

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO DESREGULADOR ENDÓCRINO
BISFENOL A E À GENISTEÍNA: EFEITOS SOBRE A
MORFOGÊNESE E A SUSCEPTIBILIDADE A
CARCINOGÊNESE PROSTÁTICA EM RATOS SPRAGUE-
DAWLEY**

BRUNA DIAS BERNARDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS FERNANDO BARBISAN

BOTUCATU - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO DESREGULADOR ENDÓCRINO
BISFENOL A E À GENISTEÍNA: EFEITOS SOBRE A
MORFOGÊNESE E A SUSCEPTIBILIDADE A
CARCINOGÊNESE PROSTÁTICA EM RATOS SPRAGUE-
DAWLEY**

MESTRANDA BRUNA DIAS BERNARDO

ORIENTADOR PROF. DR. LUÍS FERNANDO BARBISAN

CO-ORIENTADOR PROF. DR. WELLERSON RODRIGO SCARANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bernardo, Bruna Dias.

Exposição in utero ao desregulador endócrino Bisfenol A e a Genisteína :
efeitos sobre a morfogênese e susceptibilidade à carcinogênese prostática em
ratos Sprague-Dawley / Bruna Dias Bernardo. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 40105008

1. Mama - Câncer. 2. Próstata - Câncer. 3. Desreguladores endócrinos. 4.
Células - Proliferação. 5. Genisteína.

Palavras-chave: Bisfenol A; Desregulador endócrino; Genisteína; Próstata.

Dedicatória

Àqueles que estiveram comigo desde sempre e estarão para sempre

Meus pais, Manoel Gonçalves Bernardo e Aladi Dias Bernardo. Duas pessoas de extrema humildade e simplicidade, que carregam de forma inabalável a maior honestidade que já pude observar, de forma tão pura que se aproxima da inocência de uma criança. Com grande fragilidade socioeconômica durante a infância de ambos, não conseguiram estudar, porém conseguiram me guiar até onde cheguei e, mesmo ainda não tendo chegado muito longe, teria sido absolutamente impossível sem o apoio integral e o amor incondicional de vocês. Pai, você que acordava toda semana às 3 horas da madrugada para me levar até a rodoviária, muitas vezes a pé, para eu pegar o ônibus até Botucatu para realizar minhas atividades do mestrado. Mãe, você que fazia tudo por mim, até mesmo marmitta com as comidinhas que eu adorava para levar para a faculdade. Tudo o que se pode imaginar que os melhores pais do mundo fariam por um filho, vocês fizeram. São as duas pessoas que me fazem acreditar que o amor sincero e eterno existe.

Meus irmãos, Fernanda Dias Bernardo e Adriano César Dias Bernardo (in memoriam). Minha infância vive em minha memória de forma extremamente nítida e tenho orgulho de cada pique-esconde e de cada briga que tivemos. Fernanda, você continua presente na minha vida, mesmo separadas por muitos quilômetros continua como um porto seguro para todos os momentos, afinal nosso sangue será sempre o mesmo. Adriano...ah...como não chorar ao escrever esta dedicatória? A vida te levou tão cedo! A dor é inevitável e a saudade adquiriu proporções monstruosas que jamais regrediram nestes 10 anos de ausência física. Desde que você se foi consigo sentir sua presença e deixei de ter medo de fantasmas, aqueles fantasmas que me faziam ter tantos pesadelos, afinal, se espíritos ruins existem os bons também estão por aí, e você com

certeza é um deles. Perdi um irmão e ganhei um anjo da guarda. Encontraremos-nos novamente um dia. Até lá, Di!

Ao meu namorado, Douglas Bienert. As pessoas deveriam acreditar mais nas histórias da Disney. Os príncipes existem! Douglas, meu príncipe encantado. Tudo o que eu esperava que você fizesse por mim, você fez. E ainda me surpreendeu fazendo além do que eu esperava. Quando o fardo das responsabilidades acumuladas e os obstáculos começavam a me fazer pensar em desistir, você me dava forças e amor para que eu continuasse e chegasse até o fim, que na verdade não pode ser considerado um fim, mas sim um começo. Espero um dia poder retribuir tudo o que fez e continua fazendo por mim. O maior presente que a vida me deu até hoje foi você.

Agradecimientos

Sem dúvida alguma, a primeira pessoa a quem devo toda minha gratidão é meu orientador, Professor Luis Fernando Barbisan. Fez-me entender o verdadeiro significado da palavra “orientador”. Orientou-me com enorme paciência, da qual nunca vi o limite, me ensinando tudo o que precisei saber. Cheguei ao mestrado bastante imatura e inexperiente, e estou saindo com um aprendizado que jamais teria adquirido sem sua atenção e exemplo. Exemplo de profissional, exemplo de pessoa. Espelho-me na sua sabedoria, humildade e firmeza de caráter, tão raros. Agradeço imensamente pela oportunidade que, talvez, nenhum outro professor teria me dado. Sem sua compreensão diante das minhas limitações nada disso teria sido possível. Serei eternamente grata.

Agradeço ao meu co-orientador, Professor Wellerson Rodrigo Scarano, pelo conhecimento que me passou e pelo espaço cedido para mim em seu laboratório. Foram muito importantes para minha formação. Agradeço aos alunos do LabDECA, principalmente a Joyce, colaboradora deste projeto, pelos ensinamentos e trabalhos essenciais para este estudo. Agradeço também à Carina (Lesma), que me fez companhia na faculdade e fora dela, minha companheira de apartamento, que me ensinou muita coisa essencial para a elaboração da minha tese e para a minha vida!

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Carcinogênese Química Experimental (LCQE), Tony, Nelci, Flávia, Mariana F., Joyce, Mariana T., Renata, Meire, Brunno, Guilherme e Mayara. Cada um de vocês foi importante para meu crescimento profissional e pessoal. Ensinarão-me que as pessoas podem ser extremamente diferentes e devem se respeitar e conviver bem. Agradeço pelos ensinamentos, pelas risadas e pela experiência de vida inesquecível.

RESUMO

O crescimento, a maturação e a manutenção estrutural e funcional da próstata são eventos hormônio-dependentes, principalmente de andrógenos, e alterações endócrinas no período crítico de desenvolvimento prostático poderão causar efeitos adversos sobre a próstata, inclusive câncer. Bisfenol A (BPA) é um desregulador endócrino, presente em embalagens de alimentos e detectado em praticamente todos os fluidos humanos, capaz de alterar o desenvolvimento do trato reprodutivo de ratos machos por meio de exposição gestacional/pré-natal. A genisteína (GEN), um fitoestrógeno da soja, mostrou propriedades quimiopreventivas contra carcinogênese em roedores. Este estudo objetivou avaliar se a exposição gestacional ao BPA causa efeitos deletérios precoces e tardios sobre a morfogênese prostática da prole de machos Sprague-Dawley, e se a exposição concomitante à GEN modificaria estes efeitos deletérios. Fêmeas prenhes foram divididas em grupos que receberam BPA (25 ou 250 µg/kg p.c.) ou dimetilsulfóxido (DMSO – grupo controle)/óleo de canola, por gavagem e dieta basal ou contendo GEN (250 µg/kg). A prole recebeu apenas ração basal e foi eutanasiada nos dias pós-natal (DPN) 21 ou 180. A exposição gestacional à menor dose de BPA induziu alterações prostáticas precoces e tardias. A ingestão gestacional de GEN reverteu os efeitos deletérios do BPA sobre os níveis de proliferação celular no epitélio prostático, a arquitetura prostática e a expressão de receptores androgênicos na prole no DPN 21. Um aumento na incidência de inflamação multifocal e de hiperplasia prostática atípica foi observado na prole, no DPN 180, das mães tratadas com a menor dose de BPA, enquanto a ingestão gestacional de GEN atenuou estes efeitos. Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que a ingestão de GEN durante a gestação tem ação preventiva contra efeitos adversos do BPA sobre a próstata da prole.

LISTA DE ABREVIACÕES

BPA: Bisfenol A

CaP: Câncer de próstata

DE: Desreguladores endócrinos

DG: Dia gestacional

DHEA: *Dehidroepiandrosterona*

DHT: Diidrotestosterona

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPN: Dia pós natal

EAC: *Endocrine-active compounds*

GEN: Genisteína

HCl: Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina-eosina

HGPIN: *High grade prostatic intraepithelial neoplasia*

HPB: Hiperplasia prostática benigna

ISO: Isoflavona

LGPIN: *Low grade prostatic intraepithelial neoplasia*

p.c.: Peso corpóreo

p.p.: Peso da próstata

p.r.: Peso relativo

PAR-4: *Prostate apoptosis response 4*

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*

PDL: Próstata dorsolateral

PIA: *Proliferative inflammatory atrophy*

PIN: *Prostatic intraepithelial neoplasia*

PSA: *Prostatic Specific Antigen*

PV: Próstata ventral

RA: Receptor androgênico

RE: Receptor estrogênico

RP: Receptor de progesterona

SD: *Sprague-Dawley*

SUG: Seio urogenital

Test: Testosterona

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 -----	2
1. REVISÃO DE LITERATURA -----	3
1.1 A Glândula Próstata-----	3
1.2 Câncer de Próstata-----	7
1.3 Sistema endócrino-----	11
1.3.1 Desreguladores endócrinos-----	14
1.4 Bisfenol A-----	16
1.5 Genisteína-----	21
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	29
3. JUSTIFICATIVA -----	42
4. OBJETIVOS -----	43
CAPÍTULO 2 -----	44
Artigo científico-----	45
CONCLUSÃO FINAL -----	89
ANEXOS -----	90

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.A Glândula Próstata

A próstata é a maior, e uma das mais importantes, glândula sexual acessória do aparelho reprodutor masculino, que inclui também a vesícula seminal, glândulas bulbouretral e prepucial em humanos (Roberts, 2010) e vesícula seminal e glândulas bulbouretrais em roedores (Hebel-Stromberg, 1986).

A próstata é dividida em regiões (humanos) ou lobos (roedores), que se diferem quanto à origem embriológica, características histológicas, funções e susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças (Marker et al., 2003; Roy-Burman et al., 2004). Em roedores (Figura 1a), é dividida em três lobos que se abrem na uretra, estrutura utilizada como referência anatômica para a localização destes, sendo denominados lobo ventral, lobo dorsolateral e lobo anterior, também conhecido como glândula de coagulação. O lobo dorsolateral pode ser considerado dividido em dois lobos, neste caso, denominados dorsal e lateral, sendo o complexo prostático, nesta classificação, composto por quatro lobos (Jesik et al., 1982; Komáreck et al., 2000; Marker et al., 2003; Roy-Burman et al., 2004; Lee et al., 2011). Porém, é comum a classificação que considera o lobo dorsolateral, pois os lobos dorsal e lateral apresentam semelhanças quanto à origem ductal, relação topográfica e resposta fisiológica tardia à privação androgênica (Price e Williams-Ashman, 1961; Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986a,b; Rochel et al., 2007) e padrão alveolar (Jesik et al., 1982).

A próstata humana (Figura 1b) é dividida em três regiões: periférica, onde há maior incidência de câncer prostático e corresponde a 70% do volume total da glândula; de transição, região exclusiva onde ocorrem as hiperplasias benignas e corresponde a 5% do volume total, e central, que tem a menor incidência de adenocarcinomas e corresponde a 25% do volume total (McNeal., 1981; Roy-Burman et al., 2004; Lee et al., 2011).

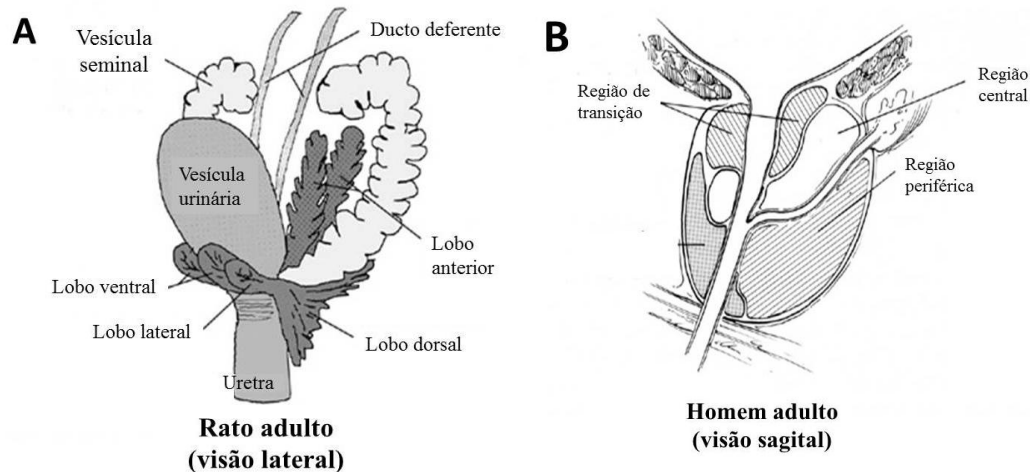


Figura 1: Diagrama esquemático representativo das próstatas de rato e humano. **A:** Próstata de rato adulto, em visão lateral, com indicação dos lobos prostáticos ventral, lateral, dorsal e anterior. **B:** Próstata de homem adulto, em corte sagital, com indicação das zonas de transição, central e periférica. (Adaptado de Bhatia-Gaur et al., 1999)

Em relação à homologia entre próstata humana e de roedores, respectivamente, as regiões periférica e dorsolateral são homólogas, assim como as regiões central e anterior, ao passo que a região de transição humana não apresenta homologia com o lobo ventral dos roedores (Roy-Burman et al., 2004). No entanto, este conceito de homologia entre humanos e roedores ainda é bastante controverso, e as diferentes opiniões têm um consenso apenas no que diz respeito à ausência de evidências suficientes para o estabelecimento desta homologia, tornando imprecisa a definição do lobo com maior relevância para extrapolação de dados de roedores para humanos, em relação às alterações clinico-patológicas no carcinoma prostático humano (Shapell et al., 2004; Rochel et al., 2007).

Independente do aspecto macroscópico da próstata (Figura 1) existem componentes histológicos com características comuns, favorecendo estudos referentes à homologia morfofuncional entre humanos e roedores (Price, 1963; Karr et al., 1995), como ilustrado na Figura 1. Embora não haja consenso acerca desta homologia, a maioria dos estudos tem considerado o lobo ventral importante para análises

comparativas, avaliando ação de carcinógenos e de manipulação hormonal, principalmente devido à sua sensibilidade a andrógenos, incidência de hiperplasias e neoplasias, ao tamanho considerável deste lobo e sua fácil dissecação (Reznik et al., 1981; Shappell et al., 2004; Rochel et al., 2007).

A próstata, tanto em humanos quanto em roedores, se desenvolve a partir do seio urogenital (SUG), que é composto por uma camada epitelial e uma mesenquimal, sendo encontrado na base da vesícula urinária em desenvolvimento (Marker et al., 2003). O SUG surge, em ratos e camundongos, após o décimo terceiro dia de gestação (DG), permanecendo indistinguível quanto ao sexo até o décimo sétimo ou décimo oitavo DG, enquanto em humanos surge após sete semanas de gestação e só começa a ser distinguível a partir de dez a doze semanas e estará completo ao nascimento (Marker et al., 2003).

Neste período, chamado de “janela”, a presença de andrógenos é fundamental para induzir o brotamento prostático, que ocorre do DG 17 ao 21 em roedores e da 10^o a 12^o semanas de gestação em humano (Takeda et al., 1986). Ao nascimento, este efeito androgênico de brotamento é cessado. Alterações hormonais neste período de “janela” podem resultar em alterações patológicas tardias, manifestadas na vida adulta, tais como inflamação, lesão pré-maligna e hiperplasia prostática benigna (HPB) (Woodham et al., 2003; Scarano et al., 2009; Prins et al., 2011). Outras alterações, que podem ser causadas por vários fatores, como estados nutricional e metabólico maternos, também podem levar à programação fetal para determinadas manifestações patológicas precoces no desenvolvimento prostático e tardias (Dolinoy et al., 2007; Rinaldi et al., 2013).

O desenvolvimento prostático ocorre por um processo denominado morfogênese de ramificação, a partir de brotamentos do SUG, os quais, após o nascimento, alongam-se e bifurcam-se, formando uma rede de ductos (próstata) (Prins e Birch, 1995; Risbridger et al., 2005). Enquanto o processo de luminização é iniciado ocorre,

concomitantemente, o processo de diferenciação funcional das células epiteliais luminais (Prins e Birch, 1995; Risbridger et al., 2005). Existe, ainda, uma espécie de cápsula composta por estroma fibromuscular, localizada da porção anterior até as laterais da próstata, separando-a da gordura periprostática (Roy-Burman et al., 2004).

Para viabilizar a contratilidade prostática, necessária ao processo de secreção glandular, as células mesenquimais periductais se condensam, concomitantemente ao processo de brotamento do SUG, formando uma camada espessa de células musculares lisas, enquanto as células mesenquimais interductais passam pelo mesmo processo e, por sua vez, diferenciam-se em fibroblastos (Hayward et al., 1996a,b). Porém, a próstata ainda está imatura, e permanece desta forma até a puberdade, onde o aumento de andrógenos circulantes resulta em processo de desenvolvimento e finalização da maturação glandular (Risbridger et al., 2005; Schauer e Rowley, 2011). Nos ratos, a maturidade sexual se inicia em torno do dia pós-natal (DPN) 42 ao DPN 56, sendo finalizada em torno de 90 dias após o nascimento (Lee et al., 2004). Porém, o crescimento prostático naturalmente não cessa após sua maturação, continuando a crescer ao longo da vida (Risbridger et al., 2005).

A próstata é responsável por secretar para o interior da uretra um composto de natureza protéica, com capacidade proteolítica, a base de fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostatic Specific Antigen*), amilase, outras enzimas específicas e alguns nutrientes, como zinco, ácido nítrico e colina (Aumuller e Seitz, 1990; Kierszenbaum, 2008). Esta secreção tem função de alcalinização do canal vaginal, maior liquefação do esperma, representando 25% do volume ejaculado e contribuindo para maior mobilidade e fertilidade dos espermatozóides (McNeal, 1981; Aumuller e Seitz, 1990).

O crescimento e a manutenção estrutural e funcional da glândula prostática são eventos hormônio dependentes, mais especificamente de andrógenos, determinando

assim, a importância da constância destes níveis séricos (Isaacs, 1984). A produção de andrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Debes e Tindall, 2002), e é composta por 95% de testosterona (Test), que é mais abundante e produzida principalmente pelas células de Leydig, e 5% de androstenediona e diidroepiandrosterona, que são produzidas pelo córtex da glândula adrenal (Aumuller e Seitz, 1990; Hsing et al., 2002). Embora a Test seja mais abundante, quando é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase é que terá seu efeito potencializado, pois a DHT tem 10 vezes mais afinidade com o receptor androgênico (RA) do que a Test (Marker et al., 2003). Todos os andrógenos se ligam ao mesmo receptor, RA, mas causam efeitos biológicos distintos, como diferenciação, crescimento e desenvolvimento (Marker et al., 2003).

A próstata é formada por dois componentes, denominados epitélio e estroma. O estroma prostático é ricamente vascularizado, com células musculares lisas dispostas concentricamente aos alvéolos e entremeadas às camadas de colágeno, além de algumas fibras colágenas e elásticas (Carvalho e Line, 1996). A matriz extracelular é produzida pelas células musculares lisas juntamente com os fibroblastos, sendo seus componentes estruturais as fibras colágenas do tipo I e III (reticulares) e elásticas, que conferem resistência mecânica e flexibilidade, servem como âncoras e meio para migração celular (Tuxhorn et al., 2001; Vilamaior et al., 2005). As células estromais e epiteliais prostáticas têm interação homeostática entre si, mediada por andrógenos e fatores de crescimento (Lee et al., 1990; Marker et al., 2003), sendo as células estromais essenciais ao processo de diferenciação e organização arquitetural do epitélio, mediada por andrógenos (Hayward et al., 1997). Em caso de desequilíbrio nesta homeostase, pode haver iniciação e promoção de lesões prostáticas benignas e malignas (Sung e Chung, 2002).

