



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

Cássia Regina Suzuki Caires

Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a
próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos

São José do Rio Preto
2016

Cássia Regina Suzuki Caires

Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a
próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite
Vilamaior

São José do Rio Preto
2016

Caires, Cássia Regina Suzuki.

Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos / Cássia Regina Suzuki Caires. -- São José do Rio Preto, 2016

47 f. : il.

Orientador: Patrícia Simone Leite Vilamaior

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

1. Biologia. 2. Próstata. 3. Gerbilos. 4. Desreguladores endócrinos. 5. Aromatase. I. Vilamaior, Patricia Simone Leite. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 591.463.4

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

Efeitos da exposição à crisina durante o período de lactação sobre a próstata ventral de gerbilos (*Meriones Unguiculatus*) adultos

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Silvia Borges Pimentel de Oliveira
UNICAMP – Campinas

Prof^a. Dr^a. Marilia de Freitas Calmon Saiki
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
29 de agosto de 2016

Dedico este trabalho à Deus, por ter aberto portas
que foram inexplicáveis através das quais, posso
ser intitulada Mestre.

Agradecimentos

Este trabalho vem sendo sonhado por mim, desde 2012, ano em que me formei. Vinda de uma faculdade particular, fui acolhida no Laboratório de Microscopia e Microanálise, sou eternamente grata ao Profº Drº Sebastião Roberto Taboga, por acreditar em mim e me dar uma oportunidade esplendorosa. Entrei, pela primeira vez, na tão sonhada UNESP, como TT3, do projeto da Profª Drª tão amada Ana Paula da Silva Perez, sem a qual este trabalho não seria possível, além de me co-orientar, foi uma grande amiga e conselheira, me ajudou não só com a parte laboratorial, me ensinou a ser melhor a cada dia, a me impor e aprender com meus erros; e do Profº Drº Manoel Biancardi, o qual estimo muito. Ao término do treinamento técnico e início de mestrado, fui novamente agraciada por Deus, colocando em minha vida como orientadora a Profª Drª Patrícia Simone Leite Vilamaior, foi ela quem persistiu em mim, me ajudou e consolou em todos os momentos, não vivi este mestrado sozinha, pois ela estava comigo em todo o tempo, consolidamos algumas características peculiares e partilhamos de muitos sentimentos, nem sempre bons, mas enfim, vencemos! À estes, o meu profundo agradecimento e admiração mais terna que existe em mim!

Com a rotina laboratorial ganhei vários amigos, uma bagagem excepcional de histórias, conselhos, alegrias, festinhas, gastrite, com tantos salgadinhos da “Dalva” e, os melhores cafês da tarde. O LMM é único, há suas desavenças, mas um respeito mútuo, um lugar alegre de gente totalmente competente. Mari Zanatelli, Cíntia, Simone, Mari Marcielo, Ana Carolina, Carolzinha, Ellen, Pedro, Douglas, Luiz Henrique, Ricardinho, Patrícia, Sarah, Camila, Gui, Júlia, Vanessinha, Diego, Mateus e Mariele, colegas LMM, obrigada pelos altos papos e pelas inúmeras risadas! Luiz Roberto, a alegria do LMM, além de um ser humano que espalha felicidade (e zoações), uma mente brilhante que TUDO sabe, obrigada ‘Loius’, tenho a absoluta certeza, que sem você os dias seriam mais tristes e as técnicas não existiriam, afinal, quem iria preparar Schiff pra mim? Agradeço também à Eloísa, Mãe, Sil, e Marina, que não hesitaram em me ajudar, nas correções, imagens, provas e aulas. À minha ‘amada’, Nayara, eu agradeço pela amizade, por compartilhar sua vida e imunos comigo, foram tantas histórias, tantas ligações, tantas mensagens, que tenho certeza que nossa amizade será duradoura, obrigada por sua amizade e paciência! À vocês, obrigada por tanto me incentivar, ajudar, me fazer rir e pelas várias horas de conversas!

Como tudo na minha vida, este mestrado não foi sonhado sozinho, para isso tive o apoio, sempre eterno, da minha mãe Miriam e do meu pai Edimilson, vocês são o meu bem mais precioso, obrigada por todo apoio, ajuda, incentivo, cuidado, paciência, enfim, obrigada

pela minha vida, pelo fato de vocês existirem, eu pude concluir mais esta etapa. Creio que Deus não falha em Seus planos e, nos fazer pais e filha, foi o plano mais lindo que Ele sonhou pra mim! Agradeço também, às minhas irmãs Débora e Giovana, por todo acolhimento nos momentos tristes. Agradeço ao meu namorado Thales, pela companhia e alegria de sempre! Agradeço vocês, intensamente, por fazerem parte dos meus dias, desempenham uma tarefa magnífica ao meu lado, a do amor em tempo integral, eu os amo!

Agradeço às Profs^a Drs^a Silvana Gisele Pegorin de Campos e Mary Massumi Itoyama, que compuseram a banca da minha qualificação, suas correções e ideias acrescentaram muito para a elaboração da versão final da dissertação. Ao programa de pós-graduação em Genética, e à CAPES pela bolsa concedida durante estes 2 anos.

