et al.* In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1409-1418, 2007.

PINHO, C. F. **Papel modulador do Raloxifeno durante a carcinogênese prostática em ratos**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2019.

SALEM, I. B. *et al.* Dichlorvos-induced toxicity in HCT116 cells: Involvement of oxidative stress and apoptosis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, p. 62-66, 2015.

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, 2004.

SHEN, B. *et al.* Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29979-29985, 1998.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 177-183, 2009.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 109, n. 3, p. 227-241, 2005.

TAVASSOLI, P. *et al.* Rapid, non-destructive, cell-based screening assays for agents that modulate growth, death, and androgen receptor activation in prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 67, n. 4, p. 416-426, 2007.

VANOVA, N. *et al.* Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 1058-1070, 2018.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 211-220, 1999.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v. 12, p. 131-55, 1978.

YAMANO, T. Dissociation of DDVP-induced DNA strand breaks from oxidative damage in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 108, n. 1-2, p. 49-56, 1996.

ZHONG, H.; SEMENZA, G. L.; SIMONS, J. W.; MARZO, A. M. de. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 2, p. 88–93, 2004.

3. ANEXO

3.1 ANEXO 1



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Influência do praguicida diclorvós sobre os marcadores moleculares de angiogênese na próstata de ratos**", registrada com o nº **741/2018 Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. SERGIO PEREIRA - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 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) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 23/08/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 01/09/2018 a 31/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico/F344
Nº de animais	40
Peso/Idade	250g/90 dias
Sexo	Macho
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP)

Profª Drª Sandra Lia do Amaral Cardoso

Vice-Coordenadora da CEUA no exercício da Coordenação

3.2 ANEXO 2

Protocolo imuno-histoquímica

1. Bloqueio da atividade da peroxidase endógena: foram adicionadas gotas suficientes de Hydrogen Peroxide Block (abcam®) para cobrir os cortes, que foram incubados por 30 minutos. Em seguida, lavou 2 vezes em TBS (Tris Buffer Solution – Tris 50mM NaCl 150mM Tween 0,01% pH 7,4) por 5 minutos com agitação.
2. Recuperação do antígeno: as lâminas foram imersas em solução tampão Citrato 10mM pH 6,0 e aquecidos em microondas de acordo com a proteína de interesse.
3. Bloqueio de reação inespecífica: as lâminas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente em Protein Block (abcam®) para bloquear a coloração de fundo não específico. Em seguida, foram lavadas uma vez em TBS por 5 minutos com agitação.
4. Incubação com anticorpo primário: as lâminas foram incubadas com anticorpo primário *overnight* à temperatura ambiente de acordo com a proteína de interesse.
5. As lâminas foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação e, depois, incubadas em Biotinylated Goat Anti-polyvalent (abcam®) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação.
6. As lâminas foram incubadas em Streptavidin Peroxidase (abcam®) durante 10 minutos à temperatura ambiente.
7. As lâminas foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação. Em seguida, foram incubadas em DAB Solution (abcam®) por 1 minuto. Foram lavadas 4 vezes em TBS por 5 minutos com agitação.
8. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina por 2 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos.
9. As lâminas foram desidratadas para colocação de lamínula.

Quadro 1. Solução tampão e diluição do anticorpo primário para HIF-1 α , VEGF, Flk-1 e endostatina.

Proteína	Tempo de microondas	Diluição anticorpo primário	Hospedeiro
HIF-1 α (MAB5382)	5 minutos	1:1000	Camundongo
VEGF (sc-152)	5 minutos	1:400	Coelho
Flk-1 (sc-6251)	6 minutos	1:400	Camundongo
Endostatina (ab64569)	6 minutos	1:250	Camundongo

3.3 ANEXO 3

Protocolo *Western Blotting*

Para as análises de Western Blotting, as amostras da próstata ventral foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (proporção de 30 mg de tecido/100ml de tampão de extração). Os homogeneizados obtidos foram centrifugados a 4°C 14000 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram solubilizados para quantificação de proteínas pelo micrométodo de Bradford.

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

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

Quadro 2. Diluição dos anticorpos primário e secundário para β-actina, HIF-1α, VEGF, Flk-1 e endostatina.

Proteína	Diluição anticorpo primário	Anticorpo secundário
β-actina (orb10033)	1:200	Anti-rabbit IgG-HRP 1:5000
HIF-1α (MAB5382)	1:500	Anti-mouse IgG-peroxidase 1:4000
VEGF (sc-152)	1:200	Anti-rabbit IgG-HRP 1:8000
Flk-1 (sc-6251)	1:500	Anti-mouse IgG-peroxidase 1:4000
Endostatina (ab64569)	1:500	Anti-mouse IgG-peroxidase 1:5000