



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Ação do desregulador endócrino bisfenol A e da dieta hiperlipídica sobre os lobos prostáticos do gerbilo

Camila Helena Facina

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Camila Helena Facina

Ação do desregulador endócrino bisfenol A e da dieta hiperlipídica
sobre os lobos prostáticos do gerbilo

São José do Rio Preto
2015

Camila Helena Facina

Ação do desregulador endócrino bisfenol A e da dieta hiperlipídica
sobre os lobos prostáticos do gerbilo

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto
2015

Facina, Camila Helena.

Ação do desregulador endócrino bisfenol A e da dieta hiperlipídica sobre os lobos prostáticos do gerbilo / Camila Helena Facina. -- São José do Rio Preto, 2015
128 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Próstata. 3. Gerbilos. 4. Desreguladores endócrinos. 5. Bisfenol A. 6 Nutrição animal. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 591.463.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Camila Helena Facina

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Alexandre Bruni-Cardoso
USP – São Paulo

Prof^a. Dr^a. Silvana Gisele Pegorin de Campos
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de fevereiro de 2015

AGRADECIMENTOS

Este espaço eu dedico àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado, pois nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos objetivos. A todos meu sincero agradecimento!

Agradeço...

Ao meu orientador **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga**, obrigada por ter me acolhido em seu laboratório, oferecendo-me a oportunidade de contribuir com suas linhas de pesquisa. Agradeço o incentivo e a confiança.

À **Dr^a Bianca Facchim Gonçalves**, pela co-orientação e empenho na elaboração desta dissertação. Obrigada pelo incentivo e pela colaboração no desenvolvimento dos meus objetivos.

À **Prof^a Dr^a Silvana Gisele Pegorin de Campos** e **Prof. Dr. Alexandre Bruni-Cardoso**, membros titulares e aos membros suplentes **Prof^a Dr^a Fernanda Cristina Alcantara dos Santos** e **Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino**, por aceitarem a indicação para formarem minha banca examinadora e, por toda a contribuição futura neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálise, por todas as experiências vividas, pelos bons momentos de descontração, por compartilharem os conhecimentos teórico-práticos específicos e, sobretudo, por toda amizade desprendida.

À **Cíntia Cristina Isicawa Puga**, por sempre estar presente quando precisei de algum esclarecimento de dúvidas tanto relacionado com as regras da pós-graduação quanto com os meus experimentos. Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar e obrigada pela amizade verdadeira.

À **Marina Guimarães Gobbo**, pela amizade sincera e companheirismo. Obrigada por todas as risadas que demos juntas e pelas lágrimas enxugadas. Com você tive a oportunidade de aprender que o importante não é o tempo de amizade, mas sim a intensidade. Te desejo tudo de melhor que a vida possa oferecer!

Agradeço aos meus **professores do curso de Graduação** que durante muito tempo me ensinaram e mostraram o quanto é bom estudar.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal** que contribuíram no aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e na minha formação profissional.

Ao técnico e amigo **Luiz Roberto Falleiros Jr** por toda a ajuda oferecida. Obrigada pelos seus conselhos, e principalmente por toda sua animação diária a qual deixa o ambiente de trabalho muito mais feliz.

À **CAPES** pelos primeiros meses de bolsa de estudo concedida.

À **FAPESP** pela bolsa de estudos concedida (Processo: 2013/01619-4).

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Em especial, agradeço...

À **Deus** por todas as oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares maravilhosos. Agradeço também por ter vivido momentos difíceis, que foram matérias-primas para o aprendizado.

Aos meus pais **Benedito S. Facina** e **Rosa Maria P. P. Facina** que me deram toda a estrutura para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Obrigada pela confiança, incentivo, apoio incondicional e pelo amor que me fortalece todos os dias! Felicidade é ter vocês ao meu lado.

Ao meu irmão **Leonardo V. Facina**, que apesar de todas as nossas discussões, está sempre ao meu lado. Tenho muito orgulho de você! Obrigada por me entender, pela amizade, companheirismo e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

A toda a **minha família**, por todo o amor e apoio desprendido e por compreender a minha ausência. Obrigada pela preocupação e por todas as orações feitas ao meu favor.

A minha amiga-irmã **Rose Mari R. S. Ramalho**, por ter compartilhado anos importantes da minha vida. Obrigada por todas as ligações e mensagens recebidas, as quais me fizeram sentir perto de você mesmo estando longe. Agradeço imensamente por me fazer sorrir nos momentos alegres e me confortar nos momentos difíceis.

Ao meu amigo e companheiro **Guilherme F. A. Scarabelo**, por ter vivenciado comigo os momentos finais e mais tensos da elaboração deste manuscrito. Obrigado por ter me oferecido todo o apoio e carinho que necessitava nos momentos difíceis. Obrigada por me fazer sorrir e tornar meus dias especiais!

***“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes”.***

Marthin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	21
3. ARTIGO 1.....	23
Ação do desregulador endócrino bisfenol a e da dieta hiperlipídica sobre os lobos prostáticos do gerbilo adulto.	
4. ARTIGO 2.....	88
Imunoexpressão dos receptores de andrógeno e estrógeno na próstata de gerbilos adultos após exposição prolongada ao bisfenol A e a dieta hiperlipídica.	
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

RESUMO

O câncer de próstata é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e cura. No entanto, a patologia molecular dessa doença é complexa, pois além de altamente relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno dependentes, é também influenciada por hormônios sexuais, fatores ambientais, dietas, respostas imunes e inflamatórias. Pesquisas recentes têm demonstrado que a exposição a desreguladores endócrinos, presentes no meio ambiente, pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na próstata. Estas substâncias tem o potencial de causar danos ao sistema endócrino, pois mimetizam hormônios esteroides podendo afetar seu metabolismo e agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo. Entre estes químicos ambientais destaca-se o bisfenol A (BPA). O BPA é um monômero liberado de polímeros plásticos amplamente utilizados na atualidade. Esta substância pode alterar a histofisiologia prostática, uma vez que mimetiza estrógenos e compete com os receptores para esses hormônios. Estudos atuais com roedores têm demonstrado que a exposição a baixas concentrações de BPA aumentam significativamente a incidência e a severidade de neoplasias prostáticas. Além disso, é relatado que o BPA é capaz de influenciar a regulação da transcrição de genes envolvidos com a obesidade podendo promover aumento do peso corporal e da adiposidade. Outro fator ambiental potencialmente associado com a carcinogênese é a dieta rica em lipídeos. O consumo de nutrientes com alta densidade calórica pode resultar em uma síndrome metabólica com sintomas associados com a resistência à insulina, dislipidemia, certo grau de obesidade e ainda contribuir para o crescimento de tumores prostáticos em roedores. Resultados preliminares do nosso grupo empregando o roedor gerbilo (*Meriones unguiculatus*) como modelo para estudos sobre alterações na glândula prostática indicam que a dieta hiperlipídica e o BPA isoladamente têm

o potencial de promover o aumento da incidência de neoplasias prostáticas. No entanto, os efeitos de sua associação sobre indivíduos adultos não foi verificado e, os resultados obtidos poderão auxiliar na compreensão do processo de carcinogênese nesse roedor. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram avaliar se a associação entre uma dieta hiperlipídica e o desregulador endócrino BPA potencializa o desenvolvimento de lesões prostáticas em animais adultos e investigar o possível envolvimento dos receptores de andrógeno e estrógeno na carcinogênese estimulada por bisfenol A e dieta hiperlipídica. Foram utilizados 24 gerbilos adultos (100 dias) submetidos às seguintes condições experimentais: **1) Controle (C):** animais que receberam ração controle; **2) Dieta Hiperlipídica (D):** animais que receberam dieta hiperlipídica, **3) Bisfenol A (BPA):** animais que receberam ração controle + BPA na concentração de 50µg/Kg/dia na água de beber, **4) Dieta Hiperlipídica + BPA (BPA+D):** animais submetidos à dieta hiperlipídica + BPA na concentração de 50µg/Kg/dia na água de beber. A eutanásia dos animais aconteceu 6 meses após o início do experimento. Os lobos Ventral e Dorsolateral prostáticos foram removidos, pesados e processados para microscopia de luz. As metodologias utilizadas envolveram análises quantitativas e estatísticas do consumo de ração, ingestão de BPA, peso corpóreo e prostático, dosagens hormonais, cálculo da incidência e multiplicidade de lesões prostáticas, bem como análises morfológicas por meio de técnicas citoquímicas (HE, Picrossírius e Reticulina de Gomori) e imunohistoquímicas (Receptores de Andrógeno (AR) e de Estrógeno (ER β), Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), α -Actina de Músculo Liso, Detecção de células do compartimento basal (p63). A análise histológica permitiu avaliar a incidência, multiplicidade, fenótipo e distribuição das lesões histopatológicas. Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram constatadas em ambos os lobos prostáticos. No entanto, os animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação entre esses compostos, apresentaram uma maior incidência e multiplicidade de lesões prostáticas. Quando comparado ao grupo controle, os grupos BPA, BPA+D e D

apresentaram maior número de Inflamações Subepiteliais, Inflamações Intraluminais e Inflamações Periductais. O compartimento estromal dos grupos tratados apresentou remodelação das fibras de colágeno, além de diversos pontos de desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a invasão estromal. Quando comparado ao grupo Controle, a atividade proliferativa das células secretoras prostáticas aumentou em ambos os lobos de todos os grupos experimentais. Ao se tratar das células basais, foi possível notar um aumento destas em ambos os lobos estudados e em todos os tratamentos, quando comparado ao grupo controle. A análise da expressão de AR na próstata do gerbilo mostrou que, há uma diferença significativa entre o grupo Controle e os grupos tratados. Foi possível notar que, ambos os lobos dos grupos tratados, apresentam uma frequência de células AR-positivas bastante semelhantes. A dieta, o bisfenol A e a associação de ambos aparentemente estimulou um aumento na frequência de células AR positivas mesmo em áreas livres de lesões. A frequência de células ER β -positivas é aparentemente maior na próstata de animais controle. Em alguns focos neoplásicos estimulados pela dieta, pelo bisfenol A ou pela associação de ambos, a presença de células ER β positivas foi baixa ou indetectável. Por outro lado, algumas poucas lesões foram observadas expressando ER β . Os níveis séricos de testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados com dieta hiperlipídica, bisfenol A e a associação de ambos, em relação ao grupo controle. No entanto, houve uma tendência de aumento estimulada pelos diferentes tratamentos. Os resultados observados indicam, portanto, que a administração de bisfenol A, da dieta hiperlipídica e da associação de ambos provocou diversas alterações morfofisiológicas na glândula, as quais podem ter contribuído para o estabelecimento de lesões, as quais comprometem diretamente a homeostasia prostática.

Palavras-chave: Bisfenol A. Desregulador Endócrino. Dieta Hiperlipídica. Gerbilo da Mongólia. Próstata.

ABSTRACT

*Prostate cancer is the main and the most common neoplastic disease that affects men and although it represents a common cause of morbidity and mortality, it is preventable and curable. However, the molecular pathology of this disease is complex, because besides being highly related to age, hereditary factors and androgen-dependent factors, it is also influenced by sex hormones, environmental factors, diet, immune and inflammatory responses. Recent research has shown that exposure to endocrine disruptors, presents in the environment, can cause permanent morphophysiological changes in the prostate. These substances have the potential to cause damage to the endocrine system, because they mimic steroid hormones and can affect their metabolism and act directly in the reproductive tract. Among these environmental chemicals is bisphenol A (BPA). BPA is a monomer released from plastic polymers widely used today. This substance can change prostatic histophysiology, since it mimics estrogens and compete with the receptors for these hormones. Recent studies with rodents have shown that exposure to low concentrations of BPA significantly increases the incidence and severity of prostatic cancer. Furthermore, it has been reported that BPA is able to influence the regulation of transcription of genes involved in obesity being able to promote body weight and adiposity increase. Another environmental factor potentially associated with carcinogenesis is the high-fat diet. The consumption of nutrients with a high caloric density can result in a metabolic syndrome with symptoms associated with insulin resistance, dyslipidemia, obesity and contribute to the growth of prostatic tumors in rodents. Preliminary results from our group using the gerbil rodent (*Meriones unguiculatus*) as a model for studies on changes in the prostate gland indicate that the high-fat diet and BPA have the potential to enhance the incidence of prostatic neoplasms. However, the effects of this association on adults animals has not been verified and the results may contribute? in understanding of the process of carcinogenesis in rodents. Thus,*

the objectives of this study were to evaluate if the combination of high-fat diet and the endocrine disrupter BPA enhances the development of prostatic lesions in adult animals and to investigate the possible involvement of androgen and estrogen receptors in carcinogenesis stimulated by bisphenol A and high-fat diet. 24 adult gerbils (100 days) were subject to the following experimental conditions: **1) Control (C):** animals receiving the control diet; **2) High-fat diet (D):** animals fed with high-fat diet, **3) Bisphenol A (BPA):** animals that received the control diet + BPA concentration of 50µg/Kg/day in drinking water, **4) High-fat diet + BPA (BPA+D):** animals subjected to the high-fat diet + BPA concentration of 50µg/Kg/day in drinking water. The animals were euthanatized 6 months after the beginning of the experiment. The ventral and dorsolateral prostate lobes were removed, weighed and processed for light microscopy. The methods involved quantitative and statistical analyzes of ratio and BPA intake, body and prostatic weight, serum hormonal measurements, incidence and multiplicity of prostatic lesions and morphological analysis by cytochemical (HE, Picrosirius and Reticulin of Gomori) and immunohistochemical (Androgen Receptor (AR) and Estrogen (ER β), Cell Proliferation Nuclear Antigen (PCNA), α -Smooth Muscle Actin, Detection of basal cell compartment (p63)) techniques. Histological analysis allowed to evaluate the incidence, multiplicity, and phenotype distribution of histopathological lesions. Premalignant and malignant lesions were found in both prostatic lobes. However, animals treated with high-fat diet, bisphenol A and the association between these compounds showed a higher incidence and multiplicity of prostatic lesions. When compared to the control group, the BPA, BPA + D and D groups presented more Subepithelial Inflammations, Intraluminal Inflammations and Periductal Inflammations. The stromal compartment of the treated groups showed remodeling of the collagen fibers, in addition to various disintegration points in the smooth muscle cells layer, promoting stromal invasion. When compared to the Control group, the proliferative activity of prostatic secretory cells was increased in both lobes of all groups. Regarding basal cells, it was possible to notice an increase in both lobes studied and by all treatments, when compared to the Control group. The

analysis of AR expression in prostate gerbil showed that there was a significant difference between the Control group and the treated groups. We observed that both lobes of the treated groups had a very similar frequency of AR-positive cells. High-fat diet, bisphenol A and the combination of both apparently stimulated an increase in the frequency of positive AR cells even in injury free areas. The ER β -positive cells frequency in the prostate was apparently greater in prostate of control animals. In some neoplastic foci occasioned by high-fat diet, bisphenol A or the combination of both, the presence of ER β positive cells was low or undetectable. Moreover, few lesions were observed expressing ER β . Serum testosterone levels were not significantly different between the groups treated with high-fat diet, bisphenol A and the combination of both, compared to the Control group. However, there was a trend in increasing testosterone levels, stimulated by these different treatments. The results indicated, therefore, that the bisphenol A, high-fat diet and a associated administration of both caused several morphological and physiological changes in the gland, which may have contributed to the establishment of lesions, which directly compromise the prostatic homeostasis.

Keywords: Bisphenol A. Endocrine Disruptor. Mongol Gerbil. High-fat diet. Prostate.

1. INTRODUÇÃO

Morfofisiologia da Próstata

O termo próstata tem sua origem na palavra grega „prohistani“, usada em 335 a.C. por Herophilus da Alexandria e que significa „estar em frente a“, se referindo a sua localização frontal em relação bexiga urinária (Kirby *et al.*, 1996). Por definição, é uma glândula acessória do sistema genital masculino que juntamente com a vesícula seminal contribui com a produção de componentes que irão compor o fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e pH adequado desta secreção (Untergasser *et al.*, 2005). O grande interesse em se compreender a biologia desta glândula deve-se tanto ao seu complexo processo de desenvolvimento, quanto à alta incidência de doenças prostáticas, como adenocarcinoma e hiperplasia prostática benigna (HPB) nos homens (Marker *et al.*, 2003). A patologia molecular desta doença é complexa, pois além de ser relacionada à idade, fatores hereditários e andrógeno-dependentes, é também influenciada por hormônios sexuais, fatores ambientais, dietas, respostas imunes e inflamatórias (Huynh *et al.*, 2001; Carruba, 2006; De Marzo *et al.*, 2007).

A morfogênese da próstata de roedores e de humanos ocorre de maneira análoga (Cunha *et al.*, 2004 a,b). Em humanos o desenvolvimento prostático inicia-se, aproximadamente, no primeiro trimestre e se completa logo em seguida ao nascimento, enquanto que em roedores o desenvolvimento inicia-se próximo ao décimo sétimo dia embrionário e o completo crescimento e maturação ocorre durante a puberdade (25° - 40° dia) (Prins & Korach, 2008). Este processo tem início a partir do seio urogenital, durante o período fetal, e é dependente de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos fetais (Cunha *et al.*, 1986; Thomson & Cunha, 1999; Thomson *et al.*, 2002). O crescimento e desenvolvimento da glândula se estendem até que a maturidade sexual seja atingida e a manutenção de sua homeostase no indivíduo adulto é garantida por hormônios esteroides como a testosterona (Cunha *et al.*, 1986; Marker *et al.*, 2003). Os efeitos androgênicos em células alvo resultam da interação do hormônio com receptores de andrógenos (AR) presentes nestas (Cunha *et al.*, 1986). A produção de andrógenos é regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Cunha *et al.*, 1986), com mais de

95% da testosterona produzida pelas células de Leydig dos testículos e menos de 5% pelas glândulas adrenais (Hsing *et al.*, 2002). Além do AR, outros receptores nucleares, como o ER α (receptor de estrógeno alfa) e o ER β (receptor de estrógeno beta), determinantes para o desenvolvimento da próstata, passam a ser expressos em locais e momentos específicos durante a organogênese prostática. Enquanto o ER α é expresso predominantemente no mesênquima, durante estágios iniciais do desenvolvimento, o ER β tem sua expressão localizada no epitélio durante as fases de diferenciação das células epiteliais prostáticas (Prins & Korach, 2008).

Em ratos e camundongos a próstata é composta por quatro lobos distintos: anterior (também chamado de glândula coaguladora), dorsal, lateral e ventral. Esses lobos compõem arranjos circunferenciais ao redor da bexiga e apresentam características particulares de ramificação de ductos e produção de secreções proteicas (Sugimura *et al.*, 1986). Em um mesmo lobo, os ductos prostáticos apresentam heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, resposta a andrógenos, síntese e secreção de proteínas (Banerjee *et al.*, 1998).

Em humanos, a próstata tem uma morfologia mais compacta, sem lobos distintos, sendo geralmente diferenciada em três zonas: central, de transição e periférica (McNeal, 1983). Em termos de homologia entre espécies, nota-se que o lobo ventral da próstata de rato corresponde à zona de transição da próstata humana e o lobo dorsal do rato à porção dorsal ou zona posterior da próstata humana.

A camada celular epitelial consiste de quatro tipos de células: basal, secretora, intermediária e neuroendócrina que são dependentes dos hormônios esteroides e reagem diferentemente a cada um deles (De Marzo *et al.*, 2007, Rumpold *et al.*, 2002). As células basais formam uma camada contínua entre o epitélio secretor e a membrana basal, o que não é observado em camundongos, nos quais as poucas células basais aparecem em camadas descontínuas ao redor dos ductos. As células neuroendócrinas podem ser notadas na camada epitelial, tanto da próstata em desenvolvimento quanto na adulta (Marker *et al.*, 2003). As células secretoras, as basais e as neuroendócrinas, que compõem a maior parte do epitélio prostático, além de diferirem quanto à regulação hormonal, são responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular que também compõem o fluido prostático (Bonkhoff *et al.*, 1998).

Entremeando as porções glandulares há um estroma conjuntivo ricamente vascularizado, com células musculares lisas dispostas concentricamente aos ácinos e

entremeadas às camadas de colágeno, bem como poucas fibras conjuntivas e elásticas (Carvalho & Line, 1996). As células musculares lisas exercem papel contráctil durante a ejaculação e juntamente com os fibroblastos são responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular. Entre os elementos estruturais que integram a matriz destacam-se as fibras de colágeno, reticulares e elásticas, as quais conferem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, servindo como substrato para a ancoragem e migração celular (Tuxhorn *et al.*, 2001; Vilamaior *et al.*, 2005).

Os tipos de populações celulares são similares entre as espécies, independentemente do aspecto macroscópico da glândula e, provavelmente, desempenham as mesmas funções fisiológicas, porém a distribuição relativa dessas populações varia (Imamov *et al.*, 2004). A similaridade de tipos de populações celulares referida acima favorece estudos referentes à homologia morfofuncional entre diferentes espécies (Price, 1963; Karr *et al.*, 1995).

A próstata do gerbilo

A utilização de gerbilos (*Meriones unguiculatus*), roedores murídeos da subfamília Gerbillinae, é cada vez maior na pesquisa científica das áreas da imunologia (Jeffers *et al.*, 1984; Nawa *et al.*, 1994), fisiologia (Nolan *et al.*, 1990), culturas de células (Moritomo *et al.*, 1991) e morfologia (Redecker, 1991; Aoki-Komori *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2000; Santos & Taboga, 2002; Corradi *et al.*, 2004; Rochel *et al.*, 2007; Fochi *et al.*, 2008; Scarano *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2010 a, b). Este roedor tem se revelado um bom modelo para o estudo da próstata apresentando respostas significativas quanto a tratamentos hormonais (Santos & Taboga, 2006; Scarano *et al.*, 2006; 2008), drogas contra hiperplasia prostática humana (Corradi *et al.*, 2004), carcinogênese química (Bosland & Prinsen, 1990; Zanetoni, 2007, Gonçalves *et al.*, 2010 a; Gonçalves *et al.*, 2013;) bem como, desenvolvimento de neoplasias espontâneas associadas ao envelhecimento (Pegorin de Campos *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Custódio *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2010).

De anatomia similar à do rato e camundongo, os gerbilos adultos de ambos os sexos variam entre 11,5 e 14,5cm de comprimento corporal, sendo que os machos nesta faixa etária pesam em torno de 70 gramas. Histologicamente, a próstata dos gerbilos adultos (100 dias) apresenta ácinos com epitélio prismático simples e altamente secretor. Entre as porções glandulares, há estroma conjuntivo vascularizado, com poucas fibras conjuntivas e elásticas, além de células musculares lisas bem compactadas, dispostas ao redor de cada ácino (Rochel *et al.*, 2007). Estas características teciduais e a disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares são também muito semelhantes às encontradas na próstata humana. Desta forma, as semelhanças morfofuncionais estabelecidas até o momento favorecem situações experimentais e correlações com o homem, devido a grande importância da próstata para a homeostase e funcionalidade de todo o aparelho reprodutor masculino. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia desta glândula.

Carcinogênese Prostática: Ação de químicos ambientais e da dieta hiperlipídica

O câncer de próstata é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e cura (Huynh *et al.*, 2001). Doenças que afetam a próstata humana como a prostatite, hiperplasia benigna e o câncer de próstata são as principais causas de mortes em homens nos países desenvolvidos. A patologia molecular desse problema é complexa, pois além de ser uma doença altamente relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno dependentes, é também influenciada por hormônios sexuais, fatores ambientais, dietas, respostas imunes e inflamatórias (Huynh *et al.*, 2001; Carruba, 2006; De Marzo *et al.*, 2007; Stacewicz-Sapuntzakis *et al.*, 2008).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a exposição a diversas substâncias químicas presentes no meio ambiente pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na próstata. Estas substâncias, denominadas desreguladores endócrinos, representam uma ampla variedade de componentes que são encontrados em quantidades significativas na água, ar, solo, alimentos e produtos industrializados em geral. Estes químicos mimetizam hormônios esteroides e tem o potencial de causar danos ao sistema endócrino, de forma a afetar diretamente o metabolismo de hormônios no organismo. Consequentemente, essas substâncias podem agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo, tanto de machos quanto de fêmeas, tendo em vista que competem com os esteroides endógenos pelos sítios de ligação dos seus receptores específicos (Biggsby *et al.*, 1999; Toppari, 2008).

Muitos destes desreguladores endócrinos pertencem à classe dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos produzidos pelo homem. Atualmente é conhecida uma infinidade de xenoestrógenos com ação de desregulador endócrino, como, por exemplo, o bisfenol A (BPA), muito utilizado na fabricação de plásticos policarbonatos, o etinilestradiol utilizado nas pílulas contraceptivas, as bifenilas policloradas (PCBs) e polibromadas (PBBs) utilizadas em diversos setores industriais, além de diversos compostos de pesticidas largamente utilizados na agricultura (Waalkes, 2000; Timms *et al.*, 2005; Prins *et al.*, 2008). Dentre os compostos citados acima, alguns se destacam pela sua ampla distribuição e pelos impactos que podem ter

sobre a saúde dos seres humanos e também sobre o meio ambiente de maneira geral, como é o caso do BPA.

O bisfenol A é uma das substâncias químicas de maior produção ao redor do mundo (Prins *et al.*, 2008), sendo cada vez mais estudada, principalmente pela sua ampla distribuição no ambiente e pelo seu potencial como desregulador endócrino. O BPA é um monômero, formado por dois anéis de fenol, muito utilizado na produção de embalagens plásticas, resinas epóxi e muitos outros produtos domésticos comuns, sendo um dos produtos químicos de maior volume de produção no mundo (Prins *et al.*, 2007). Como parte do polímero existente na grande maioria das embalagens plásticas, dos selantes dentais e da resina que reveste a maioria das latas de conserva (Timms *et al.*, 2005), o BPA pode ser facilmente liberado em solução em decorrência de repetidas lavagens, alterações de pH ou mesmo devido à um aumento de temperatura (Teilmann *et al.*, 2002; Hond & Schoeters, 2006; Seta *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2008).

O BPA é uma substância que tem potencial estrogênico, podendo mimetizar os estrógenos endógenos, se ligando aos receptores de estrógenos e ativando as vias de sinalização dos mesmos. A afinidade de ligação do BPA ao ER α e ER β é cerca de 10.000 vezes menor do que a dos estrógenos endógenos. Contudo, ele é um completo agonista destes receptores estrogênicos (Prins *et al.*, 2008). Atualmente, o BPA tem sido encontrado no soro e na urina de 95% da população mundial, em níveis que atingem de 0,2 a 20 ng/mL. De acordo com a Agência Americana de Proteção Ambiental a dose considerada segura para ingestão diária de BPA é de 50ug/kg/dia (Alonso- Magdalena *et al.*, 2011), entretanto, estudos tem mostrado efeitos adversos desta substância em concentrações inferiores, quando administrada no período fetal ou início do período pós natal, sobre o trato reprodutivo de roedores (Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013). Ho (2006) e Prins e colaboradores (2011) reportaram alterações histopatológicas como Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) em animais adultos tratados com BPA (10ug/kg/dia) durante o período neonatal. Chitra *et al.*, (2003) mostrou que a administração de baixas doses de BPA (0.2- 20 μ g/Kg) para ratos adultos elevou o peso da próstata ventral. Adicionalmente, a exposição fetal a baixas concentrações de BPA (20 μ g/Kg) induziu a expressão da citoqueratina 10, uma proteína relacionada à metaplasia escamosa no epitélio prostático (Ogura *et al.*, 2007). Assim, constata-se que a maioria dos estudos tem demonstrado que a administração de baixas doses de BPA durante o início da vida, quando os tecidos são notadamente sensíveis à ação dos desreguladores endócrinos, afeta significativamente

vários aspectos do desenvolvimento prostático (Castro *et al.*, 2013). No entanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos da exposição prolongada ao BPA durante a vida adulta sobre a histofisiologia próstática.

Outro fator ambiental potencialmente associado com a progressão tumoral é a dieta rica em lipídeos. Vários estudos epidemiológicos têm relacionado este fator às altas taxas de mortalidade por cânceres de mama, cólon, pâncreas e próstata em humanos (Fleshner *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 1994). Há um consenso entre estudos correlacionando dietas ricas em gorduras e a patogênese prostática, os quais asseguram que o consumo de ácidos graxos saturados está relacionado com o desenvolvimento do câncer prostático e que ácidos graxos poliinsaturados e gorduras vegetais apresentam uma correlação inversa (Fleshner *et al.*, 2004; Carrol & Khor, 1975; Kolonel *et al.*, 1999). Além disso, não só o consumo excessivo de gordura, mas também, e talvez mais importante, o tipo de gordura ingerida exerce influência direta sobre o risco de câncer de próstata (Escobar *et al.*, 2009). No entanto, identificar os ácidos graxos específicos que exercem um papel potencialmente causal na progressão do câncer prostático consiste em uma questão que requer maior investigação.