E, por fim, agradeço à banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Silvia Borges Pimentel de Oliveira e Prof^ª. Dr^ª. Marília de Freitas Calmon Saiki por terem aceito o convite para a correção deste estudo e, assim, somar suas experiências e conhecimentos a estes aqui apresentados. Ao Prof^º Dr^º Luis Octávio Regasini do Departamento de química e ciências ambientais, por ter cedido o composto e à Caroline Sprengel Lima, agradeço pela receptividade e colaboração para a obtenção do mesmo.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz e, os
seus planos serão bem sucedidos” (Pv 16.03)

Resumo

A morfogênese prostática do gerbilo inicia-se no 20º dia de vida pré-natal, sendo a ramificação no 1º dia do nascimento e a maturação glandular no final na puberdade. Isto contrasta com a glândula prostática de humanos, a qual tem todo o seu desenvolvimento no período pré-natal. A crisina, um flavonoide encontrado em várias espécies vegetais, como *Passiflora coerula*, *Passiflora naringenina* e em altas concentrações no mel (cerca de 5,3 mg/kg) e na própolis (28 g/L), apresenta ação inibitória sobre a enzima aromatase, a qual é responsável por catalisar a conversão de andrógenos em estrógenos. Poucos estudos relatam os efeitos da crisina, principalmente sobre a próstata. Portanto, este trabalho analisou, através de métodos morfológicos, morfométricos, sorológicos e imunoistoquímicos os efeitos da exposição à crisina, durante o período de lactação, sobre a próstata ventral de gerbilos machos adultos. Para isso, três grupos experimentais foram formados: Grupo crisina (CR), as mães receberam por gavagem 50 mg/kg/dia de crisina diluída em óleo de milho durante 14 dias do período de lactação; Grupo controle veículo (CV), as mães receberam óleo de milho no mesmo período de CR; Grupo controle (CO), as mães não receberam tratamento. Os filhotes machos foram eutanasiados com 120 dias de vida. A exposição à crisina no período neonatal não promoveu o desenvolvimento de desordens prostáticas nos gerbilos adultos, entretanto, observaram-se alterações no padrão morfológico da glândula. Assim, podemos afirmar que a crisina atuou como um desregulador endócrino sobre a próstata.

Palavras-chaves: Crisina; Gerbilo; Próstata; Aromatase.

Abstract

The morphogenesis prostatic of gerbil initiates from 20th day of prenatal period, the branching begins at the 1st day of birth and its final glandular maturation happen at end puberty. This is contrasts with prostate gland humans, which has all its development occurs in prenatal period. The chrysin a flavonoid foun in many vegetables species, like Passiflora coerula, Passiflora naringenin and in high concentrations in honey (about 5.3 mg / kg) and propolis (28 g / L), shows inhibitory action of the aromatase enzyme activity, which catalyzes the conversion of androgens to estrogens. Few studies have reported the effects of chrysin, especially on prostate. Thus, this study analyzed through morphological, morphometric, serologic and immunohistochemical methods the effects of the chrysin during the lactation period in the ventral prostate of adult male gerbils. For this, three experimental groups were formed. Chrysin group (CR): the mothers received by gavage 50 mg/kg/day of chrysin diluted in corn oil during 14 days of lactation period. Control vehicle group (CV): the mothers received corn oil in the same period CR. Control group (CO), the mothers received no treatment. The male offspring were euthanized at 120 days old. Exposure to chrysin in the neonatal period did not promote the development of prostatic disorders in adult gerbils, however, there were changes in the morphology of the gland. So we can say that chrysin presented endocrine disrupter actions on the prostate.

Keywords: Chrysin; Gerbil; Prostate; Aromatase.

Sumário

1. Introdução	13
1.1. <i>Desenvolvimento prostático</i>	13
1.2. <i>Xenoestrógeno e Fitoestrógeno</i>	14
1.3. <i>Crisina (5,7 – dihidroxiflavona)</i>	16
2. Objetivos	19
2.1. <i>Objetivo geral</i>	19
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	19
3. Material e Métodos	20
3.1. <i>Animais</i>	20
3.2. <i>Delineamento experimental</i>	20
3.3. <i>Análise biométrica</i>	21
3.4. <i>Morfologia e Morfometria</i>	21
3.5. <i>Imunoistoquímica</i>	22
3.6. <i>Níveis séricos hormonais</i>	25
3.7. <i>Análise estatística</i>	26
4. Resultados	27
4.1. <i>Análise biométrica</i>	27
4.2. <i>Morfologia e Morfometria</i>	27
4.3. <i>Imunoistoquímica</i>	28
4.4. <i>Níveis séricos hormonais</i>	29
5. Discussão	36
6. Conclusão	41
Referências	42
Anexo	46

Lista de ilustrações

Figura 1. Esquema mostrando a anatomia do trato urogenital de rato macho no dia 0 _____	13
Figura 2. Fórmula estrutural da Crisina (5,7- Dihidroxi flavona) _____	17
Figura 3. Gerbilo da Mongólia _____	18
Figura 4. Delineamento experimental _____	21
Figura 5. Cortes histológicos do lobo ventral de gerbilos machos adultos corados por HE e imunofluorescência para α actina _____	30
Figura 6. Cortes histológicos do lobo ventral de gerbilos machos adultos corados com P.A.S. e Reticulina de Gömori _____	31
Figura 7. Cortes histológicos do lobo ventral de gerbilos machos adultos submetidos à imunoistoquímica para PCNA e p-63 _____	32
Figura 8. Cortes histológicos do lobo ventral de gerbilos machos adultos submetidos à imunoistoquímica para AR, ESR1 e ESR2 _____	33
Figura 9. Cortes histológicos do lobo ventral de gerbilos machos adultos submetidos à imunoistoquímica para CYP 19 _____	34
Figura 10. Histogramas dos níveis séricos hormonais de testosterona e estradiol _____	35

Lista de tabelas

Tabela 1. Descrições dos anticorpos utilizados nas técnicas de imunoistoquímica _____ **23**

Tabela 2. Descrições dos protocolos utilizados em cada técnica de imunoistoquímica _____ **25**

Tabela 3. Parâmetros biométricos dos gerbilos da Mongólia dos grupos (n=5) controle (CO), controle veículo (CV) e crisina (CR) _____ **27**

Lista de abreviações

ABC: Kit do complexo avidina-biotina

Ais: Inibidores seletivos da aromatase

AR: Receptores de andrógenos (*Androgen Receptor*)

BPA: Bisfenol A

BSA: Albumina Sérica Bovina (de *Bovine Serum Albumin*)