1.2.Câncer de próstata

O envelhecimento é fator diretamente ligado ao surgimento das alterações mais frequentes da próstata, que são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (Ho et al., 2006), incluindo a neoplasia intraepitelial prostática (NIP), classificada como lesão pré-maligna em humanos (Bostwick, 1996). A incidência de CaP é mais alta em homens com idade mais avançada, aumentando abruptamente em torno dos 50 a 54 anos, atingindo seu pico entre 75 e 79 anos de idade (Siegel et al., 2013; SSCRG, 2012). Isto pode ser devido ao crescimento constante da próstata ao longo da vida (Risbridger et al., 2005), porém, os mecanismos que regulam a progressão e as alterações patológicas originárias do fenótipo da HPB ainda não foram totalmente desvendados (McNeal, 1990;). A HPB representa desregulação da homeostase entre os compartimentos epitelial e estromal, caracterizado por hiperplasia progressiva e descontínua de ambos, que conduzem ao aumento do tamanho da glândula, resultando no surgimento dos sintomas clínicos (McNeal, 1990).

Outro fator com forte associação à incidência de CaP é a condição sócio-econômica, com relação inversamente proporcional, sendo uma das poucas neoplasias com maior incidência em níveis sócio-econômicos mais altos, que pode ser atribuído ao maior número de exames preventivos realizados, como o PSA e o toque retal (NCIN, 2012).

Contudo, a carcinogênese prostática ainda é pouco conhecida e pode estar associada a fatores hormonais, genéticos, alimentares, longevidade, raça e ambiente (Pollard, 1992; Arunkumar et al., 2006). Processos inflamatórios, sejam causados por agentes físicos ou químicos ou por patógenos, podem ter importante contribuição na patogênese dos vários tipos de cânceres humanos, inclusive do CaP (Vral et al., 2012).

Em relação à expectativa de incidência de cânceres em homens para o ano de 2013 (Figura 2), nos Estados Unidos, o CaP sozinho corresponderá a 28% do total de cânceres (Siegel et al., 2013) e no Reino Unido corresponderá a 25%, segundo dados

retrospectivos, sendo também o mais comum desde 1990 (Siegel et al., 2013; NCIN, 2012). Nos Estados Unidos, se somado os cânceres de pulmão e brônquios e colorretal aos casos de CaP, totalizam 50% da incidência de cânceres em homens (Siegel et al., 2013). Considerando a expectativa de mortes por câncer, estes corresponderão a 48% em homens, sendo o câncer de pulmão o primeiro colocado (Siegel et al., 2013). O risco de uma pessoa ser diagnosticada com câncer de próstata ao longo de sua vida é estimado em uma a cada oito pessoas (Siegel et al., 2013; NCIN, 2012).

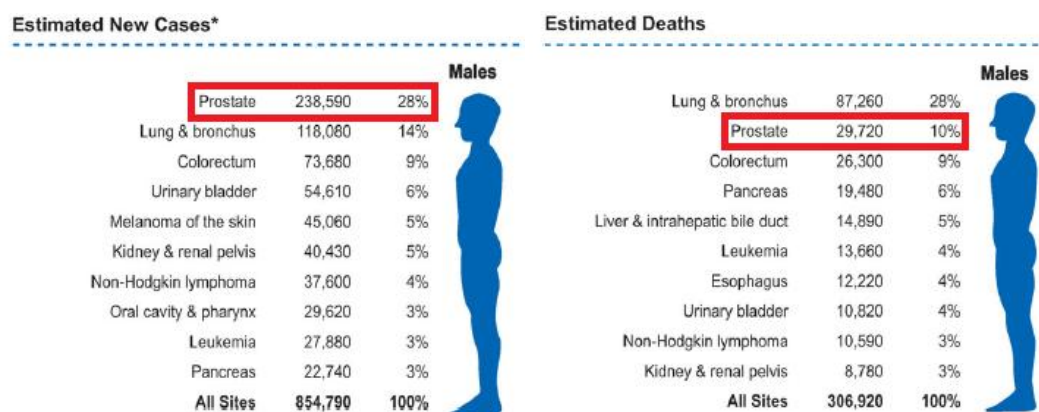


Figura 2: Estimativa de novos casos de câncer e de mortes decorrentes de cânceres nos EUA, para o ano de 2013. (Adaptado de *Cancer Statistics*, 2013).

No Brasil, o CaP é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, como mostra a Figura 3 (INCA, 2014). É ainda, em escala mundial, o sexto tipo de câncer mais frequente em homens, representando cerca de 10% do total (INCA, 2014). O INCA estimou, para o ano de 2014, 68.800 novos casos de CaP no Brasil, correspondendo a média de 70 casos a cada 100.000 homens, sendo 91/100 mil no Sul e 30/100 mil no Norte, que correspondem, respectivamente, as regiões com maior e menor índices de desenvolvimento socioeconômico do país (INCA, 2014).



Figura 3: Estimativa de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2014(INCA, 2014).

Nos países desenvolvidos, sua incidência é seis vezes maior do que nos países em desenvolvimento, podendo ser devido ao fato de que a expectativa de vida é maior nos países desenvolvidos e é realizado maior número de exames preventivos e de rastreamento de patologias da próstata (INCA, 2012; NCIN, 2012). A incidência de CaP aumentou nos últimos anos e este fato pode ser justificado, parcialmente, pela progressiva melhoria da investigação diagnóstica, da qualidade dos programas de rastreamento e sistemas de informação em saúde e da expectativa de vida (Balducci e Lyman, 1997; Hsing e Chokkalbingam, 2006).

O CaP é comumente precedido por lesões epiteliais pré-malignas (Bostwick, 1996; Brawer, 2005, Lipski et al., 1996, Murugan et al., 2013). Um exemplo destas lesões é a neoplasia intraepitelial prostática (do inglês *Prostatic Intraepithelial Neoplasia* – PIN) do tipo proliferativa, com grande potencial de progressão para adenocarcinoma (Brawer, 2005), classificada em dois graus, de acordo com sua característica histológica: LGPIN (*Low Grade PIN*), que é lesão de baixo grau, e a

HGPIN (*High Grade PIN*), que é lesão de alto grau. A LGPIN apresenta atipia celular e alterações estromais mais discretas, podendo levar à confusão de classificação com áreas de tecido normal. A HGPIN se refere a alterações anormais da proliferação celular dentro dos limites epiteliais dos alvéolos e ductos prostáticos, sem invasão estromal (Eminaga et al., 2013; Brawer, 2005), apresentando células epiteliais fenotipicamente semelhantes ao adenocarcinoma invasivo, devido à acentuação da atipia celular e do aumento dos volumes de núcleo e nucléolo (Bostwick e Brawer, 1987). O adenocarcinoma pode ser precedido por processos inflamatórios crônicos associados a alterações epiteliais, denominados Atrofia Proliferativa Inflamatória (do inglês *Proliferative Inflammatory Atrophy* - PIA) (McNeal et al., 2001).

1.3.Sistema Endócrino

O sistema endócrino é responsável pelo controle de funções e reações orgânicas em todos os seres vivos vertebrados e invertebrados, sendo um dos sistemas com maior capacidade de controle homeostático do corpo humano, visando manter suas funções e desenvolvimento frente a alterações ambientais constantes (Marty et al., 2011). Suas respostas aos estímulos são lentas, reguladas por *feedbacks* complexos que ocorrem entre as cerca de 30 glândulas que compõem este sistema, envolvidas no controle de diversos processos, como ciclo reprodutivo feminino, crescimento ósseo, proliferação celular, comportamento psicossocial, entre outros (Marty et al., 2011). Este sistema é separado em três componentes distintos, porém íntima e diretamente relacionados: I) glândulas especializadas (ex: hipófise, tireóide e paratireóide, adrenais, pâncreas e gônadas); II) hormônios, sintetizados e liberados por estas glândulas; III) tecidos e/ou células-alvo, que respondem aos estímulos hormonais (Nogueira, 1999).

Os hormônios diferem entre si no que tange sua composição química e origem, sendo classificados em três categorias: esteróides e derivados de ácidos graxos, de

composição lipídica, originados a partir de colesterol (ex: Test, estradiol, progesterona); protéicos e polipeptídicos, de composição basicamente protéica ou associada a gliceróis, sendo denominados, neste caso, glicoproteicos (ex: insulina, glucagon, hormônio foliculo-estimulante, hormônio adrenocorticotrófico); derivados de aminoácidos, originados a partir do aminoácido tirosina (ex: tiroxina e triiodotiroxina), e do triptofano (melatonina) (Gartner e Hiatt, 2007).

Os hormônios são transportados pelo sangue e agem de diferentes formas, que são classificadas, basicamente, de acordo com a localização dos tecidos e células-alvo (Gartner e Hiatt, 2007). Em relação a estas formas de ação, podem atuar de forma endócrina, quando têm ação em diferentes partes do organismo, de forma parácrina, quando age nas células e tecidos vizinhos ao seu local de produção, e de forma autócrina, quando agem sobre as próprias células que o produzem (Gartner e Hiatt, 2007). Estes hormônios são essenciais para o metabolismo geral, influenciando desde as funções do sistema imunológico e nervoso, até o estabelecimento das características sexuais, reprodutivas e comportamentais (Gartner e Hiatt, 2007).

As gônadas são responsáveis pela maior produção de Test circulante, seguidas pelas adrenais, que produzem este hormônio em menor quantidade em seu córtex, a partir do colesterol (McHenry et al., 2013; Ghayee e Auchus, 2007). O colesterol citoplasmático é transportado até a membrana da mitocôndria de células gonadais e adrenais, onde estão localizadas enzimas esteroideogênicas, que atuarão em conjunto com uma série de outras proteínas, complexos proteicos e outros hormônios para a produção de Test (McHenry et al., 2013). Este colesterol é clivado pela enzima desmolase, resultando em pregnenolona, um pro-hormônio precursor de todos os outros hormônios esteroidais, dentre eles também estão progesterona e estradiol (McHenry et al., 2013).

A pregnenolona sofre outras reações, que podem ocorrer na mitocôndria ou no retículo endoplasmático, podendo ser convertida em progesterona, ou seguir com outras reações até resultar em dehidroepiandrosterona (DHEA), que circula pelo sangue e também é produzida em pequenas quantidades pelos testículos e ovários e, ainda, pelo cérebro, considerada então um “neuroesteróide” (McHenry et al., 2013). A DHEA é convertida em androstenediona, que por sua vez pode originar tanto a Test quanto a estrona, que poderá originar o estradiol (McHenry et al., 2013). A Test pode seguir diversas vias em diferentes locais, como o citocromo P450, onde pode tanto ser clivada pela 5 α -redutase, resultando em DHT, que tem potencial androgênico maior, quanto sofrer ação da aromatase, resultando em estradiol (McHenry et al., 2013), conforme mostra a Figura 3.

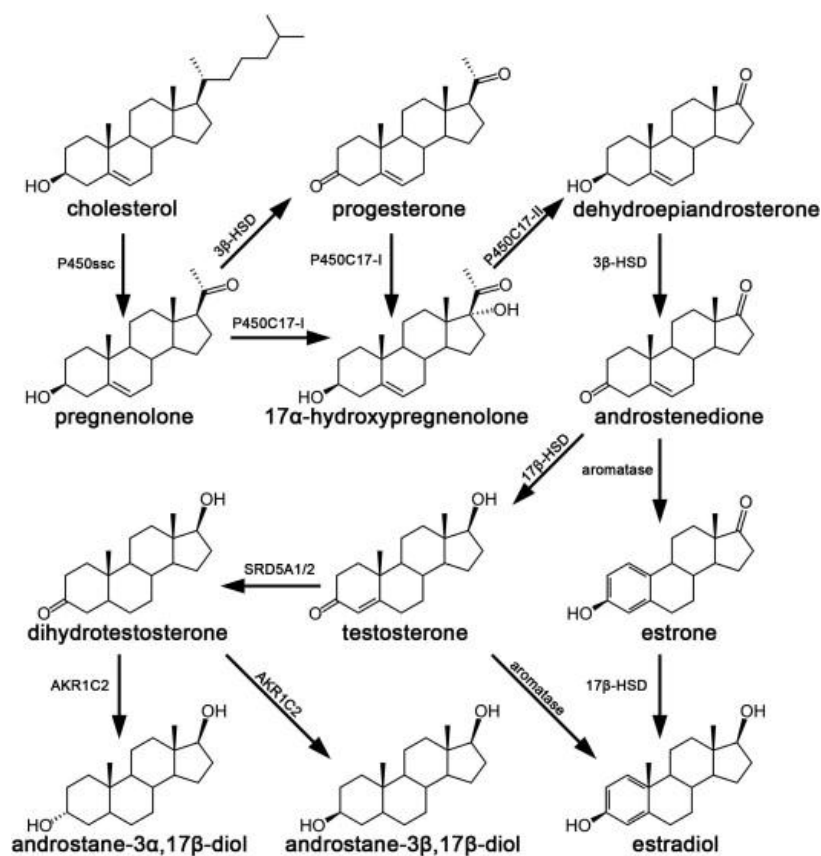


Figura 4: Esteroidogênese – Síntese de hormônios esteroides. (McHenry et al., 2013).

Assim como todo controle homeostático, o controle do sistema endócrino é finito e possui limites, que podem ser extrapolados por exposições a químicos, drogas e

estressores ambientais, nestes casos, denominados *endocrine-active compounds (EAC)*, levando a determinadas consequências, que ocorrem graças a sua grande capacidade de causar efeitos adversos, sendo eles toxicidade na reprodução e no desenvolvimento e câncer (Marty et al., 2011). A exposição aos EACs pode se dar por meio da dieta, esgoto com presença natural de hormônios, águas contaminadas com resíduos de medicamentos e agrotóxicos, entre outras formas (Marty et al., 2011). Os EACs passaram a ser denominados desreguladores endócrinos (DE) na década de 1990, quando ganharam maior notoriedade no meio científico e na mídia (Marty et al., 2011).

1.3.1. Desreguladores endócrinos

Os DE são substâncias ou misturas de substâncias químicas exógenas, sintéticas ou naturais, que demonstraram capacidade de causar efeitos semelhantes aos hormônios endógenos, sendo capazes, então, de alterar a função do sistema endócrino e causar efeitos adversos a um organismo intacto ou aos seus descendentes (EDSTAC, 1998; Kang et al., 2002, Zhao, 2011). Estes DE são compreendidos, em sua grande maioria, por substâncias sintéticas, porém, algumas substâncias naturais também demonstraram efeitos miméticos hormonais (Kang et al., 2002), podendo ser citadas como exemplo os micoestrógenos, que são estrógenos produzidos por fungos, encontrados em grãos, principalmente durante sua estocagem (Kuiper-Goodman, 1990), e os fitoestrógenos, que são estrógenos existentes em plantas, algumas delas, assim como alguns grãos, presentes na alimentação humana (Kang et al., 2002; Yildiz, 2005). A exposição a estes dois compostos está sendo considerada problema de saúde pública, uma vez que esta se dá de forma ampla e ambiental, e interage com receptores hormonais esteroidais, apresentando grande capacidade de desregulação endócrina (Andres et al., 2013; Kang et al., 2002).

Os estudos com exposição aos DE ambientais ou xenoestrógenos têm aumentado nas últimas décadas, com efeitos estrogênicos comprovados em doses baixas, ou baixas concentrações (Kang et al., 2002; Welshons et al., 1999; Yildiz, 2005). Estas concentrações baixas são tidas como similares àquelas a que humanos são expostos (Teenguarden e Hanson-Drury, 2013). Há, ainda, estudos em torno da capacidade antitumoral dos isoflavonóides, que são substâncias naturais presentes em algumas plantas e que podem atuar como fitoestrógenos em algumas células e tecidos humanos após ingestão, porém, a preocupação com seus efeitos adversos é evidente (Kang et al., 2002).

Alterações no padrão normal de desenvolvimento reprodutivo observado em populações de animais selvagens podem estar relacionadas com a exposição aos DE (Kang et al., 2002). Estudos epidemiológicos em humanos indicam aumento de incidência de malformações no trato genito-reprodutivo, diminuição da fertilidade masculina e aumento da incidência de neoplasias de testículos e próstata no homem e de mama e vagina em mulheres (Skakkebaek et al., 2001; Toppari et al., 2002; Henley e Korach, 2006).

A hipótese de que a exposição, particularmente *in útero*, a químicos ambientais poderia causar várias reações adversas decorrentes da capacidade de modulação endócrina destes químicos tem sido razão de muitos estudos (Golden et al., 1998; Kang et al., 2002, Calkins e Devaskar, 2011), os quais têm considerado cada vez mais o conceito de dosagens muito baixas (“very low-doses”), mostrando os efeitos adversos de químicos com efeitos estrogênicos (Vom Saal et al., 1997; Welshons et al., 1999; Kang et al., 2002), inclusive desregulação no desenvolvimento reprodutivo de machos e prejuízo da fertilidade em estágios mais avançados de vida, mesmo que a exposição aos xenoestrógenos tenha ocorrido nos estágios precoces de vida (Jung et al., 2004).

A União Européia, a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana, a Organização Mundial de Saúde e a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico manifestam sérias preocupações com os efeitos de DE na saúde animal e humana. Estas instituições criaram, então, comitês especiais e grupos de trabalho focados em desenvolver e organizar estudos sobre substâncias suspeitas de interferir na homeostase endócrina (OECD, 2010, EPA, 2011, Marty et al., 2011).

1.4. Bisfenol A

Bisphenol A (BPA) foi descoberto em 1891, a partir da reação de condensação da acetona com dois equivalentes de fenol, catalisada pelo ácido clorídrico (HCl) (Rubin e Soto, 2009). Na indústria, normalmente, é utilizado como catalisador um ácido ou uma resina poliestireno sulfonada (Uglea e Negulescu, 1991). Várias cetonas sofrem condensações análogas e seu único subproduto é a água (Fiege et al., 2002). É um composto de produção industrial em larga escala, sólido branco a temperatura ambiente, com odor fenólico (Tyl et al., 2002; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013; Singh e Li, 2012).

O BPA é utilizado como base, a partir de sua polimerização, para a produção de resinas epóxi e policarbonatos (Tyl et al., 2002; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013), sendo este último, um plástico rígido de alta transparência, resistência e durabilidade, utilizado na fabricação de recipientes e embalagens para alimentos e bebidas, incluindo garrafas retornáveis de água mineral, mamadeiras, equipamentos esportivos, lentes de óculos, CDs, DVDs e eletrodomésticos (Singh e Li, 2012). O policarbonato, adicionado de outras substâncias, pode ser utilizado na produção de telefones móveis, utensílios domésticos, como talheres, louças e copinhos descartáveis, e até mesmo em automóveis (Singh e Li, 2012). O BPA também é adicionado na produção de policloreto de vinila (PVC), para lhe conferir flexibilidade, e ainda, na produção de etiquetas autoadesivas e

selantes dentários. Já as resinas epóxi são empregadas no revestimento interno de latas e tampas de garrafas alimentícias (Krishnan et al., 1993; Markey et al., 2001; Welshons et al., 2006; Singh e Li, 2012; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013).

A exposição humana ao BPA é frequente e este é amplamente difundido no ambiente (Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). A forma mais comum de contato, tanto por adultos quanto por crianças, é a ingestão de alimentos contaminados com BPA, que compreende quase 100% da exposição humana (WHO e FAO, 2010). O grau de migração do BPA das embalagens e recipientes de alimentos depende mais da temperatura a que foi exposto do que ao tempo de exposição, sendo o aumento da migração diretamente proporcional ao aumento da temperatura (WHO e FAO, 2010).