A ingestão calórica excessiva é outro fator que se relaciona com o crescimento de tumores prostáticos em roedores (Mukherjee *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1994). Camundongos imunodeficientes, carregando células LNCap de carcinoma prostático humano, que consumiram dieta na qual 40% da energia era proveniente de lipídeos, apresentaram maior taxa de crescimento tumoral e altos níveis de antígeno prostático específico (PSA) em relação a aqueles que receberam dieta na qual 20% da energia provinha de lipídeos (Wang *et al.*, 1995).

Por muitos anos tem-se especulado os mecanismos que determinam a relação entre o consumo de gordura e o risco de câncer de próstata e tem sido determinado que alguns fatores como os níveis hormonais e o estresse oxidativo são afetados pelo tipo de dieta. Consideráveis evidências têm apontado que alterações nos níveis androgênicos, estimuladas pelo consumo de dietas ricas em gordura, podem elevar o risco de câncer prostático, uma vez que esta doença sofre forte influência hormonal (Fleshner *et al.*, 2004). Níveis hormonais de ratos ACI/Seg que consumiram 5 ou 20% de óleo de milho, correspondendo respectivamente à dieta com baixo e alto teor lipídico, durante longos períodos, indicaram que a testosterona aumentou significativamente e pode ter favorecido o desenvolvimento de neoplasias (Kondo *et al.*, 1994).

O consumo de nutrientes com alta densidade calórica pode resultar em uma síndrome metabólica com sintomas associados com a resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, e certo grau de obesidade. Por conseguinte, é pensado que esta síndrome metabólica seja um dos principais contribuintes para o desenvolvimento da diabetes, complicações cardiovasculares, e uma variedade de desordens urológicas, incluindo a incontinência urinária, disfunção erétil, hiperplasia benigna da próstata, e câncer prostático (Shankar *et al.*, 2012).

As causas mais comuns da obesidade têm sido geralmente atribuídas ao alto teor calórico, dietas ricas em gorduras e a falta de exercício combinada com uma predisposição genética para a doença. No entanto, o aumento alarmante da obesidade não pode ser apenas explicado por esses fatores; um componente ambiental deve estar envolvido (Newbold, 2011; Nadal, 2013). Tem sido sugerido que a exposição à desreguladores endócrinos durante fases críticas da adipogênese pode contribuir para a epidemia da obesidade. O termo *obesogens* foi cunhado para designar os químicos ambientais que estimulam o acúmulo de gordura, referindo-se a ideia de que eles regulam, inadequadamente, o metabolismo lipídico e a adipogênese para promover a obesidade (Newbold, 2011).

Recentemente, têm sido demonstrado que o BPA, é capaz de influenciar a regulação da transcrição de genes envolvidos com a obesidade (Nadal, 2013). Além disso, esses estudos mostraram que a exposição ao BPA pode promover aumento do peso corporal e a adiposidade (Newbold, 2011). Em um estudo epidemiológico, Trasande e colaboradores (2012) encontraram uma associação entre concentrações urinárias do desregulador endócrino BPA e o aumento de massa corporal em crianças e adolescentes com idade entre 6-19 anos. Surpreendentemente, o de ganho de peso não ocorre apenas em seres humanos, mas também em outros mamíferos, incluindo os primatas e roedores de laboratório, cães e gatos domésticos e os roedores selvagens (Klimentidis *et al.*, 2011). Pesquisas atuais, utilizando doses ambientais de BPA, relatam a inibição da adiponectina e o estímulo para a liberação de adipocinas inflamatórias, tais como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a partir de tecido adiposo humano, sugerindo que o BPA pode estar envolvido na obesidade e relacionado com a síndrome metabólica (Hugo *et al.*, 2008; Ben-Jonathan *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Avaliar por métodos histopatológicos qualitativos e quantitativos, se a exposição prolongada à dieta hiperlipídica e ao desregulador endócrino bisfenol A promove o desenvolvimento de lesões prostáticas em animais adultos. Bem como, se associação entre uma dieta hiperlipídica e o bisfenol A potencializa o desenvolvimento dessas lesões.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar o possível envolvimento dos receptores de andrógeno e estrógeno na carcinogênese estimulada por bisfenol A e dieta hiperlipídica;

Esta dissertação foi escrita na forma de 2 artigos científicos, os quais serão submetidos a revistas internacionais relacionadas ao tema.

Artigo 1: AÇÃO DO DESREGULADOR ENDÓCRINO BISFENOL A E DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE OS LOBOS PROSTÁTICOS DO GERBILO ADULTO.

Artigo 2: IMUNOEXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO NA PRÓSTATA DE GERBILOS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO BISFENOL A E A DIETA HIPERLIPÍDICA.

3. Artigo 1: AÇÃO DO DESREGULADOR ENDÓCRINO BISFENOL A E DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE OS LOBOS PROSTÁTICOS DO GERBILO ADULTO.

Camila Helena Facina¹, Bianca Facchim Gonçalves², Sebastião Roberto Taboga³.

*1 Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.*

2 Instituto de Biociências IBB/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Correspondência: Sebastião Roberto Taboga (taboga@ibilce.unesp.br) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP. Rua Cristovão Colombo 2265 – Jardim Nazareth. São José do Rio Preto – SP. CEP: 15054-000. Brasil - (17) 3221-2386.

RESUMO

Pesquisas recentes têm demonstrado que a exposição a diversas substâncias químicas presentes no meio ambiente, os chamados desreguladores endócrinos, pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na próstata. Muitos destes desreguladores endócrinos são estrógenos sintéticos produzidos pelo homem, como o Bisfenol A. Outro fator ambiental associado com alterações prostáticas é a dieta rica em lipídeos. O consumo de nutrientes com alta densidade calórica pode resultar em síndrome metabólica com sintomas associados com a resistência à insulina, dislipidemia, e certo grau de obesidade. Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar se a exposição prolongada à dieta hiperlipídica e ao desregulador endócrino bisfenol A promove o desenvolvimento de lesões prostáticas em animais adultos. Bem como, se associação entre uma dieta hiperlipídica e o bisfenol A potencializa o desenvolvimento dessas lesões. Foram utilizados 24 gerbilos adultos submetidos às seguintes condições experimentais: **1) Controle (C):** animais que receberam ração controle; **2) Dieta Hiperlipídica (D):** animais que receberam dieta hiperlipídica, **3) Bisfenol A (BPA):** animais que receberam ração controle + BPA na concentração de 50µg/Kg/dia na água de beber, **4) Dieta Hiperlipídica + BPA (BPA+D):** animais submetidos à dieta hiperlipídica + BPA na concentração de 50µg/Kg/dia na água de beber. Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram constatadas em ambos os lobos prostáticos. No entanto, os animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação entre esses compostos, apresentaram uma maior incidência e multiplicidade de lesões prostáticas. Quando comparado ao grupo controle, os grupos BPA, BPA+D e D apresentaram maior número de focos inflamatórios. O compartimento estromal dos grupos tratados apresentou remodelação das fibras de colágeno, além de diversos pontos de desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a invasão estromal. Quando comparado ao grupo Controle, a atividade proliferativa das células secretoras prostáticas aumentou em ambos os lobos de todos os grupos experimentais. Ao se tratar das células basais, foi possível notar um aumento destas em ambos os lobos estudados e em todos os tratamentos. Os resultados observados indicam, portanto, que a administração de bisfenol A, da dieta hiperlipídica e da associação de ambos provocou diversas alterações morfofisiológicas na glândula, as quais podem ter contribuído para o estabelecimento de lesões, as quais comprometem diretamente a homeostasia prostática.

PALAVRA-CHAVE: Bisfenol A. Dieta Hiperlipídica. Gerbilo da Mongólia. Próstata.

INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino que juntamente com a vesícula seminal contribui com a produção de componentes para o fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e pH adequado desta secreção (Untergasser *et al.*, 2005). Pesquisas recentes têm demonstrado que a exposição a diversas substâncias químicas presentes no meio ambiente, os chamados desreguladores endócrinos, pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na próstata (Bigsby *et al.*, 1999; Toppari, 2008). Muitos destes desreguladores endócrinos pertencem à classe dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos produzidos pelo homem (Timms *et al.*, 2005; Prins *et al.*, 2008). Atualmente é conhecida uma infinidade de xenoestrógenos com ação de desreguladores endócrino, como, por exemplo, o bisfenol-A (BPA). O BPA é um monômero, formado por dois anéis de fenol, muito utilizado na produção de embalagens plásticas, resinas epóxi e muitos outros produtos domésticos comuns, sendo um dos produtos químicos de maior volume de produção no mundo (Prins *et al.*, 2007). Como parte do polímero existente na grande maioria das embalagens plásticas, dos selantes dentais e da resina que reveste a maioria das latas de conserva (Timms *et al.*, 2005), o BPA pode ser facilmente liberado em solução em decorrência de repetidas lavagens, alterações de pH ou mesmo devido à um aumento de temperatura (Teilmann *et al.*, 2002; Hond & Schoeters, 2006; Seta *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2008). O BPA é uma substância que tem potencial estrogênico, podendo mimetizar os estrógenos endógenos, se ligando aos receptores de estrógenos e ativando as vias de sinalização dos mesmos (Prins *et al.*, 2008)..

Outro fator ambiental potencialmente associado com alterações prostáticas é a dieta rica em lipídeos (Ribeiro, *et al.*, 2012 a,b; Chang, *et al.*, 2014). Há um consenso entre estudos correlacionando dietas ricas em gorduras e a patogênese prostática, os quais asseguram que o consumo de ácidos graxos saturados está relacionado com o desenvolvimento do câncer prostático (Fleshner *et al.*, 2004). O consumo de nutrientes com alta densidade calórica pode resultar em síndrome metabólica com sintomas associados com a resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, e certo grau de obesidade. Por conseguinte, é pensado que esta síndrome metabólica seja um dos principais contribuintes para o desenvolvimento do diabetes, complicações

cardiovasculares, e uma variedade de desordens urológicas, incluindo a incontinência urinária, disfunção erétil, hiperplasia benigna da próstata, e câncer prostático (Shankar *et al.*, 2012). As causas mais comuns da obesidade têm sido geralmente atribuídas ao alto teor calórico, dietas ricas em gorduras e a falta de exercício combinada com uma predisposição genética para a doença. No entanto, o aumento alarmante da obesidade não pode ser apenas explicado por esses fatores; um componente ambiental deve estar envolvido (Nadal, 2013).

A obesidade tornou-se um grave problema de saúde pública devido a sua crescente incidência global e seu efeito negativo sobre múltiplos sistemas e órgãos (Chen *et al.*, 2009). Tem sido amplamente comprovado o risco aumentado de vários tipos de câncer em indivíduos obesos. A relação entre o consumo de dietas ricas em gordura saturada e o aumento do risco de câncer prostático é bem estabelecida, no entanto, os mecanismos que levam ao estabelecimento desta doença não foram completamente compreendidos. Assim como a ingestão de dietas com alto conteúdo de gordura saturada tem se tornado comum entre a maioria da população, o consumo de alimentos acondicionados em embalagens plásticas é uma prática comum na vida contemporânea. O uso de embalagens plásticas para o aquecimento, congelamento ou acondicionamento de alimentos leva a liberação de monômeros de BPA expondo os indivíduos a quantidades crescentes deste químico ambiental. A ampla exposição dos seres humanos ao BPA e suas potenciais consequências clínicas, sobretudo sobre a glândula prostática, tem estimulado a pesquisa na área (Castro *et al.*, 2013). Os objetivos do presente estudo foram avaliar por métodos histopatológicos qualitativos e quantitativos, se a exposição prolongada à dieta hiperlipídica e ao desregulador endócrino bisfenol A promove o desenvolvimento de lesões prostáticas em animais adultos. Bem como, se associação entre uma dieta hiperlipídica e o bisfenol A potencializa o desenvolvimento dessas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados gerbilos machos adultos (*Meriones unguiculatus*) com 100 dias de idade mantidos no biotério do grupo de pesquisa em *Biologia da Reprodução* do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto (SP). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, com regime alimentar específico (descrito abaixo e resumido na Tabela I). O experimento foi conduzido de acordo com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os procedimentos envolvidos foram apreciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP (Prot. N°. 079/2013).

Delineamento Experimental

Foram utilizados 24 animais (n= 6 por grupo), divididos de maneira aleatória em 4 grupos: Controle (C), Dieta Hiperlipídica (D), Bisfenol A (BPA) e Dieta Hiperlipídica + Bisfenol A (D+BPA). Animais do grupo D e D+BPA foram submetidos a uma dieta hiperlipídica e hipercalórica. Esses animais receberam ração com elevado teor de lipídios e calorias, contendo 20% de lipídeos saturados, padronizada pelo Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP e fabricada pela Agrocere (Campinas, SP, Brasil). Aos grupos C e BPA foi oferecida a ração controle desenvolvida pela mesma empresa. A composição das rações controle e hiperlipídica encontram-se na Tabela I. Foram utilizados quatro tipos de ração hiperlipídica (RC Focus 2413, 2414, 2415, 2416, Agrocere) que diferem apenas no sabor e que foram substituídas ao longo da semana evitando que houvesse redução do consumo da ração devido à habituação dos animais ao sabor das mesmas. Adicionalmente os grupos BPA e D+BPA receberam água *ad libitum* contendo BPA na concentração de 50µg/kg peso corpóreo/dia e os grupos C e D receberam água filtrada *ad libitum*. A concentração de 50µg/kg/dia foi baseada em trabalhos que reportam essa

como a dose considerada segura para ingestão diária de BPA por seres humanos (vom Saal & Hughes, 2005; Alonso- Magdalena *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013). Todos os animais foram pesados no início e ao final do experimento para o monitoramento do ganho de peso. Adicionalmente, foi avaliado o consumo semanal médio de ração por animal para todos os grupos para determinação da ingestão calórica e a ingestão de BPA para os grupos BPA e D+BPA. A eutanásia dos animais aconteceu 6 meses após o início do experimento. Os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem de anestésico.

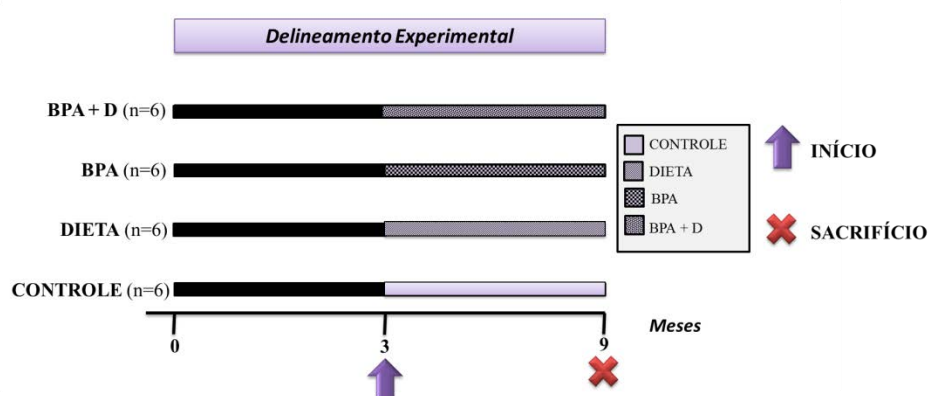


Figura 1: Delineamento Experimental do estudo

Metodologia

Análise Morfológica

Os lobos Ventral e Dorsolateral prostáticos foram removidos e pesados. Posteriormente, os lobos do complexo prostático foram fixados por imersão em Paraformaldeído tamponado (pH 7,2), desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast. Os cortes de 4-5 μ m obtidos em micrótomo rotativo automático (Leica[®]) foram corados pelos seguintes métodos histoquímicos:

- 1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE)** – Para estudos morfológicos gerais da próstata e diagnósticos histopatológicos, classificação dos tipos de lesões (pré-malignas e malignas);

2. **Picrossírius-Hematoxilina** – Para estudo das fibras de colágeno no estroma prostático;
3. **Impregnação pela prata para reticulina** – Para estudo das fibras reticulares do estroma prostático (Behmer *et al.*, 1976).

Classificação das Lesões histopatológicas

Foram obtidos cortes seriados dos lobos Ventral e Dorsolateral da próstata do gerbilo e as lesões histopatológicas detectadas nos mesmos foram classificadas de acordo com o sistema de Classificação Bar Harbor para próstata de camundongos (Shappell *et al.*, 2004). Ao longo da série de secções histológicas obtidas foram escolhidos cerca de 25 cortes do lobo Dorsolateral e 25 cortes do lobo Ventral de cada animal (n=6/grupo), os quais foram corados por HE e utilizados para a classificação e determinação da multiplicidade e incidência de lesões prostáticas. Foram quantificados os focos de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) (presença de hiperplasia e de atipia nuclear (núcleos aumentados, diminuídos ou alongados, hipercromasia, nucléolo proeminente)), Inflamações Intraluminais (focos de infiltrados inflamatórios no interior luminal), Inflamações Periductais (focos de infiltrados inflamatórios no estroma) e Inflamações Subepiteliais (focos de infiltrados inflamatórios em contato com o epitélio glandular) e Carcinoma Microinvasivo (Ruptura da camada de células musculares lisas e migração das células epiteliais para o estroma prostático).

Análise Imunohistoquímica

Os seguintes testes imunohistoquímicos foram aplicados nas próstatas dos gerbilos:

1. Verificação dos índices de proliferação celular no epitélio componente de lesões:

- Antígeno nuclear de proliferação celular: Anti-PCNA (F-2) (sc56, Mouse Monoclonal), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

2. Caracterização do painel de lesões histopatológicas identificadas, buscando determinar o grau de severidade estimulado por cada tratamento:

- α -actina de músculo liso: Anti- α -actina (Mouse Monoclonal, Clone IA4), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Detecção de células do compartimento basal: Anti-p63 (Mouse Monoclonal, Clone 4A4), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

Procedimentos gerais para as avaliações imunohistoquímicas: Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6.0 a 97°C (15-30 min.). O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com H₂O₂ (3% em metanol) durante 20-30 minutos. Anticorpos primários para os componentes acima mencionados foram utilizados em diluições variadas (entre 1:20, 1:50 e 1:200) por 60-120 minutos a 37° ou overnight a 4°C. Após serem lavados em PBS ou TBS e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase, os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB, Sigma). A contracoloração dos cortes foi feita hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

Análises Quantitativas

1. Análise biométrica

Os animais foram pesados no início e ao final do período experimental para o monitoramento do ganho de peso. Após a remoção do complexo prostático os lobos Ventral e Dorsolateral foram separados e pesados para determinação do peso absoluto e do peso relativo de cada lobo. O peso relativo (PR) foi determinado pela razão entre o peso do lobo prostático e o peso do animal. Em seguida foi removida e pesada a gordura corporal (retroperitoneal, epididimal, visceral e prostática). Foi ainda determinado o consumo semanal médio de ração por animal para avaliação da ingestão calórica.

2. Multiplicidade e Incidência de lesões prostáticas

A multiplicidade de lesões corresponde ao número médio de focos alterados presentes nos lobos prostáticos de cada grupo animal. Para sua determinação foi estimado o número total de focos de cada tipo de lesão em cada corte histológico da série avaliada e posteriormente foi calculada sua média e desvio padrão. Adicionalmente, foi quantificada a incidência de lesões prostáticas (número de animais acometidos por uma das classes de lesão – expresso em porcentagem) de cada lobo e nos diferentes grupos. Para tanto, foi considerada apenas a lesão de caráter mais avançado que ocorrer em cada animal, ou seja, lesões pré-malignas (Neoplasia Intraepitelial Prostática - PIN) ou malignas (Carcinoma Microinvasivo).

3. Contagem de núcleos com marcações positivas para PCNA

Um total de 40 campos foram obtidos, em aumento de 40x, por grupo (n= 6 animais/grupo), por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. O índice de proliferação por campo foi determinado pelo número de células marcadas em relação ao número total de células.

4. Contagem de núcleos com marcações positivas para p63

Um total de 40 campos foram obtidos, em aumento de 40x, por grupo (n= 6 animais/grupo), por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. A frequência de células p63 positivas por campo foi determinada pelo número de células marcadas em relação ao número total de células.

5. Estereologia

Análises estereológicas foram realizadas para se obter o volume absoluto de componentes epiteliais e estromais das diferentes lesões prostáticas encontradas nos 4 grupos avaliados. Foram capturadas imagens de 30 campos de cada grupo (5 campos por animal, n=6) a partir de lâminas coradas pela técnica HE, por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M168 proposto por Weibel (1978) e aplicado à próstata por Huttunen *et al.* (1981). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência absoluta das porções glandulares e estromais prostáticas, bem como, de cada componente tecidual individual (epitélio, lúmen, células musculares lisas periacinares, colágeno I e colágeno III, estroma não-muscular).

Análise Estatística

A análise exploratória dos dados coletados foi feita em planilhas e gráficos do *software* Excel 2010. Os testes estatísticos utilizados para averiguação da significância foram o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo método de Dunn (*post hoc*). para dados não paramétricos e o teste ANOVA para dados paramétricos seguido de Tukey (*post hoc*), por meio do *software* GraphPad Prism 5.00, (significância com valor de $p < 0.05$).

RESULTADOS

Dados Biométricos

A análise dos dados provenientes de animais submetidos a diferentes tratamentos durante o período de 6 meses mostrou que, a ingestão calórica foi superior nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 2). O grupo Controle e o grupo BPA permaneceram ingerindo uma quantidade menor de calorias. Consequentemente, o ganho de peso foi superior no grupo Dieta e BPA+D (Figura 3). Adicionalmente, verificou-se uma maior deposição de gordura corporal nos animais que receberam a dieta hiperlipídica (Figura 4 e 5). Os animais que receberam bisfenol A tiveram um aumento de peso, mas este não foi significativo em relação ao grupo Controle. Foi possível observar uma maior deposição de gordura corporal no grupo BPA quando comparado ao grupo Controle (Figura 4).

Ao se tratar da medida de cintura foi possível notar um aumento significativo na cintura dos animais que compõe o grupo D e BPA+D, quando comparados ao grupo Controle. Apesar de não apresentar um aumento estatisticamente significante, houve uma tendência de aumento na cintura dos animais do grupo BPA em relação ao grupo Controle (Figura 6).

O lobo Dorsolateral e o Ventral permaneceram com peso relativo similar, resultando em diferenças não significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 7A, B). Por outro lado, o Complexo Prostático apresentou peso relativo diferente entre os grupos analisados, resultando em diferenças significativas entre os animais (Figura 7C). Os grupos tratados com bisfenol A apresentaram um maior peso relativo do complexo prostático em relação ao grupo Controle (Figura 7C).

O consumo de bisfenol A na água de beber foi semelhante entre os grupos BPA e BPA+D, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos que ingeriram este composto (Figura 8).

Análise Morfológica

Por meio da análise morfológica foi possível notar que o lobo Ventral dos animais que compõe o grupo controle é formado por um conjunto de alvéolos e ductos envoltos por um estroma fibromuscular. O epitélio é colunar simples, com células

secretoras e basais, e apresentam lúmens amplos que armazenam o fluido prostático. O estroma é composto por células musculares e fibroblastos, e por fibras colágenas e elásticas (Figura 9A, B). O lobo Dorsolateral dos animais controle possui composição semelhante. No entanto, o epitélio acinar é composto de células com aspecto cuboide (Figura 10A, B). A análise histológica permitiu avaliar a incidência, multiplicidade, fenótipo e distribuição das lesões histopatológicas que acometeram o tecido prostático após 6 meses de tratamento. Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram constatadas em ambos os lobos prostáticos (Figura 9 e 10). No entanto, os animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação entre esses compostos, apresentaram uma maior incidência e multiplicidade de lesões prostáticas (Figuras 17 e 18). Quando comparado ao grupo controle, os grupos BPA, BPA+D e D apresentaram maior número de Inflamações Subepiteliais, Inflamações Intraluminais e Inflamações Periductais, além de lesões pré-malignas (Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN)) e malignas (Carcinomas Microinvasivos) (Figuras 9 e 10). Nestes grupos foi possível notar aumento do volume epitelial seguido de redução luminal. As células apresentaram diversas atipias, tais como aumento da área nuclear e nucléolo bastante evidente.

O compartimento estromal dos grupos tratados apresentou remodelação das fibras de colágeno (Figura 11), além de diversos pontos de desestruturação da camada de células musculares lisas (Figura 12), favorecendo a invasão estromal.

Quando comparado ao grupo Controle, a atividade proliferativa das células secretoras prostáticas aumentou em ambos os lobos de todos os grupos experimentais (Figura 13 e 14). No lobo Dorsolateral o maior índice proliferativo foi observado no grupo BPA+D (Figura 14A). Por outro lado, o lobo Ventral do Grupo BPA, apresentou o maior índice proliferativo (Figura 14B). Os dados quantitativos confirmam o caráter bastante proliferativo das lesões determinadas pela análise histopatológica.

Ao se tratar das células basais, foi possível notar um aumento destas em ambos os lobos estudados e em todos os tratamentos, quando comparado ao grupo controle (Figura 16). As células basais, no grupo controle, formam uma camada contínua entre o epitélio secretor e a membrana basal (Figura 15). Essa disposição é perdida nos demais grupos experimentais e as células basais aparecem em camadas descontínuas ao redor dos ductos ou dispersas pelo epitélio secretor (Figura 15).

Análise Quantitativa

A análise da incidência de lesões prostáticas de animais submetidos a 6 meses de tratamento mostrou que, o lobo Dorsolateral do grupo Intacto possui uma maior predisposição para o desenvolvimento de lesões neoplásicas (Figura 17A). O lobo Dorsolateral do grupo Dieta apresentou apenas lesões de caráter pré-maligno (Figura 17A). Já nos grupos BPA e BPA+D foi constatado o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas neste mesmo lobo (Figura 17A).

No lobo Ventral do grupo D, BPA e BPA+D foi possível verificar o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas (Figura 17B).

A multiplicidade de lesões evidenciou um aumento significativo no número de lesões pré-malignas (Figura 18A) no Lobo Dorsolateral do grupo BPA+D, quando comparado com o grupo controle. Apesar dos grupos D e BPA não terem apresentado diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle, estes grupos também apresentaram um incremento no número desta classe de lesões. No lobo Ventral foi constatado um aumento significativo nas lesões pré-malignas no grupo D e BPA. No grupo BPA+D, apesar das diversas alterações morfológicas encontradas, a multiplicidade de lesões foi menor quando comparada à administração da dieta ou do bisfenol A isoladamente (Figura 18A). Ao se tratar das lesões malignas (Figura 18B), estas tiveram um incremento no lobo Dorsolateral dos grupos BPA e BPA+D. Por outro lado, no Lobo Ventral foram constatadas lesões malignas em todos os grupos tratados. Apesar de ambos os lobos prostáticos desenvolverem lesões, o lobo Ventral foi o mais afetado pelo consumo da dieta isoladamente. No grupo Bisfenol A, as lesões pré-malignas acometeram ambos os lobos de forma semelhante. No entanto, ao se tratar de lesões malignas lobo Ventral apresentou um maior número deste tipo de lesão. Quando associamos o desregulador endócrino com a dieta rica em lipídios, foi possível notar que o Lobo Dorsolateral foi o mais afetado.

Com relação às desordens inflamatórias, observou-se uma correlação positiva entre estas e as lesões histopatológicas na próstata do gerbilo. Dentre as desordens inflamatórias as mais comuns foram Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Intraluminal (IIL) e Inflamação Subepitelial (ISE).

De acordo com a multiplicidade de inflamações prostáticas (Figura 19 e 20), foi possível notar que os grupos experimentais foram mais acometidos por esses três tipos de inflamações quando comparado ao grupo Controle.

Análise estereológica

A análise estereológica mostrou diferenças nas proporções assumidas pelos diferentes compartimentos glandulares (Epitélio, Lúmen, Colágeno I, Colágeno III, Músculo Liso e Estroma) nos lobos prostáticos do gerbilo (Figura 21 e 22). Em ambos os lobos e nos diferentes tratamentos, houve um aumento no volume ocupado pelo epitélio acompanhado de uma redução do volume luminal em relação ao controle. O volume ocupado pelo Epitélio e pelo Lúmen, não variou muito entre os lobos do grupo Controle. Nos dois lobos estudados, ao se tratar dos elementos estromais Colágeno I e Músculo Liso, foi observado um aumento do volume ocupado por eles, no grupo de animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação de ambos. Por outro lado, o volume ocupado pelo estroma não muscular diminuiu quando comparado ao grupo Controle. O Colágeno III sofreu um incremento nos grupos D e BPA em relação ao controle em ambos os lobos. No entanto houve uma diminuição dessas fibras em ambos os lobos do grupo BPA+D (Figura 21 e 22). Estes elementos estromais foram observados dispostos paralelamente à membrana basal circundando porções glandulares íntegras (Figura 11A, B e Figura 23A, B) e, em sítios neoplásicos, sofreram reestruturação (Figura 11C – K e 23C – H).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a influência da dieta hiperlipídica, do desregulador endócrino bisfenol A e da associação entre ambos sobre os lobos prostáticos do gerbilo, após seis meses de tratamento, sobretudo no que diz respeito ao estabelecimento e desenvolvimento de lesões histopatológicas nesta glândula.