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CO: Grupo controle

CR: Grupo cricina

CV: Grupo controle veículo

CYP 19: Anticorpo usado para marcação da aromatase

DAB: Diaminobenzidina

DHT: Diidrotestosterona

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EE: 17 α - etinilestradiol

ER: Receptor de estrógeno (*Estrogen Receptor*)

ESR1: Receptores de estrógeno alfa (ER α)

ESR2: Receptores de estrógeno beta (ER β)

FIT-C: Fluorescein isothiocyanate

g: Grama

g/L: gramas por litro

HE: Hematoxilina- Eosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

mg: miligramas

mg/kg: miligrama por kilo

n: Número amostral

NIP: Neoplasia intraepitelial prostática

PBS: Tampão salino difosfato

P.A.S.: Ácido periódico de Schiff

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

p-63: Anticorpo usado para marcar células basais

pg/mL: picograma por mililitro

RPM: Rotação por minuto

SC: Santa Cruz

T: Testosterona

TBS: Tampão salino trifosfato

TNF: Fator de necrose tumoral

UGM: Mesênquima do seio urogenital

UGS: Seio urogenital

α -actina: Anticorpo usado para marcação de musculatura lisa

°C: Grau Celsius

μ m: Micrômetro

η m: Nanômetro

5 α -R: 5 α -Redutase

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento prostático

Em mamíferos a próstata se desenvolve a partir do seio urogenital (UGS), o qual é uma estrutura de origem endodérmica (PRINS; PUTZ, 2008), que é derivado de uma porção caudal do intestino grosso, chamado cloaca. O UGS está rodeado por tecido conjuntivo embrionário chamado mesênquima do seio urogenital (UGM) (CUNHA et al., 2004; PRINS; PUTZ, 2008). O UGS é um rudimento embrionário, encontrado em ambos os sexos; em machos dará origem à próstata, à uretra prostática e às glândulas bulbo-uretrais, já no sexo feminino à vagina, à uretra menor e à próstata feminina, conhecida como glândula de Skene (SANTOS et al., 2003; SANCHES et al., 2016) e, em ambos os sexos origina a bexiga. Em resposta aos andrógenos testiculares fetais, células epiteliais emergem da parede do UGS, que formam botões que penetram no mesênquima circundante, de uma forma precisa e, assim estabelecem em roedores machos as subdivisões lobulares da próstata em dorso-lateral, ventral e dorsal, cada uma com suas características morfofisiológicas distintas (Figura 1) (CUNHA et al., 2004; PRINS; PUTZ, 2008; ROCHEL et al., 2007).

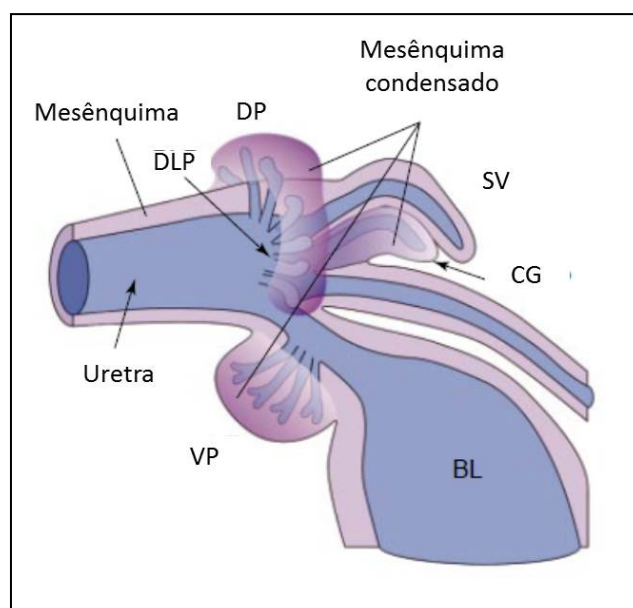


Figura 1. Esquema mostrando a anatomia do trato urogenital de rato macho no dia 0 (dia do nascimento). Em azul é mostrado o epitélio, o mesênquima e, as áreas condensadas do mesênquima em lilás. BL: bexiga; CG: glândula coaguladora; DLP: próstata dorso lateral; DP: próstata dorsal; VP: próstata ventral e SV: vesícula seminal (Adaptado de TOMSON, 2001).

Em humanos, o desenvolvimento da próstata ocorre durante o segundo e o terceiro trimestre da gravidez e completa-se até o nascimento. Isto contrasta com a glândula prostática de roedores, a qual é rudimentar no nascimento e sofre a maior parte do seu

desenvolvimento durante os primeiros 15 dias de vida neonatal (período de lactação). A morfogênese completa de todo o complexo e sua ramificação (diferenciação de células mesenquimais e epiteliais), conclui-se entre o 15º e o 30º dia de vida pós-natal e a maturação final ocorre na puberdade, quando os níveis de andrógenos circulantes sobem acentuadamente (PRINS; PUTZ, 2008). Segundo TIMMS et al., (2005), o período inicial do desenvolvimento prostático começa no 17º dia de gestação em camundongos, já em seres humanos, esse processo, ocorre durante a 10ª semana de gestação. Nos gerbilos (*Meriones unguiculatus*) modelo experimental do estudo apresentado, o início do desenvolvimento prostático ocorre entre o 20º e 21º dia do período pré-natal e o processo completo envolve cinco etapas sequenciais, são elas: determinação; iniciação e brotamento; ramificação; diferenciação e maturação (SANCHES et al., 2014).

A ocorrência precisa desses acontecimentos leva à formação normal da próstata no adulto, de modo que interferências podem perturbar o desenvolvimento do complexo prostático, afetando a sua função e levando às alterações na arquitetura e/ou no desenvolvimento de lesões prostáticas (SANCHES et al., 2014; PRINS; PUTZ, 2008).