Durante a fabricação, a degradação química industrial e a reciclagem de alguns produtos, o BPA pode ser liberado para a atmosfera na forma gasosa, porém, será rapidamente degradado, pois tem meia-vida de 0,13 dias nestas condições (NTP, 2008). Em ambientes aquáticos e terrestres, a biodegradação aeróbia é, provavelmente, a principal forma de eliminação, além da fotólise (Sing e Li, 2012). Todavia, o BPA pode aderir a sólidos em suspensão e sedimentos e estudos mostram que quase não há degradação deste composto sob condições de pouco ou nenhum oxigênio, evidenciado pela presença de BPA em sedimentos (NTP, 2008). Outra forma de exposição humana é o contato dérmico com papéis térmicos, comumente utilizados para impressão de extratos bancário e recibos de caixas (Singh e Li, 2012).

O BPA, originalmente, foi descoberto como estrogênio de natureza sintética com o objetivo de utilização para otimizar o crescimento de gados e aves, criados em larga escala para consumo humano (Singh e Li, 2012). Também já foi utilizado, por um curto período de tempo, em terapias de reposição hormonal para mulheres (Singh e Li, 2012).

A molécula de BPA tem características estruturais semelhantes ao 17β -estradiol (Figura 5) e outros compostos estrogênicos naturais encontrados em alguns alimentos,

como daidzeína e genisteína que estão presentes na soja, que lhe conferem fraca capacidade de ligação a receptores estrogênicos (RE) (Hu e Aizawa, 2003; Teegarden e Hanson-Drury, 2013), com afinidade de 1:2000 quando comparado ao [3H]Estradiol, e a receptores de progesterona (RP), com afinidade de 1:5000, conforme dados obtidos em estudo com *Saccharomyces cerevisiae* (Krishnan et al., 1993), o que torna o BPA um competidor de receptor com o hormônios esteroidais endógenos (Singh e Li, 2012).

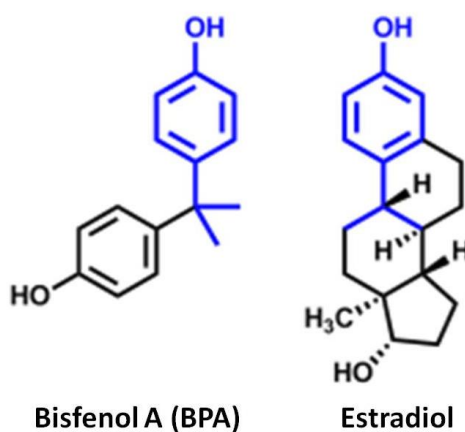


Figura 5: Semelhança estrutural das moléculas de bisfenol A e estradiol. (Adaptado de Rubin e Soto, 2009).

Esta capacidade de ligação a receptores hormonais torna o BPA uma substância considerada como um DE, pois permite alterações na fisiologia estrógeno-dependente desde que em doses adequadas (Takayanagi et al., 2006; Hu e Aizawa, 2003). Porém, existem evidências de que o BPA atuaria como DE mesmo em baixas doses, mas, neste caso, seu efeito estrogênico seria muito baixo, tornando a compreensão dos efeitos causados por baixas doses confusa, principalmente quando consideramos que o BPA também pode se ligar a outros receptores, como receptor gama relacionado a estrogênio (*estrogen-related receptor gamma*) (Takayanagi et al., 2006). Além disso, o BPA e os cinco ftalatos mais frequentes podem interagir com 1232 genes e 265 proteínas, de acordo com informações do *Comparative Toxicogenomics Database* (Singh e Li, 2012).

O termo “low-dose”, que pode ser traduzido como baixa dose ou baixo nível, tem sido amplamente utilizado para se referir ao grupo de estudos sobre toxicidade do BPA, e outras substâncias químicas, em doses próximas daquelas a que humanos estão expostos. Ainda assim, este termo é impreciso para determinar a faixa de exposição que este compreende, pois em sua revisão de literatura Teeguarden e Hanson-Drury (2013) concluíram que apenas a minoria dos estudos sobre baixas doses de BPA, de fato, utilizaram concentrações semelhantes às daquelas a que humanos estão expostos.

Em roedores expostos a altas doses de BPA, como efeitos adversos podem ser citados a redução do peso ao nascer e diminuição da sobrevivência e do crescimento da prole. Ao passo que, em roedores expostos a baixas doses, semelhantes às daquelas a que humanos estão expostos, os efeitos adversos observados recaem sobre alterações no comportamento, no desenvolvimento da próstata e das glândulas mamárias, aceleração da puberdade e problemas endócrinos em geral (NTP, 2010).

A respeito da exposição humana ao BPA e suas implicações, existem duas posições diferentes no meio científico. Uma delas afirma que há dados publicados suficientes para concluir que a exposição humana atual, ou seja, a baixos níveis, é suficiente para causar toxicidade (Vandenberg et al., 2010; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). A outra corrente afirma que a exposição humana é muito baixa quando comparada às daquelas que realmente causaram efeitos em animais nos já estudos publicados (Dekant e Volkel, 2008; Teeguarden et al., 2011; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013).

Estudos epidemiológicos demonstraram associações entre níveis de BPA sanguíneos em mulheres e respectivos problemas de saúde, como hiperplasia endometrial e até mesmo obesidade (Lang et al., 2008). Estes níveis também têm sido relacionados com alterações nas características sexuais secundárias, neurocomportamentais e morfometria celular, observados em exposições abaixo de

5mg/kg p.c. de BPA (WHO e FAO, 2011; Singh e Li, 2012). O período fetal, considerando a exposição de mulheres grávidas, e o período da infância são considerados os de maior risco para a ocorrência de efeitos adversos, quando comparados com a exposição de adultos às mesmas concentrações de BPA (Singh e Li, 2012).

Exames de sangue e urina podem ser utilizados para avaliar a presença de BPA, porém, tendem a subestimar o potencial tóxico desta substância (Singh e Li, 2012). A análise do suor pode ser considerada um método adicional para dar suporte ao monitoramento da bioacumulação, e ainda, a indução de suor parece ser uma forma eficaz para sua eliminação (Genius et al., 2012).

Estudos observaram padrão de curva dose-resposta não monotônica, evidenciando que a resposta tóxica ao BPA não é diretamente proporcional ao aumento da dose (vom Saal, 1997, Prins et al., 2007). Os efeitos tóxicos, tais como alterações na ingestão alimentar, aumento do peso corpóreo e do fígado, aumento da adiposidade abdominal (número de adipócitos e respectivos volumes) e dos níveis séricos de leptina e insulina, diminuição da adiponectina sérica e da tolerância à glicose foram observados, principalmente, naquelas doses consideradas abaixo do “no adverse effect level” (NOAEL) (Angle et al., 2013).

Diante destas questões e da dificuldade em se estabelecer níveis seguros de exposição ao BPA, organizações de países como Estados Unidos da América, Inglaterra, Japão e da União Européia concluíram que os níveis de exposição humana ao BPA estão abaixo dos níveis seguros, mas, ainda assim, alguns estados proibiram o uso desta substância, pois estudos apontam riscos decorrentes da exposição a esta substância mesmo quando em níveis abaixo daquele considerado seguro (Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). Os consumidores destes países podem notar seu desuso progressivo por meio da sinalização de “BPA-Free” nos produtos (Teeguarden e Hanson-Drury, 2013).

Outros países, como Argentina, Dinamarca, Costa Rica e China também restringiram o uso de BPA.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a fabricação e importação de mamadeiras que contenham BPA, por meio da resolução RDC 41/2011, publicada em 19 de setembro de 2011. Para a fabricação dos demais produtos, o emprego do BPA ainda é permitido, mas a legislação estabelece limite máximo de migração deste para o alimento. Esta decisão foi tomada pelo princípio da precaução, visto que os resultados dos inúmeros estudos a cerca do BPA não são realmente conclusivos.

1.5.Genisteína

A genisteína (GEN) é uma molécula de estrutura polifenólica, pertencendo, então, ao grupo dos polifenóis, ou seja, aqueles que possuem hidroxilas ligadas a anéis aromáticos (fenóis), como mostra a Figura 6. A GEN pertence à classe dos flavonóides, que são moléculas polifenólicas encontradas em vegetais, na parte aérea da planta, e possuem atividade, principalmente, antioxidante (Danciu et al., 2012). Os flavonoides são abundantes na natureza, onde existe cerca de quatro mil compostos deste tipo, que são divididos em subclasses. A GEN está locada na subclasse das isoflavonas (ISO), as quais possuem efeito estrogênico devido à grande semelhança com a molécula de estrógeno, sendo consideradas, assim, de fitoestrógenos (Danciu et al., 2012).

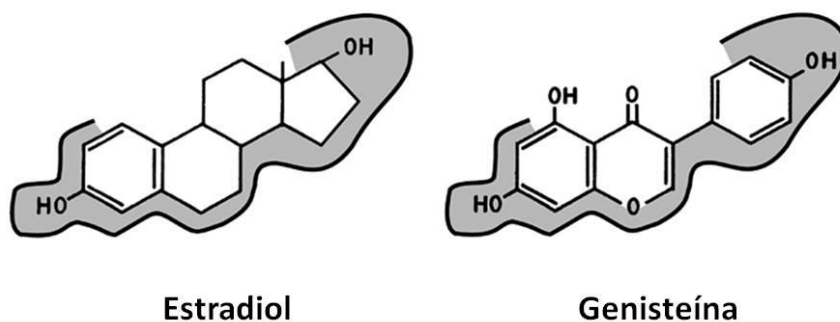


Figura 6: Semelhança estrutural entre as moléculas de estradiol e genisteína. (Marini et al., 2012)

A soja possui quatro isoflavonas, porém, uma delas, a isogenisteína, não demonstrou propriedades físicas semelhantes às demais ISO (Walter, 1941; Coward et al., 1998). Somente duas destas ISO estão disponíveis na planta na forma biologicamente ativa, que são a GEN e a daidzeína (Pihlajamaa et al., 2011), sendo a GEN o fitoestrógeno predominante. Já a GEN é encontrada em uma forma glicosilada biologicamente inativa, mas ao sofrer hidrólise pelo ácido clorídrico do suco gástrico resulta em uma molécula de aglicona bioativa de GEN e uma molécula de glicose (Walter, 1941; Pihlajamaa et al., 2011). A GEN é encontrada, majoritariamente, na soja e em seus produtos derivados, podendo ser encontrada também em outros vegetais utilizados na alimentação como tremoço, fava, e outras plantas como kudzu, utilizada na culinária japonesa, e *Psoralea corylifolia*, de uso comum na China e na Índia (Kaufman et al., 1997).

As ISO da soja podem estar presentes nos alimentos na forma glicosilada, predominante, a qual apresenta um açúcar ligado à posição 5 ou 7 do anel A (conjugada), ou na forma de aglicona, formada a partir de processamento industrial, como é o caso dos isolados protéicos de soja, ou do metabolismo da soja no organismo (Delclos et al., 2001; Coward et al., 1998). As agliconas são absorvidas no intestino delgado por não estarem conjugadas (Delclos et al., 2001; Coward et al., 1998). Portanto, a biodisponibilidade da GEN na soja pode variar conforme o preparo, tanto industrial quanto caseiro. A fermentação, por exemplo, torna as ISO mais biodisponíveis, havendo a presença majoritária de agliconas nos alimentos como missô e tempé, quando comparados aos alimentos à base de soja não fermentados como leite de soja, tofu, farinha, proteína concentrada e isolado protéico de soja (Coward et al., 1998). A concentração de ISO na soja, em ambas as formas, pode variar, ainda,

conforme o local do cultivo, a temperatura empregada no processamento industrial e o tipo de processamento a que foi submetido o grão, o que torna difícil o controle dos teores de ISO nos alimentos, incluindo o controle da GEN (Carrão-Panizzi et al., 2003).

Dietas ricas em soja têm sido relacionadas com vários efeitos benéficos à saúde, inclusive atividade quimiopreventiva contra uma série de tipos de neoplasias, incluindo as de próstata, mama e cólon (Adlercreutz, 1990) e amenização de alguns sintomas da menopausa (Setchell e Cassidy, 1999; Delclos et al., 2001). No entanto, é preciso ter cautela com a recomendação do consumo de soja, visto que este grão possui componentes considerados “fatores antinutricionais” que podem interferir negativamente na biodisponibilidade de alguns nutrientes (Wyatt e Triana-Tejas, 1994).

A população asiática consome, tradicionalmente, uma alimentação com alto teor de soja e seus derivados, comprovada pela presença freqüente de fitoestrógenos do tipo ISO em sua urina (Morton et al., 1997), diferente dos americanos e europeus (Adlercreutz et al., 1991; Armstrong e Dool, 1975). Esta informação vem acompanhada de dados de menor incidência de manifestação clínica de CaP nos homens asiáticos (Wang e Lamartiniere, 2002). Índices de mortalidade por CaP, e, conseqüentemente, de metástase, têm relação inversamente proporcional à concentração de GEN no sangue (Lakshman et al., 2008).

Pessoas que habitualmente consomem soja apresentam concentração sanguínea de GEN ~2 logs maior do que aqueles que não a consomem (Lakshman et al., 2008). O consumo médio de GEN ou outras ISO na dieta tradicional asiática é de 1,5 mg/kg/dia, enquanto na dieta tradicional ocidental este valor é menor que 0,2 mg/kg/dia (Coward et al., 1993). Homens do sudeste asiático com hábito de consumir soja representam índice de mortalidade ~10 vezes menor do que dos homens ocidentais não consumidores de soja (Lakshman et al., 2008). Todavia, os asiáticos que migraram para os Estados Unidos e se tornaram adeptos à dieta ocidental perderam esta “proteção” contra o CaP

(Cook et al., 1999; Wang e Lamartiniere, 2002). É importante considerar que as diferenças nas dietas asiáticas e ocidentais não se restringem apenas aos teores de soja.

A associação de dietas ricas em soja com menor incidência de doenças, comuns aos adeptos à dieta ocidental, pobre em soja, levou ao desenvolvimento de concentrados de extratos naturais, para suplementação de ISO, os quais começaram a ser avaliados em estudos clínicos somente após sua difusão e venda (Delclos et al., 2001). São comuns, ainda, alimentos infantis a base de soja, que estão disponíveis no mercado há décadas (Delclos et al., 2001). A ingestão humana média de ISO de soja é estimada em aproximadamente 1 mg/kg de alimento/dia para adultos e 6 a 9 mg/kg/dia em fórmulas infantis (Setchell et al., 1997). A exposição de neonatos a ISO merece especial atenção, uma vez que o período perinatal é o mais sensível a químicos estrogênicos (Kang et al., 2002) por se tratar de um período onde a produção endógena de estrógenos é baixa, permitindo que a ISO se ligue com maior facilidade aos ERs nos tecidos sensíveis ao estrogênio, maximizando efeitos estrogênicos no organismo (Kaludjerovic et al., 2012).

Os EACs que estão presentes nos alimentos podem ser chamados de componentes dietéticos com atividade endócrina. A exposição humana a estes componentes é, geralmente, muito maior do que a exposição aos EACs sintéticos (Delclos et al., 2001). O estudo dos EACs dietéticos se torna de grande importância para o entendimento e avaliação do impacto que seus efeitos adversos têm sobre a vida humana e animal, sobretudo quando consideramos o aumento de seu consumo por meio de suplementações diversas e a amplitude de distribuição, principalmente das ISOs, na natureza (Delclos et al., 2001; Jung et al., 2004).

O foco de muitos estudos tem sido especificamente as ISO da soja, em especial a GEN, por ter sido demonstrado sua atuação como componente ativo, ou até mesmo responsável, pelos efeitos benéficos da soja, graças a sua capacidade de interação com REs, com afinidade menor do que o estrogênio endógeno (Jung et al., 2004), que leva a

alterações na síntese e no metabolismo hormonal (Delclos et al., 2001). Estas alterações podem ser decorrentes de efeitos estrogênicos sutis ou anti-estrogênicos da GEN, demonstrados em alguns estudos (Park et al., 2000; Kang et al., 2002).

Estudos *in vitro* mostraram que ISO, incluindo a GEN, agem como agonistas dos REs (Lamartiniere et al., 2002). No entanto, outros fatores, além da capacidade de interação com REs, podem estar relacionados a estes efeitos endócrinos, tais como capacidade antioxidante, inibição de enzimas como aromatase, tirosinas quinases e DNA topoisomerases (Kang et al., 2002), visto que a GEN ainda é capaz de modular várias enzimas envolvidas na regulação do crescimento, incluindo estas citadas (Delclos et al., 2001; Jung et al., 2004). Ainda, por se tratar de uma ISO, a GEN apresenta outras atividades biológicas, como inibição de angiogênese, proliferação celular, radicais livres e enzimas metabolizadoras de esteróides (Whitten e Patisal, 2001; Fritz et al., 2003; Jung et al., 2004).

Existem registros de alterações reprodutivas em animais que se alimentaram com dietas ricas em soja ou em seus componentes e estudos em humanos que mostraram efeitos hormonais em mulheres (Xu et al., 1998; Delclos et al., 2001). Em estudos com animais ovariectomizados, os efeitos da soja e das ISOs isoladas foram benéficos ao sistema cardiovascular e aos ossos, em doses que não causaram alterações no trato reprodutivo (Delclos et al., 2001). O mesmo foi observado em estudos com fêmeas de ratos SD induzidas quimicamente para a carcinogênese mamária, onde se observou resultado de proteção, sem alterações do sistema reprodutivo (Delclos et al., 2001).

Porém, os mecanismos pelos quais a GEN protege contra desenvolvimento e crescimento de tumores ainda não foi bem esclarecido (Fritz et al., 2002). Estudos *in vitro* com células de linhagem de câncer de mama demonstraram efeitos antagônicos da GEN conforme sua dosagem: em baixas concentrações, a GEN estimulou a proliferação

celular tumoral, enquanto em concentrações mais altas a proliferação foi reduzida (Fritz et al., 2002).

Em relação ao CaP, estudos mostraram que a incidência e crescimento dos tumores foi reduzida em ratos e camundongos geneticamente modificados que receberam dieta rica em soja (Pollard, 1999; Landstrom et al., 1998; Pollard et al., 2000; Mentor-Marcel et al., 2001) e administrações de GEN inibiram o crescimento e metástase de tumores transplantados (Schleicher et al., 1999). Embora os mecanismos de ação da GEN *in vitro* estejam mais bem esclarecidos, os mecanismos de ação *in vivo* que protegem contra o CaP ainda precisam ser melhor compreendidos, principalmente quando em concentrações próximas às aquelas a que humanos estão sujeitos (Fritz et al., 2002).

Em seu estudo, Lakshman et al (2008) mostraram inibição de metástase em ratos transplantados com células humanas de de CaP, por inibição das primeiras etapas do processo metastático, denominadas “desprendimento celular” e “invasão celular”; por meio de GEN fornecida pela dieta. A concentração de GEN no soro dos ratos deste estudo foi semelhante às aquelas encontradas no soro humano em estudos epidemiológicos. A concentração de GEN é um fator importante e determinante para os mecanismos, pois muitos destes foram diretamente relacionados com a GEN, mas a maioria requer concentrações >2 logs acima daquelas encontradas no sangue após a ingestão (Lakshman et al., 2008).

Outro aspecto que pode ser influenciado pela GEN, no CaP, é o fato da próstata, naturalmente, ser dependente de andrógenos para crescer, bem como o CaP. Sendo assim, é importante avaliar o papel da GEN sobre os andrógenos circulantes, especialmente sobre a Test e a DHT. Outros fatores que devem ser avaliados são sua influência sobre os RAs do trato reprodutivo, assim como sobre os RE α e β , já que o

estrogênio também é importante para a função prostática e a GEN tem capacidade de interagir com estes (Fritz et al., 2002).