Diversos estudos têm apontado a dieta rica em lipídeos como um fator ambiental potencialmente associado com a progressão tumoral. Tem sido investigada uma possível associação entre ácidos graxos específicos e o risco do câncer prostático, contudo, os resultados não são consistentes (Fleshner *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 1994).

Animais que ingeriram ração rica em lipídeos saturados (grupo D e BPA+D) por um período de seis meses apresentaram ingestão calórica superior ao grupo Controle e ao grupo Bisfenol A. Os animais tratados com a dieta hiperlipídica atingiram peso superior em relação aos animais do grupo Controle e BPA que ingeriram ração controle. Aliado ao ganho de peso foi possível observar um aumento significativo de gordura corporal nos grupos D e BPA+D. Esse acúmulo está diretamente associado ao estabelecimento de um desbalanço energético (Chen *et al.*, 2009). Os resultados encontrados indicam, portanto, que a metodologia utilizada foi eficaz em gerar alterações metabólicas, as quais comprometem diretamente a homeostasia prostática. Muitos estudos epidemiológicos apoiam o conceito que, o risco de câncer de próstata é aumentado por níveis elevados de ingestão de gorduras (Cai *et al.*, 2006). Além disso, outros estudos mostraram que a exposição ao BPA pode promover aumento do peso corporal e a adiposidade (Newbold, 2011). Em um estudo epidemiológico, Trasande e colaboradores (2012) encontraram uma associação entre concentrações urinárias do desregulador endócrino BPA e o aumento de massa corporal em crianças e adolescentes. Segundo Boucher e colaboradores (2014) o bisfenol A pode ter um papel importante na formação de células de gordura e no metabolismo, tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta. Este desregulador pode alterar os mecanismos de adipogênese e de acúmulo de lipídios contribuindo, assim, para o estabelecimento da obesidade.

A dieta estimulou o desenvolvimento de lesões histopatológicas na próstata do gerbilo. Dentre as lesões, a mais comum foi a Neoplasia Intraepitelial Prostática,

caracterizada por anormalidades genéticas e por ocasionar alterações que comprometem as funções da glândula prostática (Zanetoni, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010 a,b). Essas lesões, na maior parte das vezes, apresentaram crescimento papilar, formando invaginações epiteliais restritas a determinados sítios e um elevado número de células atípicas, ocasionado pela grande extensão das mesmas, além do comprometimento das unidades glandulares. Diversos estudos apontam evidências morfológicas e moleculares de que a PIN de alto grau pode ser uma lesão precursora de alguns carcinomas da próstata (Montironi *et al.*, 2011). A análise da ingestão de grande quantidade de gordura saturada por longos períodos de tempo confirmou que há diferenças na resposta dos lobos prostáticos à dieta hiperlipídica. O lobo Ventral da próstata do gerbilo do grupo Dieta foi mais sensibilizado pela ingestão de gordura saturada que o lobo Dorsolateral, já que desenvolveu lesões microinvasivas.

Os mecanismos pelos quais a dieta promove o desenvolvimento do câncer de próstata são incertos. Estudos prévios sugerem que alterações na ação androgênica nesta glândula, pode ser um mecanismo potencial (Fleshner *et al.*, 2004). Lesões histopatológicas espontâneas, bem como as induzidas quimicamente, podem ser reforçadas por altos níveis de testosterona, bem como por uma dieta rica em lipídeos (Cai *et al.*, 2006). Dessa forma, desequilíbrios hormonais como diferenças nos níveis séricos de testosterona, associados ao tratamento com a dieta hiperlipídica, podem ter contribuído para a evolução de alterações histopatológicas na glândula prostática.

A administração de bisfenol A em gerbilos adultos promoveu um aumento da atividade proliferativa e secretora das células epiteliais e um aumento no número das células basais. Além disso, houve um aumento do número de lesões pré-malignas e malignas e de focos inflamatórios na próstata de animais que receberam este composto. O surgimento de reações inflamatórias na próstata é um evento usualmente associado ao aparecimento de lesões prostáticas (De Marzo *et al.*, 2007; Bernoulli *et al.*, 2008). Há crescentes evidências apontando para a associação entre Prostatite, Hiperplasia Prostática Benigna (Nickel, 2008; Wang *et al.*, 2008) e Câncer Prostático humano (De Marzo *et al.*, 2007; Stock *et al.*, 2008). Nos lobos prostáticos do gerbilo, o surgimento de desordens inflamatórias foi concomitante ao desenvolvimento das lesões prostáticas. Mesmo em “baixas doses” ou “doses ambientais”, ou seja, aquelas na faixa típica de exposição ambiental humana, a ingestão de BPA pode promover diversas alterações na próstata de gerbilos. Esses efeitos podem não ser aparentes em doses mais elevadas que são comumente utilizadas em estudos toxicológicos tradicionais (Vandenberg, *et*

al.,2007). Esses resultados são reforçados por diversos outros estudos que mostram que a exposição a baixas doses de bisfenol A são bastante prejudiciais para o sistema reprodutor masculino (Ramos, *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2001; Ho, *et al.*, 2006; Rochester, 2013; Teeguarden & Hanson-Drury, 2013).

Após a ingestão da dieta hiperlipídica, do BPA e da associação de ambos, constatou-se alteração do volume ocupado pelos componentes teciduais glandulares. Nos grupos D, BPA e BPA+D o volume relativo epitelial foi maior que o grupo Controle, sugerindo que a dieta rica em lipídeos saturados e o bisfenol A são capazes de promover instabilidade na homeostase das células epiteliais, favorecendo a proliferação. Consequentemente, houve diminuição do volume relativo do compartimento luminal, devido aos numerosos focos proliferativos. O estroma não muscular sofreu redução em seu volume, o que possivelmente se deve ao aumento da proliferação celular na glândula.

Foi possível notar que as alterações histopatológicas estavam associadas com mudanças estruturais na matriz extracelular, caracterizando o início da reação dos componentes do estroma. As fibras colágenas e reticulares se apresentaram como componentes estruturais com percentual representativo e sofreram fragmentação e posterior reestruturação em áreas com focos neoplásicos. Essas fibras formam uma barreira à migração celular, contudo, com a progressão tumoral esses componentes sofrem reestruturação para favorecer a migração de células cancerosas. Assim, as interações epitélio-estromais são de extrema importância não apenas durante o desenvolvimento normal da próstata como também durante a tumorigênese. De acordo com Tuxhorn (2001), o estroma prostático atua com o um participante ativo no estabelecimento e desenvolvimento de lesões proliferativas, criando, assim, um microambiente favorável ao desenvolvimento do carcinoma e de seu potencial invasivo.

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares do presente trabalho demonstram que o consumo de dietas ricas em gorduras saturadas favoreceu o desenvolvimento de lesões histopatológicas na próstata do gerbilo. Apesar de ambos os lobos prostáticos desenvolverem lesões, o lobo Ventral do grupo Dieta foi o mais afetado pelo consumo da dieta. Além disso, a exposição ao desregulador endócrino bisfenol A, em níveis ambientais, que são considerados seguros pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Hunt *et al.*, 2009), ocasionou diversas alterações morfológicas na próstata destes animais. No grupo BPA, aparentemente, o lobo Ventral foi o mais afetado pela ingestão de bisfenol A. Quando associamos o bisfenol A com a dieta rica em lipídios, é possível notar que o Lobo Dorsolateral foi o mais afetado. Estudos posteriores, tais como análises imunohistoquímicas e dosagens hormonais devem ser realizadas para a melhor compreensão dessas lesões prostáticas nos diferentes lobos prostáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.** 7, 346–353.
- Behmer AO, Tolosa EMC, Neto AGF. 1976. **Manual de aulas práticas para histologia normal e patológica.** EDART-EDUSP, SP 329p
- Bernoulli J, Yatkin E, Laakso A, Anttinen M, Bosland M, Vega K, Kallajoki M, Santti R, Pylkkänen L. 2008. Histopathological evidence for an association of inflammation with ductal pin-like lesions but not with ductal adenocarcinoma in the prostate of the noble rat. **Prostate.** v.68, n.7, p.728-739.
- Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller T, Vom Saal FS. 1999. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. **Environ Health Perspect.** 107:613-618.
- Boucher JG, Boudreau A, Atlas E. 2014. Bisphenol A induces differentiation of human preadipocytes in the absence of glucocorticoid and is inhibited by an estrogen-receptor antagonist. **Nature Nutrition & Diabetes.** 4, e102; doi:10.1038/nutd.2013.43.
- Cai LQ, Imperato-McGinley, J. and Zhu, Y.-S. 2006. Regulation of prostate 5 α -reductase-2 gene expression and prostate weight by dietary fat and caloric intake in the rat. **Prostate,** 66: 738–748.
- Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. 2013. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. **PLoS One.** 8(2):e55905.
- Chang S, Han J, Abdelkader TS, Kim T, Lee JM, Song J, Kim K, Park J, Park J. 2014. High animal fat intake enhances prostate cancer progression and reduces glutathione peroxidase 3 expression in early stages of TRAMP mice. **Prostate,** DOI: 10.1002/pros.22843.
- Chen JQ, Brown TR, Russo J. 2009. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. **Biochim Biophys Acta.** v.1793, n.7, p.1128-43.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer.** v.7, n.4, p.256-69.
- Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. 2004. Dietary fat and prostate cancer. **J Urol** v.171, p.19–24.

Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Campos SGP. 2010. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol.** v. 88, n.1, p.96-106, (a)

Gonçalves BF, Campos SGP, Falleiros Junior LR, Taboga SR. 2010. Association between MNU and steroids promoters or fat diet on gerbil prostatic lobes: carcinogenic effects. In: **XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. SBBC XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology**, São Paulo, p. 06-06. (b)

Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant. **Cancer Res** 1: 5624–5632.

Hond ED, Schoeters G. Endocrine disrupters and human puberty. 2006. **Int J Androl**, 29(1):264-271.

Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ. 2009. The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. **Biol Reprod.** 81(5):807-13.

Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **J Anat** 132: 357-370.

Kondo Y, Homma, Y, Aso, Y, Kakizoe, T. 1994. Promotional effect of two-generation exposure to a high-fat diet on prostate carcinogenesis in ACI/Seg rats. **Cancer Res** v.23, p.6129-6132.

Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Cheng L. 2011. Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. **BJU International**, v.108, p.1394–1401.

Nadal A. 2013. Fat from plastics? Linking bisphenol A exposure and obesity. 2013. **Rev. Endocrinol.** v. 9, p.9–10

Newbold RR. 2011. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life. **Am J Clin Nutr.** 94(suppl):1939S–42S.

Nickel JC. 2008. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. **Urol Clin North Am** v.35, p.109–115.

Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reprod Toxicol**, 23(3): 374-382.

- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal exposure to estradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 102: 134-138.
- Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. 2011. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol**. Jan;31(1):1-9.
- Ramos JG, Varayoud J, Sonnenschein C, Soto AM, de Toro MM, Luque EH. 2001. Prenatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A Alters the Periductal Stroma and Glandular Cell Function in the Rat Ventral Prostate. **Biol Reprod**. 65, 1271–1277.
- Ribeiro DL, Pinto ME, Maeda SY, Taboga SR, Góes RM. 2012. High fat-induced obesity associated with insulin resistance increases the FGF-2 content and causes stromal hyperplasia on the rat ventral prostate. **Cell and Tissue Research**., v.349, n.2, p.577-88 (a).
- Ribeiro DL, Pinto ME, Rafacho A, Bosqueiro JR, Maeda SY, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Góes RM. 2012. High-Fat Diet Obesity Associated with Insulin Resistance Increases Cell Proliferation, Estrogen Receptor, and PI3K Proteins in Rat Ventral Prostate. **J. Androl.**, v.33, n.5, p.854-65 (b).
- Rochester JR. 2013. Bisphenol A and human health: A review of the literature. **Reprod Toxicol**. 42, 132– 155.
- Rubin BS, Murray, MK, Damassa, DA, King, JC, Soto, AM. 2001. Perinatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A Affects Body Weight, Patterns of Estrous Cyclicity, and Plasma LH Levels. **Environ Health Perspect**. v.109, n7.
- Shankar E, Vykhovanets EV, Vykhovanets OV, MacLennan GT, Singh R, Bhaskaran N, Shukla S, Gupta S. 2012. High-Fat Diet Activates Pro-Inflammatory Response in the Prostate Through Association of Stat-3 and NF-Kb. **The Prostate**, 72:233-243
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Res** v.64, p.2270–2305.
- Stock D, Groome PA, Siemens DR. 2008. Inflammation and prostate cancer: a future target for prevention and therapy? **Urol Clin North Am** v.35, p.117–130.
- Teeguarden JG & Hanson-Drury S. 2013. A systematic review of Bisphenol A „low dose” studies in the context of human exposure: A case for establishing standards for reporting „low-dose” effects of chemicals. **Food Chem Toxicol**. 62, 935–948.

Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J. 2002. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 16(1):105-121.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102(19):7014-7019.

Toppari J. 2008. Environmental endocrine disrupters. **Sex Dev**, 2: 260-267.

Trasande L, Attina TM, Blustein J. 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. **JAMA**. v.308. p.1113–1121.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. **J Urol** v.166, p.2472-2483.

Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Exp Gerontol**. v.40, p.121-128.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reprod Toxicol**. 24, 139–177.

vom Saal FS, Hughes C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. **Environ Health Perspect**. Aug;113(8):926-33.

Wang L, Yang JR, Yang LY, Liu ZT. 2008. Chronic inflammation in benign prostatic hyperplasia: implications for therapy. **Med Hypotheses** v.70, p.1021–1023.

Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest** 12:131-155.

Zanetoni C. 2007. Indução experimental de tumores na próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus*. Campinas. Tese de Doutorado – UNICAMP, Campinas.

Figura 2. Ingestão calórica semanal (kcal) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). O Superíndice (***) $p \leq 0,001$ indica diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 2

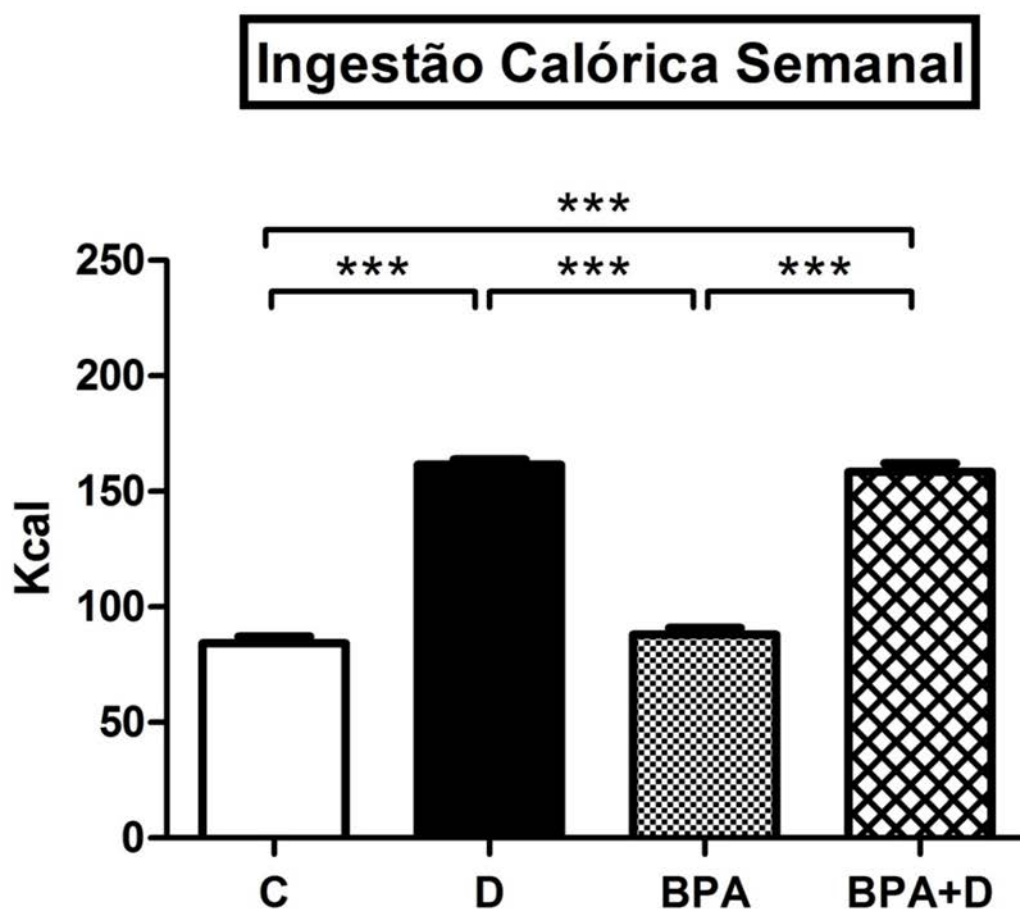


Figura 3. Ganho de peso (g) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). O Superíndice (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indica diferenças significativas entre os grupos analisados.

Figura 4. Gordura corporal (g) (soma das gorduras epididimal, retroperitoneal, visceral e prostática) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por seis meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 3

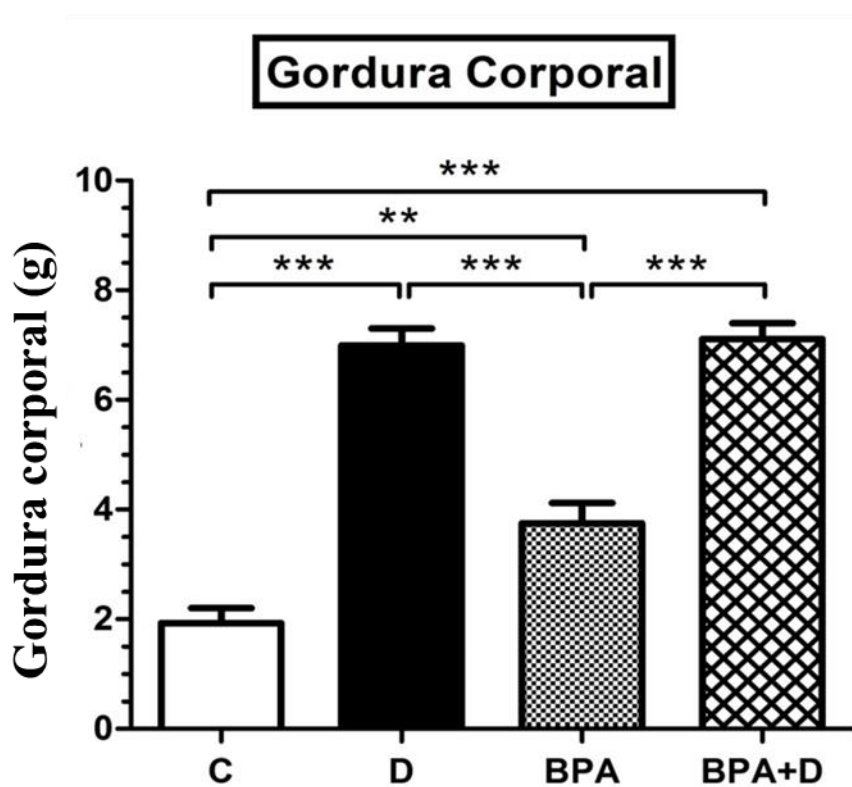
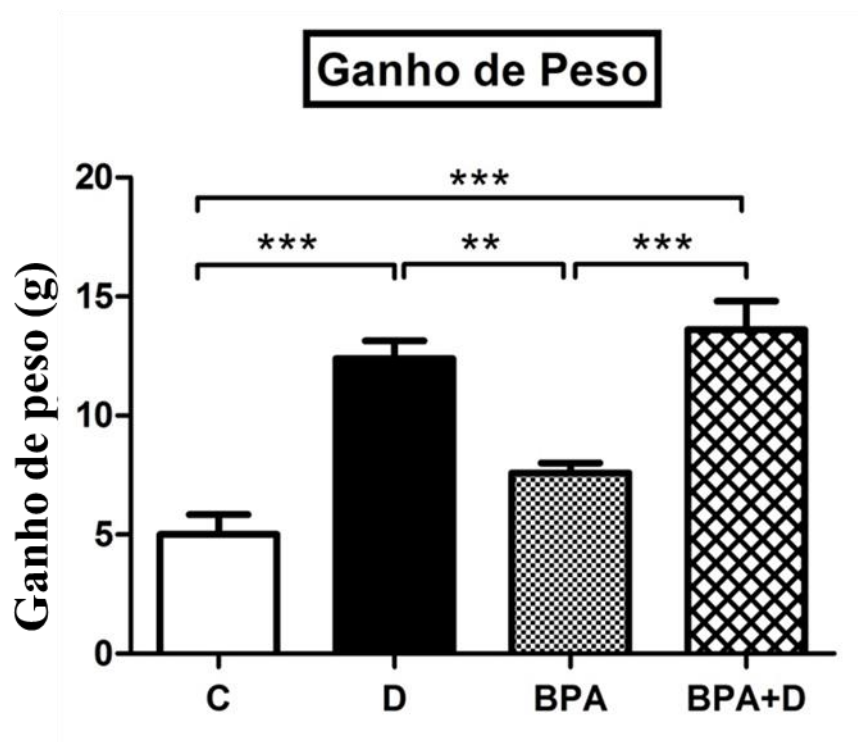


Figura 5. Gerbilos submetidos a diferentes tratamentos durante 6 meses. Notar Gordura Epididimal (GE), Gordura Visceral (GV) e Gordura Retroperitoneal (GRP). **A.** Gordura Epididimal. **B.** Gordura Visceral. **C.** Gordura Retroperitoneal.

FIGURA 5

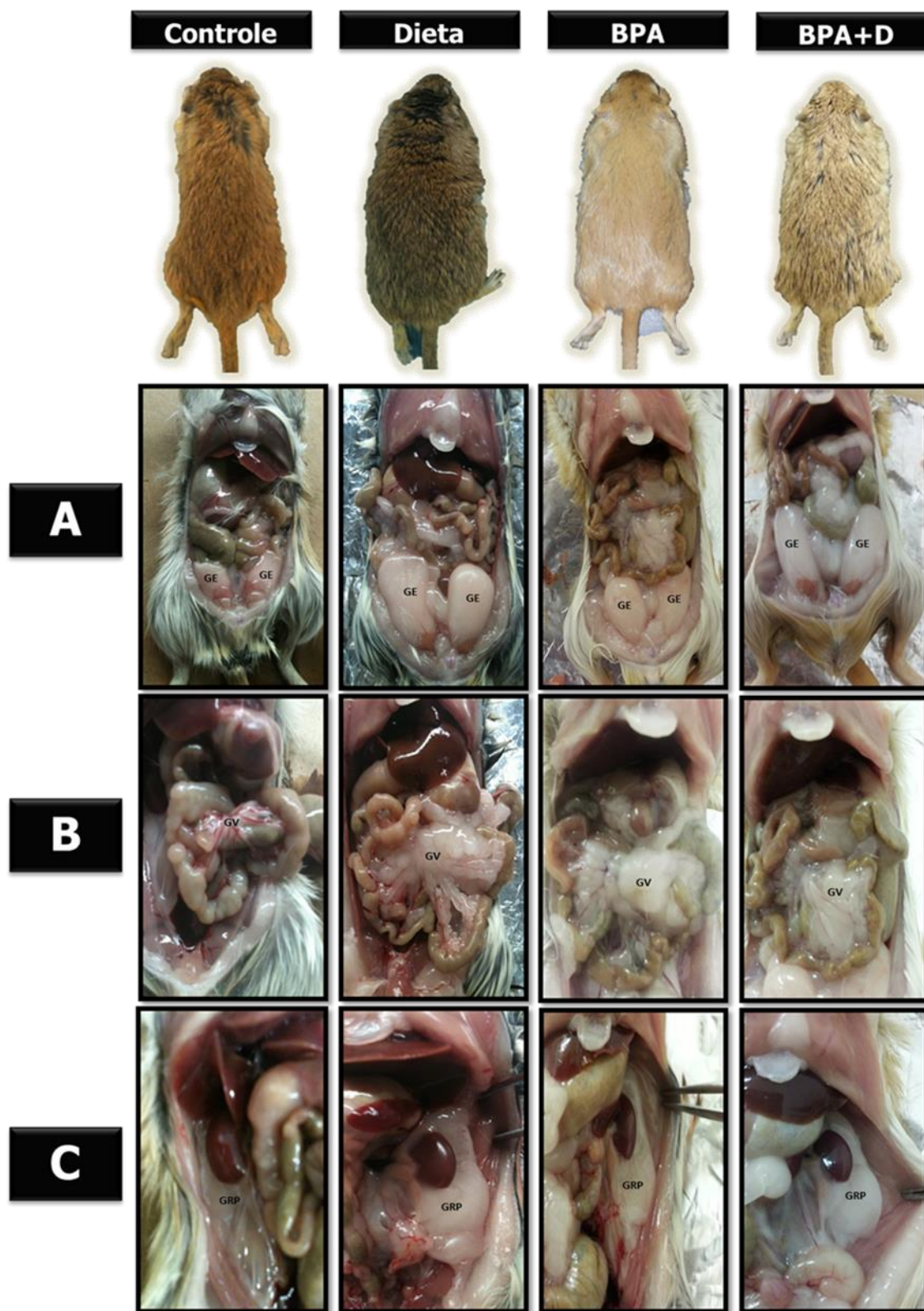


Figura 6. Cintura (cm) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos durante 6 meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0.05$). Os Superíndices (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 6

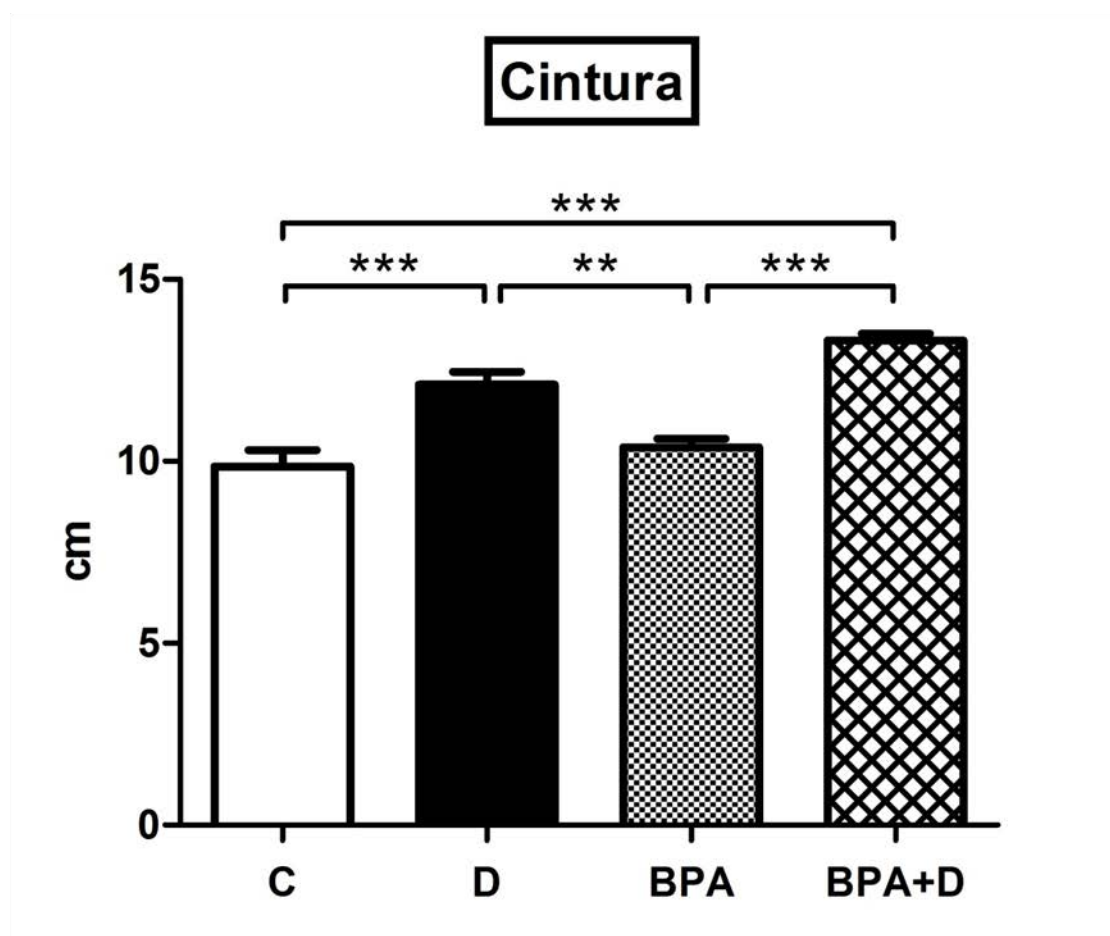


Figura 7. Peso Relativo (g) (10^4) dos lobos Dorsolateral (A) e Ventral (B) e do Complexo Prostático (C) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por seis meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados. O peso relativo (PR) foi determinado pela razão entre o peso do lobo prostático e o peso do animal.