1.2. Xenoestrógenos e fitoestrógenos

Ao contrário dos xenoestrógenos, que são estrógenos sintéticos, os quais entraram no ambiente como resultado da atividade humana, os fitoestrógenos encontram-se na biosfera ao longo da evolução da vida na terra, portanto devem ser considerados como parte integrante do ambiente natural (LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010), os quais formam uma classe natural de estrógenos, que incluem dentre outros, os flavonoides e diversas micotoxinas (EDMUNDS et al., 2005). Os flavonoides são rapidamente metabolizados e excretados, não permanecendo no organismo, no entanto isso pode variar grandemente na dependência do metabolismo individual (LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010) e da estrutura química destes compostos, como a metilação (WALLE et al., 2007). A crisina e o 17 α -etinilestradiol (EE) são exemplos de fitoestrógenos e xenoestrógenos, respectivamente. Ambos os compostos estão associados com efeitos no sistema reprodutor e com a ação de hormônios estrogênicos (CIFTCI et al., 2010; PEREZ et al., 2011; 2012).

Os flavonoides foram descobertos na década de 30 por Albert Szent-Gyorgyi, como compostos com atividade antioxidante. A sua capacidade de eliminação de radicais hidroxilas, radicais superóxidos e peroxiradicaís, convergem com muitas funções dos flavonoides no organismo, que são importantes para a prevenção de doenças associadas com uma degradação oxidativa de membranas, proteínas e DNA (HODEK; TREFIL;

STIBOROVA, 2002). Estudos sugerem que esses compostos naturais apresentam várias atividades biológicas, incluindo efeitos antialérgicos, antivirais, anti-inflamatórios e anticancerígenos especialmente em relação aos tecidos expostos aos hormônios sexuais (mama e próstata) (SUGIHARA et al., 1999; ZHENG et al., 2003; NASO et al., 2010; HODEK; TREŤIL; STIBOROVA, 2002). Alguns flavonoides exercem efeito antiestrogênico, interferindo na atividade de enzimas específicas que modulam o metabolismo estrogênico, sendo este efeito crucial para suas ações como desregulador endócrino (LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010).

Substâncias naturalmente produzidas são vistas, pela população, como sendo inofensivas à saúde, não causando nenhum efeito colateral, no entanto, elas nem sempre são tão inofensivas ou benéficas assim. A exposição a esse tipo de composto tem sido comum através da cozinha tradicional pelo consumo de alimentos à base de plantas, alguns legumes, sementes e ervas (NABAVI et al., 2015). Além do mais, nos últimos anos houve um aumento do interesse em medicina alternativa, cujo objetivo é a prevenção de doenças com a utilização de suplementos alimentares e produtos à base de plantas (CIFTCI et al., 2010). A ingestão de flavonoides, varia de 50 a 800 mg/dia, podendo ser maior em meio a suplementação, sendo que a sua principal fonte é através do consumo de frutas e vegetais (NABAVI et al., 2015).

Segundo TIMMS et al. (2005), a exposição dos fetos humanos aos compostos estrogênicos, pode ocorrer de diversas maneiras, por exemplo, em média 3% das mulheres grávidas fazem uso contínuo de etinilestradiol, como método contraceptivo por não saberem que estão em período gestacional, ademais, podem estar expostas ao bisfenol A (BPA), através do aquecimento de produtos plásticos. A análise dos efeitos desses desreguladores endócrinos, sobre o desenvolvimento da próstata ou outros órgãos do sistema reprodutor masculino tem sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa (PEREZ et al., 2016; COLLETA et al., 2015). Os resultados da exposição ao BPA levaram à conclusão de que os xenoestrógenos inibem o desenvolvimento prostático, sendo esse efeito observado durante a fase adulta, onde se verificou que a próstata apresentou ser 10% menor que o tamanho normal, além da presença de displasia epitelial e neoplasia intraepitelial prostática (NIP) (TAYLOR et al., 2011). A exposição a baixas doses de etinilestradiol, durante o período pré-natal promove alterações na interação entre o epitélio e o estroma prostático em roedores adultos (PEREZ et al., 2011; 2012), levando ao desenvolvimento de lesões prostáticas nesta fase e durante o envelhecimento (PEREZ et al., 2016).

Nos últimos 60 anos, estudos relataram que a qualidade e a quantidade do esperma humano diminuíram e que, a incidência de defeitos do trato genital masculino e do câncer de próstata e de mama, aumentaram. O mesmo foi documentado em espécies selvagens. Neste mesmo período houve uma introdução de produtos químicos sintéticos hormonalmente ativos levando alguns estudiosos a postularem que os resultados diversos documentados em população humana e animais selvagens pode ser a consequência da exposição extemporânea para os xenoestrógenos durante o desenvolvimento (MAFFINI et al., 2006).

Além de conduzir a um aumento da sensibilidade para andrógeno na idade adulta (TAYLOR et al., 2011), pouco se sabe sobre os mecanismos que medeiam os efeitos da exposição aos compostos químicos estrogênicos durante o desenvolvimento prostático e sobre as alterações dessa glândula nas fases tardias.

1.3 Crisina (5,7- dihidroxiflavona)

A exposição moderada aos fitoestrógenos, pode impedir malignidades e melhorar a saúde cardiovascular. Alguns fitoestrógenos também impedem o metabolismo estrogênico, como é o caso da crisina (Figura 2), um flavonoide encontrado em várias espécies vegetais, como *Passiflora coerula*, *Passiflora naringenina* e em altas concentrações no mel (cerca de 5,3 mg/kg) e na própolis (28 g/L) (NABAVI et al., 2015). A crisina apresenta atividade antioxidante (LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010), anti-inflamatória, antidiabética e anticancerígena (KASALA et al., 2015). Além disto, esse composto apresenta efeitos inibitórios sobre a atividade enzimática da aromatase (EDMUNDS et al., 2005; TA; WALLE, 2007; WANG; MORRIS, 2007; NABAVI et al., 2015), levando à sua comercialização em lojas de alimentos saudáveis, visando o aumento dos níveis séricos de testosterona (T), atualmente é disponível cápsulas contendo 500 mg de crisina (alta dosagem), a posologia pode chegar à seis cápsulas por dia (CIFTCI et al., 2010) farmacologicamente, está sendo prescrita como método de terapia endócrina, para a reposição hormonal e, no tratamento do câncer, pois favorece a morte celular induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF) (NABAVI et al., 2015). Entretanto, sua eficácia e efeitos a curtos e longos prazos, relacionados ao tecido prostático, não foram totalmente demonstrados *in vivo* (TA; WALLE, 2007).