Pesquisas têm avaliado o potencial deletério das ISO em diversas concentrações e doses e, ainda, em diferentes fases de vida (Delclos et al., 2001; Jung et al., 2004). A fase em que se dá a exposição merece atenção especial, pois alguns efeitos deletérios de determinados EACs são específicos para determinadas fases da vida (Delclos et al., 2001; Jung et al., 2004). Vários estudos mostraram que exposição a químicos estrogênicos em estágios precoces do desenvolvimento causam anormalidades e diminuição do peso de órgãos do trato reprodutivo, grave comprometimento da produção espermática em animais experimentais e selvagens e em humanos (Jung et al., 2004; Spearow et al., 1999; David et al., 2000).

Dados de pesquisas clínicas indicam que a exposição materna a altas doses de estrogênio durante a gestação aumenta o risco de câncer de mama nas filhas (Ekbom et al., 1992; Sanderson et al., 1996), enquanto outros estudos não observaram alterações nos órgãos do sistema reprodutivo de machos e fêmeas de roedores que receberam baixas doses de GEN durante a gestação e a lactação (Kang et al., 2002; Jung et al., 2004). Por outro lado, efeitos adversos da GEN nas funções do trato reprodutivo, após a puberdade, de animais que foram expostos a baixas doses foram encontrados (Wisniewski et al., 2003; Jung et al., 2004).

Delclos et al. (2001) demonstraram que altas doses de GEN afetaram mais significativamente múltiplos órgãos sensíveis ao estrogênio quando comparadas com as baixas doses, tanto em ratos machos quanto nas fêmeas. Neste estudo foi considerado como altas doses aquelas acima de 500 partes por milhão (ppm) na ração. A partir desta dose, já foram observados efeitos no sistema reprodutivo, mas não foram observados efeitos tóxicos sistêmicos para as mães ou a prole. Jung et al. (2004) sugeriram que a

ingestão diária de GEN, em várias fases da vida, não causaria efeitos adversos sobre o desenvolvimento reprodutivo de ratos machos.

O crescente número de dados de pesquisas científicas acerca da toxicidade da GEN em roedores mostra certa controvérsia devido às diferenças em relação às espécies de animais utilizadas, doses ou concentrações, fases da vida em que as doses foram aplicadas, os órgãos alvo dos estudos, suas vias de administração e as formas químicas utilizadas, podendo ser soja *in natura* ou extratos de soja, que possuem a forma glicosilada das ISO ou as agliconas (Jung et al., 2004; Chiyomaru et al., 2012).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hämäläinen E, Hasegawa T, et al. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am. J. Clin. Nutr. Nutr.* 1991 Apr; 54(6):1093–100.
- Adlercreutz H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1990; 201:3–23.
- Andres SA, Bumpus SB, Wittliff JL. Assessment of phytoestrogen and mycoestrogen recognition by recombinant human estrogen receptor- α using ligand titration arrays. *Phytochem. Anal.* 2013 Jul-Aug; 24(4):357-66.
- Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer* 1975 Apr; 15(4):617– 31.
- Arunkumar A, Vijayababu MR, Venkataraman P, Senthilkumar K, Arunakaran J. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by diallyl disulfide, an organosulfur compound of garlic. *Biol Pharm Bull.* 2006 Feb; 29(2):375–79.
- Aumuller G, Seitz J. Protein Secretion and Secretory Process in Male Accessory Sex Gland. *Int Ver Citol.* 1990; 121:127-231.
- Balducci L, Lyman GH. Cancer in the elderly. Epidemiologic and clinical implications. *Clin Ger Med.* 1997; 13:1–14.
- Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, ET al. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* 1999 Apr; 13(18):966-77.
- Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer.* 1987 Feb 15; 59(4):788–94.

- Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1996 Jul; 78(2): 330-6.
- Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. *Rev Urol* 2005; 7 Suppl. 3:S11-8.
- Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch. Health risk assessment of bisphenol A from food packaging applications. August 2008. Health Canada press.
- Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *BMJ Case Reports*. 2011 Jul; 41(6):158–76.
- Carrão-Panizzi MC; Simão AS; Kikuchi A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. *Pesq Agrop Bras, Brasília*. 2003; 38(8):897-902.
- Carvalho HF, Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int*. 1996;20:809–19.
- Chiyomaru T, Yamamura S, Zaman MS, Majid S, Deng G, Shahryari V, et al. Genistein suppresses prostate cancer growth through inhibition of oncogenic microRNA-151. *PLoS One*. 2012 Jan; 7(8):e43812.
- Cook DG, Whincup PH, Miller G, Carey IM, Adshear FJ, Papacosta O, et al. Fibrinogen and factor VII levels are related to adiposity but not to fetal growth or social class in children aged 10-11 years. *Am. J. Epidemiol*. 1999 Oct; 150(7):727–36.
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein and daidzein, and their glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem*. 1993; 41:1961–67.
- Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking. *Am. Soc. Clin. Nutr*. 1998; 68 (suppl):1486S–91S.

- Danciu C, Soica C, Csanyi E, Ambrus R, Feflea S, Peev C, et al. Changes in the anti-inflammatory activity of soy isoflavonoid genistein versus genistein incorporated in two types of cyclodextrin derivatives. *Chem. Cent. J.* 2012 Jan; 6(1):58.
- David J, Hendelsmen S, Wishart A, Conway J. Estradiol enhances testosterone-induced suppression of human spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 2000; 15:672–79.
- Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* 2001 Aug;15(6):647–63.
- EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report. *Federal Register Notice* 1998 Aug; 63,(248) 71541-71568.
- Ekbom A, Trichopoulos D, Adami HO, Hsieh CC, Lan SJ. Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. *Lancet.* 1992; 340:1015–18.
- Eminaga O, Hinkelammert R, Abbas M, Titze U, Eltze E, Bettendorf O, et al. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: existence of HGPIN near prostate cancer. *Prostate.* 2013 Jul; 73(10):1115–22.
- Fiege H; Voges HW, Hamamoto T, Umemura S, Iwata T, Miki H, et al. Phenol Derivatives. *Weinheim:Wiley-VCH – Ullman’s Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 2002:37-39.
- Fritz WA, Cotroneo MS, Wang J, Eltoum I, Lamartiniere CA. Dietary Diethylstilbestrol but Not Genistein Adversely Affects Rat Testicular Development. *J. Nutr.* 2003; 133:2287–93.
- Fritz WA, Eltoum I, Cotroneo MS, Lamartiniere CA. Genistein Alters Growth but Is Not Toxic to the Rat Prostate. *J. Nutr.* 2002;132:3007–11.
- Gartner LP, Hiatt, JL. *Tratado de Histologia em Cores.* Saunders – Elsevier 2007; 3º edição:309-312.

- Ghayee HK, Auchus RJ. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2007 Dec; 8(4):289–300.
- Golden RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Kaufman R, Mitten-dorf R, Stillman R, Reese EA. Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evi- dence. *Critical Reviews in Toxicology* 1998; 28:109–227.
- Harper CE, Cook LM, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Arabshahi A, et al. Genistein and resveratrol, alone and in combination, suppress prostate cancer in SV-40 tag rats. *The Prostate* 2009 Nov; 69(15):1668–82.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *BR J Urol.* 1997; 2:18-26.
- Hebel R. & Stromberg M.V. *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat.* BioMed Verlag, Wörthensee. 1986;270p.
- Henley DV, Korach KS. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 2006; 147:S25–32.
- Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006 May; 11:1388-413.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and Prostate Cancer: Current Perspectives and Future Directions. *Prostate.* 2002; 52:213-35.
- Hu JY, Aizawa T. Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Research* 2003 Mar; 37(6):1213–1222.
- Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate.* 1984; 5(5): 545-47.
- Jesik CJ, Holland JM, Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate.* 1982; 3(1):81-97.

- Jung E-Y, Lee B-J, Yun YW, Kang J-K, Baek I-J, Jurg M-Y, et al. Effects of Exposure to Genistein and Estradiol on Reproductive Development in Immature Male Mice Weaned from Dams Adapted to A Soy-based Commercial Diet. *J. Vet. Med. Sci.* 2004 Jun; 66(11):1347–54.
- Kaludjerovic J, Chen J, Ward WE. Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 2012 Jan; 75(11):649–60.
- Kang KS, Che JH, Lee YS. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. *Food Chem Toxicol.* 2002 Jan; 40(1):43–51.
- Karr JF, Kantor JA, Hand PH, Eggensperger DL, Schlom J. The presence of prostatic-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.* 1995 Jun; 55(11):2453-62.
- Kaufman PB, Duke JA, Brielman H, Boik J, Hoyt JE. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human health and nutrition. *J Altern Complement Med.* 1997; 3:7–12.
- Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.* Elsevier 2^a ed, Rio de Janeiro; 2008:677p.
- Komáreck V, Gembardt C, Krinke A, Mahrous T, Schaetti P. Synopsis of the organ anatomy. *The Laboratory rat – The Handbook of Experimental Rats.* London: Academic Press. 2000:283-322.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology.* 1993 Jun; 132(6):2279–86.

- Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990 Jul; 68(7):1017-24.
- Lakshman M, Xu L, Ananthanarayanan V, Cooper J, Takimoto CH, Helenowski I, et al. Dietary genistein inhibits metastasis of human prostate cancer in mice. *Cancer Res.* 2008 Mar; 2014-32.
- Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr* 2002;132:552S-8S.
- Landstrom M, Zhang JX, Hallmans G, Aman P, Bergh A, Damber JE, et al. Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *The Prostate* 1998 Aug; 36(3):151-61.
- Lee BJ, Jung EY, Yun YW, Kang JK, Baek IJ, Yon JM, Lee YB, Sohn HS, Lee JY, Kim KS, Nam SY. Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. *J Reprod Dev.* 2004 m s; 50: 399-409.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka S, Liao S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod.* 1990; 43:1079-86.
- Lee JM, Lee YK, Mamrosh JL, Busby SA, Griffin PR, Pathak MC, et al. A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* 2011; 474:506-10.
- Lipski BA, Garcia RL, Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: significance and management. *Semin Urol Oncol.* 1996 Aug;14(3):149-155.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 Jul; 454(7203):436-44.
- Marini H, Polito F, Adamo EB, Bitto A, Squadrito F, Benvenga S. Update on genistein and thyroid: an overall message of safety. *Fron. Endocrinol.* 2012; 94.

- Marker PC, Donjacour A a, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* 2003 Jan; 253(2):165–74.
- Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM. The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 2001; 109:55-60.
- Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 2011 Mar; 120 Suppl 1:S93-108.
- McHenry J, Carrier N, Hull E, Kabbaj M. Sex differences in anxiety and depression: Role of testosterone. *Front. Neuroendocrinol.* 2013 Sep ;16.
- McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am.* 1990 Aug; 17(3): 477-86.
- McNeal JE, Cohen RJ, Brooks JD. Role of cytologic criteria in the histologic diagnosis of Gleason grade 1 prostatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 2001 Apr; 32(4):441–6.
- McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 1981; 2(1):35-49.
- Mentor-marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum I, Greenberg NM, Elgavish A. Genistein in the Diet Reduces the Incidence of Poorly Differentiated Prostatic Adenocarcinoma in Transgenic Mice (TRAMP). *Cancer Res.* 2001 Sep; 61:6777–82.
- Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, AbranchesMonteiro L, et al. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the UK. *Prostate* 1997 Jul; 32(2):122–8.
- Murugan S, Zhang C, Mojtahedzadeh S, Sarkar DK. Alcohol Exposure in Utero Increases Susceptibility to Prostate Tumorigenesis in Rat Offspring. *Alcohol Clin Exp Res* 2013 Jul 26;1–9.

- National Cancer Intelligence Network. Prostate Cancer Survival. *Natl. Cancer Intell. Netw.* 2012;(September):2009–10.
- National Institute of Environmental Health Sciences - NIH-HHS. Bisphenol A (BPA). *Natl. Toxicol. Progr.* 2010 August. National Toxicology Program press.
- National Toxicology Program - U.S. Department of Healthy and Human Services. NTP-CERHR Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. *NIH Pub.* 2008 Sep; 8:1-16p.
- Nogueira J. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos. *Bol. da Soc. Port. Química.* 1999; 65–71.
- Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. *Health at a Glance: Europe 2010.* OECD Publishing. 2010.
- Park JS, Lee BJ, Kang KS, Tai JH, Cho JJ, Cho MH, Inoue T, Lee YS. Hormonal effects of several chemicals in recombinant yeast, MCF-7 cells and uterotrophic assays in mice. *J Microbiol Biotechnol.* 2000; 10:293–99.
- Pihlajamaa P, Zhang F-P, Saarinen L, Mikkonen L, Hautaniemi S, Jänne OA. The phytoestrogen genistein is a tissue-specific androgen receptor modulator. *Endocrinology* 2011 Nov; 152(11):4395–405.
- Pollard M, Wolter W. Prevention of spontaneous prostate- related cancer in lobund wistar rats by a soy protein isolate/ isoflavone diet. *Prostate* 2000 Oct; 45(2):101-5.
- Pollard M. Prevention of prostate-related cancers in Lobund-Wistar rats. *The Prostate* 1999 Jun; 39(4):305-9.
- Pollard M. The Lobund–Wistar rat model of prostate cancer. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1992; 16H:84–8.
- Price D, Williams-Ashman HG. *Sex and Internal Secretion.* 1961; 3rd edn. Vol. 1:366-448.

- Price D. Comparative aspects of development and structures in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1963 Oct; 12:1-18.
- Prins GS, Ye S-H, Birch L, Ho S, Kannan K. Serum Bisphenol A Pharmacokinetics and Prostate Neoplastic Responses following Oral and Subcutaneous Exposures in Neonatal Sprague-Dawley Rats. *Reprod. Toxicol.* 2011Jan ;31(1):1–9.
- Reznik G, Ward JM. Morphology of hyperplastic and neoplastic lesions in the clitoral and preputial gland of the F344 rat. *Vet. Pathol.* 1981; 18:228–38.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res.* 2005; 322:173–81.
- Roberts KP. What are the components of male reproductive system? *Am. Soc. Androl.* 2010:1-5.
- Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken).* 2007; 290(10):1233-47.
- Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Impot. Res.* 2008 Dec;20 Suppl 3:S11–8.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkford J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer developmental. *Endocr. Relat. Cancer.* 2004 Nov;11:225-324.
- Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *NIH Public Access.* 2009; 304(1-2):1–17.
- Sanderson M, Williams MA, Malone KE, Stanford JL, Emanuel I, White E, et al. Perinatal factors and risk of breast cancer. *Epidemiology* 1996; 7:34–7.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Campos SGP , Justulin Jr LA, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas WG. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate:

proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol.* 2009 Aug; 262(3): 215-23.

Schleicher RL, Lamartiniere CA, Zheng M, Zhang M. The inhibitory effect of genistein on the growth and metastasis of a transplantable rat accessory sex gland carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 136:195–201.

Setchell KDR, Cassidy A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *J. Nutr.* 1999; 129:758S–67S.

Shapell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. *Cancer Res.* 2004; 64:2270-305.

Shauer IG, Rowley DR. The Functional Role of Reactive Stroma in Benign Prostatic Hyperplasia. *Differentiation.* 2011; 82:200-10.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics , 2013. *Ca Cancer J Clin.* 2013; 63(1):11–30.

Singh S, Li SS-L. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Int. J. Mol. Sci.* 2012 Aug; 13:10143–53.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 2001 May; 16(5):972–8.

Spearow JL, Doemeny P, Sera R. Genetic variation susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science.* 1999; 285:1259–61.

Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA, Bigsby RM, Brody JR. Whole-mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol. Reprod.* 1986b; 34:985-95.

- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Bio. Reprod.* 1986a; 34:961-71.
- Sung Sy; Chung LW. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanisms and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation.* 2002 Dec; 70(9-10): 506-21.
- Takeda H, Lasnitzki I, Mizuno T. Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *J. Endocrinol.* 1986 Sep; 110: 467–470
- Teeguarden JG, Hanson-Drury S. 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* 2013 Jul.
- Toppari J, Haavisto A-M, Alanen M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad. Saúde Pública do Rio Janeiro.* 2002; 18(2):413–20.
- Tuxhorn JA; Ayala GE; Smith MJ; Smith VC; Dang TD; Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype an extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:2912-23.
- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 2002 Jul; 68(1):121–46.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). *Exposure Factors Handbook* : 2011 Edition. EPA Publ. 2011 Sep.
- Uglea, CV, Negulescu I. *Synthesis and Characterization of Oligomers.* CRC Press. 1991. p. 103.
- Urological Cancers SSCRG. Mortality from Prostate Cancer. *Natl. Cancer Intell. Netw.* 2012; 1–16.

- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int* 2005; 29:809-16.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer K a, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997 Mar 4;94(5):2056–61.
- Vral A, Magri V, Montanari E, Gazzano G, Gourvas V, Marras E, et al. Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: a biopsy study in chronic prostatitis patients. *Int. J. Oncol.* 2012 Dec; 41(6):1950–8.
- Walter ED. Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans. *J Am Chem Soc* 1941;63:3273–6.
- Wang J, Eltoum I-E, Lamartiniere CA. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett.* 2002 Dec; 186(1):11–8.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 2006; 147:S56–S69
- WelshonsWV, Nagel SC, Thayer KA, JudyBM, Vom Saal FS. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 1999 Jan-Mar 15(1-2):12–25.
- Whitten PL, Patisaul HB. Cross-Species and Interassay Comparisons of Phytoestrogen Action. *Env. Heal. Perspect.* 2001 Mar; 109(1):5–20.

- Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *J Urol.* 2003; 169:1582–6.
- Woodham C, Birch L, Prins GS. Neonatal estrogen down-regulates prostatic androgen receptor through a proteasome-mediated protein degradation pathway. *Endocrinology.* 2003 Nov; 144: 4841-50.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting 2–5 November 2010 and Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A. 2010 Nov. World Health Organization Press, Geneva.
- Wyatt C Jane, Triana-Tejas A. Soluble and Insoluble Fe, Zn, Ca, and Phytates in Foods Commonly Consumed in Northern Mexico. *J. Agri. Food Chem.* 1994; 42:2204-9.
- Xu X, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS. Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Dec;7(12):1101-8.
- Yildiz F. Phytoestrogens in Functional Foods. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Ltd; 2005 Sep. p257.
- Zhao E, Mu Q. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci. Pharm* 2011 Mar; 79(1):1–20.

3. JUSTIFICATIVA

O crescimento, a maturação e a manutenção estrutural e funcional da próstata são eventos hormônio-dependentes, principalmente de andrógenos. Sendo assim, alterações hormonais que ultrapassem a capacidade de controle homeostático do sistema endócrino/reprodutivo poderão resultar em efeitos adversos sobre a próstata, sobretudo quando estas alterações ocorrerem no período crítico de desenvolvimento prostático.

O homem e os animais estão expostos a componentes com atividade endócrina, os DEs, que são encontrados no ambiente, seja por compostos químicos industriais ou por estarem presentes naturalmente em alguns alimentos. Um exemplo de substância sintética deste tipo é o BPA, amplamente utilizado pela indústria e que está presente em recipientes de armazenamento e venda de alimentos e bebidas e em uma vasta gama de artigos domésticos, esportivos, automotivos, dentre outros. O BPA possui atividade estrogênica devido a sua capacidade de ligação a REs, podendo causar alterações adversas no trato reprodutivo e até mesmo maior propensão ao desenvolvimento e crescimento de lesões preneoplásticas e tumores. A GEN, isoflavona da soja, também tem atividade endócrina estrogênica, porém, está relacionada a efeitos benéficos sobre a carcinogênese prostática e mamária e à reposição hormonal feminina.