FIGURA 7

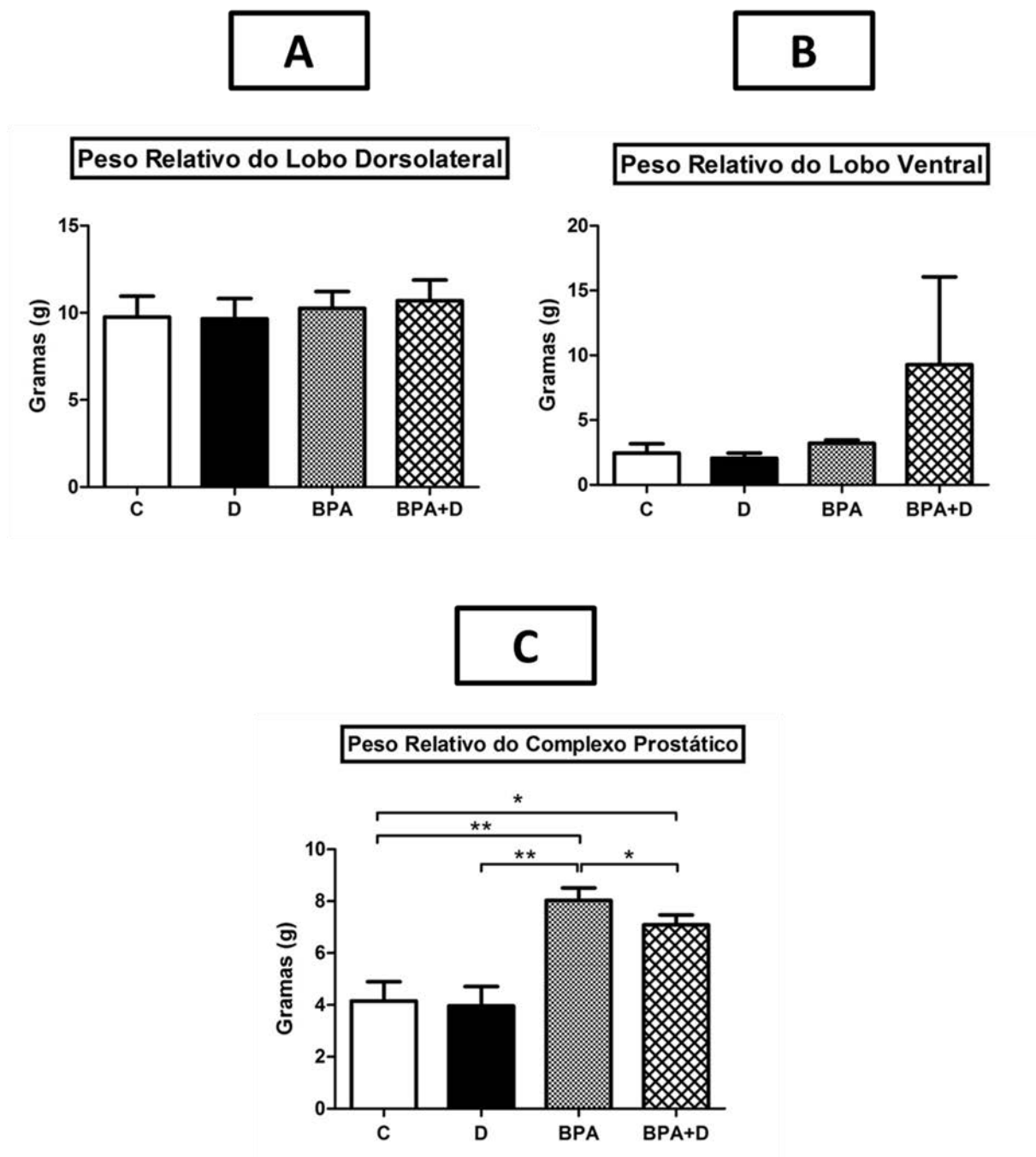


Figura 8. Consumo semanal de Bisfenol A (mL) por animal nos grupos BPA e BPA+D. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 8

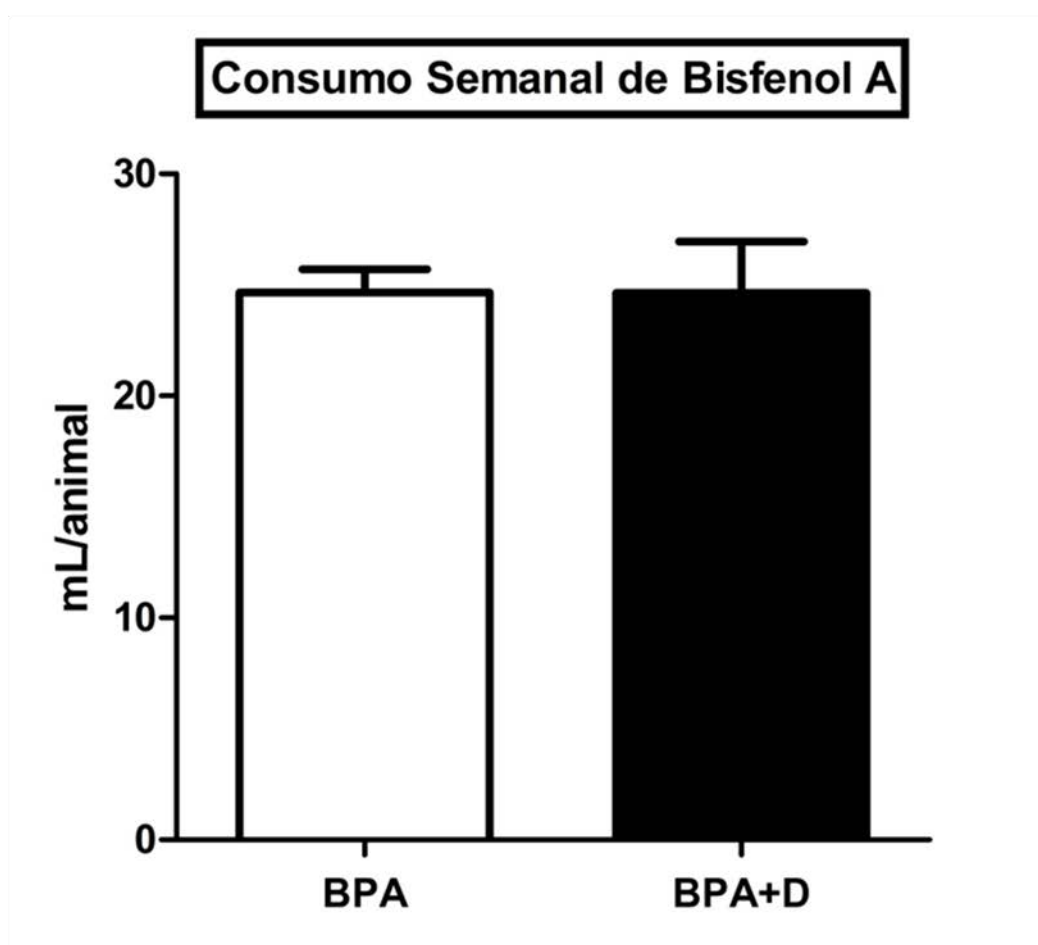


Figura 9. Lobo Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A e B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada delgada de células musculares lisas (ML). O epitélio apresenta células secretoras de formato cilíndrico. **C.** Epitélio prostático atípico, onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), com invaginação do epitélio para o interior do lúmen. **D.** Ácino acometido por Inflamação Intraluminal. Observa-se um grande número de células inflamatórias no lúmen acinar. **E.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática. Notar extensa Inflamação Periductal (IPD) e Intraluminal (IIL). **F.** Carcinoma Microinvasivo acometendo um ácino. **G.** Detalhe da figura anterior. É importante ressaltar a desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a invasão do estroma (*). **H.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática. **I.** Epitélio prostático atípico (*). Notar a presença de diversas células inflamatórias no lúmen acinar e de uma extensa Inflamação Periductal. **J.** Epitélio prostático atípico, onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática. É possível notar extensa Inflamação Subepitelial (ISE) e Intraluminal (IIL). **K.** Carcinoma Microinvasivo acometendo um ácino. É possível notar a desestruturação da camada de células musculares lisas (*), favorecendo a invasão do estroma. **L.** Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), com invaginação do epitélio para o interior do lúmen. **M.** Extensa Inflamação Periductal no estroma prostático (*). **N.** Epitélio prostático atípico (*). Notar a presença de diversas células inflamatórias no lúmen acinar. **O.** Inflamação Periductal (IPD). **A-O.** Hematoxilina-Eosina (HE). Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células musculares lisas (ML), Inflamação Intraluminal (IIL), Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Subepitelial (ISE), Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), Carcinoma Microinvasivo (CM). **A, B.** Grupo Controle. **C-G.** Grupo Dieta. **H-K.** Grupo Bisfenol A. **L-O.** Grupo Bisfenol A + Dieta.

FIGURA 9

Lobo Ventral

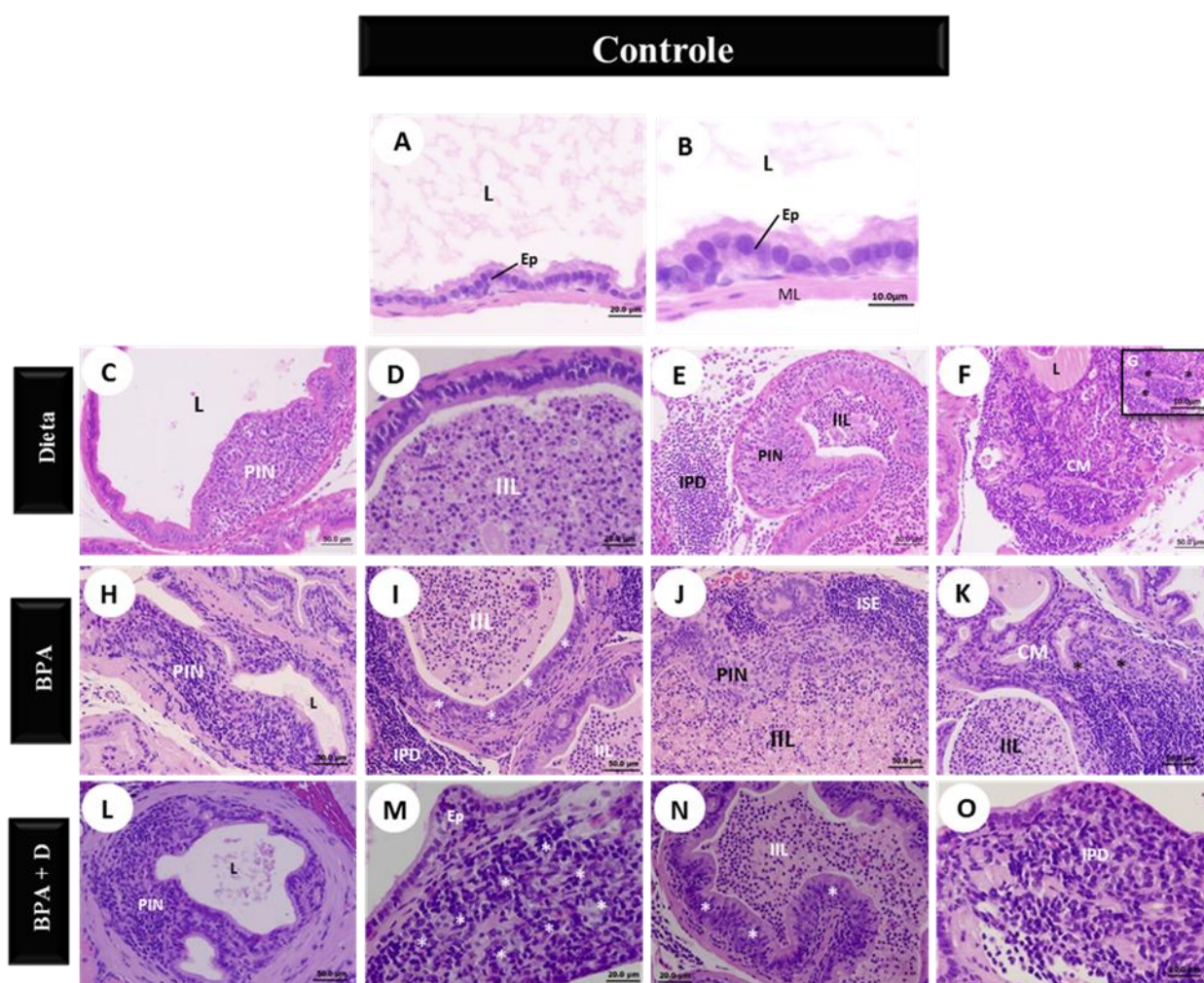


Figura 10. Lobo Dorsolateral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Epitélio prostático íntegro. **B.** O epitélio do lobo dorsolateral apresenta células secretoras de formato cúbico e é circundado por uma camada espessa de células musculares lisas. **C.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática, com invaginação do epitélio para o interior do lúmen. Além disso, é possível notar uma extensa Inflamação Periductal (IPD). **D.** Detalhe da figura C. É possível observar células atípicas com núcleos aumentados e nucléolos evidentes. **E.** Ácino com Inflamação Intraluminal (IIL). Notar a presença de inúmeras células inflamatórias no lúmen acinar e o epitélio prostático encontra-se atípico. **F.** Epitélio prostático atípico onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática. **G.** Epitélio prostático atípico (*). Notar extensa inflamação Subepitelial e a presença de inúmeras células inflamatórias no lúmen acinar. **H.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática. Notar Inflamação Intraluminal. **I.** Epitélio prostático atípico. Notar a presença de diversas células inflamatórias no lúmen acinar. **J.** Extensa Inflamação Periductal. **K.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática. **L.** Ácino com Neoplasia Intraepitelial Prostática. Notar redução do volume luminal. **M.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo. Notar o epitélio anômalo e a diminuição da área luminal. **N.** Inflamação Intraluminal. Observa-se um grande número de células inflamatórias no lúmen. **O.** Carcinoma microinvasivo acometendo um ácino. É importante ressaltar a desestruturação da camada de células musculares lisas, favorecendo a invasão do estroma (setas). **A-O.** Hematoxilina-Eosina (HE). Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células musculares lisas (ML), Inflamação Intraluminal (IIL), Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Subepitelial (ISE), Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), Carcinoma Microinvasivo (CM). **A, B.** Grupo Controle. **C-G.** Grupo Dieta. **H-K.** Grupo Bisfenol A. **L-O.** Grupo Bisfenol A + Dieta.

FIGURA 10

Lobo Dorsolateral

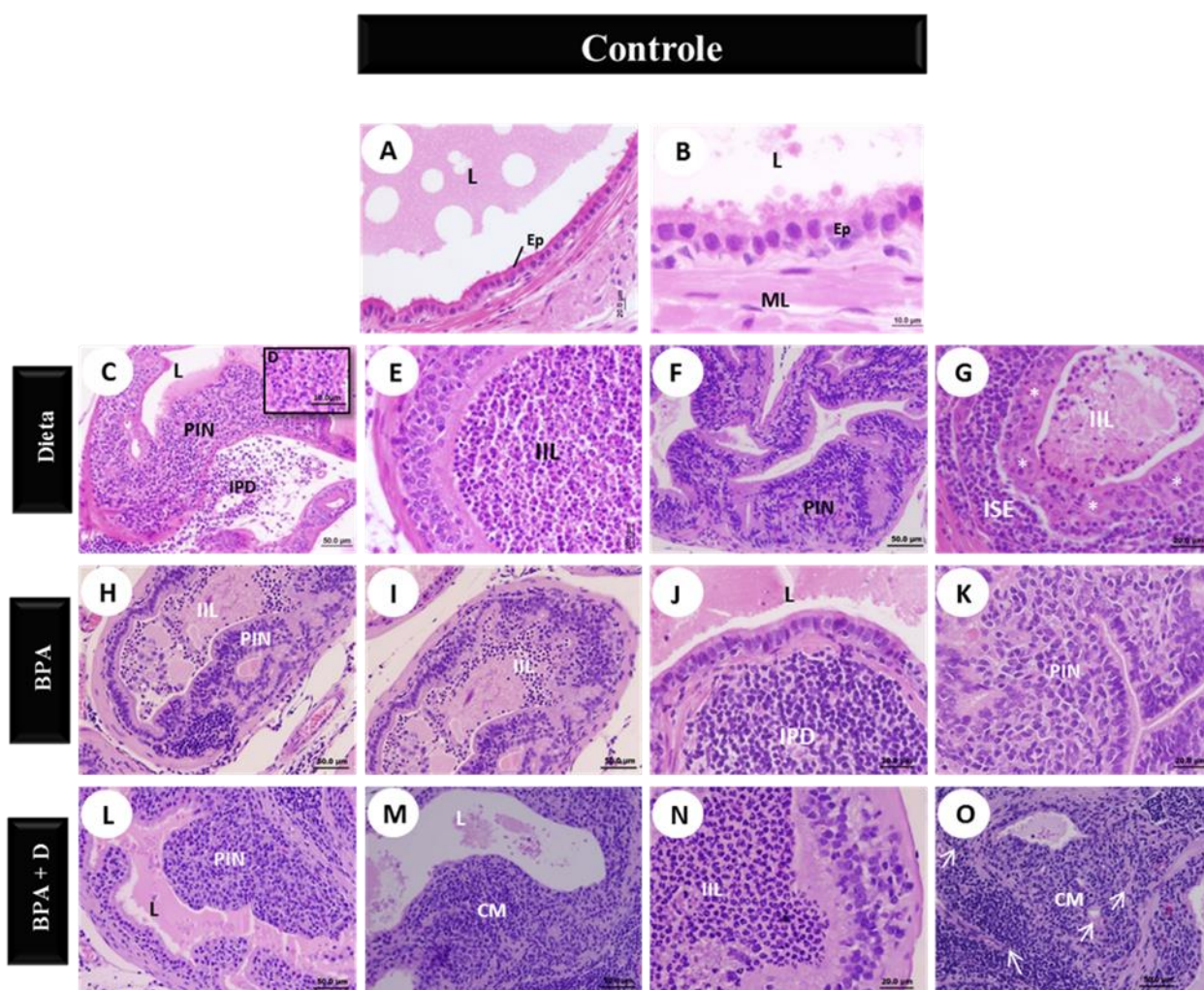


Figura 11. Elementos colagênicos dos lobos Dorsolateral e Ventral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas (ML) e por uma espessa camada de colágeno subepitelial (setas). **B.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por finas camadas de colágeno subepitelial (setas). **C.** Ácino com epitélio atípico. Observa-se reestruturação dos elementos colagênicos (seta) nesse sítio alterado. **D.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). **E.** No detalhe do ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática observa-se reestruturação dos elementos colagênicos (*), caracterizando o processo de pré-invasão. **F.** Ácino com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). **G.** Detalhe do ácino anterior. Os asteriscos indicam reestruturação das fibras de colágeno. **H.** Ácino com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). As setas indicam rompimento dos elementos colagênicos no sítio neoplásico. **I.** Ácino com epitélio atípico (*). **J.** No detalhe do ácino com epitélio atípico é possível observar a desestruturação das fibras de colágeno que circundam o epitélio (*). **K.** Ácino acometido por PIN. Observar o início da desestruturação dos elementos de matriz extracelular (setas) associados a esse sítio neoplásico. Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células Musculares Lisas (ML). **A e B.** Grupo Controle. **C, D, E.** Grupo Dieta. **F, G, H.** Grupo Bisfenol A. **I, J, K.** Grupo Bisfenol + Dieta. **A, C, F, G, I, J.** Lobo Dorsolateral. **B, D, E, H, K.** Lobo Ventral. **A-K.** Picrossírius-Hematoxilina.

FIGURA 11

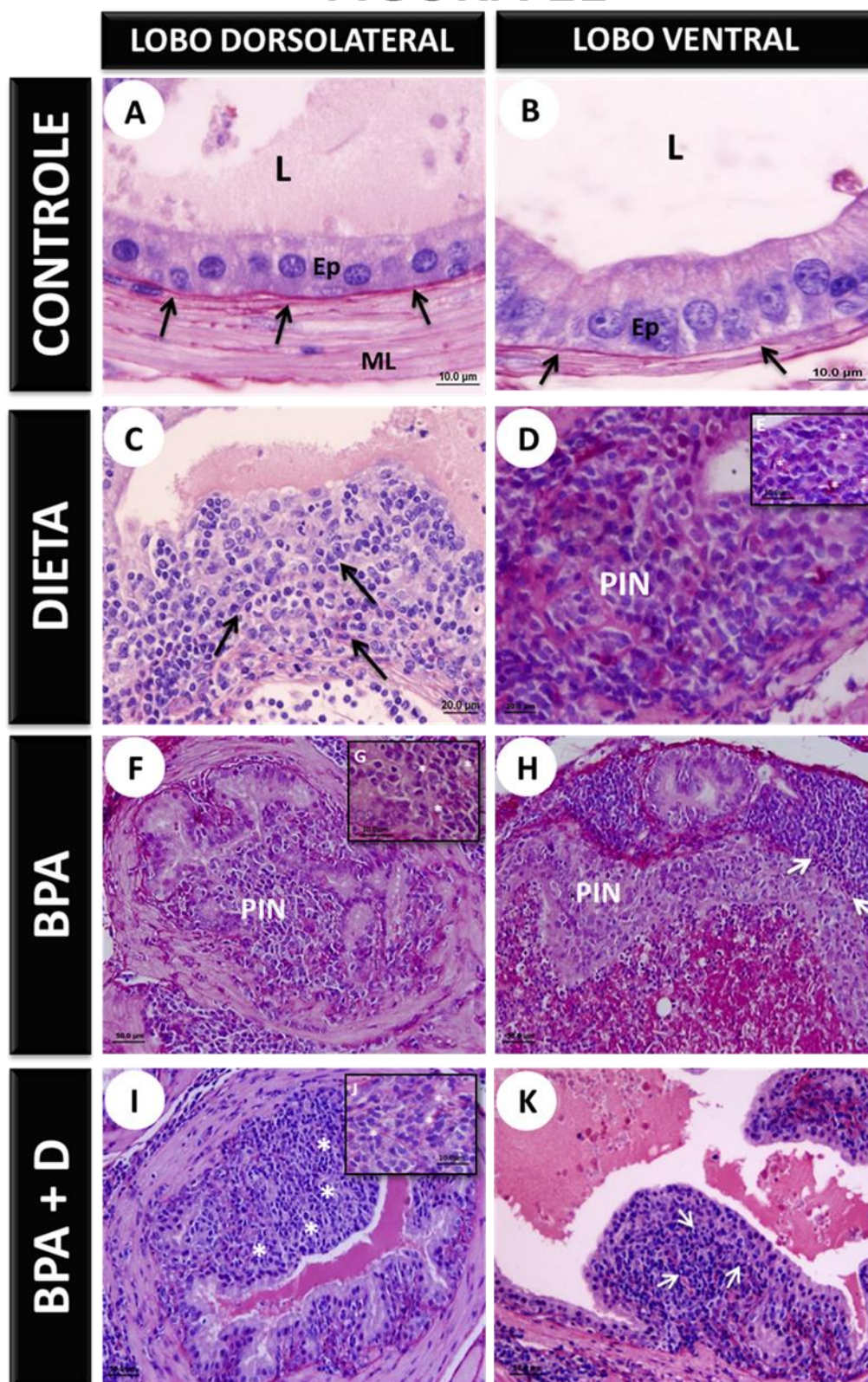


Figura 12. Imunohistoquímica para alfa-actina de músculo liso. **A e B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada de células musculares lisas (ML). **C.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Observar o início da desestruturação da camada de células musculares lisas neste sítio neoplásico. **D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar rompimento da camada de células musculares lisas (setas). **E.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar a desestruturação da camada de células musculares lisas (*). **F, G e H.** Ácino com Carcinoma Microinvasivo (CM). As setas indicam rompimento da camada de células musculares lisas. Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células Musculares Lisas (ML). Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Carcinoma Microinvasivo (CM). **A e B.** Grupo Controle. **C e D.** Grupo Dieta. **E e F.** Grupo Bisfenol A. **G e H.** Grupo Bisfenol + Dieta. **A, C, E, G.** Lobo Dorsolateral. **B, D, F, H.** Lobo Ventral. **A-H.** Alfa-actina de músculo liso.

FIGURA 12

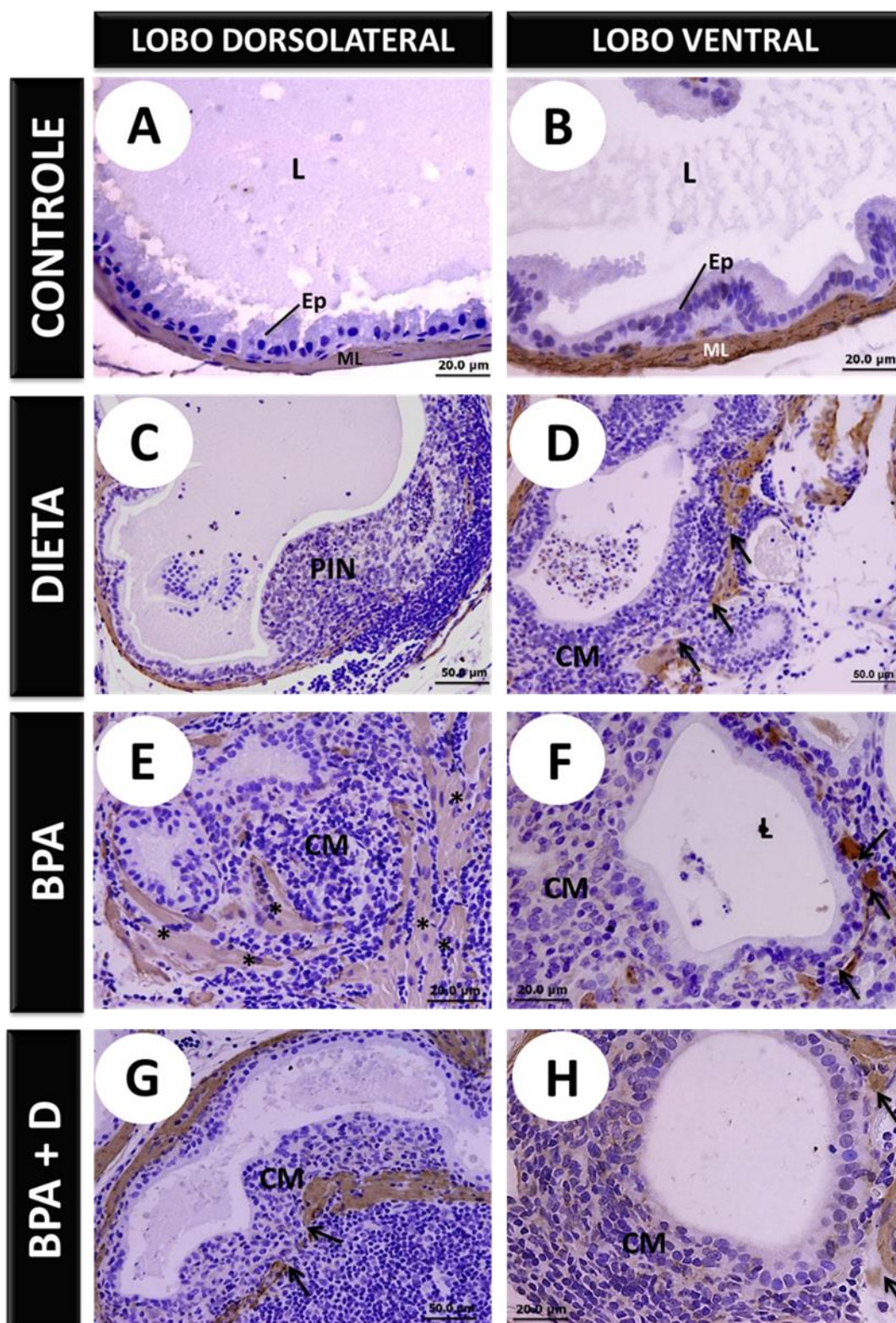


Figura 13. Atividade proliferativa nos lobos Dorsolateral e Ventral de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos, após seis meses. **A.** Proliferação celular no lobo Dorsolateral do grupo Controle. **B.** Proliferação celular no lobo Ventral controle. **C.** Intensa proliferação em lesão pré-maligna (PIN) no lobo Dorsolateral do grupo Dieta. **D.** Proliferação celular em Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) no lobo Ventral do grupo Dieta. **E.** Células proliferativas colonizando o estroma glandular do lobo Dorsolateral no grupo BPA. Notar foco microinvasivo. **F.** Proliferação celular em um Carcinoma Microinvasivo (CM) no lobo Ventral do grupo BPA. **G.** Intensa proliferação em lesão maligna no lobo Dorsolateral no grupo BPA +D. **H.** Proliferação celular em PIN no lobo Ventral do grupo BPA+D. **PIN.** Neoplasia Intraepitelial Prostática. **CM.** Carcinoma Microinvasivo. **A – H. PCNA** (Proliferative Nuclear Cell Antigen).