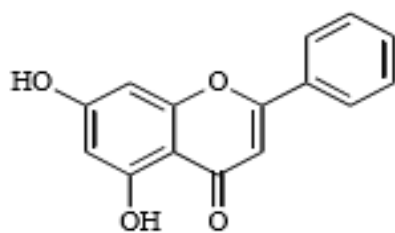


Figura 2. Fórmula estrutural da Crisina (5,7- Dihidroxi flavona) (LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010).

A aromatase é a enzima que catalisa a conversão de andrógenos e testosterona a estrógenos e 17β -estradiol, respectivamente, visando a preservação do equilíbrio de metabólitos mais ativos destes hormônios no interior da próstata com o objetivo de manter a função fisiológica normal deste tecido (EDMUNDS et al., 2005; CORRADI et al., 2009). Esta enzima regula a disponibilidade de estradiol no organismo e têm-se tornado alvo para a síntese de fármacos que inibem vias dependentes de estrógeno, utilizados no tratamento de câncer, como o de mama e também o câncer de pulmão (TA; WALLE, 2007). A aromatase é expressa em muitos tecidos, como por exemplo: nos ovários, nos testículos, no cérebro, no fígado, no tecido adiposo, na pele, na placenta e na próstata (LI, 2010; HODEK; TREFIL; STIBOROVA, 2002).

O equilíbrio adequado da proporção de andrógenos e estrógenos é um fator clinicamente importante, visto que esse equilíbrio tem se mostrado crucial no desenvolvimento prostático (MCPHERSON; ELLEM; RISBRIDGER, 2008). Os andrógenos regulam o crescimento, a diferenciação e a morte programada das células da próstata através da interação com receptores de andrógenos (AR) (CORRADI et al., 2009). Esta glândula, por sua vez, também é sensível a estrógenos, os quais possuem efeito na metaplasia escamosa. Os efeitos estrogênicos são mediados por receptores de estrógenos (ERs), que são expressos durante o desenvolvimento prostático e na próstata de adulto (CUNHA; HAYWARD; WANG, 2002).

A atividade enzimática e funcional da aromatase tem sido considerada essencial, não só para o tratamento do câncer de mama, mas também em casos de ginecomastia e câncer de próstata. A expressão da aromatase em carcinomas cervicais humanos foi detectada em cerca de 35% dos casos, enquanto que nenhuma expressão foi detectada em tecidos cervicais pré-cancerosos ou normais, o que sugere que os estrógenos, através da sinalização de ER, podem estar envolvidos no crescimento de tumores (LI, 2010).

Inibidores seletivos da aromatase (AIs), são compostos que atuam na inibição da biossíntese de estrógeno a partir da testosterona, sendo utilizados como um método de

terapia endócrina. Esses inibidores foram aceitos como o primeiro agente no tratamento de câncer de mama durante a pós-menopausa, diminuindo também os riscos de desenvolver câncer de endométrio (LI, 2010).

Muitos estudos têm sido realizados em nosso grupo de pesquisa, utilizando-se como modelo experimental o gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) (Figura 3), envolvendo a exposição a hormônios sintéticos e a manipulação hormonal com subsequente análise do complexo prostático desses animais (SANTOS et al., 2006; BIANCARDI et al., 2012; PEREZ et al., 2011; 2012; 2016; COLLETA et al., 2015). Uma vez que o complexo prostático é um importante alvo para atividade dos hormônios esteroides, as alterações causadas por desequilíbrios ou desregulação endócrina podem ser verificadas nesses órgãos, colocando-os como modelos adequados para estudos de desregulação endócrina.

No entanto, ainda há uma carência de informações envolvendo fitoestrógenos, particularmente com relação aos seus efeitos sobre a glândula prostática. Como é grande o número de pessoas que diariamente se expõem a esses compostos, através do consumo de frutas e legumes, as consequências dessa exposição são muitas vezes negligenciadas e pouco difundidas. Desse modo, prevalece a necessidade de elucidar os efeitos da exposição à crisina - durante o período de lactação em roedores, correspondendo a fase pré-natal em humanos - um flavonoide amplamente encontrado em vegetais e, portanto bastante utilizado atualmente, abrindo um campo promissor em pesquisas científicas relacionadas à fitoterapia



Figura 3. Gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar os efeitos da exposição à crisina, durante o período de lactação, sobre a próstata ventral de gerbilos machos adultos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Analisar os parâmetros biométricos, morfológicos, morfométricos e estereológicos da próstata de gerbilos machos adultos que foram expostos à crisina durante o período de lactação.

2.2.2 Analisar os efeitos da exposição à crisina, durante o período de lactação, sobre os níveis séricos da testosterona e estradiol dos machos na fase adulta.

2.2.3 Analisar a expressão de marcadores de receptores de hormônios esteroides, de proliferação celular e de células basais, na próstata de machos adultos que foram expostos à crisina no período de lactação.