Diante desses dados, este estudo relacionou a exposição ao BPA e à GEN durante a gestação, e avaliou seus efeitos precoces e tardios sobre a morfogênese prostática da prole de ratos recém desmamada (DPN 21) e na vida adulta (DPN 180).

4. OBJETIVOS

Avaliar se a exposição gestacional ao BPA causa efeitos deletérios sobre a morfogênese próstática da prole de machos no DPN 21 e 180.

Avaliar se a exposição gestacional a GEN, concomitante à exposição ao BPA, modificaria os efeitos deletérios deste sobre a morfogênese prostática na geração F1 no DPN 21 e 180.

CAPÍTULO 2

Efeitos da exposição gestacional ao bisfenol A sobre o desenvolvimento prostático na prole de ratos Sprague-Dawley e o papel modulador da genisteína.

Bruna D. Bernardo¹; Joyce Z. Brandt²; Tony F. Grassi¹; Wellerson R². Scarano Luis F. Barbisan^{1,2*}

¹ UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Botucatu 18618-970, SP, Brasil.

² UNESP – Univ. Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, Botucatu 18618-970, SP, Brasil.

*Autor correspondente

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-0970 Botucatu, SP, Brasil. Telefone: +55 14 38800469.

E-mail: barbisan@ibb.unesp.br (L.F. Barbisan).

Palavras-chave: Genisteína; Bisfenol A; Próstata; Desregulador endócrino

Resumo

O Bisfenol A (BPA) é uma substância química que tem sido frequentemente investigada devido ao seu potencial para causar doenças em órgãos hormônio-sensíveis, incluindo a próstata. No presente estudo, ratas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram tratadas com BPA nas doses de 25 ou 250 µg/kg dia gestacional (DG) 10 ao 21 e ração convencional ou acrescida de genisteína (GEN) na concentração de 250 mg/kg de ração. A GEN é uma isoflavona com potencial quimiopreventivo contra o desenvolvimento de vários tipos de neoplasias, incluindo as de mama e próstata. A prole de machos das diferentes ninhadas e tratamentos foram eutanasiadas no dia pós-natal (DPN) 21 ou 180. O tratamento gestacional com a menor dose de BPA induziu alterações prostáticas precoces (DPN 21) e tardias (DPN 180). O tratamento gestacional com a GEN reverteu os efeitos deletérios do BPA sobre os níveis de proliferação celular no epitélio prostático, arquitetura prostática e expressão de receptores androgênicos (RA) da prole no DPN 21. Um aumento na incidência de inflamação multifocal e de hiperplasia prostática atípica foi observado na prole das mães tratadas com a menor dose de BPA no DNP 180. Por outro lado, o tratamento gestacional com a GEN atenuou os efeitos tardios do BPA sobre a próstata. Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que a ingestão da GEN, concomitante à exposição ao BPA, durante a gestação tem ação preventiva contra seus efeitos adversos sobre a próstata.

Abstract

Bisphenol A (BPA) is a chemical that has been widely studied because has adverse potential in hormone-dependent organs, including prostate. In the present study, pregnant Sprague-Dawley females were treated with BPA at 25 or 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses from gestational day 10-21 and received basal diet or basal diet containing genistein (GEN) at 250 mg/kg diet. GEN is an isoflavone with chemopreventive potential against the development of several tumors, including breast and prostate. The male offspring from different litters/treatments were euthanized on post natal day (PND) 21 or 180. Gestational treatment with the lower BPA dose induced earlier (PND 21) and elderly prostatic changes. Gestational treatment with GEN reduced the deleterious effects of BPA on prostatic epithelial cell proliferation levels, prostatic architecture and androgen receptor (AR) expression at PND 21. An increase on incidence of multifocal inflammation and atypical hyperplasia in the prostate were observed in male offspring at DPN 180 that received the lower BPA dose. On the other hand, the gestational GEN treatment attenuated the elderly BPA effects on prostate. This way, the present study results point to preventive action of GEN on deleterious BPA effects on prostate.

1. Introdução

Os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias ou misturas de substâncias químicas exógenas, sintéticas ou naturais, que demonstraram capacidade de induzir efeitos semelhantes aos dos hormônios endógenos, sendo capazes, então, de alterar as funções do sistema endócrino e causar efeitos adversos à saúde humana (EDSTAC, 1998; Kang et al., 2002, Zhao, 2011). Da mesma forma, algumas substâncias naturais apresentam efeitos miméticos hormonais, como os fitoestrógenos, que são compostos com ação estrogênica existentes em vegetais e alguns grãos presentes na dieta humana (Kang et al., 2002; Yildiz, 2005).

O Bisphenol A (BPA) é um composto industrial produzido em larga escala e utilizado como base para a produção de resinas epóxi e policarbonatos (Tyl et al., 2002; NTP, 2010; Singh e Li, 2012; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). A exposição humana ao BPA é frequente devido a sua ampla distribuição pelo meio ambiente (Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). Entretanto, a forma mais comum de contato tanto por adultos quanto por crianças é a ingestão de alimentos contaminados, que compreende quase 100% da exposição humana (WHO e FAO, 2011). Além disso, estudos experimentais observaram padrão de curva dose-resposta do BPA não monotônica, evidenciando que sua resposta tóxica não é diretamente proporcional ao aumento do nível de exposição (vom Saal et al., 1998).

Vários estudos indicam que a exposição humana, particularmente *in útero*, a DE ambientais pode causar várias reações adversas, incluindo alterações deletérias ao sistema endócrino e reprodutivo (Golden et al., 1998; Singh e Li, 2012). Em especial, estudos experimentais mostram que a exposição aos DE em doses muito baixas, similares àquelas a que humanos são expostos, levam a alterações no desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas, com prejuízo na fertilidade, reprodução, e desenvolvimento de doenças na vida adulta, mesmo que a exposição tenha ocorrido nos

estágios iniciais da vida (Vom Saal et al., 1997; Welshons et al., 1999; Kang et al., 2002; Jung et al., 2004; Teenguarden e Hanson-Drury, 2013).

A próstata em roedores se desenvolve a partir do seio urogenital que surge após o décimo terceiro dia de gestação (DG), permanecendo indistinguível quanto ao sexo (Marker et al., 2003). Neste período, chamado de “janela”, a presença de andrógenos é fundamental para induzir o brotamento prostático que ocorre durante o DG 17 ao 21, considerado o período final da gestação em ratos e camundongos (Takeda et al., 1986). Alterações hormonais neste período crítico podem resultar em alterações morfofuncionais e desenvolvimento de lesões prostáticas inflamatórias e/ou pré e neoplásicas na vida adulta (Woodham et al., 2003; Scarano et al., 2009; Prins et al., 2011).

A genisteína (GEN) é uma isoflavona encontrada na soja e seus derivados que possui efeito estrogênico devido à grande semelhança estrutural com a molécula de estrogênio e capacidade de ligação aos receptores estrogênicos (RE), sendo classificada como um fitoestrógeno. (Hu e Aizawa, 2003; Danciu et al., 2012; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013). A ingestão de dietas ricas em soja e seus derivados têm sido relacionada com vários efeitos benéficos à saúde, inclusive atividade quimiopreventiva contra uma série de tipos de neoplasias hormônio dependentes, incluindo as de próstata e mama (Adlercreutz, 1990; Jung et al., 2004) e amenização de alguns sintomas da menopausa (Setchell e Cassidy, 1999; Delclos et al., 2001). O homem asiático consome, tradicionalmente, uma dieta com alto teor de soja e seus derivados (Morton et al., 1997), diferente do americano e do europeu (Adlercreutz et al., 1991; Wang e Lamartiniere, 2002). Essas informações vêm acompanhadas de dados de menor incidência de manifestação clínica de câncer de próstata (CaP) nos homens asiáticos (Wang e Lamartiniere, 2002). Todavia, os asiáticos que migraram para os Estados Unidos e se tornaram adeptos à dieta ocidental perderam a “proteção” contra o CaP (Cook et al.,

1999; Wang e Lamartiniere, 2002). Por se tratar de uma isoflavona, a GEN apresenta outras atividades biológicas, como inibição de angiogênese e proliferação celular, de formação de radicais livres e alterações em enzimas metabolizadoras de esteróides (Whitten e Patisal, 2001; Fritz et al., 2003 Jung et al., 2004). Em relação ao CaP, estudos mostraram que a incidência e crescimento dos tumores foi reduzida em roedores que receberam dieta rica em soja ou seus componentes isolados (Pollard, 1999; Landstrom et al., 1998; Pollard et al., 2000; Mentor-Marcel et al., 2001).

Devido ao crescente número de dados de pesquisas científicas acerca da toxicidade reprodutiva do BPA in útero e sobre o potencial preventivo da ingestão da soja e seus derivados sobre o desenvolvimento e carcinogênese prostática, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ingestão materna de GEN sobre os efeitos deletérios do BPA na morfogênese prostática.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley (SD) em idade reprodutiva foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo n0. 1055/2013-CEUA).

Durante a fase gestacional, foram avaliados peso corpóreo, consumo de água e de ração nos DG 0, 6, 9, 12, 15, 18 e 20, e semanalmente durante o período de lactação. O peso corpóreo da prole foi documentado ao nascimento e no decorrer do experimento e os consumos de água e de ração avaliados semanalmente.

2.2 Preparo da ração com genisteína

A genisteína (GEN) (DSM Nutritional Products HNH, Brazil, 99,7% de pureza) foi adicionada e misturada à ração em pó Nuvilab-CR1 (Nuvital-PR) na concentração final de 250mg/kg de ração. Após completa homogeneização e umidificação, realizada em misturador industrial (CAF-modelo M60), a ração foi peletizada em máquina peletizadora de ração (Chavantes – PR), seca por ventilação e acondicionada em sacos plásticos previamente identificados e mantidos sob refrigeração (-8°C) até o momento do uso.

2.3 Delineamento experimental

Após o período de aclimatação duas fêmeas sexualmente virgens foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). A presença de esperma no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da fase de estro foram consideradas indicadores do dia gestacional 0 (DG 0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas.

Grupos de fêmeas prenhes foram expostas ao BPA (Sigma-Aldrich Co., USA, CAS No. 80-05-7) via oral (gavage) nas concentrações de 25 e 250µg/kg de peso corpóreo (p.c.) ou volume equivalente de dimetil sulfóxido (DMSO)/óleo de canola (1/99%, v/v), do dia DG 10 até o DG 21, considerado o período crítico de desenvolvimento prostático intrauterino (Marker et al., 2003; Prins et al., 2007;

Vilamaior et al., 2007). Durante esse período, as fêmeas receberam ração basal ou acrescida com GEN e água *ad libitum*. Sendo assim, foram constituídos cinco grupos experimentais: G1: DMSO + ração basal; G2: BPA25 + ração basal; G3: BPA250 + ração basal; G4: BPA25 + ração acrescida com GEN; e G5: BPA250 + ração acrescida com GEN. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, sempre que possível mantendo 4 machos/4 fêmeas. Os filhotes machos foram sacrificados no dia pós-natal (DPN) 21, para avaliação dos efeitos precoces dos tratamentos, enquanto outros foram sacrificados no DPN 180, para avaliação dos efeitos tardios sobre a próstata.

A Figura 1 mostra o delineamento experimental na forma de diagrama, para facilitar o entendimento.

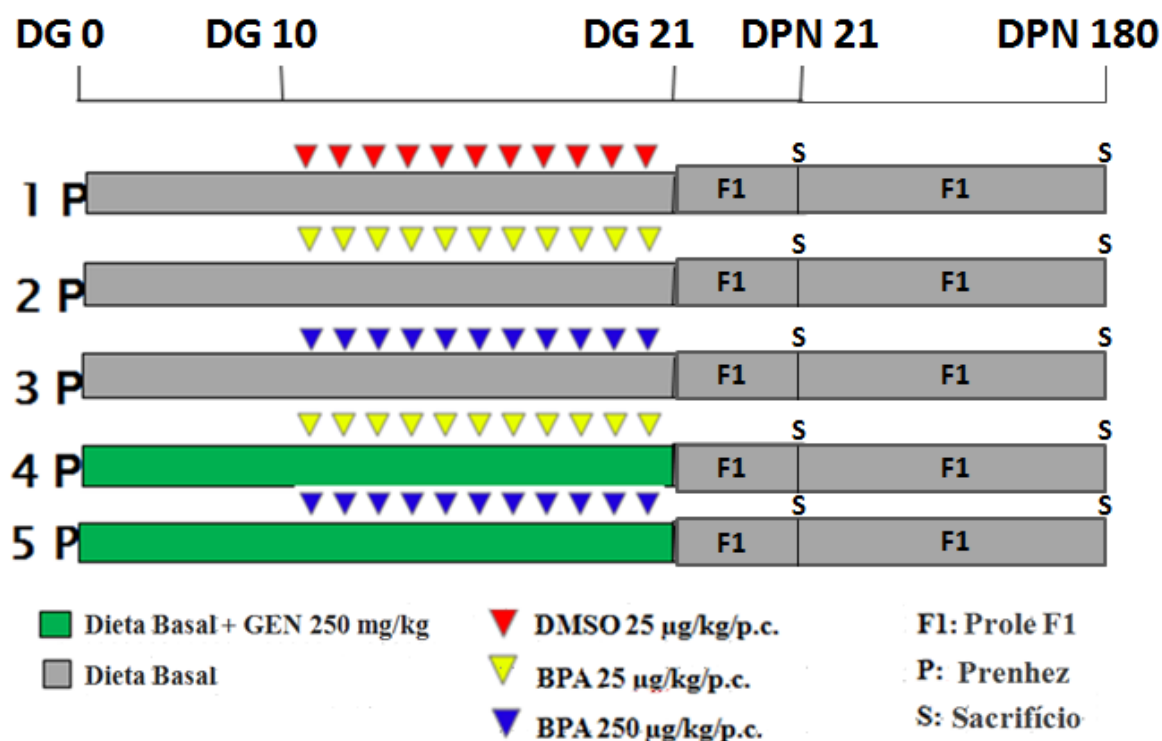


Figura 1: Delineamento experimental na forma de diagrama.

2.4 Repercussões precoces e tardias sobre a próstata

Após o desmame (DPN 21) e na idade adulta (DPN 180), oito a dez filhotes machos por grupo foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono para a avaliação dos efeitos imediatos e tardios sobre a próstata, respectivamente. Imediatamente após o sacrifício, o sangue foi coletado por punção intra-cardíaca para dosagens hormonais de estradiol e Test. O complexo prostático foi removido e fragmentos da porção distal da próstata ventral (PV) e dorsolateral (PDL) foram fixados em metacarn (ácido acético a 10%, metanol a 70% e clorofórmio a 20%) e destinados à rotina histotécnica para avaliação histopatológica. Fragmentos também foram congelados a -80°C para posterior extração protéica e análise semi-quantitativa por Western Blot de PCNA, PAR-4, ER α e AR (dados em finalização).

2.5 Microscopia de luz

Fragmentos da PV e PDL foram fixados por imersão em metacarn, durante 3 horas, mantidos em álcool (70%) até o momento da inclusão, e incluídos em parafina. Cortes de 5 μm foram obtidos em micrótomo rotativo e submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (HE) - para análises morfológica e morfométrica; impregnação pela prata - para evidenciar fibras reticulares; picrossirius-hematoxilina - para evidenciar fibras colágenas (dados de impregnação por prata e picrossirius-hematoxilina em finalização).

2.6 Análise morfométrica e estereológica

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando um microscópio de luz com sistema analisador de imagens (CellSens Standard Imaging System, Olympus, Japão). Os fragmentos prostáticos dos animais sacrificados no DPN 21 passaram por análise morfométrico-estereológica, segundo Weibel (1963), na qual se utiliza um sistema de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas.

Assim, foram obtidas as proporções ocupadas pelos componentes prostáticos: lume, epitélio e estroma. Foi realizada, ainda, a contagem de alvéolos prostáticos por campo (7 campos/próstata).

2.7 Análise imunohistoquímica de Ki-67

Os níveis de expressão proteica de ki-67 (marcador de proliferação celular) foram avaliados nos fragmentos da PV utilizando um sistema de polímero (*MACH 4 Universal HRP polymer Detection, Biocare, CA, USA*). Os cortes de 5 µm obtidos sob lâminas silanizadas foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica em panela de pressão Pascal (*Dako Cytomation Denmark A/S*) a 120 °C em tampão citrato 0,01M (pH 6.0) durante 5 minutos. Após a recuperação, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ e PBS por 10 minutos, e ao bloqueio de proteínas inespecíficas em leite desnatado a 5%, durante 1 hora. Após esses procedimentos foram realizadas as incubações com anticorpo de camundongo anti-Ki-67 (diluição de 1:100, *Abcam ab 16667, Cambridge, MA 02139*), deixados em overnight a 4°C, e em seguida incubados com bloqueio e polímero-peroxidase, deixados durante 30 minutos em temperatura ambiente. A reação de revelação foi feita com a 3,3'diaminobenzidina tetrahydrocloridro (*Sigma-Aldrich, Co, USA*)/H₂O₂. Então, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

O índice de proliferação celular foi obtido pela relação entre as células epiteliais prostáticas marcadas positivamente para ki-67 e as células não marcadas. Esta relação foi calculada a partir da divisão das células positivas pelo total de células analisadas (foram analisadas e contadas todas as células dos campos, sendo sete campos por animal). A análise do índice proliferativo foi feita utilizando-se o programa ImageJ Launcher.

2.8 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada nas lâminas com cortes de fragmentos da próstata ventral e dorsolateral dos ratos sacrificados no DPN 180. Foram analisadas as incidências de inflamação focal e multifocal e hiperplasias fisiológica, reativa e atípica, a partir dos conceitos estabelecidos por Bosland et al, 1998.

2.9 Western Blotting (immunoblotting)

O WB foi realizado para quantificação de RA e receptor 4 ativado por protease (*prostate apoptosis response 4* - PAR-4) marcador de apoptose. Para isso, as amostras da próstata foram mantidas a -80°C após o sacrifício até o início das análises. O tecido foi homogeneizado a 4°C em tampão Tris-HCl 50mmol/L pH 7,6 contendo 5mmol/L EDTA, 0,25% de Triton X-100, 0,1M NaCl, 250mmol/L sacarose e inibidores de proteases em homogeneizador do tipo Tureaux em 3 ciclos de 5 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado. A quantificação das proteínas foi realizada em placas de Bradford, com 96 poços e leitura em leitor de ELISA. As alíquotas (70 μg de proteína) foram diluídas em solução tampão para amostra (Laemli sample buffer – Bio-rad) e β -mercaptoetanol a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as proteínas adicionadas em gel de poliacrilamida para “corrida” em eletroforese a 160V, durante aproximadamente 1 hora, e então, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em leite desnatado a 5% em tampão Tris-HCl contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com os anticorpos primários anti-AR (diluição de 1:250, *clone sc-816, Santa Cruz® Biotechnology, Inc., USA*) e anti-PAR-4 (diluição 1:400, *clone sc-1666, Santa Cruz Biotechnology®, Inc., USA*), diluídos em BSA a 1 ou 3%, ou leite a 2%, todos diluídos em TBST, e deixados em overnight.

Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico (anti-mouse ou anti-rabbit), diluídos em BSA a 1% ou leite a 2%, por 2 horas. Os componentes imunorreativos foram detectados por kit *ECL selective WB detection*, para fotodocumentação. Estes componentes foram quantificados com auxílio do programa ImageJ Launcher. A expressão dos receptores analisados foi obtida pela relação da intensidade ótica dos componentes imunorreativos marcados com anticorpo anti-AR ou anti-PAR-4 e anticorpo anti-beta-actina, utilizado como normalizador.