FIGURA 13

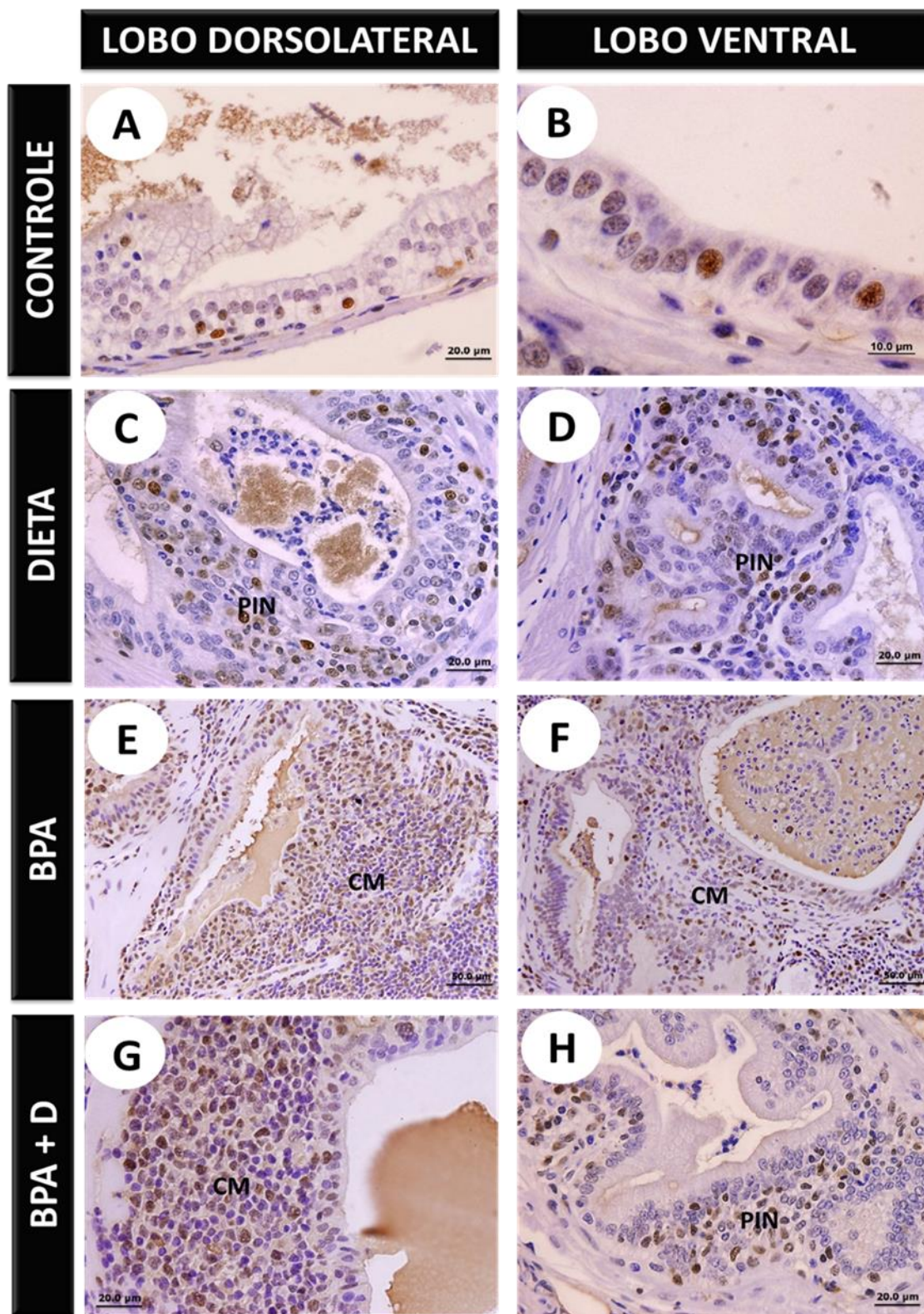
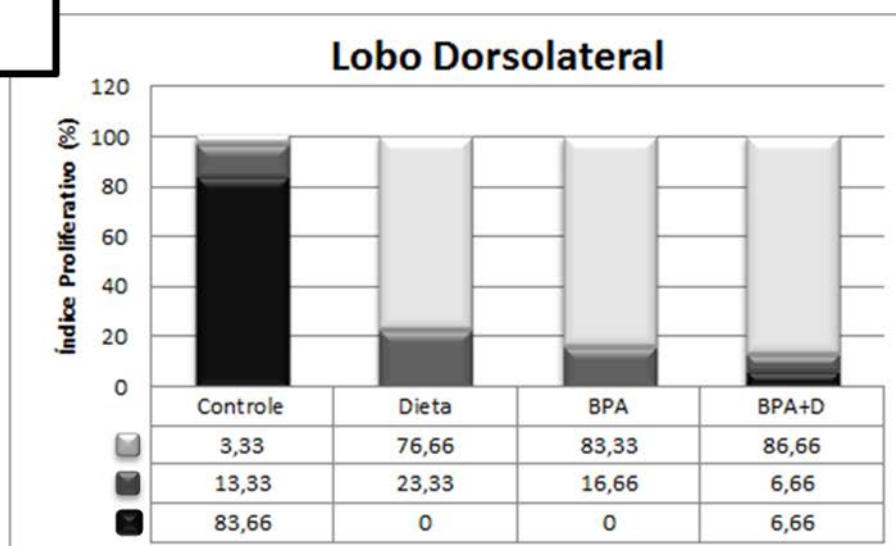


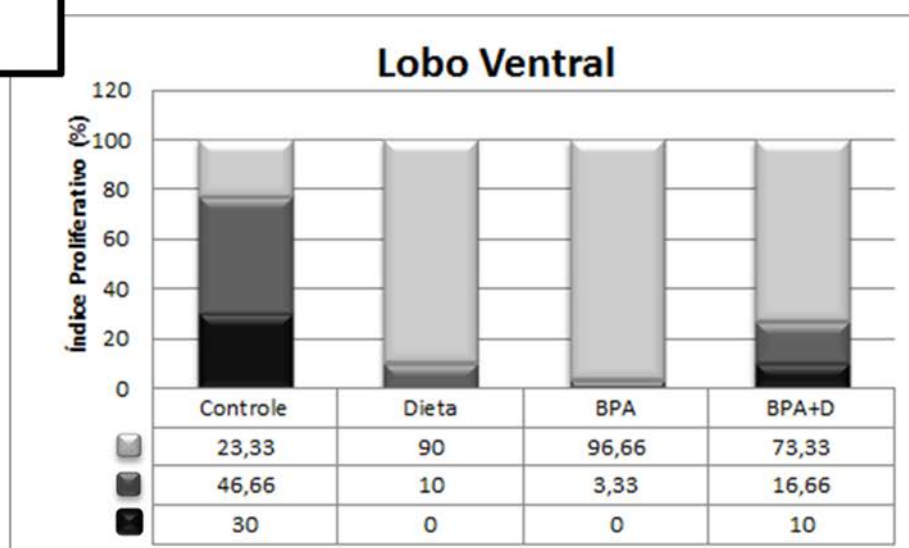
Figura 14. Índice proliferativo (%) dos lobos Dorsolateral (A) e Ventral (B) da próstata do gerbilo após seis meses de tratamento.

FIGURA 14

A



B



■ + (0-30%)

■ ++ (30-50%)

■ +++ (>50%)

Figura 15. Imunolocalização de células basais nos lobos Dorsolateral e Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes condições experimentais, após 6 meses. **A e B.** Grupo Controle com células basais formando uma camada contínua entre o epitélio secretor e a membrana basal. **C-H.** Células basais nos grupos tratados. Notar o aumento dessa população de células em ambos os lobos prostáticos de todos os grupos tratados. Nestes, as células basais aparecem em camadas descontínuas ao redor dos ductos ou dispersas pelo epitélio secretor **A-H.** p63 - Detecção de células do compartimento basal.

FIGURA 15

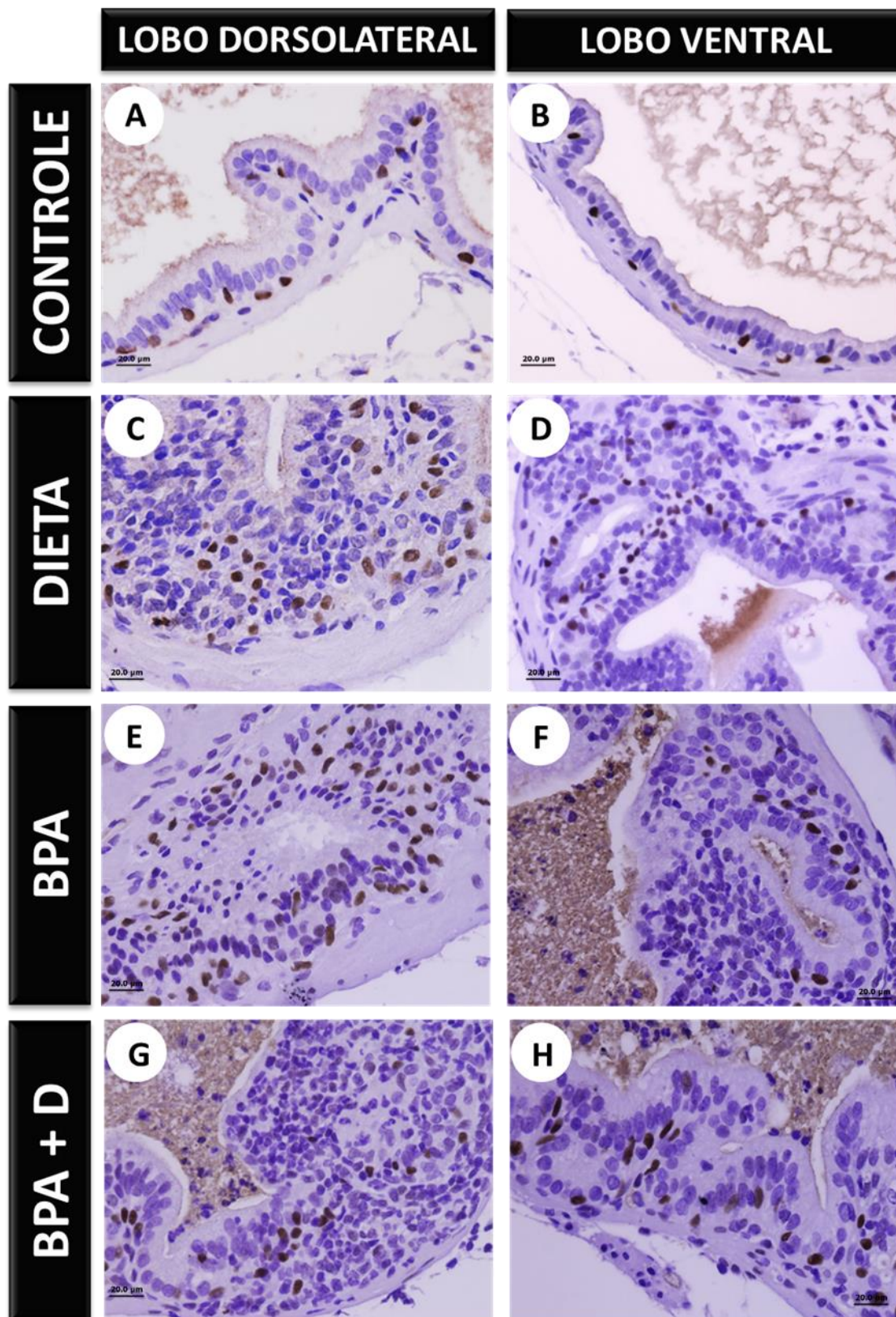


Figura 16. Frequência de células p63-positivas na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos, após seis meses. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). O Superíndice (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$) indica diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 16

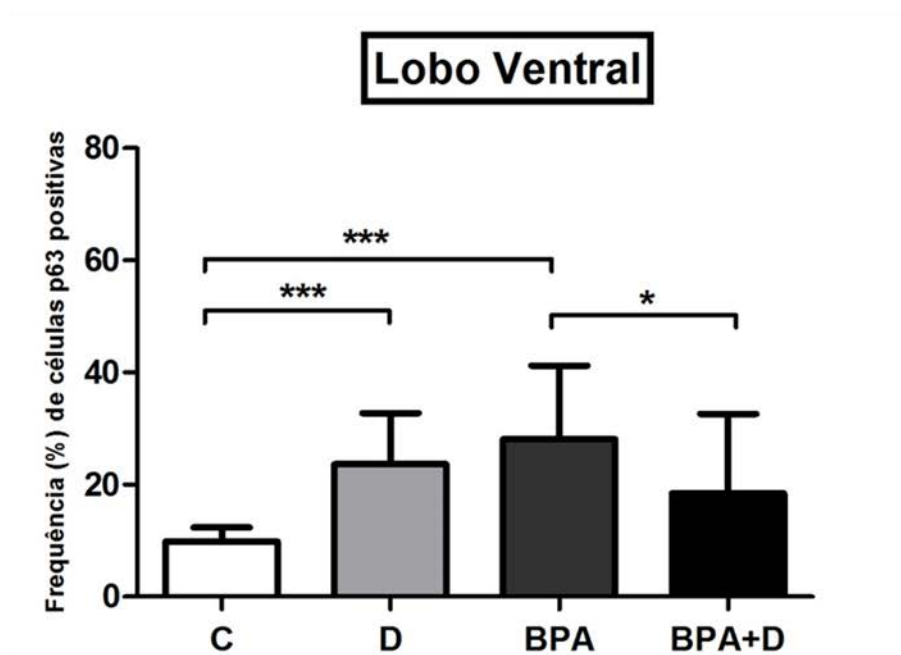
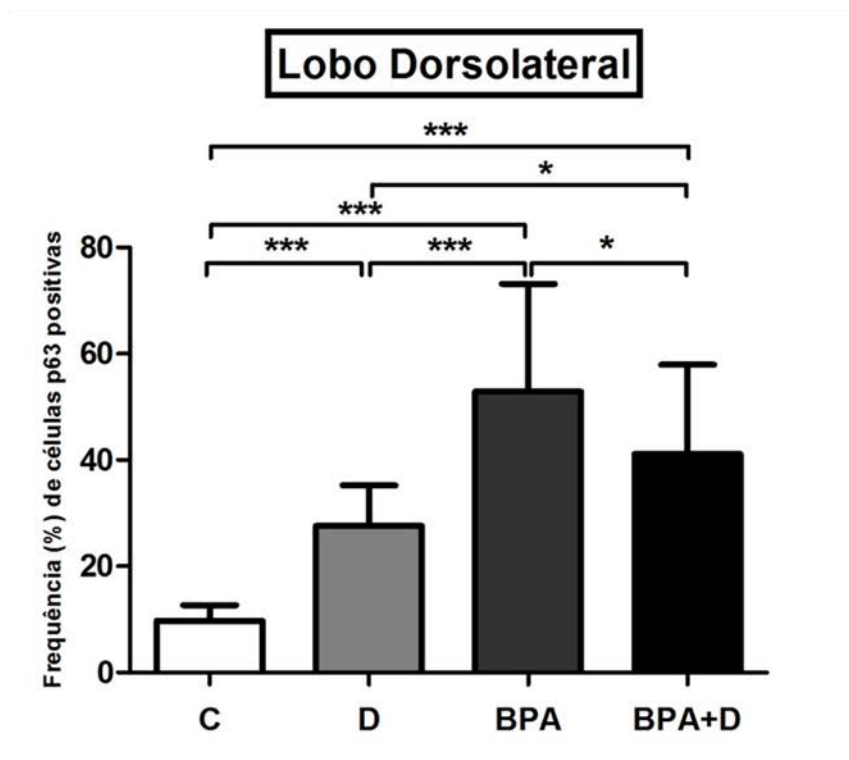


Figura 17. Incidência de lesões histopatológicas (%) no lobo Dorsolateral (A) e Ventral (B) de gerbilos adultos após 6 meses de tratamento.

FIGURA 17

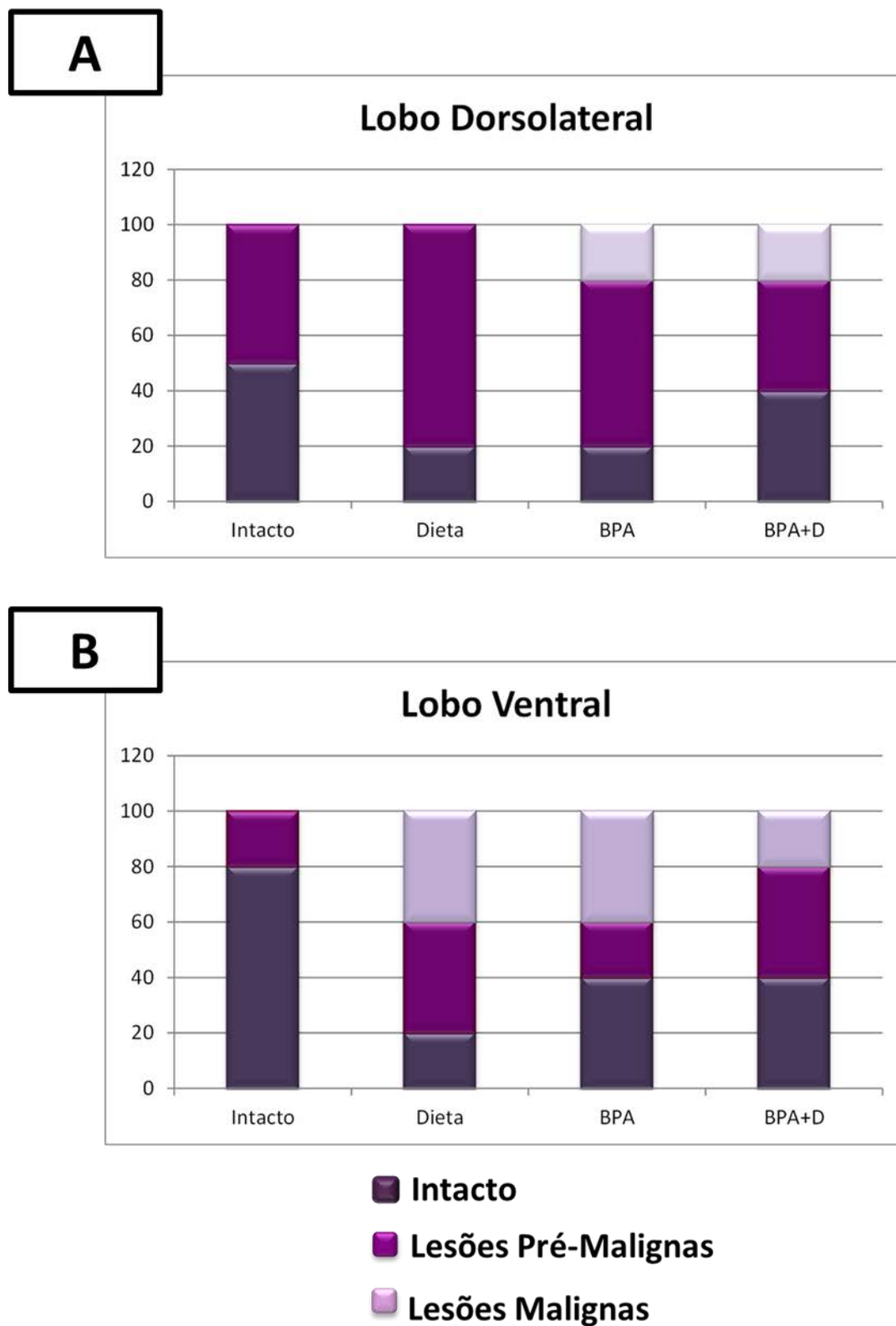
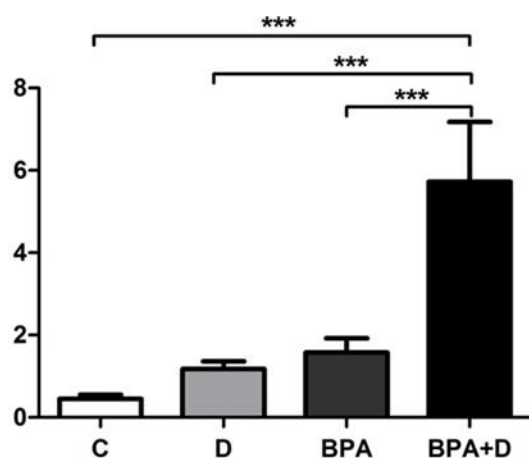


Figura 18. Multiplicidade de lesões prostáticas Pré-Malignas (A) e Malignas (B) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por seis meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

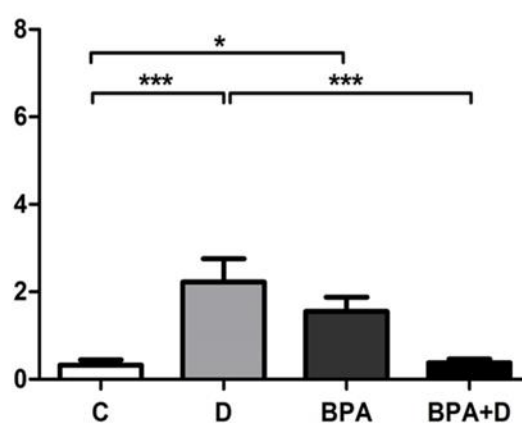
FIGURA 18

A

Lobo Dorsolateral - Lesões Pré-Malignas

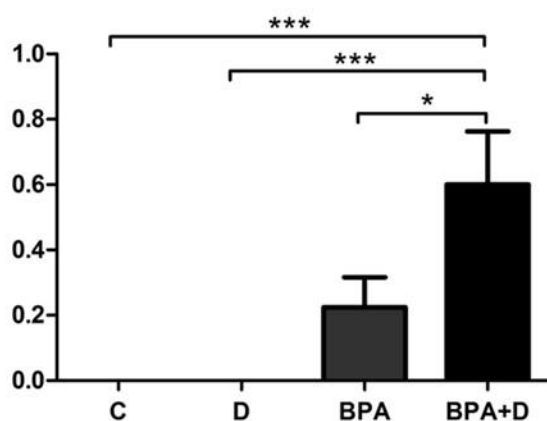


Lobo Ventral - Lesões Pré-Malignas



B

Lobo Dorsolateral - Lesões Malignas



Lobo Ventral - Lesões Malignas

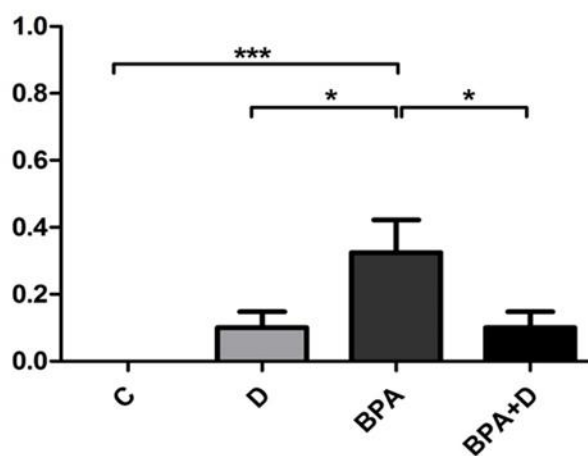


Figura 19. Multiplicidade de Inflamações Prostáticas no Lobo Dorsolateral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por seis meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados. Inflamação Intraluminal (IIL), Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Subepitelial (ISE).

FIGURA 19

LOBO DORSOLATERAL

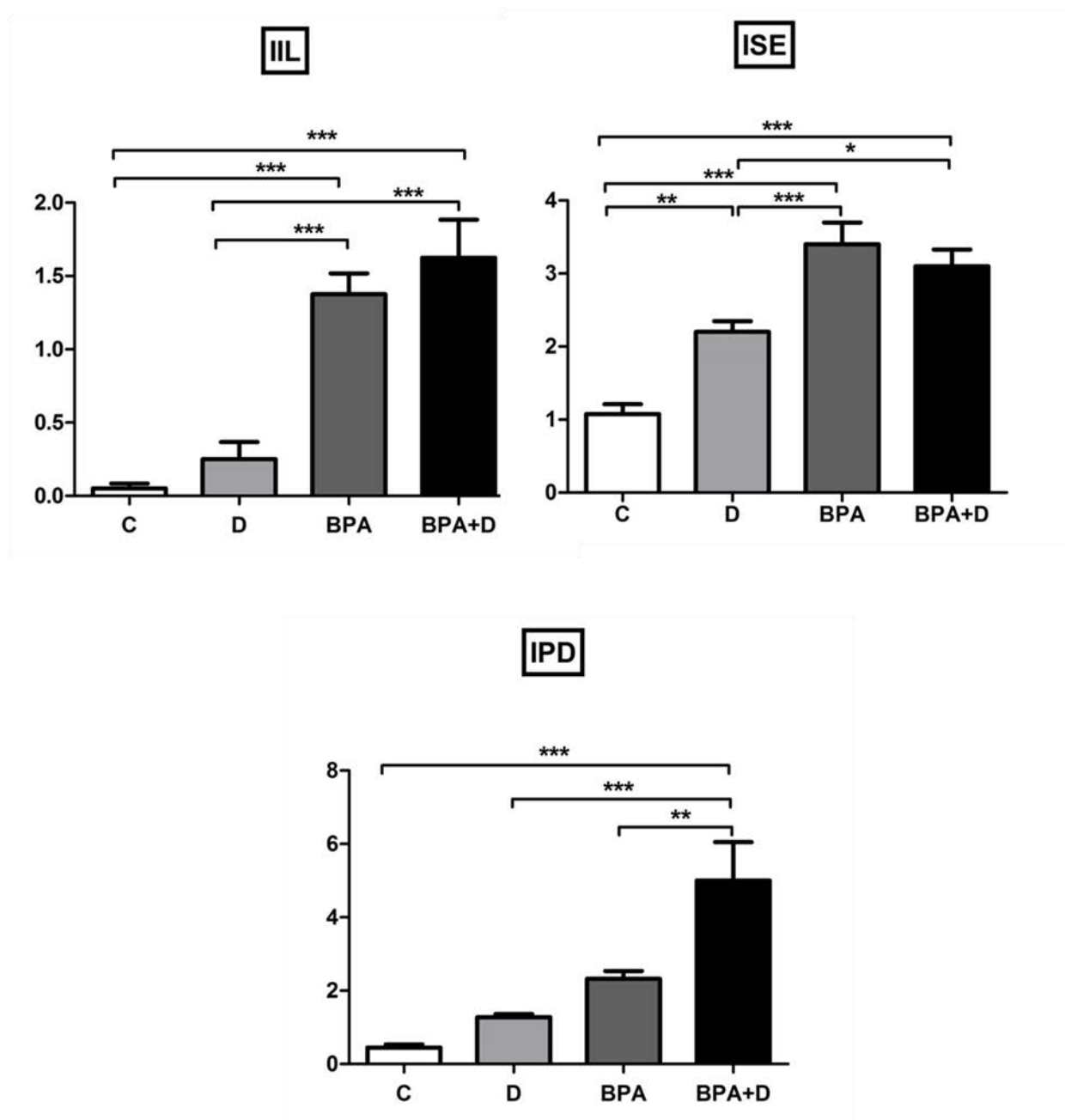


Figura 20. Multiplicidade de Inflamações Prostáticas no Lobo Ventral de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos por seis meses. Os valores representam média $\pm$ EP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados. Inflamação Intraluminal (IIL), Inflamação Periductal (IPD), Inflamação Subepitelial (ISE).