3. Materiais e Método

3.1. Animais e composto

As fêmeas e os machos de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) utilizados nesse experimento foram mantidos no biotério do grupo de pesquisa em *Biologia da Reprodução* do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, câmpus de São José do Rio Preto (SP). Os animais foram acondicionados em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*” (componentes: 23% proteína, 12% minerais, 5% fibras e 4% lipídios totais). O projeto foi aprovado pelas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) IBILCE/UNESP (Protocolo nº 107/2015). O composto utilizado (crisina), foi obtido do laboratório Química Verde & Medicinal (LQVM), sendo que este já vem purificado pelo fabricante, Sigma Aldrich.

3.2. Delineamento experimental

Nesse experimento foram utilizadas 15 fêmeas de gerbilo virgens adultas (90 a 120 dias de idade). Cada fêmea foi mantida com um macho da mesma idade para que ocorresse o acasalamento. O período gestacional dessas fêmeas foi diariamente acompanhado, a fim de certificar com precisão o dia do nascimento dos filhotes. Em seguida, as fêmeas, a partir do primeiro dia do período de lactação, foram divididas nos 3 grupos experimentais seguintes (Figura 4):

Grupo crisina (CR): As fêmeas receberam por gavagem altas doses de crisina, 50 mg/kg/dia (TAHIR; SULTANA, 2011) diluída em óleo de milho, segundo modificações do método de CIFTCI et al. (2010), no 1º dia do nascimento dos filhotes, durante 14 dias consecutivos do período de lactação.

Grupo controle veículo (CV): As fêmeas receberam por gavagem 1 ml de veículo (óleo de milho) no 1º dia do nascimento dos filhotes, durante 14 dias consecutivos do período de lactação.

Grupo controle (CO): As fêmeas não receberam tratamento durante o período de lactação.

Os filhotes machos dos grupos experimentais (n=5 para cada grupo experimental) foram eutanasiados ao completarem 120 dias de vida, considerado fase adulta. Nas

metodologias descritas a seguir, utilizaram-se machos provenientes de diferentes mães para termos uma maior diversidade dos animais e, assim não interferir nos dados obtidos.

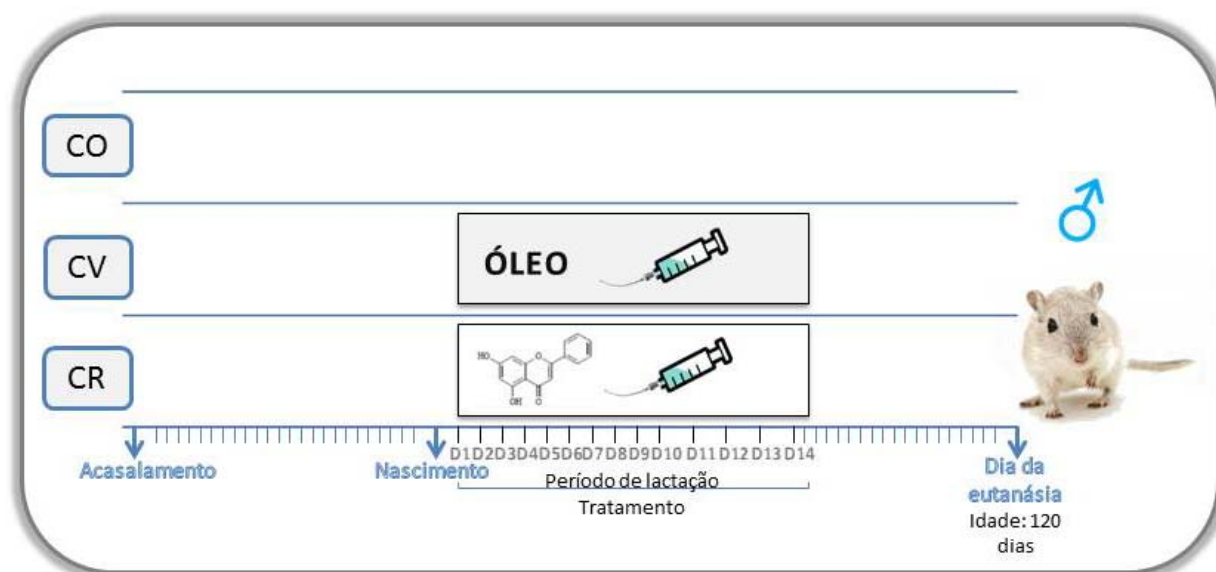


Figura 4. Esquema do delineamento experimental, mostrando os grupos controle (CO), controle veículo (CV) e crisina (CR). No grupo controle, os animais não receberam tratamento, no grupo controle veículo as fêmeas receberam apenas óleo de milho durante 14 dias do período de lactação e no grupo crisina, as fêmeas receberam 50 mg/Kg/dia de crisina durante 14 dias do período de lactação. Os filhotes machos dos grupos experimentais foram eutanasiados ao completarem 120 dias de vida.

3.3. Análise Biométrica

Ao fim de cada tratamento, os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados por meio de superdosagem de anestésico (realizada através de cloridrato de xilazina 3 mg/kg e cloridrato de cetamina 10 mg/kg) administrados por via subcutânea, em seguida, foram pesados e decapitados para a coleta da próstata e do sangue total. Após a dissecação, o complexo prostático e a próstata ventral dos machos adultos foram retirados e pesados.

3.4. Morfologia e Morfometria

Após a pesagem, a próstata ventral dos grupos experimentais (n=5) foi fixada em metacarn (na proporção 1: 3: 6, respectivamente, de solução de ácido acético, clorofórmio e metanol), submetidas às etapas do processamento histológico (desidratadas em concentrações de etanol e clarificadas em xilol) e incluídas em Paraplast (Sigma Aldrich). Posteriormente, os órgãos foram seccionados a 5 µm e corados com *Hematoxilina-Eosina* (HE) para estudos morfológicos e morfométricos das próstatas. Para análise do compartimento estromal prostático, utilizou-se a técnica citoquímica de *Reticulina de*

Gömöri (fibras reticulares e colágenas prostáticas) e para a identificação precisa de glicoproteínas, utilizou-se a coloração pelo ácido periódico de Schiff (Periodic Acid & Schiff – P.A.S.) (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976).