2.10 Análise estatística dos dados

Os dados foram comparados entre os grupos experimentais utilizando os teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis, para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. O contraste entre os grupos para estes testes foi avaliado utilizando os Testes de Tukey ou Student-Neuman-Keuls (Zar, 1984). A incidência de animais com inflamação ou lesões proliferativas prostáticas foi analisada pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fischer. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Dados gestacionais e lactacionais

Os dados gestacionais e da prole de machos na fase de lactação estão apresentados na Tabela 1. Os tratamentos com BPA e GEN durante a fase gestacional não alteraram o peso corpóreo e consumo de ração materno e das ninhadas, indicando ausência de toxicidade sistêmica evidente. Os tratamentos com BPA, isoladamente e em associação com a GEN, não alteraram a duração da gestação, o tamanho médio da ninhada ou a proporção entre fêmeas e machos ao nascimento.

Houve redução significativa ($p < 0,001$) no peso corpóreo médio no DG 20 das mães do grupo tratado com BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2) em comparação com as mães do grupo tratado com BPA nesta mesma dosagem + GEN (G4). Este grupo tratado somente BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2) também apresentou ganho de peso corpóreo, no período do DG 0 ao DG 20, significativamente ($p = 0,021$) menor quando comparado com o grupo tratado somente com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3), sugerindo que doses mais baixas de BPA têm maior interferência no ganho de peso corpóreo. Entre os demais grupos experimentais, não houve diferença estatisticamente significativa no ganho de peso materno. Os dados de ingestão diária de GEN também estão demonstrados na Tabela 1 e não houve diferença estatisticamente significativa na ingestão entre os grupos que receberam a isoflavona.

Em relação ao peso corpóreo da prole de machos, durante a lactação, houve diferenças significativas de acordo com o grupo de tratamento, com aumento principalmente nos animais tratados com BPA concomitante à GEN (G4 e G5) nos primeiros 10 dias de vida. Estas diferenças não se mantiveram no mesmo padrão durante todo o período de lactação (DPN 1-21), sendo observadas diminuições nos pesos médios destes mesmos grupos (G4 e G5), no DPN 21, quando comparados aos animais do grupo controle (G1), indicando que as alterações corporais são mais evidentes logo após o nascimento e se modificam durante a lactação. Pode ser inferida uma relação entre as alterações corpóreas e a proximidade com a exposição gestacional ao BPA e à GEN, ficando mais evidentes as alterações nos primeiros dias após o nascimento.

Os animais tratados com BPA 25 μg + GEN (G4), no DPN 3, apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no peso corpóreo em relação a todos os demais grupos. Nos animais que receberam a maior dose de BPA + GEN foi observada diferença significativa apenas quando comparados aos animais do grupo controle (G1).

3.2 Dados do sacrifício no DPN 21 e 180

Os dados de peso corpóreo final e pesos absoluto e relativo da próstata, obtidos no DPN 21 e no DPN 180 estão apresentados na Tabela 2.

Em relação aos animais sacrificados no DPN 21, houve diminuição do peso corpóreo estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nos grupos tratados com BPA 25 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G4 e G5) e com BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3) em comparação ao grupo controle (G1), indicando efeito adverso do BPA sobre a próstata.

Apenas os animais tratados com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3) não apresentaram alterações significativas no peso corpóreo quando comparados ao grupo controle (G1). No entanto, este mesmo grupo (G3), apresentou aumento significativo do peso absoluto da próstata ($p < 0.05$), quando comparado a todos os demais grupos (G1, G2, G4 e G5), indicando que o BPA na dose mais alta tem potencial deletério sobre a glândula em estágios precoces do desenvolvimento. O peso relativo da próstata dos animais tratados com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G5) foi menor quando comparado aos animais que receberam apenas BPA 25 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2 e G3), indicando potencial protetor da GEN contra os efeitos deletérios precoces do BPA sobre a próstata. De fato, o peso relativo da próstata dos animais tratados com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3) também foi significativamente maior ($p < 0.05$) do que a do grupo que recebeu BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G4) e do grupo controle (G1).

Os animais sacrificados no DPN 180 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, em nenhum dos parâmetros analisados, sugerindo que os efeitos deletérios da exposição *intra uterina* ao BPA são revertidos nos estágios tardios (Tabela 2).

3.3 Análise de proliferação e apoptose celular prostática no DPN 21

Um aumento significativo ($p= 0.029$) nos índices de proliferação celular pelo Ki-67 no epitélio alveolar prostático foi observado no grupo tratado com BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2), quando comparado ao grupo controle (G1). Diferenças estatisticamente significativas na proliferação celular não foram observadas entre os demais grupos, indicando efeito adverso do BPA apenas na dose mais baixa (Tabela 3 e Figura 2a).

3.4 Análises estereológicas da próstata no DPN 21

A exposição gestacional ao BPA resultou em diferenças estatisticamente significativas nos compartimentos estromal e luminal dos grupos tratados, evidenciando aumento do estroma em detrimento do lúmen no DPN 21 (Figura 2C).

O compartimento estromal do grupo tratado com BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2) aumentou de forma significativa ($p= 0.01$) em relação ao grupo que recebeu apenas BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G5) e em relação ao grupo controle (G1). Este compartimento também sofreu aumento significativo ($p= 0,01$) no grupo tratado com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3) em comparação ao grupo que recebeu esta mesma dosagem de BPA + GEN (G5) e ao G1, sugerindo efeito deletério do BPA isolado e interferência do tratamento com GEN neste efeito.

O compartimento luminal dos grupos tratados com BPA 25 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2 e G3) diminuiu de forma significativa ($p= 0,01$) quando comparados aos grupos controle (G1) e tratado com BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G5). Entretanto, o compartimento epitelial não apresentou diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

A contagem de alvéolos por campo, realizada sobre as mesmas lâminas de HE, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$) entre os grupos de tratamento (Tabela 3).

3.5 Análise histopatológica da próstata no DPN 180

A análise histopatológica da PV e PDL dos animais do grupo controle (G1) demonstrou arquitetura glandular regular, caracterizada por predominância de epitélio simples e colunar baixo nos alvéolos, ancorados por um estroma fibromuscular delicado (Figuras 3 A e G). Os animais de todos os grupos experimentais apresentaram hiperplasia fisiológica em alvéolos prostáticos periféricos na PV (Figura 3F) e na PDL. Os grupos tratados com BPA 25 ou 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2 a G5) apresentaram áreas de hiperplasias atípicas e reativas (associadas a inflamação) em alvéolos prostáticos isolados (Figuras 3 B, C, D, E, H e I). O grupo BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2) apresentou aumento na incidência de hiperplasia atípica em relação ao grupo controle (G1). Por outro lado, o grupo BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G4) apresentou incidência de hiperplasia atípica semelhante estatisticamente ao grupo controle (G1), sugerindo potencial protetor da GEN sobre os efeitos do BPA sobre o desenvolvimento de inflamação prostática (Tabela 4).

O grupo que recebeu apenas BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G2) apresentou aumento estatisticamente significativo ($p= 0,001$) na incidência de inflamação multifocal e hiperplasia atípica na PV, ambas presentes em 87,5% dos animais deste grupo, quando comparado ao grupo controle (G1) (Tabela 4). Os focos inflamatórios foram predominantemente compostos por células mononucleares (Figura 3E e H), características de inflamação crônica. O grupo que recebeu BPA 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (G3) não apresentou aumento na incidência de inflamação multifocal, evidenciando o potencial deletério do BPA na menor dose. O grupo BPA 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GEN (G4) que apresentou incidência de inflamação multifocal semelhante em relação ao grupo controle (G1), sugerindo potencial protetor da GEN sobre os efeitos do BPA na indução tardia de hiperplasia atípica (Tabela 4).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que diz respeito à inflamação focal, hiperplasia reativa e fisiológica na VP entre os grupos de

tratamento. A análise histológica da PDL não resultou em diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 4).

3.6 Western Blotting

A análise de *immunoblotting* revelou que o grupo que recebeu a menor dose de BPA (G2) apresentou aumento estatisticamente significativo ($p=0.015$) na expressão de RA, quando comparado aos grupos controle (G1) e que receberam GEN (G4 e G5), conforme mostram as Figuras 4A, 4B e 5A. Os diferentes tratamentos não induziram alterações importantes na expressão de PAR-4, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4. Discussão

Alterações no ambiente intrauterino podem resultar em maior predisposição a doenças crônicas que se manifestam somente na vida adulta (Sallout e Walker, 2003, Soto et al, 2013). Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento *in útero* com a menor dose de BPA causa alterações nos níveis de proliferação celular e na arquitetura prostática refletindo em maior incidência de inflamação e hiperplasia atípica prostática na vida adulta.

A proliferação celular e apoptose são eventos celulares antagônicos que estão intimamente relacionados ao processo de carcinogênese prostática, pois quando estes saem do controle homeostático podem dar origem a lesões ou condições pré-neoplásicas com potencial para progressão às lesões malignas (Harper et al., 2009). Além disso, o aumento dos níveis de proliferação celular pode estar relacionado ao desenvolvimento de lesões hiperplásicas prostáticas, tais como a HBP no homem (Murugan et al., 2013). A HPB é caracterizada pelo aumento do número de células epiteliais e estromais na área

periuiretral prostática, porém, o mecanismo molecular deste processo hiperplásico não está bem elucidado (Roherborn et al., 2008). Existe a possibilidade de a HPB ser causada pelo aumento da proliferação celular e/ou por redução dos níveis de apoptose (Roherborn et al., 2008).

A próstata ventral de roedores parece ser mais susceptível aos efeitos decorrentes de polifenóis do que a próstata dorsolateral, evidenciando a maior susceptibilidade deste lobo aos efeitos de substâncias com atividade endócrina, visto que o lobo ventral em roedores é mais susceptível à carcinogênese do que os demais (Harper et al., 2009). Os polifenóis têm a propriedade de reduzir os níveis de proliferação celular e aumentar os níveis de apoptose na próstata de roedores, podendo ser considerados benéficos contra carcinogênese prostática e, portanto, classificados como agentes quimiopreventivos (Harper et al., 2009).

Neste estudo, a análise da proliferação celular pela marcação imunohistoquímica de Ki-67 foi realizada na próstata ventral, baseada no fato de que esta proteína é expressa em todas as fases da proliferação celular, com exceção da fase G₀, sendo um marcador eficaz de proliferação celular (Scholzen e Gerdes, 2000). O marcador PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) também pode ser utilizado para analisar a proliferação celular, porém, este não está presente somente nas fases da mitose, mas também em eventos de síntese de DNA associada ao reparo do DNA (Guzińska-Ustymowicz et al., 2009), sendo assim, menos específico para a análise de proliferação isoladamente.

A análise de Ki-67 indicou que o tratamento gestacional com a menor dose de BPA 25µg/kg aumentou os níveis de proliferação celular epitelial prostático na prole em relação ao grupo controle (G1). Por outro lado, a prole que recebeu a maior dosagem de BPA 250 µg/kg (G3) não sofreu alterações significativas neste parâmetro. Estes dados

corroboram com nossos dados recentemente publicados (Brandt et al., 2013) e aqueles registrados em estudos anteriores que consideram a curva de ação do BPA não monotônica (Davis e Svendsgaard, 1990; vom Saal, 1997). Se a curva de ação fosse monotônica, as doses e os efeitos seriam diretamente proporcionais, porém não é isto que ocorre, conforme demonstrado neste e em outros estudos, sendo observados efeitos adversos maiores causados em dosagens mais baixas, que são amenizados ou extintos à medida que estas doses vão aumentando (vom Saal et al, 1997).

O grupo cujas mães foram tratadas na gestação com BPA 25µg/kg e GEN (G4) não apresentou aumento estatisticamente significativo nos níveis de proliferação celular (epitélio prostático) em relação ao grupo controle (G1), o que evidencia o potencial protetor da GEN (250 mg/kg de ração) contra os efeitos deletérios do BPA em dose que reproduz a exposição humana (Welshons et al., 2006). O consumo médio de ginesteína em nosso estudo ficou na faixa de 5 a 7 mg/kg de peso corpóreo, baseado no consumo médio de ração e peso das mães durante a gestação.

Porém, efeito contrário a este foi demonstrado em um estudo de Nakamura et al., (2011), onde a GEN na dose de 80 mg/Kg/dia, considerada alta dosagem, aumentou os níveis de proliferação celular e reduziu os de apoptose na próstata de ratos transplantados com a linhagem celular de carcinoma prostático (CaP) humano metastático. Esses efeitos foram mediados por meio da fosforilação do receptor de fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor - EGFR*) e tirosinas quinases, evidenciando a importância de maiores estudos sobre dose-resposta da GEN, visto que esta isoflavona parece causar efeitos deletérios quando administrada em altas doses.

Os níveis de apoptose na próstata podem ser analisados através da expressão de PAR-4, que é uma proteína pró-apoptótica utilizada como substrato pela caspase-3 (Chaundhry et al, 2012) e desempenha importantes papéis em uma série de processos

celulares, como resposta a injúrias diversas, tais como radiação UV, citocinas, ablação hormonal e agentes citotóxicos (Gacía-Cao et al., 2005).

Por meio do *immunoblotting*, em nosso estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. Harper et al (2009) obtiveram resultado diferente do nosso, onde a GEN induziu aumento de apoptose da PV de ratos com CaP, alimentados com a mesma dose de GEN do nosso estudo. Todavia, nosso estudo forneceu a GEN concomitante ao BPA para as fêmeas prenhes, ao passo que no estudo de Harper et al (2009) a GEN foi fornecida isolada e diretamente aos ratos machos, o que pode justificar a divergência nos resultados. Nakamura et al (2011) obteve outro resultado divergente do nosso estudo e do estudo de Harper et al 2009, onde a GEN diminuiu a apoptose na próstata de ratos com CaP, porém, neste estudo foi utilizada alta dose farmacológica de GEN, indicando que a GEN apresenta curva de efeitos não monotônica. É importante considerar que a ausência de significância estatística na expressão de PAR-4 em nosso estudo pode ser devido ao pequeno número de amostras utilizadas para a realização do Western Blotting apenas para a PAR-4, 2 amostras por grupo, devido a uma limitação do nosso estudo referente à degradação de algumas amostras.

A homeostasia entre os compartimentos epitelial e estromal mantém o controle da diferenciação e organização arquitetural do epitélio prostático (Lee et al, 1990; Marker et al., 2003). As células estromais são responsáveis por este controle, juntamente com os andrógenos e, portanto, o aumento na relação estroma-epitélio não necessariamente indica alteração estromal, pois pode ser causada, na verdade, por alterações epiteliais ou ambas (Hayaward et al., 1992; Roehrborn, 2008). Desta forma, alterações na homeostase destes compartimentos podem levar a iniciação e promoção de lesões prostáticas (Sung e Chung, 2002).

Exposições intrauterina e neonatal ao BPA podem interferir no desenvolvimento prostático, alterando tanto a arquitetura glandular quanto a homeostase, com a possibilidade de indução de inflamação, hiperplasia e metaplasia na vida adulta (Prins et al, 2007; Barker, 2004; Ho et al, 2006). Neste estudo, o BPA, quando administrado isoladamente (G2 e G3), causou aumento no compartimento estromal e diminuição no compartimento luminal, quando comparado ao grupo controle (G1). Esta alteração arquitetural indica prejuízo na homeostasia glandular, podendo favorecer ou resultar, mais tardiamente, em iniciação e promoção de lesões prostáticas (Sung e Chung, 2002). Essas alterações evidenciam o efeito tóxico do BPA na morfogênese prostática com repercussões sobre a carcinogênese desta glândula devido ao potencial de desregulação endócrina deste químico, uma vez que a morfogênese é dependente de hormônios, principalmente andrógenos, mas também de estrógenos (Woodham ET AL., 2013; Prins ET AL., 2011; Isaacs, 1984; NTP, 2010). Assim, como o BPA promove alterações em órgãos hormônio-dependentes e visto que o estrógeno pode também interferir no desenvolvimento prostático, alterações em vias androgênicas e estrogênicas podem ser importantes para caracterizar os efeitos deletérios do BPA sobre a próstata. (Fritz et al., 2002; Prins e Korach, 2008).

O grupo BPA 250 µg/kg e GEN (G5) não apresentou alterações estruturais significativas quando comparado ao grupo controle (G1). Este resultado pode indicar efeito protetor da GEN contra os efeitos deletérios do BPA, uma vez que este, quando administrado isoladamente na mesma dose, resultou em alterações morfométricas epiteliais e estromais, embora sem repercussões tardias importantes sobre a próstata.

Tanto o BPA, quanto a GEN, possuem capacidade estrogênica, atuando por meio da ligação aos receptores de estrógeno (REs) (Hu e Aizawa, 2003; Teeguarden e Hanson-Drury, 2013; Danciu et al., 2012). Analisando apenas teoricamente, os efeitos hormonais causados pelo BPA seriam de exacerbação da estrogenicidade no organismo,

porém, os xenoestrógenos são, geralmente, menos potentes do que o estradiol (Silva et al, 2002; Soto et al, 2013). Desta forma, a dose analisada se torna crucial para os efeitos observados pois, disputando os mesmos receptores com o estradiol, o efeito estrogênico poderia ser diminuído caso a dose de xenoestrógenos fosse alta o suficiente para que suas moléculas se ligassem à maioria dos REs, em detrimento do estradiol. Além disso, em baixas doses, os efeitos do BPA podem ser aditivos aos efeitos do estradiol, uma vez se ligam aos receptores livres, sem prejuízo da ligação do estradiol aos REs (Silva et al, 2002).

Por outro lado, a GEN também apresenta efeito estrogênico menor do que o estradiol, mas seus efeitos protetores à carcinogênese podem ser explicados por sua capacidade antioxidante e fase de administração (Silva et al, 2002; Danciu et al., 2012; Soto et al, 2013). Sendo a GEN um fitoestrógeno com capacidade protetora contra a carcinogênese, ao disputar os mesmos receptores com o BPA, diminui ou até mesmo anula os efeitos adversos deste sobre a morfogênese e a carcinogênese prostática.

Processos inflamatórios são importantes na patogênese de muitas neoplasias humanas e estão presentes no tecido antes de alterações malignas ocorrerem (Mantovani et al., 2008). Injúrias causadas por patógenos ou agentes citotóxicos pró-inflamatórios podem desencadear proliferação celular prostática, levando ao surgimento de lesões epiteliais, conhecidas como atrofia inflamatória proliferativa (PIA – *Proliferative Inflammatory Atrophy*) (Vral et al, 2012). A infiltração de células inflamatórias na próstata libera espécies reativas de oxigênio, podendo levar as células atroficas à progressão neoplásica (Vral et al, 2012). Esta hipótese de que PIA é uma lesão de risco para a carcinogênese prostática tem sido amplamente estudada a nível celular e molecular, mas há poucos dados morfológicos sobre o assunto relacionando PIA e neoplasia intraepitelial prostática (PIN – *prostatic intraepithelial neoplasia*) com inflamação (Vral et al., 2012).

Em um estudo de vom Saal et al. (1997), a exposição intrauterina à baixa dose de estradiol ou dietilestilbestrol, ao contrário da exposição às altas doses, aumentou o número de alvéolos prostáticos, os níveis de proliferação celular e o tamanho da próstata em ratos adultos. Porém, neste mesmo estudo, não foram encontradas alterações histopatológicas importantes. No presente estudo, também foram observadas alterações na proliferação celular e no peso da próstata nos animais no DPN 21, corroborando os resultados do estudo de vom Saal et al. (1997). Todavia, não foram encontradas diferenças no número de alvéolos prostáticos nos ratos no DPN 21 e foram encontradas alterações histopatológicas nos ratos tratados com dose baixa de BPA, representadas por aumento na incidência de inflamação multifocal e hiperplasia atípica na próstata ventral, diferindo dos resultados do estudo supracitado, que podem ser devido às diferentes fases da vida de análise, às espécies diferentes de rato e substâncias utilizadas, sendo que no estudo de vom Saal a espécie utilizada foi de ratos CF-1, apenas na idade adulta e as substâncias foram estradiol e dietilestilbestrol e no presente estudo foram utilizados ratos Sprague-Dawley e BPA isolado ou com GEN, com análises precoces e tardias (DPN 21 e 180).