FIGURA 20

LOBO VENTRAL

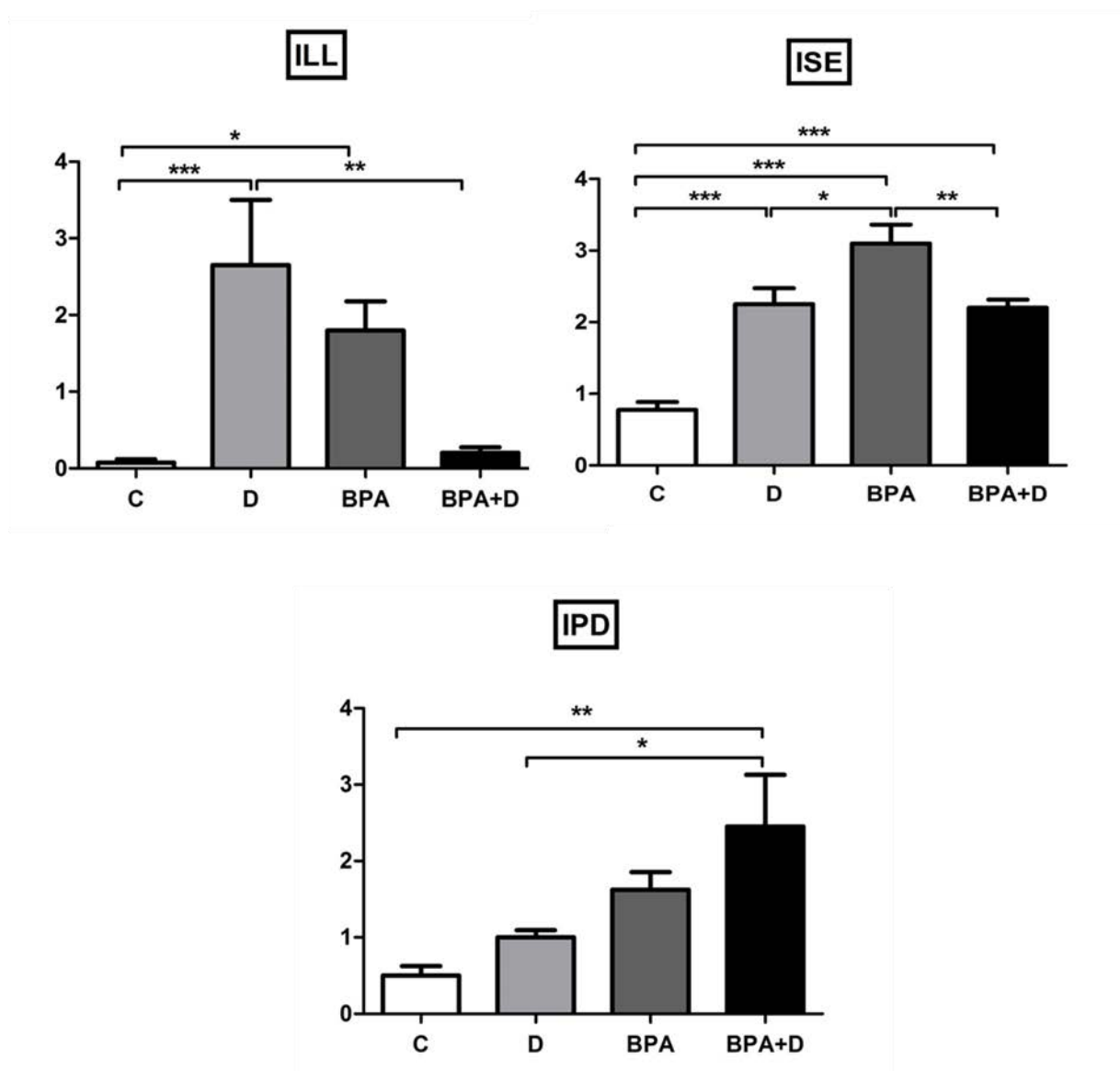


Figura 21. Componentes teciduais do lobo Dorsolateral de gerbilos adultos. Volume absoluto dos componentes teciduais (mm^3) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 21

LOBO DORSOLATERAL

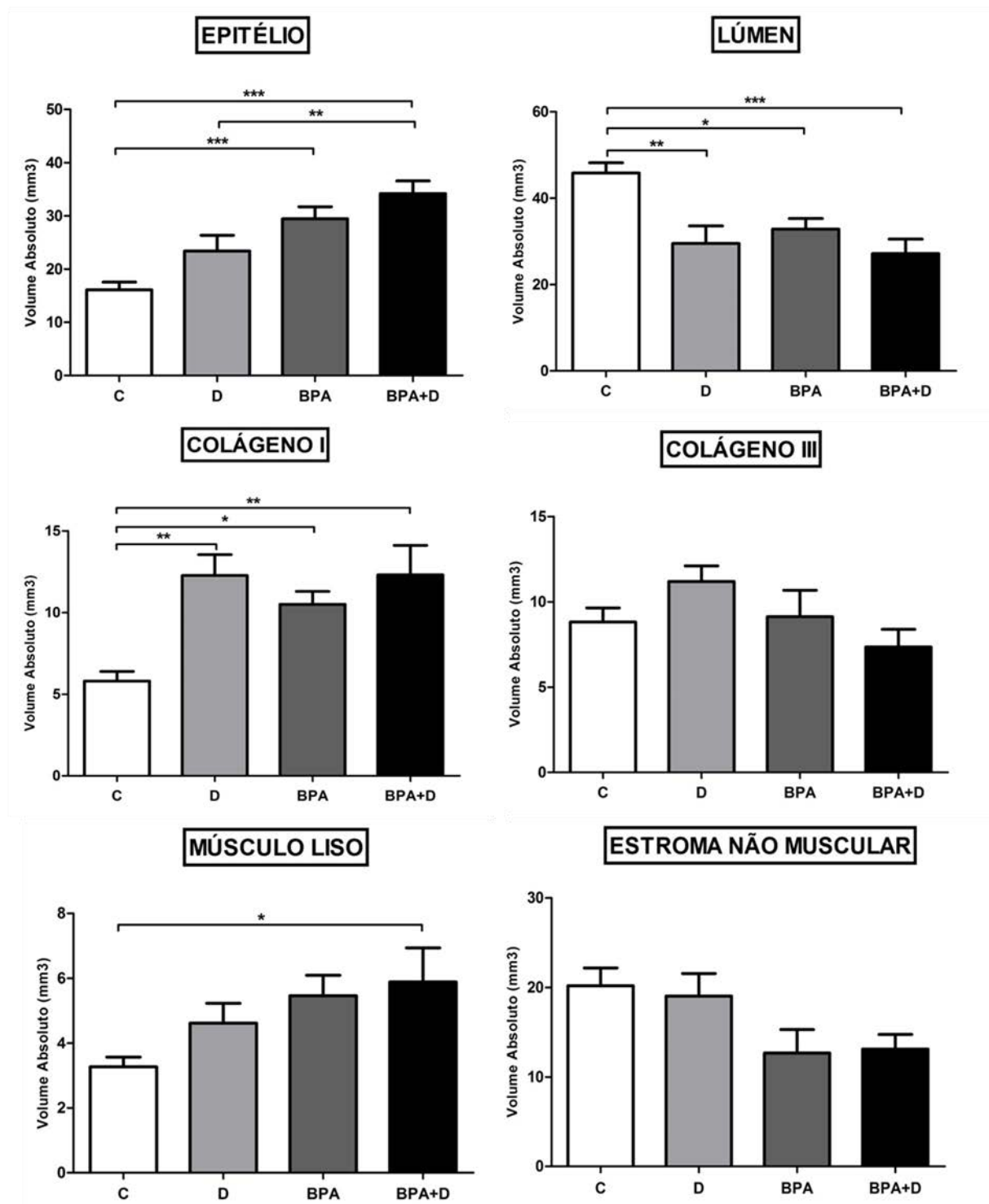


Figura 22. Componentes teciduais do lobo Ventral de gerbilos adultos. Volume absoluto dos componentes teciduais (mm^3) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 22

LOBO VENTRAL

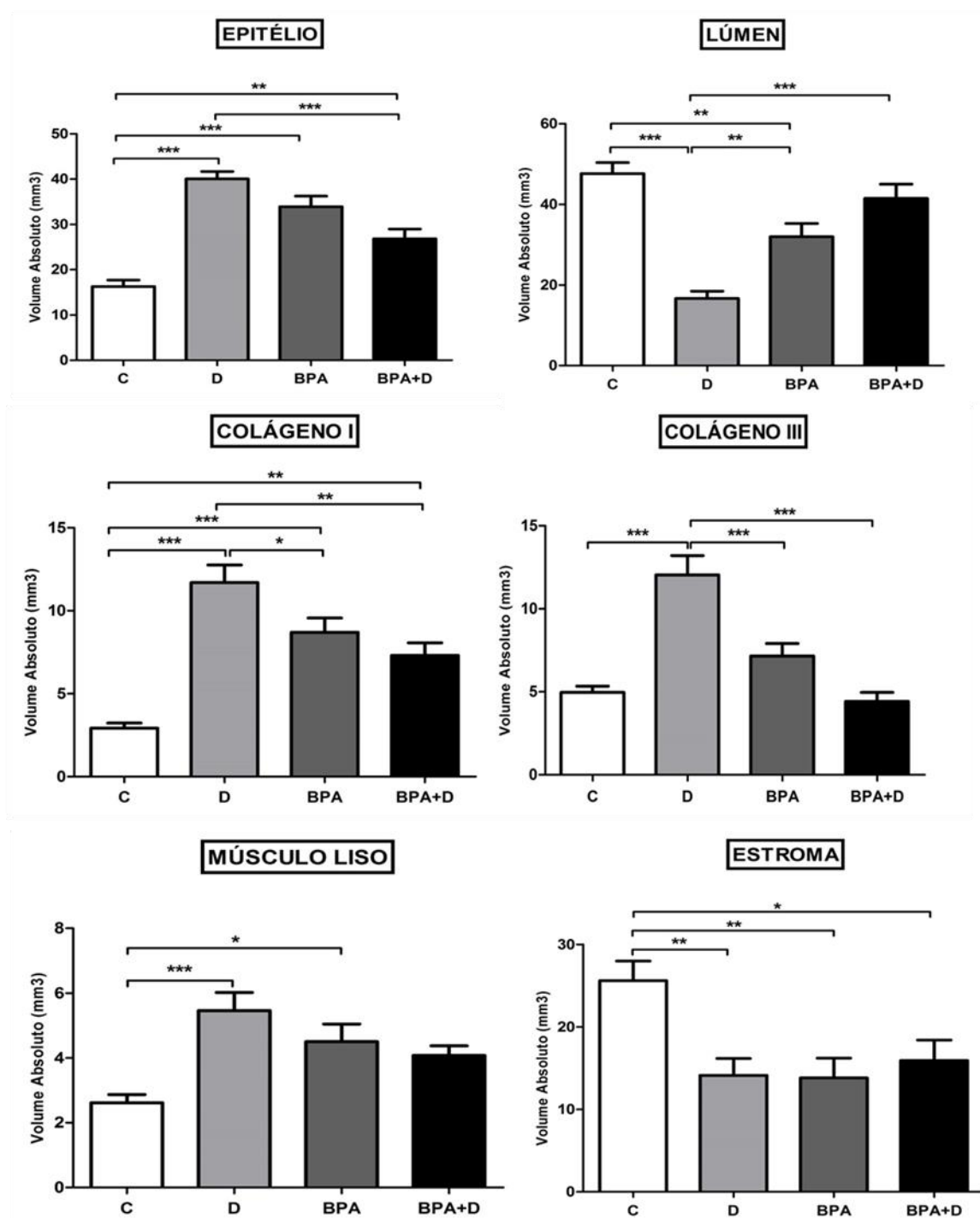


Figura 23. Lobo Dorsolateral e Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A e B.** Epitélio prostático íntegro, circundado por finas camadas de colágeno subepitelial do tipo I (Cabeça de Seta) e do tipo III (Seta) dispostas paralelamente à membrana basal. **C.** Carcinoma Microinvasivo acometendo o lobo Dorsolateral do grupo Dieta. Notar intensa fragmentação dos elementos colagênicos (setas). **D.** Carcinoma Microinvasivo acometendo o lobo Ventral da próstata do gerbilo. Nota-se a invasão do estroma por células neoplásicas por meio da membrana basal. Os elementos colagênicos (cabeça de seta) sofreram intensa fragmentação dispondo-se perpendicularmente à membrana basal. **E, F.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Notar início de desestruturação dos elementos de matriz extracelular (seta) associados a esse sítio neoplásico. **G.** Ácino com Carcinoma Microinvasivo (CM). Observa-se reestruturação dos elementos colagênicos (seta) nesse sítio neoplásico, caracterizando o processo de invasão estromal. **H.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Notar início de desestruturação dos elementos de matriz extracelular (setas). **A, B.** Grupo Controle. **C, D.** Grupo Dieta Hiperlipídica. **E, F.** Grupo Bisfenol A. **G, H.** Grupo Bisfenol A mais Dieta Hiperlipídica. **A, C, E, G.** Lobo Dorsolateral. **B, D, F, H.** Lobo Ventral. **A-H.** Reticulina de Gömöri.

FIGURA 23

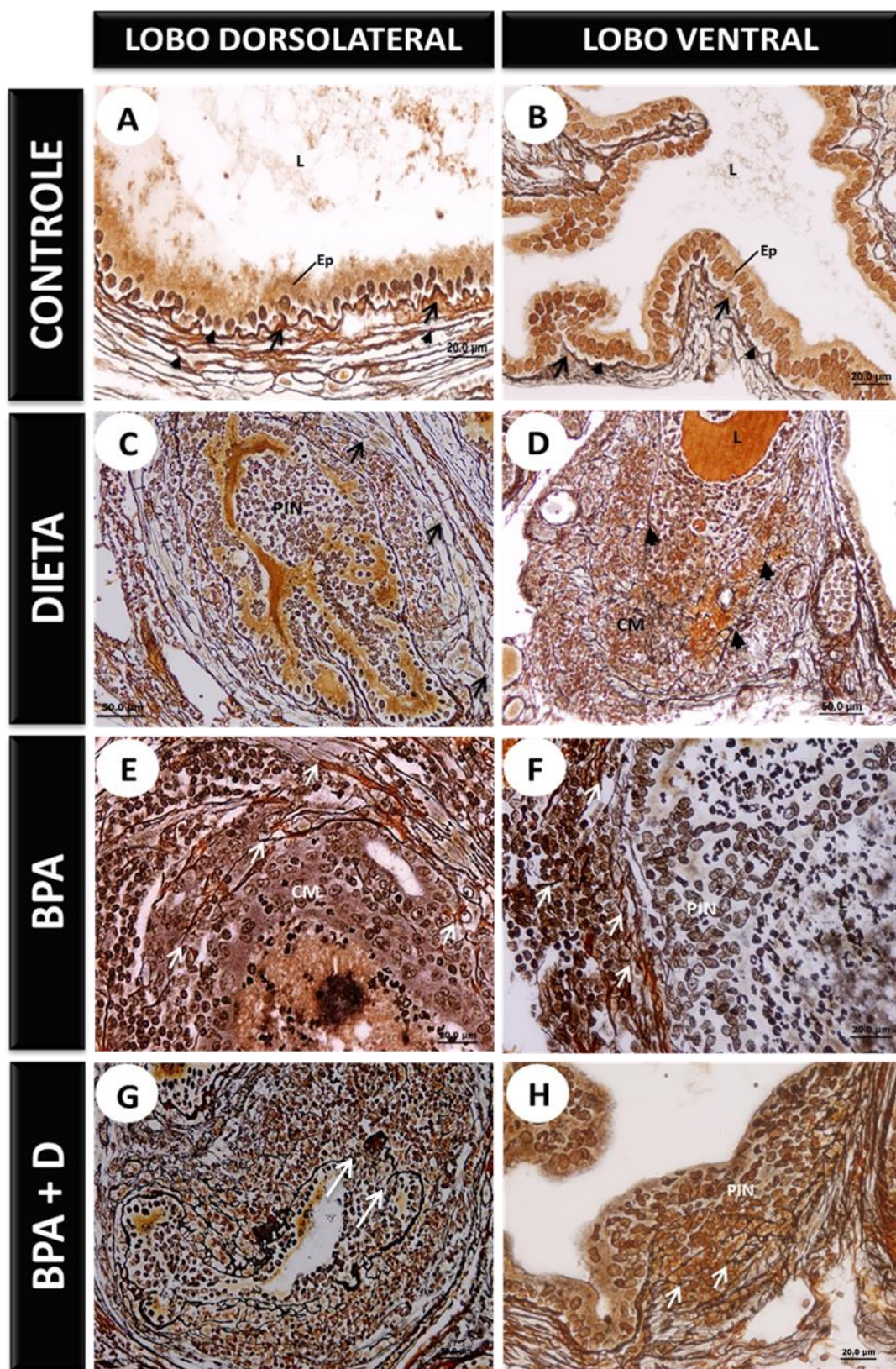


Tabela I. Teor de nutrientes das dietas.

Parâmetros	Controle	Hiperlipídica e Hiper calórica
	RC Focus 1765	RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416
Proteína (%)	22	20
Carboidrato (%)	48	37
Gordura Saturada (%)	4	20
Calorias (Kcal/g)	3,16	4,8
Outros (%)*	26	23

*Vitaminas, minerais e água

4. Artigo 1: IMUNOEXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ANDRÓGENO E ESTRÓGENO NA PRÓSTATA DE GERBILOS ADULTOS APÓS EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO BISFENOL A E A DIETA HIPERLIPÍDICA.

Camila Helena Facina¹, Bianca Facchim Gonçalves², Sebastião Roberto Taboga³.

1 Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2 Instituto de Biociências IBB/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Correspondência: Sebastião Roberto Taboga (taboga@ibilce.unesp.br) - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP. Rua Cristovão Colombo 2265 – Jardim Nazareth. São José do Rio Preto – SP. CEP: 15054-000. Brasil - (17) 3221-2386.

RESUMO

O câncer de próstata é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens. A patologia molecular dessa doença é bastante complexa, pois além de altamente relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno-dependentes, é também influenciada por hormônios sexuais, respostas imunes e inflamatórias, fatores ambientais e dietas. Estudos recentes têm demonstrado que a exposição à desreguladores endócrinos, como o Bisfenol A, presentes no meio ambiente, pode causar alterações morfofisiológicas permanentes na glândula. Outro fator ambiental potencialmente associado com a carcinogênese é a dieta rica hiperlipídica. O consumo excessivo de gordura, e o tipo de gordura ingerida exerce influência direta sobre o risco de câncer de próstata. Por muitos anos tem-se especulado os mecanismos que determinam a relação entre o consumo de gordura e o risco de câncer de próstata e tem sido determinado que alguns fatores como os níveis hormonais e o estresse oxidativo são afetados pelo tipo de dieta. Consideráveis evidências têm apontado que alterações nos níveis androgênicos, estimuladas pelo consumo de dietas ricas em gordura, podem elevar o risco de câncer prostático, uma vez que esta doença sofre forte influência hormonal. Os objetivos do presente estudo são avaliar a morfologia prostática após a administração prolongada do bisfenol A e da dieta hiperlipídica e, investigar o possível envolvimento dos receptores de andrógeno e estrógeno na carcinogênese estimulada por bisfenol A e dieta hiperlipídica e pela associação de ambos. A análise morfológica evidenciou a presença de lesões de caráter pré-maligno e maligno, em ambos os lobos prostáticos, dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação de ambos. Foi possível notar que, ambos os lobos dos grupos tratados, apresentaram uma frequência de células AR positivas bastante semelhantes. A dieta, o bisfenol A e a associação de ambos aparentemente estimulou um aumento na frequência de células AR positivas mesmo em áreas livres de lesões. A frequência de células ER β -positivas é aparentemente maior na próstata de animais controle. Em alguns focos neoplásicos estimulados pela dieta, pelo bisfenol A ou pela associação de ambos, a presença de células ER β positivas foi baixa ou indetectável. Por outro lado, algumas poucas lesões foram observadas expressando ER β . Os níveis séricos de testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados com dieta hiperlipídica, bisfenol A e a associação de ambos. No entanto, houve uma tendência de aumento estimulada pelos diferentes tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Bisfenol A. Dieta Hiperlipídica. AR. ER β . Próstata.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e cura (Huynh *et al.*, 2001). No entanto, a patologia molecular dessa doença é bastante complexa, pois além de altamente relacionada à idade, a fatores hereditários e andrógeno-dependentes, é também influenciada por hormônios esteroides sexuais, respostas imunes e inflamatórias, fatores ambientais e dietas (Carruba, 2006; De Marzo *et al.*, 2007). Estudos recentes têm demonstrado que a exposição a desreguladores endócrinos, presentes no meio ambiente, pode causar alterações morfológicas e fisiológicas permanentes na glândula prostática (Prins *et al.*, 2008). Estas substâncias tem o potencial de causar danos ao sistema endócrino, pois mimetizam hormônios esteroides podendo afetar sua ação e agir diretamente sobre os órgãos do trato reprodutivo. Dentre estes químicos ambientais destaca-se o bisfenol A (BPA). O BPA é um monômero liberado de polímeros plásticos amplamente utilizados na atualidade (Prins *et al.*, 2007). Esta substância pode alterar a histofisiologia prostática, uma vez que mimetiza estrógenos e compete com os receptores para esses hormônios (Prins *et al.*, 2008). A afinidade de ligação do BPA ao ER α e ER β é cerca de 10.000 vezes menor do que a dos estrógenos endógenos. Contudo, ele é um completo agonista destes receptores estrogênicos (Prins *et al.*, 2008). Atualmente, o BPA tem sido encontrado no soro e na urina de 95% da população mundial, em níveis que atingem de 0,2 a 20 ng/mL. De acordo com a Agência Americana de Proteção Ambiental a dose considerada segura para ingestão diária de BPA é de 50ug/kg/dia (Alonso - Magdalena *et al.*, 2011), entretanto, estudos tem mostrado efeitos adversos desta substância em concentrações inferiores, quando administrada no período fetal ou início do período pós natal, sobre o trato reprodutivo de roedores (Ho *et al.*, 2006; Prins *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013).

Outro fator ambiental potencialmente associado com a carcinogênese é a dieta rica em lipídeos saturados. Vários estudos epidemiológicos têm relacionado este fator às altas taxas de mortalidade por cânceres de mama, cólon, pâncreas e próstata em humanos (Fleshner *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 1994). O consumo excessivo de gordura, e o tipo de gordura ingerida exerce influência direta sobre o risco de câncer de próstata (Escobar *et al.*, 2009). Por muitos anos tem-se especulado os mecanismos que

determinam a relação entre o consumo de gordura e o risco de câncer de próstata e tem sido determinado que alguns fatores como os níveis hormonais e o estresse oxidativo são afetados pelo tipo de dieta. Consideráveis evidências têm apontado que alterações nos níveis androgênicos, estimuladas pelo consumo de dietas ricas em gordura, podem elevar o risco de câncer prostático, uma vez que esta doença sofre forte influência hormonal (Fleshner *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que o BPA, é capaz de influenciar a regulação da transcrição de envolvidos com a obesidade podendo promover aumento do peso corporal e da adiposidade. Resultados preliminares do nosso grupo empregando o roedor gerbilo (*Meriones unguiculatus*) como modelo para estudos sobre alterações na glândula prostática indicam que a dieta hiperlipídica e o BPA isoladamente têm o potencial de promover o aumento da incidência de neoplasias prostáticas (Facina 2012, dados não publicados). No entanto, os efeitos de sua associação sobre indivíduos adultos não foi verificado e, os resultados obtidos poderão auxiliar na compreensão do processo de carcinogênese nesse roedor. Os objetivos do presente estudo são avaliar a morfologia prostática após a administração prolongada do desregulador endócrino bisfenol A e da dieta hiperlipídica e, investigar o possível envolvimento dos receptores de andrógeno e estrógeno na carcinogênese estimulada por bisfenol A e dieta hiperlipídica e pela associação de ambos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os procedimentos envolvidos foram apreciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP (Prot. No. 079/2013).

Foram utilizados vinte e quatro gerbilos adultos machos (*Meriones unguiculatus*), com 100 dias de idade mantidos no biotério do grupo de pesquisa em *Biologia da Reprodução* do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, *campus* de São José do Rio Preto (SP). Esses animais foram mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, com regime alimentar específico (Tabela I).

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos (n=6 por grupo), como descritos abaixo:

- **Grupo Controle (C):** animais que receberam ração controle (RC Focus 1765, Agrocere[®]).
- **Grupo Bisfenol A (BPA):** animais que receberam ração controle (RC Focus 1765, Agrocere[®]) + BPA na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber.
- **Grupo Dieta Hiperlipídica (D):** animais submetidos à dieta hiperlipídica (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®]).
- **Grupo Dieta Hiperlipídica + Bisfenol A (D+BPA):** animais submetidos à dieta hiperlipídica (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®]) + BPA na concentração de 50µg/kg/dia na água de beber.

A eutanásia dos animais aconteceu 6 meses após o início do experimento. O período de dissecação estipulado foi definido de acordo com estudos anteriores envolvendo carcinogênese prostática em gerbilos (Zanetoni, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010a; 2013). Os animais foram mortos por superdosagem de anestésico e decapitados para a coleta de sangue que foi submetido à dosagem hormonal de testosterona.

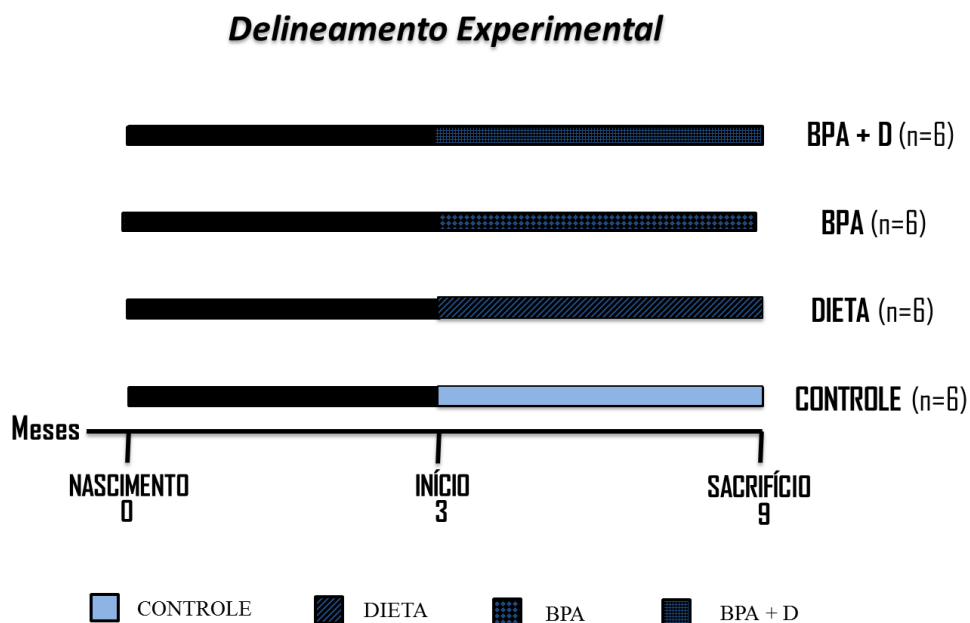


Figura 1: Delineamento Experimental do estudo

Análise Morfológica

Os lobos Dorsolateral e Ventral foram fixados por imersão em paraformaldeído recém preparado em tampão fosfato (pH 7,2), para processamento em parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo (4 μ m de espessura) e aderidos em lâminas de vidro e corados pelos seguintes métodos histoquímicos: **Coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE)** – Para estudos morfológicos gerais da próstata e diagnósticos histopatológicos, classificação dos tipos de lesões (pré-malignas e malignas); **Picrossírius-Hematoxilina** – Para estudo das fibras de colágeno no estroma prostático.

As lesões histopatológicas detectadas foram classificadas de acordo com o sistema de Classificação Bar Harbor para próstata de camundongos (Shappell *et al.*, 2004).

Análise Estereológica

Medidas relativas à altura do epitélio e espessura da camada muscular foram realizadas. Foram capturadas imagens de 30 campos de cada grupo, em aumento de 100x, (5 campos por animal, n=6) a partir de lâminas coradas pela técnica HE, por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics.

Análise Imunohistoquímica

Caracterização do painel de lesões histopatológicas identificadas, buscando determinar o grau de severidade estimulado por cada tratamento:

- α -actina de músculo liso: Anti- α -actina (Mouse Monoclonal, Clone IA4), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

Verificação de possíveis alterações na expressão de receptores hormonais em células epiteliais e estromais componentes de lesões:

- Receptor de andrógeno: Anti-AR (N-20), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).
- Receptores de estrógeno: Anti-ER β (H-150), (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia).

Caracterização dos macrófagos tipo I no estroma prostático:

- CD163: Anti CD163 (Antibody (ED2) Mouse Monoclonal sc-58965), (Santa Cruz Biothechnology, Califórnia).

Procedimentos gerais para as avaliações imunohistoquímicas: Os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica

em tampão citrato pH 6.0 a 97°C (15-30 min.). O bloqueio de peroxidases endógenas foi efetuado com H₂O₂ (3% em metanol) (20-30 min). Anticorpos primários (monoclonais ou policlonais) para os componentes acima mencionados foram utilizados em diluições variadas (entre 1:20, 1:50 e 1:200) por 60-120 minutos a 37° ou overnight a 4°C. Após serem lavados em PBS ou TBS e incubados com anticorpos secundários marcados com peroxidase, os cortes passaram pela revelação com a diaminobenzidina (DAB, Sigma). A contracoloração dos cortes foi feita hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

Contagem de núcleos com marcações positivas para AR

Um total de 40 campos foram obtidos, em aumento de 40x, por grupo (n= 6 animais/grupo) e por lobo, por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. A frequência relativa de células AR positivas por campo foi determinada pelo número de células marcadas em relação ao número total de células.

Contagem de núcleos com marcações positivas para ERβ

Um total de 40 campos foram obtidos, em aumento de 40x, por grupo (n= 6 animais/grupo) e por lobo, por meio do Sistema Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus. A frequência de células ERβ positivas por campo foi determinada pelo número de células marcadas em relação ao número total de células.