Durante a análise morfométrica foram coletadas 200 medidas da próstata ventral de cada grupo experimental. As medidas coletadas (μm) foram da altura epitelial e da espessura da camada muscular das próstatas analisadas, a partir de lâminas coradas por HE. A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio Olympus BX60. Enquanto que as medidas morfométricas foram realizadas por meio do software Image-Pro-Plus (Média Cybernetics).

As análises estereológicas foram realizadas para a obtenção do volume relativo dos diferentes compartimentos prostáticos de cada grupo experimental. Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo, a partir de lâminas coradas por HE, por meio do fotomicroscópio Olympus BX60. As medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por WEIBEL (1978) e aplicado à próstata por HUTTUNEN; ROMPPANEN; HELMINEN (1981), por meio do programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics). A partir dos dados obtidos para cada campo analisado foi calculado o volume relativo dos compartimentos epitelial, estromal e luminal da glândula prostática.

3.5. Imunoistoquímica

Para a realização das técnicas de imunoistoquímica, as próstatas dos grupos experimentais foram fixadas em paraformol tamponado a 4%, submetidos às etapas de processamento histológico (desidratação, diafanização e infiltração), incluídos em Paraplast (Sigma Aldrich) e seccionados à 5 μm . Os cortes foram submetidos à imunoistoquímica para detecção de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), p63 (células basais), α -actina (alfa actina de músculo liso), dos receptores AR (receptores de andrógenos), ESR1 e ESR2 (receptores de estrógeno α e β , respectivamente) e CYP 19 (aromatase). A Tabela 1 mostra a descrição detalhada de cada anticorpo utilizado e suas respectivas diluições.

Tabela 1. Descrições dos anticorpos utilizados nas técnicas de imunohistoquímica.

Anticorpo	Descrição	Diluição
AR	Coelho policlonal IgG, N-20: sc-816, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:75
CYP 19	Coelho policlonal IgG, H-300: sc-30086, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:100
ESR1	Coelho policlonal IgG, H-184: sc-7207, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:50
ESR2	Coelho policlonal IgG, H-150: sc-8974, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:50
PCNA	Camundongo monoclonal IgG _{2a} , PC-10: sc-56, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:100
p63	Camundongo monoclonal IgG _{2a} , 4A4: sc-8431, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:100
α -actina	Camundongo monoclonal IgG _{2a} , 1A4: sc 32251, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA	1:100

A Tabela 2 mostra a descrição dos protocolos utilizados em cada imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi seguida de três lavagens em tampão, de 5 minutos cada. No bloqueio de peroxidase, foi utilizado o H₂O₂ a 5% diluído em metanol, seguida de três lavagens em tampão (as técnicas para ESR1 e ESR2, passaram pela permeabilização em triton a 0,2% diluído em tampão durante 10 minutos, seguido de duas lavagens). Posteriormente, todos os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas. Os anticorpos foram diluídos em BSA 1%, como descrito na Tabela 1 e, em seguida, os cortes foram incubados *overnight* à 4°C (com exceção da imunohistoquímica anti-PCNA, cujos cortes foram incubados por 1 hora à 4°C). Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes consecutivas, por 5 minutos e incubados com Polímero (Novolink, Novocastra) à 37°C por 45 minutos ou, em anticorpo secundário biotinizado, seguido por Kit do complexo avidina-biotina ABC (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, o material foi revelado com diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) por aproximadamente 1 minuto e contra corado com Hematoxilina de Harris. A análise dos dados imunohistoquímicos, foi realizada para a obtenção da frequência de células epiteliais positivas e estromais para AR, PCNA, ESR1, ESR2 e células basais positivas para p63 da próstata masculina dos grupos experimentais. Para isso, foram contadas 4.000 células para cada técnica analisada em cortes seriados. As imagens

foram capturadas por meio do fotomicroscópio Olympus BX60 e a contagem de células foram realizadas por meio do software Image-Pro-Plus (Média Cybernetics).

Para a caracterização das fibras musculares através da marcação com α -actina, usou-se a técnica de imunofluorescência. A recuperação antigênica foi seguida de três lavagens em tampão. Posteriormente houve o bloqueio de ligações inespecíficas, seguido da incubação com o anticorpo primário diluído em BSA 1%, à 4°C, *overnight*. O anticorpo secundário anti-mouse, contendo o fluorocromo FITC (sc 2010, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA), foi diluído a 1:200 em BSA 1% e os cortes incubados por 2 horas, seguido de três lavagens em tampão, por 10 minutos cada lavagem. Em seguida, foi utilizado um meio de montagem apropriado contendo DAPI (Ultracruz Mounting Medium: sc-24941, para fluorescência com DAPI, Santa Cruz Biotechnology CA, EUA). As imagens foram analisadas e capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M2.

Tabela 2. Descrição dos protocolos utilizados em cada técnica de imunistoquímica.