Em seu estudo, Prins et al (2007) relacionaram a exposição a baixa dose de BPA durante o desenvolvimento prostático com o aumento na susceptibilidade à lesões prostáticas com o envelhecimento, principalmente após exposição concomitante ao estradiol. No presente estudo, encontramos maior incidência de inflamação multifocal e hiperplasia atípica nos ratos adultos que receberam BPA em baixa dose, corroborando os dados do estudo de Prins et al (2007). Assim, como a inflamação crônica leva à infiltração celular do epitélio prostático por células inflamatórias, esse processo inflamatório pode causar alterações reativas na proliferação do epitélio, desencadeando processos carcinogênicos (Bernoulli et al, 2008).

O grupo de filhotes de mães tratadas com BPA na dose de 25 µg/kg, que apresentou aumento na incidência de lesões na vida adulta, foi o mesmo grupo que apresentou aumento nos níveis de proliferação celular no DPN 21, indicando que a menor dose de BPA apresenta efeitos deletérios sobre a próstata que podem ser observados precocemente e se refletem em lesões prostáticas na vida adulta.

Neste grupo que recebeu a menor dose de BPA também foi observada maior expressão de RA quando comparado ao grupo controle. O grupo proveniente das fêmeas que receberam esta mesma dose de BPA, porém com ração acrescida de GEN, não apresentaram este aumento no RA quando comparados ao grupo controle, o que indica capacidade protetora da GEN em reduzir os efeitos do BPA na próstata neste aspecto e nestas condições. Este resultado indica, ainda, que doses baixas de BPA têm maior potencial para causar efeitos adversos na próstata da prole do que doses mais altas, evidenciando a curva não-monotônica de ação desta substância.

O RA tem papel importante na carcinogênese e progressão tumoral do CaP, pelo fato de ser um receptor nuclear de xenoestrógenos que está relacionado com respostas mitóticas, participando do controle do crescimento e desenvolvimento celular (Cato et al, 2002; Wang et al, 2010). A GEN e o BPA são considerados ligantes alternativos de RA, desempenhando papéis androgênicos ou anti-androgênicos, dependendo da dose utilizada, pois podem disputar receptores com hormônios endógenos como DHT (Wang et al, 2010). No caso da GEN, que apresenta papel protetor contra o CaP, além de disputar receptor com andrógenos, pode disputar também com xenoestrógenos, como o BPA, diminuindo os efeitos negativos deste sobre a CaP (Wang et al, 2010). Os resultados do presente estudo acerca da expressão de AR corroboram estes dados da literatura, pois a GEN atenuou os efeitos do BPA sobre o aumento da expressão de AR.

Este aumento no RA deste grupo converge, ainda, com os resultados do estudo de Nagel et al (1997) e Gupta (2000), onde a exposição pré-natal ou neonatal de camundongos machos a baixas doses de compostos estrogênicos, BPA e DES, levaram ao aumento da expressão de RA e da sensibilidade a andrógenos na vida adulta. Aumento na expressão de AR também foi observado por Scarano et al (2008) e Brandt et al (2014), por meio de suplementação estrogênica em ratos castrados ou exposição intra-uterina ao BPA na mesma dose do presente estudo.

Em conclusão, o tratamento gestacional com GEN atenuou os efeitos precoces e tardios do BPA sobre a próstata, indicando que essa isoflavona tem ação preventiva contra efeitos adversos do BPA sobre a próstata.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Apoio financeiro

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Bruna Dias Bernardo foi beneficiária de bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hämäläinen E, Hasegawa T, et al. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am. J. Clin. Nutr. Nutr.* 1991 Apr; 54(6):1093–100.
- Adlercreutz H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1990; 201:3–23.
- Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer* 1975 Apr; 15(4):617– 31.
- Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.* 2004 Dec; 23(6 suppl):588S-95S.
- Bernoulli J, Yatkin E, Laakso A, Anttinen M, Bosland M, Vega K, et al. 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.* 2008 May 15;68(7):728–39.
- Bosland M, Tuomari D, Elwell M, Shirai T, Ward J, McConnell R. Proliferative Lesions of the Prostate and Other Accessory Sex Glands in Male Rats. Washington, DC: Guides for Toxicologic Pathology; 1998. p. 1–20.
- Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1996 Jul; 78(2): 330-6.
- Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. *Rev Urol* 2005; 7 Suppl. 3:S11-8.

- Bureau of Chemical Safety, Food Directorate, Health Products and Food Branch. Health risk assessment of bisphenol A from food packaging applications. August 2008. Health Canada press.
- Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE* 2002; 138:9.
- Chandhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol Cell Biol.* 2012 Feb; 32(4): 826-39.
- Cook DG, Whincup PH, Miller G, Carey IM, Adsheed FJ, Papacosta O, et al. Fibrinogen and factor VII levels are related to adiposity but not to fetal growth or social class in children aged 10-11 years. *Am. J. Epidemiol.* 1999 Oct; 150(7):727–36.
- Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking. *Am. Soc. Clin. Nutr.* 1998; 68 (suppl):1486S–91S.
- Danciu C, Soica C, Csanyi E, Ambrus R, Feflea S, Peev C, et al. Changes in the anti-inflammatory activity of soy isoflavonoid genistein versus genistein incorporated in two types of cyclodextrin derivatives. *Chem. Cent. J.* 2012 Jan; 6(1):58.
- Davis JM, Svendsgaard DJ. U-shaped dose-response curves: their occurrence and implications for risk assessment. *J Toxicol Environ Health.* 1990 Jun;30(2):71-83.
- Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2002 Dec;187(1-2):1–7.
- Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* 2001 Aug;15(6):647–63.

- Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007 Aug;104(32):13056–61.
- EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report. *Federal Register Notice* 1998 Aug; 63,(248) 71541-71568.
- Fritz WA, Cotroneo MS, Wang J, Eltoum I, Lamartiniere CA. Dietary Diethylstilbestrol but Not Genistein Adversely Affects Rat Testicular Development. *J. Nutr.* 2003 ;133:2287–93.
- Fritz WA, Eltoum I, Cotroneo MS, Lamartiniere CA. Genistein Alters Growth but Is Not Toxic to the Rat Prostate. *J. Nutr.* 2002;132:3007–11.
- García-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martín-Caballero J, Flores JM, et al. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. *EMBO Rep.* 2005 6:577-3.
- Golden RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Kaufman R, Mitten- dorf R, Stillman R, Reese EA. Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evi- dence. *Critical Reviews in Toxicology* 1998; 28:109–227.
- Guzińska-Ustymowicz Z, Pryczynicz A, Kemonia A, Czyżewska J. Correlation between Proliferation Markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2009 Aug; 29(8):3049-52.
- Harper CE, Cook LM, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Arabshahi A, et al. Genistein and resveratrol, alone and in combination, suppress prostate cancer in SV-40 tag rats. *The Prostate* 2009 Nov; 69(15):1668–82.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.* 1996a; 155(2):81–93.

- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat.* 1996b; 155(2): 94–103.
- Ho S-M, Tang W-Y, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 2006 Jun; 66(11):5624–32.
- Hu JY, Aizawa T. Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Research* 2003 Mar; 37(6):1213–1222.
- Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate.* 1984; 5(5): 545-47.
- Jung E-Y, Lee B-J, Yun YW, Kang J-K, Baek I-J, Jurg M-Y, et al. Effects of Exposure to Genistein and Estradiol on Reproductive Development in Immature Male Mice Weaned from Dams Adapted to A Soy-based Commercial Diet. *J. Vet. Med. Sci.* 2004 Jun; 66(11):1347–54.
- Kang KS, Che JH, Lee YS. Lack of adverse effects in the F1 offspring maternally exposed to genistein at human intake dose level. *Food Chem Toxicol.* 2002 Jan; 40(1):43–51.
- Landstrom M, Zhang JX, Hallmans G, Aman P, Bergh A, Damber JE, et al. Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of Dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *The Prostate* 1998 Aug; 36(3):151-61.
- Lee BJ, Jung EY, Yun YW, Kang JK, Baek IJ, Yon JM, Lee YB, Sohn HS, Lee JY, Kim KS, Nam SY. Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. *J Reprod Dev.* 2004; 50: 399-409.

- Lipski BA, Garcia RL, Brawer MK. Prostatic intraepithelial neoplasia: significance and management. *Semin Urol Oncol*. 1996 Aug;14(3):149-155.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 Jul; 454(7203):436-44.
- Marker PC, Donjacour A a, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol*. 2003 Jan; 253(2):165–74.
- Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 2011 Mar; 120 Suppl 1:S93-108.
- McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am*. 1990 Aug; 17(3): 477-86.
- McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 1981; 2(1):35–49.
- Mentor-marcel R, Lamartiniere CA, Eltoum I, Greenberg NM, Elgavish A. Genistein in the Diet Reduces the Incidence of Poorly Differentiated Prostatic Adenocarcinoma in Transgenic Mice (TRAMP). *Cancer Res*. 2001 Sep; 61:6777–82.
- Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, AbranchesMonteiro L, et al. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the UK. *Prostate* 1997 Jul; 32(2):122–8.
- Murugan S, Zhang C, Mojtahedzadeh S, Sarkar DK. Alcohol Exposure in Utero Increases Susceptibility to Prostate Tumorigenesis in Rat Offspring. *Alcohol Clin Exp Res* 2013 Jul 26;1–9.
- National Institute of Environmental Health Sciences - NIH-HHS. Bisphenol A (BPA). *Natl. Toxicol. Progr*. 2010 August. National Toxicology Program press.

- Pihlajamaa P, Zhang F-P, Saarinen L, Mikkonen L, Hautaniemi S, Jänne OA. The phytoestrogen genistein is a tissue-specific androgen receptor modulator. *Endocrinology* 2011 Nov; 152(11):4395–405.
- Pollard M, Wolter W. Prevention of spontaneous prostate-related cancer in lobund wistar rats by a soy protein isolate/ isoflavone diet. *Prostate* 2000 Oct; 45(2):101-5.
- Pollard M. Prevention of prostate-related cancers in Lobund-Wistar rats. *The Prostate* 1999 Jun; 39(4):305-9.
- Prins GS, Birch L, Tang W-Y, Ho S-M. Developmental Estrogen Exposures Predispose to Prostate Carcinogenesis with Aging. *NIH Public Access*. 2007;23(3):374–82.
- Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*. 1995 Mar; 136(3):1303–14.
- Prins GS, Ye S-H, Birch L, Ho S, Kannan K. Serum Bisphenol A Pharmacokinetics and Prostate Neoplastic Responses following Oral and Subcutaneous Exposures in Neonatal Sprague-Dawley Rats. *Reprod. Toxicol*. 2011Jan ;31(1):1–9.
- Rinaldi JC, Justulin LA Jr, Lacorte LM, Sarobo C, Boer PA, Scarano WR, Felisbino SL. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Sci*. 2013 Apr; 92:763-74.
- Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int. J. Impot. Res*. 2008 Dec;20 Suppl 3:S11–8.
- Sallout B, Walker M. The fetal origin of adult diseases. *J Obstet Gynaecol*. 2003; 23:555–60.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Campos SGP , Justulin Jr LA, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas WG. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate:

- proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol.* 2009 Aug; 262(3): 215-23.
- Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.
- Setchell KDR, Cassidy A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *J. Nutr.* 1999; 129:758S–67S.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics , 2013. *Ca Cancer J Clin.* 2013;63(1):11–30.
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol.* 2002; 36:1751–6.
- Singh S, Li SS-L. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Int. J. Mol. Sci.* 2012 Aug; 13:10143–53.
- Soto AM, Brisken C, Schaeberle C, Sonnenschein C. Does cancer start in the womb? Altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2013 Jun; 18(2):199–208.
- Sung Sy; Chung LW. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanisms and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation.* 2002 Dec; 70(9-10): 506-21.
- Takeda H, Lasnitzki I, Mizuno T. Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *J. Endocrinol.* 1986 Sep; 110: 467–470
- Teeguarden JG, Hanson-Drury S. 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* 2013 Jul.

- Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* 2002 Jul; 68(1):121–46.
- Vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer K a, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997 Mar 4;94(5):2056–61.
- Vral A, Magri V, Montanari E, Gazzano G, Gourvas V, Marras E, et al. Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: a biopsy study in chronic prostatitis patients. *Int. J. Oncol.* 2012 Dec; 41(6):1950–8.
- Wang H, Li J, Gao Y, Xu Y, Pan Y, Tsuji I, et al. Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens are alternative ligands for the androgen receptor. *Asian J. Androl.* Nature Publishing Group; 2010 Jul;12(4):535–47.
- Wang J, Eltoum I-E, Lamartiniere CA. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett.* 2002 Dec; 186(1):11–8.
- WelshonsWV, Nagel SC, Thayer KA, JudyBM, Vom Saal FS. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 1999 Jan-Mar 15(1-2):12–25.
- Whitten PL, Patisaul HB. Cross-Species and Interassay Comparisons of Phytoestrogen Action. *Env. Heal. Perspect.* 2001 Mar; 109(1):5–20.
- Woodham C, Birch L, Prins GS. Neonatal estrogen down-regulates prostatic androgen receptor through a proteosome-mediated protein degradation pathway. *Endocrinology.* 2003 Nov; 144: 4841-50.

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting 2–5 November 2010 and Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A. 2010 Nov. World Health Organization Press, Geneva.

Yildiz F. Phytoestrogens in Functional Foods. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Ltd; 2005 Sep. p257.

Zhao E, Mu Q. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci. Pharm* 2011 Mar; 79(1):1–20.

Lista de figuras

Figura 1: Delineamento experimental (para maiores detalhes, consulte Materiais e Métodos).

Figura 2: Prancha com figuras representativas de fotomicrografia (20x) dos cortes histológicos de próstata ventral de ratos no DPN 21 com marcações por imunohistoquímica de ki-67 (proliferação) e coloração por HE para análise estereológica. **2A:** Célula com núcleo marcado positivamente com ki-67 (seta) em coloração marrom escura. Corte histológico de animal do grupo exposto ao BPA 25 µg + GEN. **2B:** Corte com coloração de hematoxilina e eosina (HE). Corte histológico de animal do grupo exposto ao BPA 25 µg + GEN. Abreviações: Ep: epitélio; Es: estroma; Lu: lúmen; PV: próstata ventral.

Figura 3: Prancha com figuras representativas de fotomicrografia (20x e 40x) dos cortes histológicos de próstata ventral (PV) e dorsolateral (PDL) de ratos no DPN 180. **3A:** região da PV com histologia normal. Corte histológico de animal do grupo controle. **3B, 3C e 3D:** regiões da PV com hiperplasias atípicas, apresentando formações microglandulares. Cortes histológicos de animais do grupo exposto ao BPA 25 µg. **3E:** região da PV com foco inflamatório e hiperplasia reativa. Cortes histológicos de animais do grupo exposto ao BPA 25 µg. **3F:** região da PV com hiperplasia funcional. Corte histológico de animal do grupo exposto ao BPA 25 µg. **3G:** região da PDL com histologia normal. Corte histológico de animal do grupo controle. **3H:** região da PDL com hiperplasia reativa e foco inflamatório. Corte histológico de animal do grupo exposto ao BPA 25 µg. **3I:** região da PDL com hiperplasia atípica (aumento: nucléolos evidentes, característicos de hiperplasia atípica). Corte histológico de animal do grupo exposto ao BPA 25 µg. Abreviações: Ep: epitélio; Es: estroma; Lu:

lúmen; PV: próstata ventral; PDL: próstata dorsolateral; HA: hiperplasia atípica; Inf: inflamação; HR: hiperplasia reativa; HF: hiperplasia funcional.

Figura 4: Prancha com figuras representativas dos componentes imunorreativos, obtidos por imunoblotting a partir de fragmentos da próstata ventral de ratos no DPN 21, dos diferentes grupos experimentais. As bandas representam, em ordem, animais dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5. **4A:** Componentes marcados com anticorpo anti-beta-actina para normalização dos componentes marcados com anti-RA (**4B**). **4C:** Componentes marcados com anticorpo anti-beta-actina para normalização dos componentes marcados com anti-PAR-4 (**4D**).

Figura 5: Gráficos representativos da quantificação da intensidade ótica dos componentes imunorreativos das bandas representadas na Figura 4, a partir da média e do desvio padrão. **Figura 5A:** Relação RA/beta-actina e as diferenças entre os grupos experimentais. **Figura 5B:** Relação PAR-4/beta-actina e as comparações entre os grupos experimentais. ^{a, d} e ^e: diferença estatisticamente significativa quando comparado, respectivamente, aos grupos controle, BPA 25 µg + GEN e BPA 250 µg + GEN.