Dosagem hormonal sérica

As amostras de sangue foram coletadas após decapitação e o plasma foi separado por centrifugação a 1200g e congelado a -80 ° C para análise dos níveis de testosterona. As medições foram realizadas por captura/ ELISA sanduíche (anticorpo-antígeno-anticorpo), utilizando kits comerciais específicos (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA), com sensibilidade de 14,0 pg/mL e variação de intensidade de 11,3 pg/mL. As leituras foram realizadas Sistema Espectrofotômetro Epoch Multi-Volume (BioTek Instruments, VT, EUA).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.00. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA one-way seguido de Tukey e para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn. Dados com o valor de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Análise Morfológica

A análise morfológica permitiu avaliar o fenótipo e a distribuição das lesões histopatológicas que acometeram o tecido prostático após 6 meses de tratamento. Lesões de caráter pré-maligno e maligno foram constatadas nos animais submetidos a dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação de ambos (Figura 2 e 3). Foi possível notar um maior número e uma maior extensão das lesões nos grupos tratados quando estes foram comparados ao grupo controle. Dentre as lesões, a mais comum foi a Neoplasia Intraepitelial Prostática, caracterizada por anormalidades genéticas e perda de controle da função celular e comprometimento das unidades glandulares. Essas lesões apresentaram crescimento papilar, formando invaginações epiteliais restritas a determinados sítios ou aspecto cribiforme (Figura 2 e 3). Também foi possível observar lesões de caráter maligno, formadas por um maior número de células atípicas, ruptura da camada de células musculares lisas periacinares com migração das células epiteliais para o estroma prostático (Figura 2 e 3). Associadas às lesões epiteliais notou-se a presença de desordens inflamatórias (Inflamações Intraluminais, Inflamações Periductais e Inflamações Subepiteliais) em ambos os lobos dos grupos tratados (Figura 2 e 3). Além disso, foi possível observar um grande número de macrófagos do tipo I associados às áreas acometidas por alguma classe de lesões (Figura 2 e 3).

Análise Estereológica

A análise estereológica evidenciou um aumento da altura epitelial em ambos os lobos dos grupos tratados, principalmente quando se associou a dieta hiperlipídica com o desregulador endócrino bisfenol A (Figura 4). Ao se tratar da espessura da camada muscular lisa foi possível notar uma tendência de aumento desta camada em ambos os lobos dos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

Análise Imunohistoquímica

A análise da expressão de AR na próstata do gerbilo mostrou que, há uma diferença significativa entre o grupo Controle e os grupos tratados (Figura 5). Foi possível notar que, ambos os lobos dos grupos tratados, apresentam uma frequência de células AR positivas bastante semelhantes (Figura 5A,B). A imunomarcagem para esse receptor foi detectada na maioria das células secretoras e mostrou distribuição homogênea entre as diferentes regiões do lobo. A dieta, o bisfenol A e a associação de ambos aparentemente estimulou um aumento na frequência de células AR positivas mesmo em áreas livres de lesões. A frequência de células AR positivas foi maior em áreas de lesões histopatológicas, principalmente dos grupos tratados (Figura 6).

A frequência de células ER β -positivas é aparentemente maior na próstata de animais controle (Figura 7). Nos animais tratados a frequência dessas células é menor ou semelhante ao grupo Controle (Figura 7). Em alguns focos neoplásicos estimulados pela dieta, pelo bisfenol A ou pela associação de ambos, a presença de células ER β -positivas foi baixa ou indetectável (Figura 8). Por outro lado, algumas poucas lesões foram observadas expressando ER β (Figura 8)

Dosagem hormonal sérica

Os níveis séricos de testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados com dieta hiperlipídica, bisfenol A e a associação de ambos, quando comparados ao grupo controle. No entanto, houve uma tendência de aumento estimulada pelos diferentes tratamentos (Figura 9).

DISCUSSÃO

A dieta, o bisfenol A e associação de ambos estimulou o desenvolvimento de lesões histopatológicas na próstata do gerbilo. Dentre as lesões, a mais comum foi a Neoplasia Intraepitelial Prostática, caracterizada por anormalidades genéticas e perda de controle das funções (Zanetoni, 2007; Gonçalves *et. al.*, 2010). Foi possível constatar um maior número de células atípicas nessas lesões, ocasionado pela maior extensão das mesmas, além do comprometimento das unidades glandulares. Além disso, foi possível observar a presença de lesões de caráter maligno, caracterizadas pela ruptura das células da camada muscular lisa periácinar e migração das células em direção ao estroma. Como descrito por Facina e colaboradores (2015, dados não publicados) há um aumento da incidência e da multiplicidade de lesões prostáticas frente o tratamento com a dieta hiperlipídica e o bisfenol A.

A população celular bem como os mediadores químicos presentes no microambiente tumoral podem contribuir para progressão da neoplasia ou para sua inibição e controle (Balkwill & Coussens, 2004; Visser & Coussens, 2005). Os macrófagos desempenham uma diversidade de papéis. Podem contribuir tanto com eventos de combate, pela produção de IL-2 IL-12 e IL-18 (estimulantes do sistema imune) e mediadores da citotoxicidade tumoral (TNF- α) quanto com eventos de crescimento e progressão, pela produção de fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- β , e em algumas condições pela secreção de metaloproteinases e VEGF (Coussens & Werb, 2002).

Os mecanismos pelos quais a dieta e bisfenol A promove o desenvolvimento do câncer de próstata são incertos. Estudos prévios sugerem que alterações na ação androgênica nesta glândula, pode ser um mecanismo potencial (Fleshner, 2004). Segundo Cai (2006), lesões histopatológicas espontâneas, bem como as induzidas quimicamente, podem ser reforçadas por altos níveis de testosterona. Assim, desequilíbrios hormonais como diferenças nos níveis séricos de testosterona, associados ao tratamento com a dieta hiperlipídica, bisfenol A ou ambos podem ter contribuído para a evolução de alterações histopatológicas nos ácinos prostáticos.

A expressão do receptor de andrógeno foi detectada em próstatas intactas e em lesões pré-malignas e malignas nos diferentes grupos, o que sugere o envolvimento do receptor no processo de estabelecimento tumoral na próstata do gerbilo. O receptor de

andrógeno é expresso durante vários estágios da carcinogênese prostática, desde estágios iniciais como a PIN até tumores primários invasivos ou metastáticos e antes ou após terapia antiandrogênica (Koochekpour, 2010). O crescimento tumoral depende da relação entre a taxa de proliferação e morte celular e os andrógenos são os principais reguladores deste processo, estimulando a proliferação e inibindo a apoptose (Feldman & Feldman, 2001). Assim as células tumorais necessitam de um nível de estimulação androgênica para se multiplicarem (Denmeade *et al.*, 1996). Próstatas de animais submetidos à dieta hiperlipídica, ao bisfenol A e a associação dos dois compostos mostraram maior expressão do receptor de andrógeno, o que explica o maior índice proliferativo e o maior número de lesões histopatológicas.

Receptores de estrógeno são encontrados no epitélio (ER- β) e no estroma (ER- α) prostáticos, indicando uma ação direta desse hormônio na glândula (Royuela *et al.*, 2001; Imamov *et al.*, 2004). Acredita-se, também, que estrógenos influenciem o crescimento prostático, indiretamente, por ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, o que resulta na supressão por *feedback* de produção de testosterona testicular (Risbridger *et al.*, 2001; Bianco *et al.*, 2002). Alterações dinâmicas na expressão do ER- β tem sido observadas durante a progressão do câncer de próstata, o que sugere que a ação estrogênica via ER β pode exercer papel importante no processo carcinogênico (Prins, 2008). Muitos estudos estão de acordo que há uma redução na expressão deste receptor com a progressão da carcinogênese (Prins & Korach, 2008; Asgari & Morakabati, 2011). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram algumas lesões que exibiram menor expressão de ER β , nas quais se pode observar extensos focos inflamatórios associados. Uma possível explicação para tal fato seria o papel anti-inflamatório exercido pelo ER β , que quando ausente, deixa de desempenhar sua função protetora sobre a glândula prostática. Isso se apoia no fato de que lesões que expressaram o ER β não estiveram associadas com inflamação. Estudos afirmam que o ER β exerce um papel imunoprotetor sobre a glândula prostática possivelmente limitando o dano tecidual ou modulando o estímulo para a infiltração de células imunes (Prins & Korach, 2008).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que houve um aumento no número e na severidade das lesões prostáticas em ambos os lobos dos grupos tratados. Os lobos Ventral e Dorsolateral apresentaram uma frequência de células AR positivas bastante semelhantes. A dieta, o bisfenol A e a associação de ambos aparentemente estimulou um aumento na frequência de células AR positivas mesmo em áreas livres de lesões. A frequência de células AR positivas foi maior em áreas de lesões histopatológicas, principalmente dos grupos tratados. Em relação a frequência de células ER β -positivas foi possível notar que esta é maior na próstata de animais controle. Nos animais tratados a frequência dessas células é menor ou semelhante ao grupo Controle. Em alguns focos neoplásicos estimulados pela dieta, pelo bisfenol A ou pela associação de ambos, a presença de células ER β positivas foi baixa ou indetectável. Por outro lado, algumas poucas lesões foram observadas expressando ER β . No entanto, estudos complementares como análise da expressão dos receptores de andrógeno e estrógeno por meio da técnica de Western blotting são necessários para melhor compreender as alterações histopatológicas encontradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Magdalena, P. Quesada I, Nadal A. 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.** 7, 346–353.
- Asgari M, Morakabati A. 2011. Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinomas. **Diagnostic Pathology**, v.6, n.6.
- Balkwill F; Coussens LM. 2004. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 405-6.
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP. 2002. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. **Endocrinol** v.143, n.12, p.4922-4933.
- Cai, LQ, Imperato-McGinley, J and Zhu, YS. 2006. Regulation of prostate 5 α -reductase-2 gene expression and prostate weight by dietary fat and caloric intake in the rat. **Prostate**, 66: 738–748. doi: 10.1002/pros.20397.
- Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. 2013. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. **PLoS One**. 8(2):e55905.
- Carruba G. 2006. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci** v.1089, p.201-217.
- Coussens LM, Werb, Z. 2002. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p.19-26.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**. v.7, n.4, p.256-69.
- Denmeade, SR., Lin, XS. & Isaacs, JT. 1996. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. **Prostate** v.28, p.251–265.
- Escobar EL, Gomes-Marcondes MC, Carvalho HF. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. **Prostate**, v.69, n.5, p.1-11.
- Feldman BJ & Feldman D. 2001. The Development of Androgen-independent prostate cancer. **Nat Rev Cancer**. v.1, p.34-45.
- Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. 2004. Dietary fat and prostate cancer. **J Urol** v.171, p.19–24.
- Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Campos SGP. 2010. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol**. v. 88, n.1, p.96-106.

- Gonçalves BF, Campos SGP, Zanetoni C, Scarano WR, Falleiros Júnior LR, Amorin RL, Góes RM, Taboga SR. 2013. A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. **Prostate**. doi: 10.1002/pros.22669.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant. **Cancer Res** 1: 5624–5632.
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TW. 2001. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **J Endocrinol** v.171, p.109-18.
- Imamov O, Morani A, Shin G-J, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson J-A. 2004. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. **Proc Natl Acad Sci** v.101, n.25, p.9375-9380.
- Kondo Y, Homma Y, Aso Y, Kakizoe T. 1994. Promotional effect of two-generation exposure to a high-fat diet on prostate carcinogenesis in ACI/Seg rats. **Cancer Res** v.23, p.6129-6132.
- Koochekpour S. 2010. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. **Asian J Androl**. v.12, n.5, p.639–657.
- Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reprod Toxicol**, 23(3): 374-382.
- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal exposure to estradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 102: 134-138.
- Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. 2011. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol**. Jan;31(1):1-9.
- Prins & Korach. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids** v.73, p. 233-244.
- Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G. 2001. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. **Endocrinol** v.142, n.5, p.2443-2450.
- Royuela M, Miguel MP, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua, R. 2001. Estrogen receptors α e β in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. **J Endocrinol** v.168, p.447-454.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus

report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Res** v.64, p.2270–2305.

Visser KE, Coussens LM. 2005. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, p. 1143–52.

Wang L, Yang JR, Yang LY, Liu ZT. 2008. Chronic inflammation in benign prostatic hyperplasia: implications for therapy. **Med Hypotheses** v.70, p.1021–1023.

Zanetoni C. 2007. Indução experimental de tumores na próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus*. Campinas. Tese de Doutorado – UNICAMP, Campinas.

Figura 2. Lobo Dorsolateral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Epitélio prostático íntegro. O epitélio do lobo dorsolateral apresenta células secretoras de formato cúbico e é circundado por uma camada espessa de células musculares lisas. **B, C e D.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar o epitélio anômalo, a diminuição da área luminal e a ruptura da camada de células musculares lisas (setas). **E.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas (ML) e por uma espessa camada de colágeno subepitelial (setas). **F.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Notar a reestruturação dos elementos colagênicos (setas). **G e H.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Observar a desestruturação dos elementos de matriz extracelular (setas) associados a esse sítio neoplásico. **I.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada de células musculares lisas (ML) (*). **J, K e L.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar rompimento da camada de células musculares lisas (setas). **M.** Grupo Controle com ausência de células CD163 positivas. **N, O, P.** Presença de células CD163 positivas. **A-D.** Hematoxilina-Eosina. **E-H.** Picrosírius-Hematoxilina. **I-L.** Imunohistoquímica para alfa-actina. **M-P.** Imunohistoquímica para CD163. Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células musculares lisas (ML), Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), Carcinoma Microinvasivo (CM).

FIGURA 2

Lobo Dorsolateral

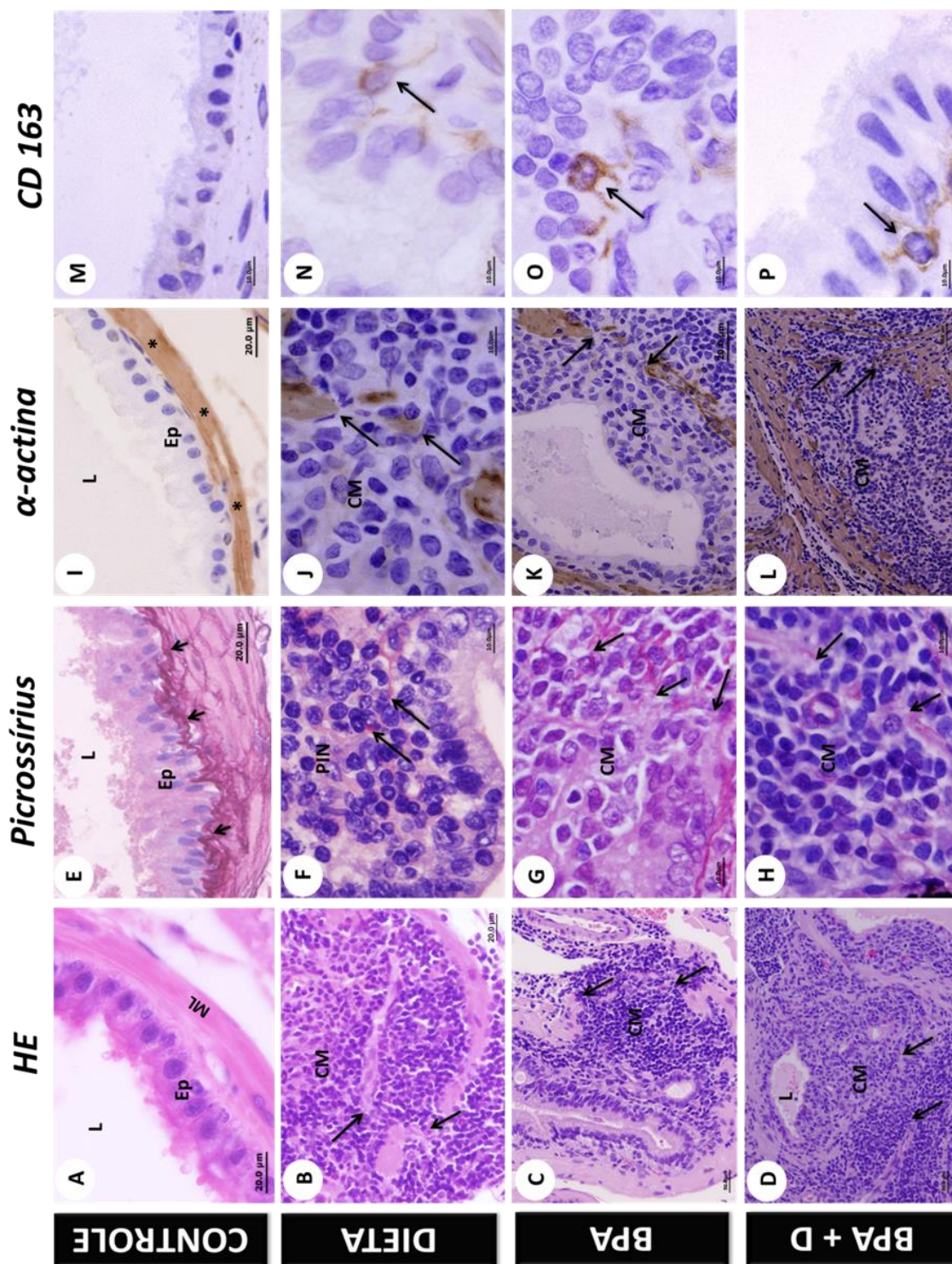


Figura 3. Lobo Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada delgada de células musculares lisas (ML). O epitélio apresenta células secretoras de formato cilíndrico. **B.** Epitélio prostático atípico, onde é possível observar a presença de Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), com invaginação do epitélio para o interior do lúmen. Notar início da desestruturação da camada de células musculares lisas periacinares (setas). **C.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Observa-se desestruturação da camada de células musculares lisas periacinares (setas), com as células epiteliais migrando para o estroma. **D.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática. Notar redução da área luminal. **E.** Epitélio prostático íntegro circundado por células musculares lisas e por finas camadas de colágeno subepitelial (setas). **F.** Ácino acometido com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). É possível notar a reestruturação dos elementos colagênicos (setas). **G.** Ácino com Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Observar reestruturação das fibras de colágeno. **H.** Ácino com Carcinoma Microinvasivo. Observar reestruturação das fibras de colágeno. **I.** Epitélio prostático íntegro, circundado por uma camada de células musculares lisas (ML) (*). **J.** Ácino com extensa ruptura da camada de células musculares lisas. (setas) **K.** Ácino acometido por Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN). Notar pontos de ruptura da camada de células musculares lisas periacinares (setas). **L.** Ácino acometido por Carcinoma Microinvasivo (CM). Notar a desestruturação da camada de células musculares lisas (setas). **M.** Grupo Controle com ausência de células CD163 positivas. **N, O, P.** Presença de células CD163 positivas. **A-D.** Hematoxilina-Eosina. **E-H.** Picrossírius-Hematoxilina. **I-L.** Imunohistoquímica para alfa-actina. **M-P.** Imunohistoquímica para CD163. Epitélio (Ep), Lúmen (L), Células musculares lisas (ML), Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), Carcinoma Microinvasivo (CM).

FIGURA 3

Lobo Ventral

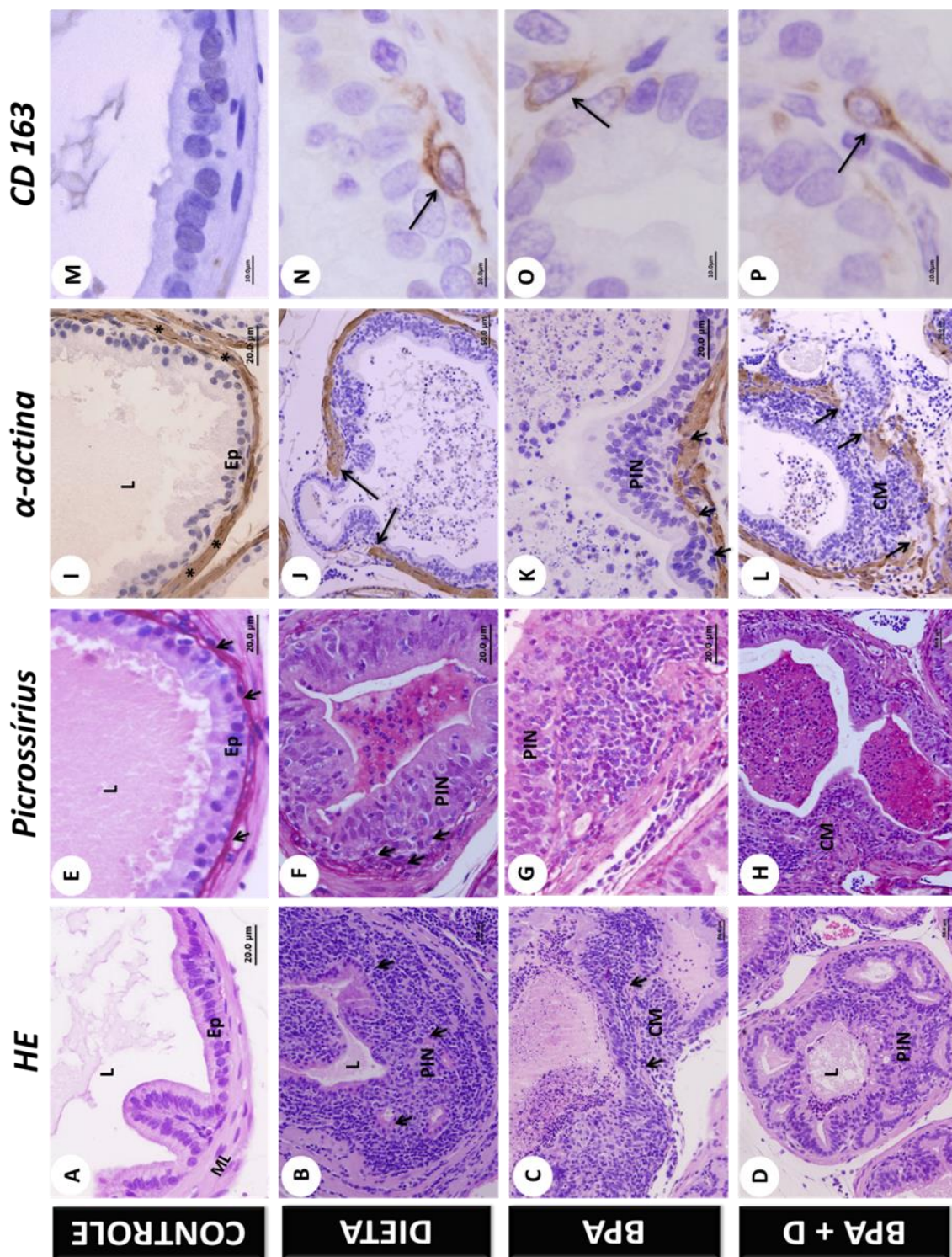
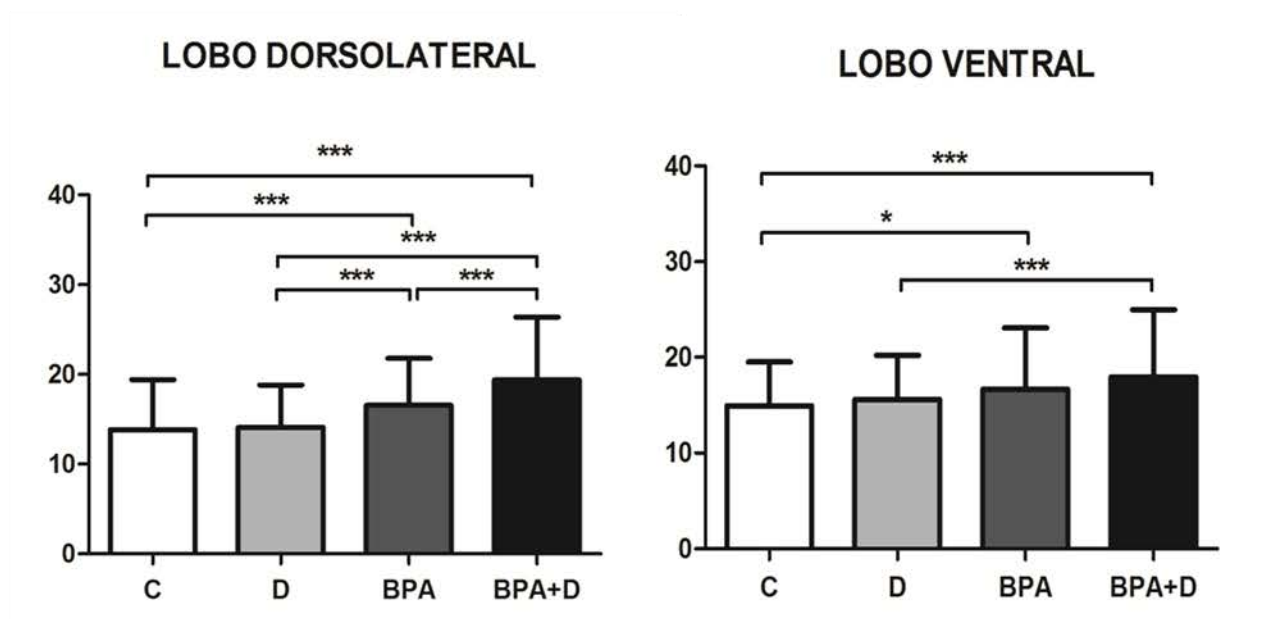


Figura 4. Análise morfométrica (Altura Epitelial e Espessura da camada de células musculares lisas) dos lobos Dorsolateral e Ventral de gerbilos, após 6 meses de tratamento. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0.05$). Os Superíndices (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$) indicam diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 4

Altura Epitelial



Espessura Camada Muscular Lisa

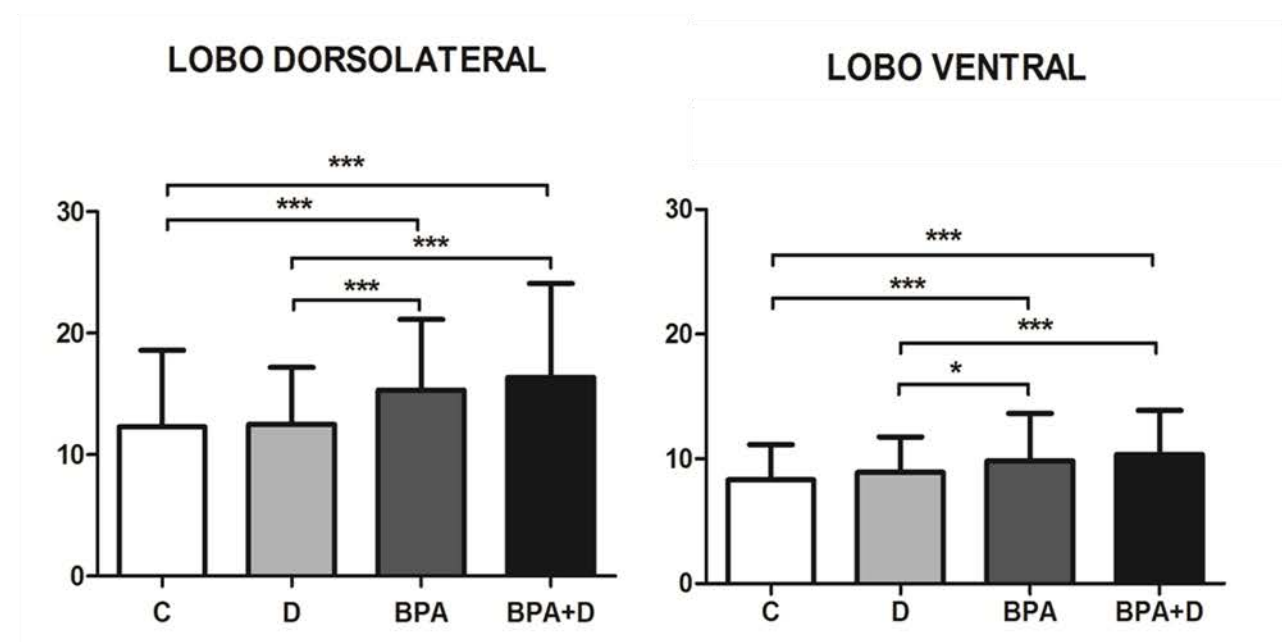


Figura 5. Frequência de células AR positivas na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos, após seis meses. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0.05$). O Superíndice (***) $p \leq 0,001$ indica diferenças significativas entre os grupos analisados.