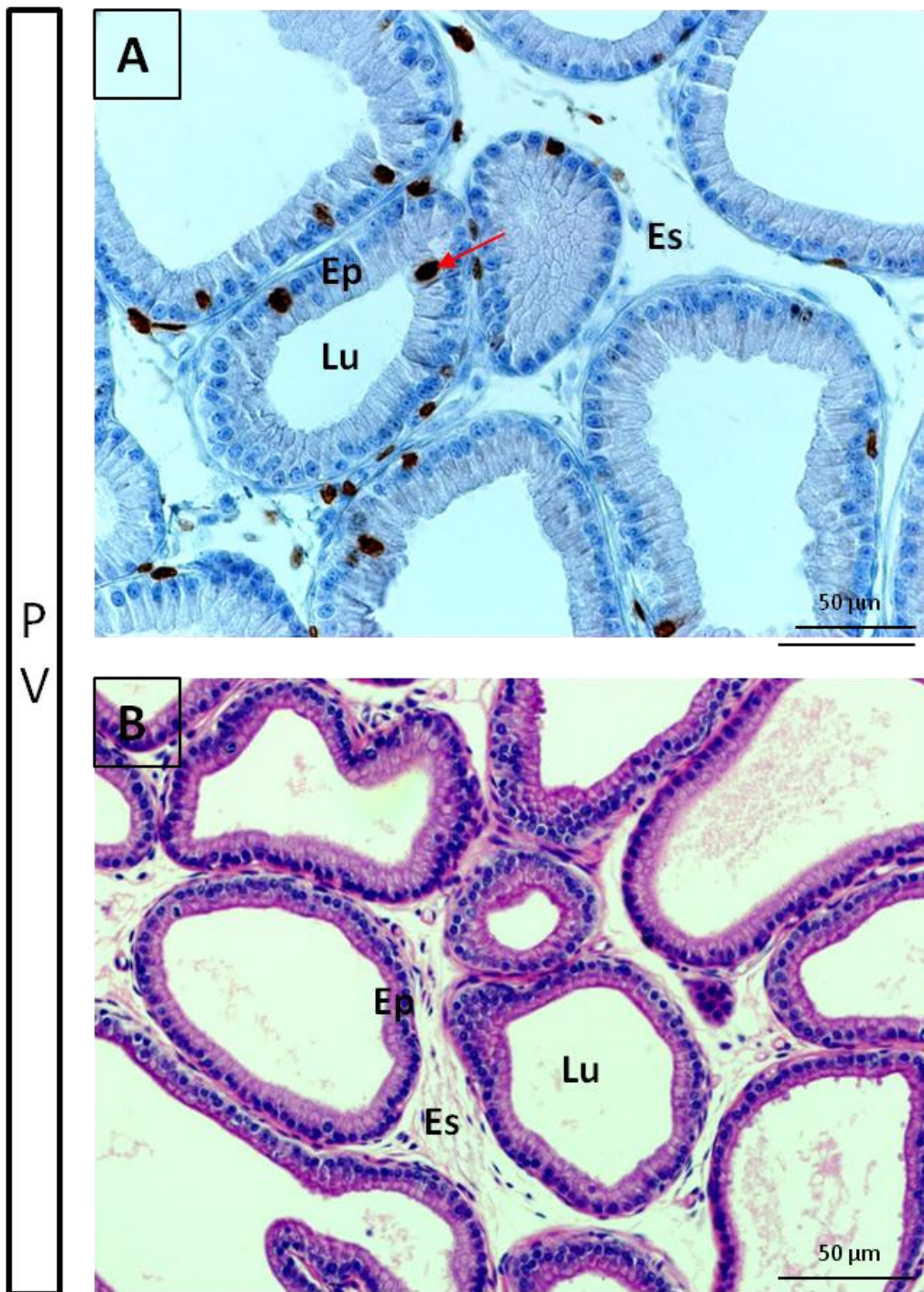


Figura 2

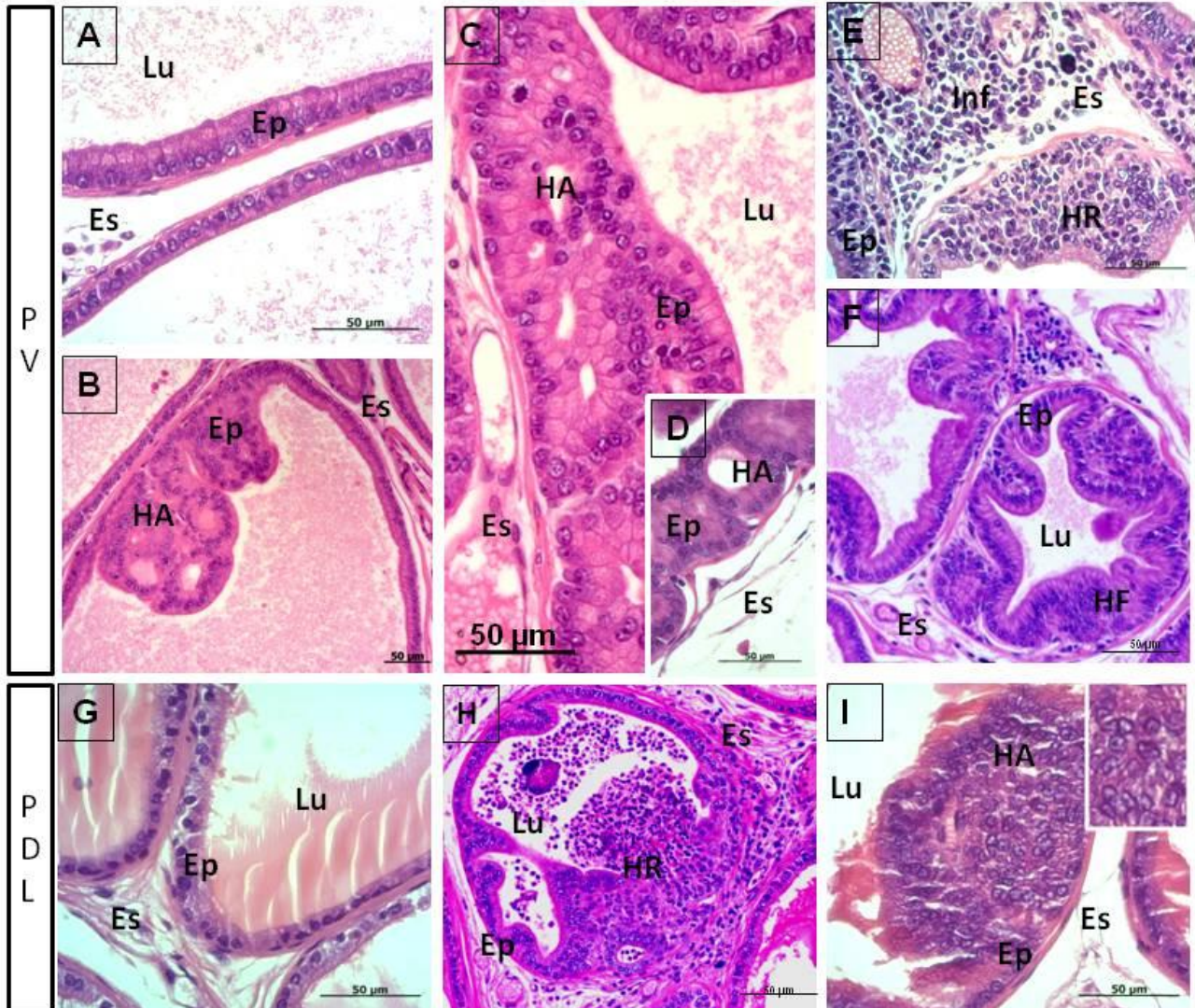


Figura 3

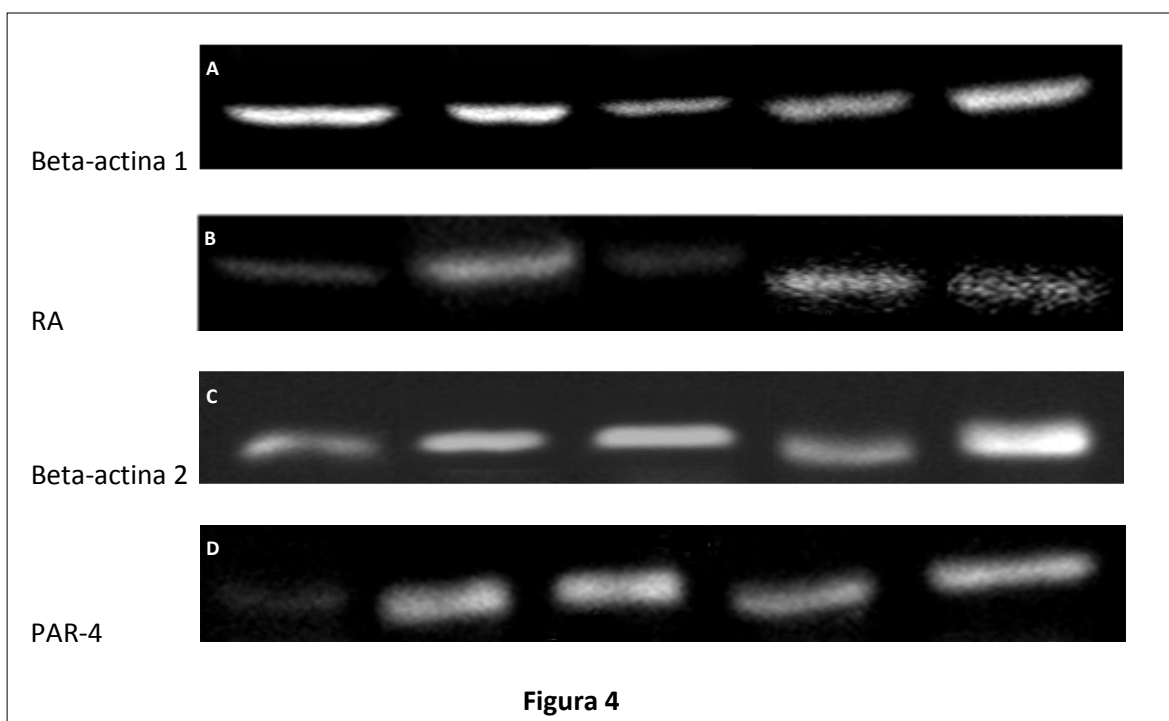


Figura 4

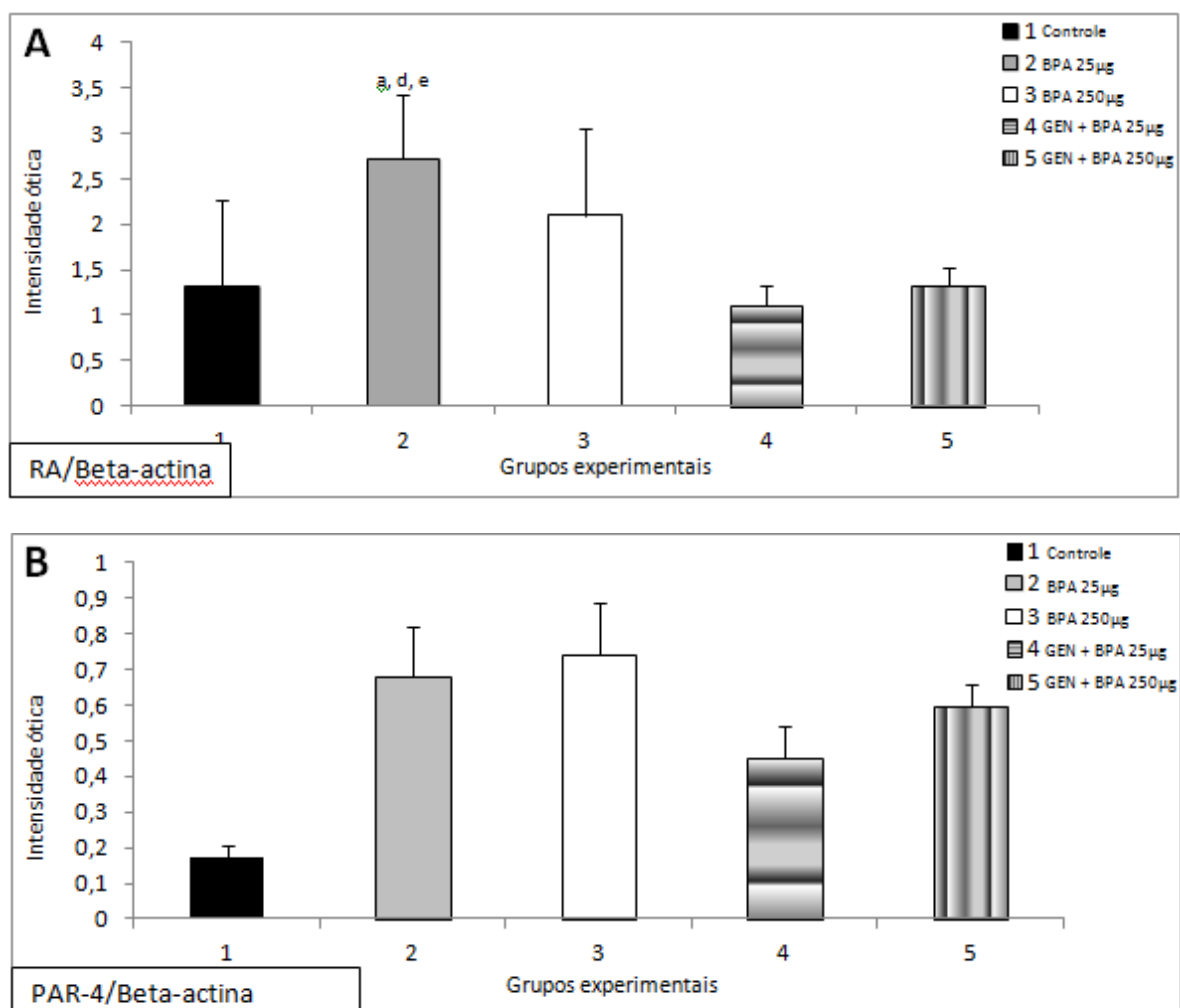


Figura 5

Tabela 1: Dados gestacionais e lactacionais dos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos/Tratamentos				
	G1 (Controle)	G2 (BPA 25µg/Kg)	G3 (BPA 250µg/Kg)	G4 (BPA 25µg + GEN)	G5 (BPA 250µg + GEN)
Fêmeas Prenhes (n)	10	13	11	8	12
Duração da Gestação (dias)	22.08±0.9	21.79±0,43	21.92±0.29	22.08±0.29	21.83±0.39
Tamanho da ninhada	10.00±4.41	11.21±2.83	11.25±3.22	9.33±2.96	10.42±3.81
Proporção sexo da prole (F:M)	0.86±0.41	1.11±1.44	0.97±0.58	1.92±1.14	1.72±1.83
Peso corpóreo (g) no DG20	376.40±32.82	367.31±19.89	391.10±23.23	423.13±31.20 ^b	382.55±30.71
Ganho de peso corpóreo (g)	127.70±22.43	113.00±19.32 ^c	134.40±12.16	133.56±21.01	122.60±17.86
Consumo de ração (g/rato/dia)	63.94±31.22	64.54±25.63	64.08±26.72	69.41±34.91	60.45±29.37
Ingestão de Gen (mg/kg/dia)	-	-	-	5.78	5.16
Prole de machos					
Peso corpóreo (g)					
DPN 3	7.93±0.67	8.09±0.72	8.08±0.75	8.94±0.75 ^{a,b,c,e}	8.71±1.3 ^a
DPN 10	20.61±1.33	20.41±1.23	21.27±1.12 ^b	23.19±4.18 ^{a,b}	22.33±1.96 ^{a,b}
DPN 21	53.1±4.74	47.8±2.84 ^a	51.3±5.31	48.26±2.33 ^a	49±5.16 ^a

^a, ^b, ^c e ^e: Estatisticamente diferente quando comparado, respectivamente, aos grupos G1, G2, G3 e G5 (p<0.05).

Tabela 2: Pesos Corpóreos e Pesos Absolutos e Relativos da Próstata dos animais no DPN 21 e 180.

Parâmetros	Grupos/Tratamentos				
	G1 (Controle)	G2 (BPA 25µg/Kg)	G3 (BPA 250µg/Kg)	G4 (BPA 25µg + GEN)	G5 (BPA 250µg + GEN)
DPN 21					
Pesos					
Absoluto da Prostata - p.p. (g)	0.031±0.006	0.031±0.006	0.041±0.006 ^{a,b,d,e}	0.028±0.002	0.026±0.004
Relativo da Prostata - p.p./p.c.	0.056±0.011	0.068±0.011 ^e	0.081±0.010 ^{a,d,e}	0.059±0.003	0.054±0.007
DPN 180					
Pesos					
Corpóreo - p.c.(g)	520.8±23.06	516.8±29.01	518.85±52.3	519±35.71	517±38.15
Absoluto da Prostata - p.p. (g)	0.65±0.1	0.71±0.12	0.71±0.18	0.69±0.15	0.62±0.13
Relativo da Prostata - p.p./p.c.	0.12±0.02	0.13±0.02	0.14±0.03	0.13±0.02	0.13±0.02

^{a, b, d, e} Estatisticamente diferente quando comparado, respectivamente, ao G1, G2, G4 e G5 (p<0.05).

Tabela 3: Dados de análise estereológica, índice de proliferação na próstata ventral de animais no DPN 21.

Parâmetros	Grupos/Tratamentos				
	G1 (Controle)	G2 (BPA 25µg/Kg)	G3 (BPA 250µg/Kg)	G4 (BPA 25µg + GEN)	G5 (BPA 250µg + GEN)
Análise estereológica					
Compartimento epitelial (%)	38.74±13,56	43.15±7.16	42.87±8.46	38.41±7.8	38.56±10.45
Compartimento estromal (%)	20.07±6.79	26.48±7.69 ^{a,e}	27.26±7.94 ^{a,e}	23.98±13.52	20.89±7.36
Compartimento luminal (%)	41.18±17.69	30.35±9.40 ^{a,e}	30.40±9.10 ^{a,e}	37.59±9.59	40.54±12.36
Contagem de alvéolos/campo	20.31±4.59	22.38±6.33	22.82±5.98	22.91±8.79	23±7.07
Índice de proliferação	14.18±5.06	20.05±10.20 ^a	16.11±5.99	19.24±9.10	19.03±9.05

^a e ^e: Estatisticamente diferente quando comparados, respectivamente, aos grupos G1 e G5 (p=0.01).

Tabela 4: Incidência de lesões histopatológicas nos lobos ventral (PV) e dorsolateral (PDL) da próstata dos animais no DPN 180.

Parâmetros	Lobo	Grupos/Tratamentos				
		G1 (Controle) (n=8)	G2 (BPA 25µg/Kg) (n=8)	G3 (BPA 250µg/Kg) (n=8)	G4 (BPA 25µg + GEN) (n=10)	G5 (BPA 250µg + GEN) (n=10)
Inflamação Focal	PV	2 (25)	0 (0)	3 (37.5)	2 (20)	1 (10)
	PDL	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (40)	2 (20)
Inflamação Multifocal	PV	0 (0)	7 (87,5) ^a	2 (25)	3 (30)	0 (0)
	PDL	3 (37.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
Hiperplasia Fisiológica	PV	8 (100)	8 (100)	8 (100)	10 (100)	10 (100)
	PDL	8 (100)	8 (100)	8 (100)	10 (100)	10 (100)
Hiperplasia Reativa	PV	0 (0)	3 (37.5)	3 (37.5)	2 (20)	0 (0)
	PDL	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	3 (30)
Hiperplasia Atípica	PV	0 (0)	7 (87.5) ^a	0 (0)	4 (40)	0 (0)
	PDL	2 (25)	3 (37.5)	2 (25)	7 (70)	6 (60)

n: número de animais analisados. Os resultados estão representados pelo número de animais que apresentaram lesão, seguido da respectiva porcentagem, calculada pela incidência de lesões e o número total de animais analisados. ^a: Estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle (G1).

CONCLUSÃO FINAL

O tratamento gestacional com a GEN reverteu os efeitos deletérios precoces do BPA sobre os níveis de proliferação celular no epitélio prostático, arquitetura prostática e expressão de RA da prole. Um aumento tardio na incidência de inflamação multifocal e de hiperplasia prostática atípica foi observado na prole descendente das mães tratadas com a menor dose de BPA, porém, o tratamento gestacional com a GEN também atenuou os efeitos tardios do BPA sobre a próstata. Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que a ingestão da GEN durante a gestação tem ação preventiva contra efeitos adversos do BPA sobre a próstata, sob as condições deste estudo. No entanto, este estudo, por si só, não é suficiente para basear recomendações nutricionais para humanos ou concluir definitivamente sobre o efeito protetor da GEN contra patologias prostáticas, pois este estudo foi realizado sob condições específicas de associação da GEN com o BPA em determinadas doses. Como já discutimos, as doses são determinantes para os efeitos de ambas as substâncias utilizadas neste estudo, determinando um limiar discutível entre os efeitos benéficos e maléficos destas. A fase de exposição a estas substâncias também são determinantes para seus efeitos, não podendo extrapolar estas conclusões para ingestão humana, visto que a alimentação é complexa, influenciada por fatores culturais, e a presença de isoflavonas que é alterada por métodos de cocção e locais de cultivo, bem como é impossível mensurar e controlar a exposição ao BPA, diante da amplitude de exposição e variação da migração deste para os alimentos conforme o tempo e temperatura de armazenamento e cocção. Sendo assim, este estudo vem contribuir como base para o delineamento e discussão de outros estudos sobre xenoestrógenos, fitoestrógenos, alimentação e próstata.





Comissão de Ética no Uso de Animais


Criada através da Portaria DFM nº 614 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1055/2013-CEUA

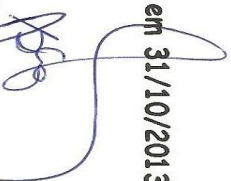
CERTIFICAMOS que o Projeto de pesquisa "Exposição in útero ao desregulador endócrino Bisfenol A e a *Genisteína*: efeitos sobre a morfogênese e susceptibilidade a carcinogênese prostática em ratos sprague-dawley", a ser conduzida por **Bruna Dias Bernardo**, orientada pelo **Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan**, Co-orientada pelo **Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scaramo** e colaboração de **Joyce Zalotti Brant** e **Tony Fernando Grassi**, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - **CONCEA**, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de **170** ratos. Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 31/10/2013



Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capellupi
Secretário da CEUA