FIGURA 5

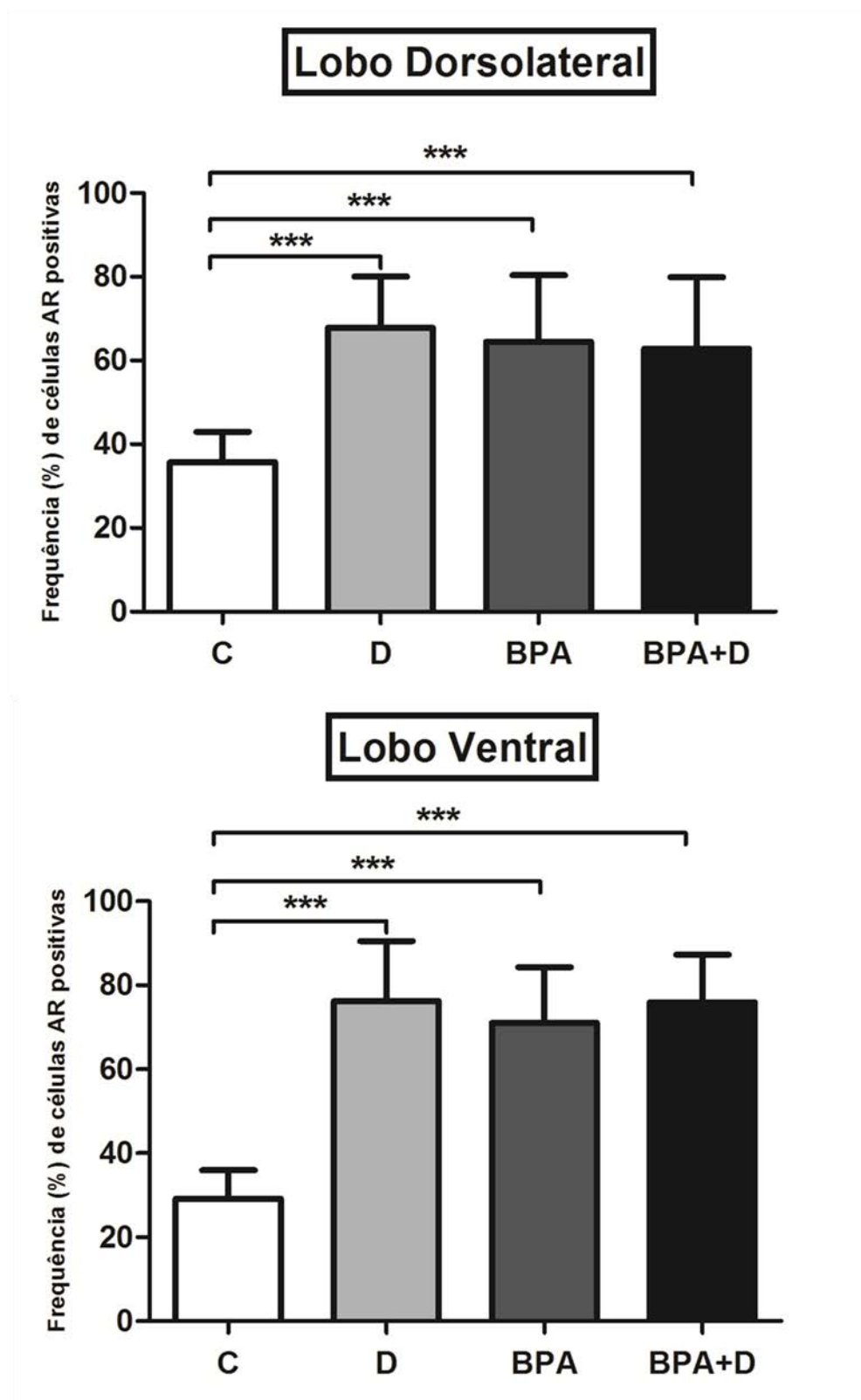


Figura 6. Imunolocalização do receptor de andrógeno (AR) nos lobos Dorsolateral e Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes tratamentos. **A e B.** Grupo Controle com menor número de células AR positivas em relação aos demais grupos. **C.** Expressão de AR em região com Neoplasia Intraepitelial Prostática. **D.** Ácino com atípias celulares expressando grande quantidade de AR. **E.** Ácino com epitélio atípico expressando grande quantidade de AR. **F.** Lesão pré-maligna no lobo Ventral do grupo BPA expressando grande quantidade de AR. **G.** Ácino do lobo Dorsolateral do grupo BPA + D, acometido por PIN, mostrando expressão de AR na maioria das células epiteliais. **H.** Lesão pré-maligna no lobo Ventral do grupo BPA + D expressa o receptor de andrógeno.

FIGURA 6

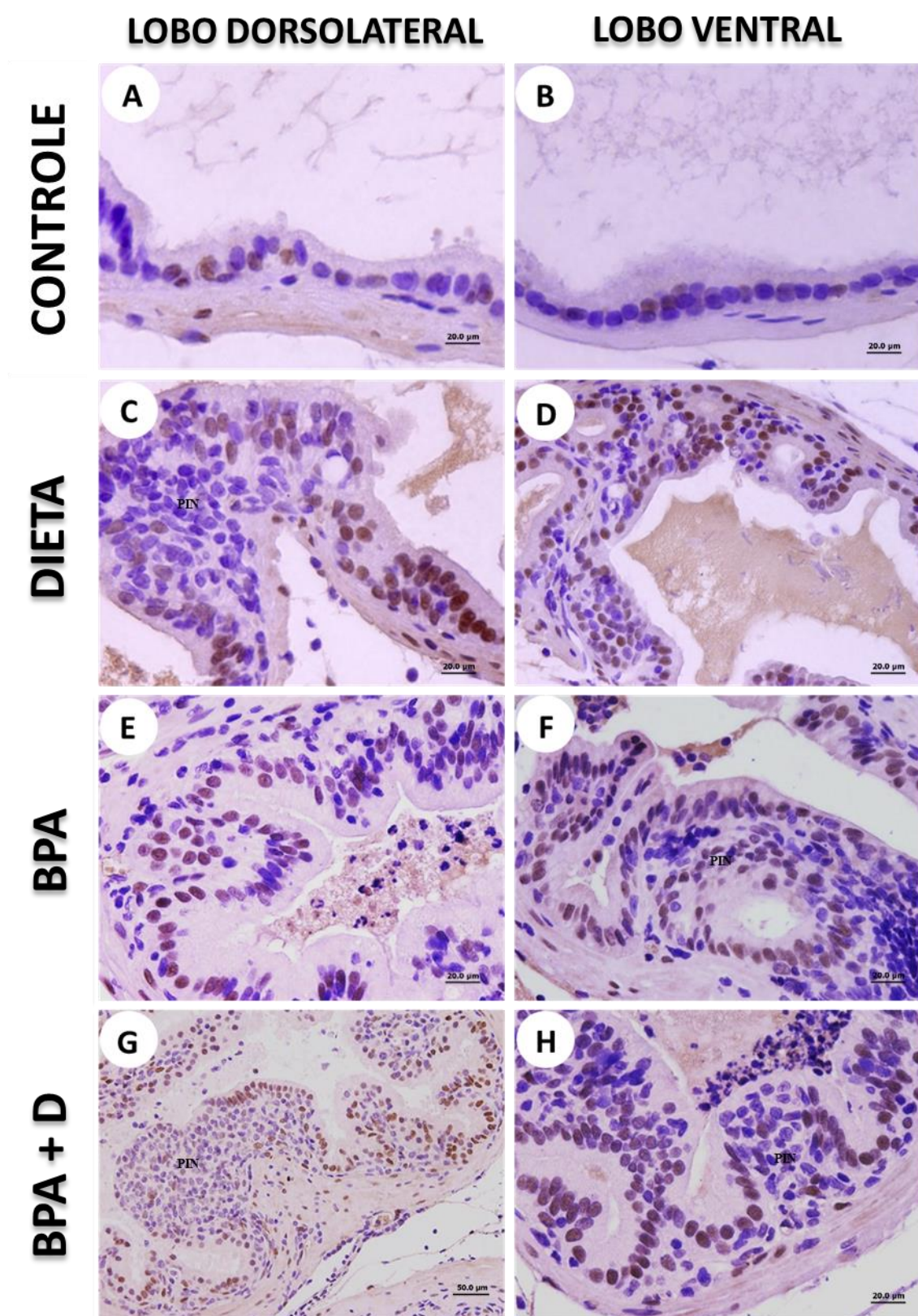


Figura 7. Frequência de células ER β -positivas na próstata de gerbilos adultos submetidos a diferentes tratamentos, após seis meses.

FIGURA 7

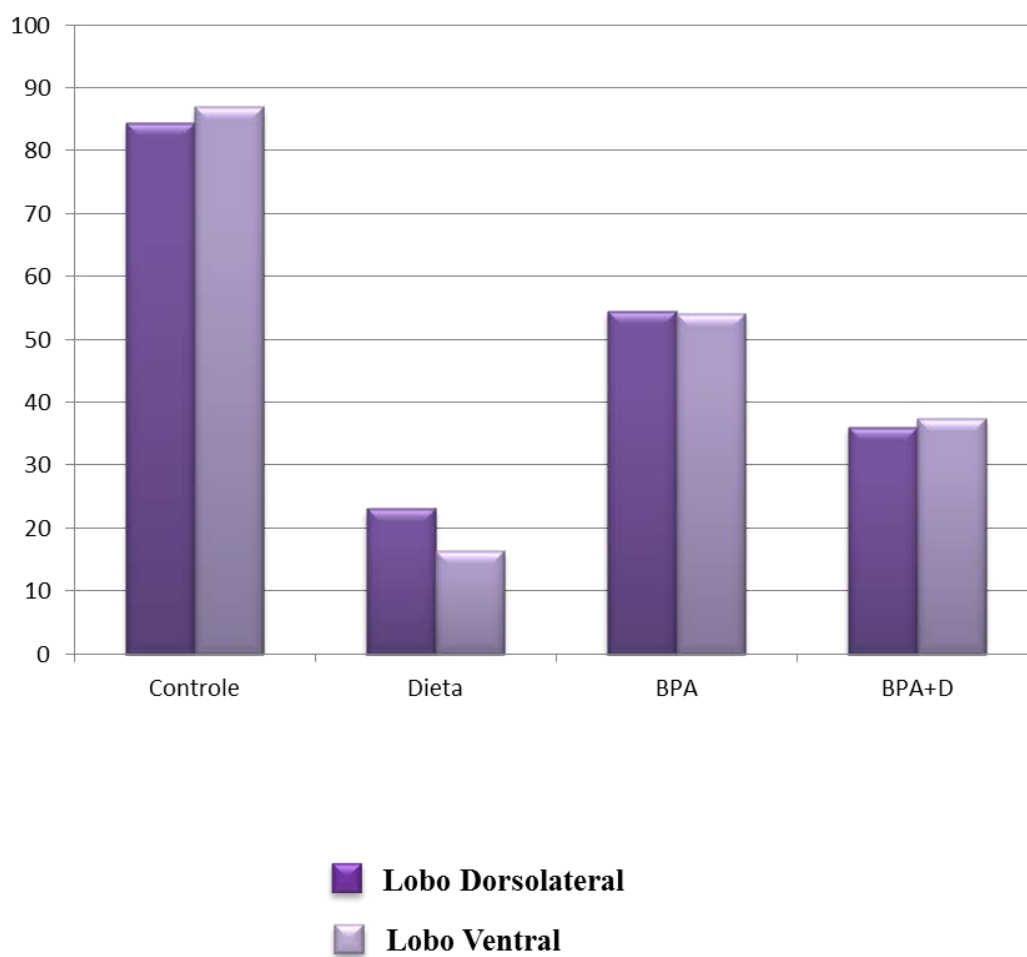


Figura 8. Imunolocalização do receptor de estrógeno (ER β) nos lobos Dorsolateral e Ventral da próstata de gerbilos adultos, submetidos a diferentes regimes nutricionais, após seis meses de tratamento. **A.** Expressão de ER β em ácino do lobo Dorsolateral do grupo Intacto. **B.** Expressão de ER β em ácino do lobo Ventral do grupo Intacto. **C.** Ácino acometido por lesão histopatológica, no qual as células secretoras que compõem o epitélio aparentemente íntegro expressam ER β (setas), enquanto que as células secretoras componentes da lesão não expressam esse receptor (*). **D.** Expressão indetectável de ER β em células secretoras de ácino acometido por lesão histopatológica (setas) grupo dieta. Notar extensa inflamação (*) circundando o ácino. **E.** Células secretoras, componentes de uma lesão acometendo o lobo Dorsolateral, expressam ER β . **F e G.** Baixa expressão de ER β em células secretoras de ácino acometido por lesão histopatológica (setas). **H.** Células secretoras, componentes de uma lesão acometendo o lobo Ventral, expressam ER β .

FIGURA 8

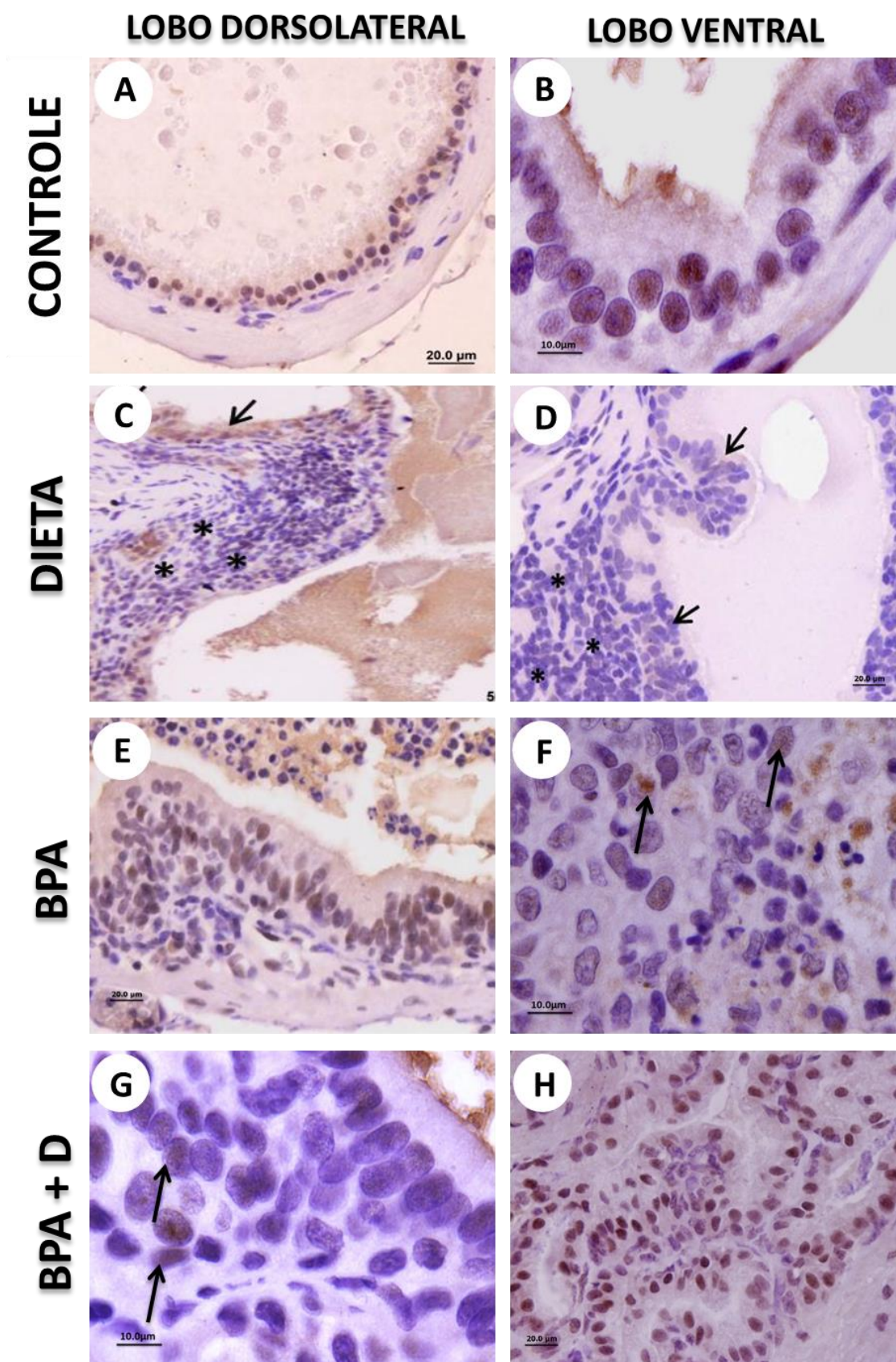


Figura 9. Níveis séricos de testosterona (ng/mL) de gerbilos submetidos a diferentes tratamentos. Os valores representam média $\pm$ DP (n, 6 por grupo). Análise estatística baseada nos testes de ANOVA e Tukey-honest ($p \leq 0,05$)

FIGURA 9

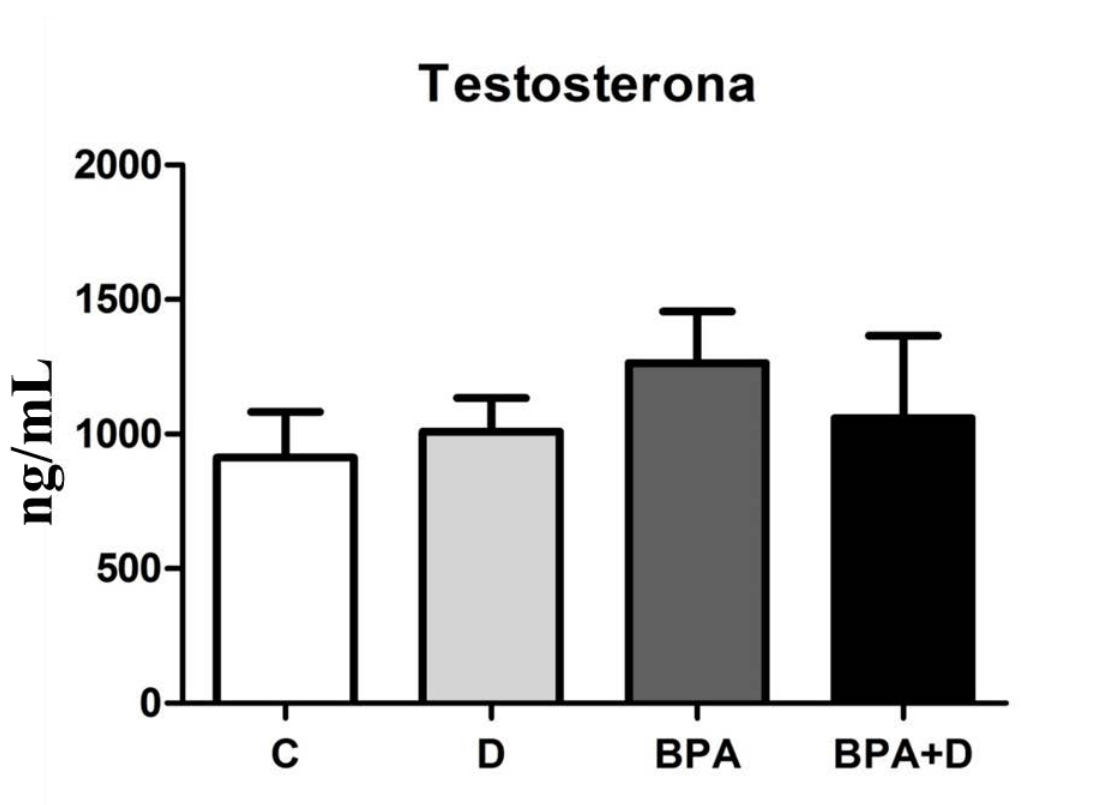


Tabela I. Teor de nutrientes das dietas.

Parâmetros	Controle	Hiperlipídica e Hipercaleórica
	RC Focus 1765	RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416
Proteína (%)	22	20
Carboidrato (%)	48	37
Gordura Saturada (%)	4	20
Calorias (Kcal/g)	3,16	4,8
Outros (%)*	26	23

*Vitaminas, minerais e água

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Magdalena, P. Quesada I, Nadal A. 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.** 7, 346–353.
- Aoki-Komori S, Saito TR, Umeda M, Sugiyama M, Takahashi KW, Taniguchi K. 1994. Lectin histochemical studies on the scent gland in the Syrian hamster and Mongolian gerbil. **Jikken Dobutsu** v.43, p.181-90.
- Banerjee PP, Banerjee S, Lai JM, Strandberg JD, Zirkin BR, Brown TR. 1998. Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. **Biol Reprod.** v.59, p.1163-1170.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD. 2009. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol.** 304:49–54.
- Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray LE, Howdeshell KL, Zoeller T, Vom Saal FS. 1999. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. **Environ Health Perspect.** 107:613-618.
- Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K. 1998. Relation between Bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. **Prostate** 34: 251-258.
- Bosland MC, Prinsen MK. 1990. 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 Res** v.50, n.3, p.691-699.
- Campos SG, Zanetoni C, Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. 2008. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **Int J Exp Pathol** v.89, p.13-24.
- Campos SGP, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FCA, Custodio AMG, Vilamaior PSL, Goes RM, Taboga SR. 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. **Int J Exp Path.** doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00706.x
- Castro B, Sánchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. 2013. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5 α -reductase isozymes in rat prostate. **PLoS One.** 8(2):e55905.
- Carroll KK, Khor HT. 1975. Dietaty fat in relation to tumorigenesis. **Prog Biochem Pharmacol.** v.10, p.308–353, 1975.
- Carruba G. 2006. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci** v.1089, p.201-217.

- Carvalho HF, Line SRP. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. **Cell Biol Int** v.20, p.809-819.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. 2003. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. **Toxicology**. 14: 119–127.
- Corradi LS, Goes RM, Taboga SR. 2004. Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inducer of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. **Differentiation** v.72, p.198-208.
- Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. 1986. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. **Biochem Cell Biol** v.64, p.608-614.
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. 2004. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Arch Histol Cytol**. v.67, p.417-34 (a).
- Cunha GR, Riche W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v.92, p.221-36 (b).
- Custodio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. **Anat Rec (Hoboken)**. v.291, p.463-74.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**. v.7, n.4, p.256-69.
- Escobar EL, Gomes-Marcondes MC, Carvalho HF. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. **Prostate**, v.69, n.5, p.1-11.
- Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V. 2004. Dietary fat and prostate cancer. **J Urol** v.171, p.19–24.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (skene paraurethral glands). **Biol Reprod**. v.79, p.1084-91.
- Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Campos SGP. 2010. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol**. v. 88, n.1, p.96-106, (a)
- Gonçalves BF, Campos SGP, Falleiros Junior LR, Taboga SR. 2010. Association between MNU and steroids promoters or fat diet on gerbil prostatic lobes: carcinogenic

effetcts. In: **XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. SBBC XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology**, São Paulo, p. 06-06. (b)

Gonçalves BF, Campos SGP, Zanetoni C, Scarano WR, Falleiros Júnior LR, Amorin RL, Góes RM, Taboga SR. 2013. A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. **Prostate**. doi: 10.1002/pros.22669.

Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant. **Cancer Res** 1: 5624–5632.

Hond ED, Schoeters G. Endocrine disrupters and human puberty. 2006. **Int J Androl**, 29(1):264-271.

Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. **Prostate** v.52, n.3, p.213-235.

Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. 2008. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. **Environ Health Perspect.**116:1642–7.

Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TW. 2001. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **J Endocrinol** v.171, p.109-18.

Imamov O, Morani A, Shin G-J, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson J-A. 2004. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. **Proc Natl Acad Sci** v.101, n.25, p.9375-9380.

Jeffers GW, Klei TR, Enright FM. 1984. Activation of jird (*Meriones unguiculatus*) macrophages by the filarial parasite *Brugia pahangi*. **Infect Immun.** v.43, p.43-48.

Jones D, Gonzalez-Lima F, Crews D, Galef BG Jr, Clark MM. 1997. Effects of intrauterine position on the metabolic capacity of the hypothalamus of female gerbils. **Physiol Behav.** v.61, p.513-519.

Karr JF, Kantor JA, Hand PH, Eggensperger DL, Scholm J. 1995. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. **Cancer Res** v.55, p.2455-2462.

Kirby RS, Christmas TJ, Brawer M. 1996. **Prostate Cancer**. 1 ed. London, England: Mosby, 170 p.

Klimentidis YC. et al. 2011. Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of plurality of obesity epidemics. **Proc. Biol. Sci.** v.278, p.1626–1632.

Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. 1999. Dietary fat and prostate cancer: current status. **J Natl Cancer Inst.** v.91, p.414-28.

- Kondo Y, Homma Y, Aso Y, Kakizoe T. 1994. Promotional effect of two-generation exposure to a high-fat diet on prostate carcinogenesis in ACI/Seg rats. **Cancer Res** v.23, p.6129-6132.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development. **Dev Biol** v.253, p.165-174.
- McNeal JE. 1983. The prostate gland: morphology and pathobiology. **Monogr Urol** v.4, p.3-33.
- Moritomo T, Saito H, Watanabe T, Mochizuki K. 1991. Tissue culture study on Mongolian gerbil's (*Meriones unguiculatus*) malignant melanoma. **Jikken Dobutsu** v.40, p.385-388.
- Mukherjee P, Sotnikov AV, Mangian HJ, Zhou J, Visek WJ, Clinton SK. 1999. Energy Intake and Prostate Tumor Growth, Angiogenesis, and Vascular Endothelial Growth Factor Expression. **J. Natl. Cancer Inst.** v.91, p.512-523.
- Nadal A. 2013. Fat from plastics? Linking bisphenol A exposure and obesity. 2013. **Rev. Endocrinol.** v. 9, p.9–10
- Nawa Y, Horii Y, Okada M, Arizono N. 1994. Histochemical and cytological characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Int Arch Allergy Immunol.** v.104, p.249-254.
- Newbold RR. 2011. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life. **Am J Clin Nutr.** 94(suppl):1939S–42S.
- Nolan CC, Brown AW, Cavanagh JB. 1990. Regional variations in nerve cell responses to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbils and rats; further evidence for involvement of the Golgi apparatus. **Acta Neuropathol.** v.81, p.204-212.
- Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, Wang Y, Sugimura Y. 2007. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. **Differentiation**, 75(8): 745-56.
- Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Goes RM, Taboga SR. 2006. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol** v.288, p.723-33.
- Pinto ME, Botta LS, Taboga SR, Góes RM. 2010. Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage. **Anat Rec (Hoboken)** v.293, p.310-419.
- Price D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr** v.12, p.1-27.

- Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reprod Toxicol**, 23(3): 374-382.
- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal exposure to estradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 102: 134-138.
- Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. 2011. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. **Reprod Toxicol**. Jan;31(1):1-9.
- Prins & Korach. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids** v.73, p. 233-244.
- Redecker P. 1991. Ultrastructural demonstration of neurohaemal contacts in the internal zone of the median eminence of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): correlation with synaptophysin immunohistochemistry. **Histochemistry**. v.95, p.503-511.
- Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Anat Rec (Hoboken)**. v. 290, p.1233-1247.
- Rumpold H, Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. 2002. The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. **Experimental Gerontology** 37: 1001-1004.
- Santos FCA, Corradi LS, Martinez FE, Taboga SR. 2000. Aspectos morfológicos da prostata residual em fêmeas do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). **Braz J Morphol Sci** v.17, p.56.
- Santos FCA, Taboga SR. 2002. Interações epitélio-estroma na próstata feminina: estudos experimentais em gerbilos. In: Bauer ME; Jeckel-Neto EA. (Org.). **Avanços em biologia celular**. 1 ed. EDIPUCRS, Porto Alegre, v. 1, p. 131-135.
- Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Anim Reprod**, 3(1):3-18.
- Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. 2006. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol** v.288, p.1190-2000.
- Scarano WR, Sousa DE, Campos SG, Corradi LS, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. **Int J Exp Pathol** v.89, p.25-37.
- Seta DD, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessì-Filgheri F, Farabollini F. 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. **Horm Behav**, 50(2):301-307.

- Shankar E, Vykhovanets EV, Vykhovanets OV, MacLennan GT, Singh R, Bhaskaran N, Shukla S, Gupta S. 2012. High-Fat Diet Activates Pro-Inflammatory Response in the Prostate Through Association of Stat-3 and NF-Kb. **The Prostate**, 72:233-243
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Borthakur G, Burns JL, Bowen PE. 2008. Correlations of dietary patterns with prostate health. **Mol. Nutr. Food Res.** v.52, p.114-130.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biol Reprod** v.34, p.961–971.
- Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J. 2002. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal developmental in the human. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 16(1):105-121.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102(19):7014-7019.
- Thomson AA, Cunha GR. 1999. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. **Development** v.126, p.3693-3701.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. **Development** v.129, p.1905-1912.
- Toppari J. 2008. Enviromental endocrine disrupters. **Sex Dev**, 2: 260-267.
- Trasande L., Attina T. M., Blustein J. 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. **JAMA.** v.308. p.1113–1121.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. 2001. Reative stroma in prostate cancer progression. **J Urol** v.166, p.2472-2483.
- Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Exp Gerontol.** v.40, p.121-128.
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral protate after castration. **Cell Biol Int** v.29, p.809-816.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. **J Inorganic Biochem**, 79: 241-244.
- Wang Y, Corr JG, Thaler HT, Tao Y, Fair WR, Heston WDW. 1995. Decreased growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice fed a low-fat diet. **J Natl Cancer Inst** v.87, p.1456–1462.
- Wang L, Yang JR, Yang LY, Liu ZT. 2008. Chronic inflammation in benign prostatic hyperplasia: implications for therapy. **Med Hypotheses** v.70, p.1021–1023.

Zanetoni C. 2007. Indução experimental de tumores na próstata do gerbilo *Meriones unguiculatus*. Campinas. Tese de Doutorado – UNICAMP, Campinas.