Imunistoquímica	Recuperação antigênica	Tampão de lavagem	Bloqueio da peroxidase endógena	Inibição de ligações inespecíficas	Polímero Leica	Complexo avidina biotina
Anti-AR	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS + tween	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	Não utilizou	X
Anti- CYP19	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 1 hora	X	Não utilizou
Anti- ESR1	45 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	TBS + tween	2 trocas de 15 minutos	Leite em pó a 5% por 1 hora	Não utilizou	X
Anti – ESR2	TRIS – EDTA por 7 minutos no micro-ondas com potência média e 14 minutos em potência baixa	TBS + NP 40	20 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	X	Não utilizou
Anti - PCNA	20 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	PBS	20 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	X	Não utilizou
Anti - p63	20 minutos em tampão citrato (pH 6) à 92°C	PBS	20 minutos	Leite em pó a 5% por 30 minutos	X	Não utilizou
Anti- α actina	50 minutos em tampão citrato (pH 6) à 98°C	PBS	Não utilizou	Leite em pó a 5% por 60 minutos	Não utilizou	Não utilizou

3.6. Níveis séricos hormonais

O sangue dos descendentes machos adultos dos grupos experimentais foi coletado no momento da decapitação. O soro foi centrifugado (3000 rpm, 20 minutos) e estocado à -80°C até o momento da análise. As dosagens hormonais foram realizadas em duplicata com o uso de kit de ELISA (testosterona e 17 β -estradiol, Cayman Chemical Company, MI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O limite de detecção para a testosterona e para o 17 β -estradiol foi de 6ng/mL e 19 pg/mL, respectivamente. As leituras foram realizadas no leitor SpectraMax Plus 384, a 405 nm (Molecular Devices, CA, EUA).

3.7. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados biométricos, morfométricos, estereológicos, imunoistoquímicos e sorológicos foram realizadas em planilhas e gráfico software *GraphPad Prism 5.00*. Para a comprovação da significância dos resultados paramétricos foi utilizado o teste “Tukey”. Para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste “Kruskal-Wallis statistic”. O nível de significância adotado foi: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***), expressos em média e desvio padrão ($\pm$).

4. Resultados

4.1. Análise Biométrica

Durante a análise dos dados biométricos dos machos adultos, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos experimentais, no que diz respeito ao peso corpóreo, ao peso do complexo prostático e ao peso do lobo ventral, como observado na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros biométricos dos gerbilos da Mongólia nos grupos (n=5) controle (CO), controle veículo (CV) e crisina (CR).

	Grupos Experimentais		
	CO	CV	CR
Peso corpóreo (g)	68,80 ± 6,42	77,60 ± 1,67	73,60 ± 11,70
Complexo prostático (mg)	0,62 ± 0,13	0,69 ± 0,14	0,67 ± 0,13
Lobo prostático ventral (mg)	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão

4.2. Morfologia e Morfometria

A análise dos dados morfométricos (Figura 5 i) mostrou um aumento significativo na altura do epitélio prostático do grupo CR em relação ao grupo CV, sendo que nesse parâmetro a diferença significativa foi maior quando comparado com o grupo CO. Além disso, os machos adultos do grupo CR apresentaram uma camada muscular lisa mais espessa com relação ao grupo CV, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos CO e CR, conforme mostra a Figura 5.

Na análise estereológica (Figura 5 j), observou-se diminuição significativa no volume relativo do compartimento luminal da próstata dos machos adultos do grupo CR comparado ao grupo CV. Com relação ao compartimento estromal prostático, verificou-se aumento significativo no grupo CR comparado ao grupo CV, entretanto esse compartimento apresentou-se menor no grupo CV comparado ao grupo CO. O compartimento epitelial prostático não apresentou diferenças significativas no volume relativo entre os grupos experimentais.

Por meio da reação citoquímica para P.A.S. foi possível observar um aparente aumento da atividade secretora no grupo CR em relação ao grupo CO (Figura 6 a-c), fato evidenciado

pelo aumento da região marcada positivamente para P.A.S. no interior dos ácinos prostáticos.

Para a análise do compartimento estromal da próstata ventral dos grupos experimentais, foi realizada a reação citoquímica para Reticulina de Gömori, onde foi possível observar um aparente desarranjo das fibras reticulares e colágenas do grupo CR comparada aos demais grupos experimentais (Figura 6 d-g).

4.3. Imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica, observou-se um aumento significativo na frequência de células epiteliais prostáticas positivamente marcadas por PCNA nos grupos CV e CR quando comparados ao grupo CO (Figura 7 a-d, i). A frequência das células basais (p63-positivas) na próstata ventral dos grupos experimentais foi maior no grupo CR quando comparado aos grupos CO e CV, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 7 e-h, j).

Pela análise imunoistoquímica para os receptores nucleares hormonais (Figura 8), verificou-se uma diminuição significativa da frequência de células epiteliais para AR no grupo CR em relação aos demais grupos. Diferentemente do que se observaram nas células estromais, onde se verificou um aumento significativo da frequência de AR nos grupos CV e CR quando comparados ao grupo CO (Figura 8 a-d, m).

Na frequência das imunomarcações para os receptores de estrógenos, notou-se diminuição significativa da frequência do ESR1 nas células epiteliais da próstata dos machos adultos do grupo CV em relação aos demais grupos experimentais no compartimento epitelial prostático. Porém, a imunomarcação nas células estromais prostáticas não sofreu variação significativa entre os grupos experimentais (Figura 8 i-l, n).

A imunoistoquímica para o ESR2 revelou uma maior frequência significativa desse receptor nas células epiteliais prostáticas no grupo CV em relação ao grupo CO, esse aumento também foi observado no grupo CR, comparado ao grupo CO e CV. A frequência da imunorreatividade do ESR2 nas células estromais foi maior significativamente na próstata do grupo CV e CR em relação ao grupo CO (Figura 8 e-h, o).

Outra análise imunoistoquímica foi para o CYP19 (Figura 9), utilizada para a verificação da imunomarcação da enzima aromatase. Sendo esse, um marcador citoplasmático, há uma certa dificuldade na mensuração da frequência de sua imunorreatividade. Entretanto, a técnica permitiu observar uma diminuição na

imunomarcção de CYP19 no citoplasma estromal da próstata dos machos adultos expostos à crisina durante o período de lactação, comparada aos grupos controle e veículo.

4.4. Níveis séricos hormonais

Este estudo mostrou que o tratamento com crisina diminuiu os níveis séricos hormonais de T e aumentou a circulação de estradiol, ambos os parâmetros comparados ao CV e CO, porém estas variações entre estes grupos experimentais não foram estatisticamente significantes, como mostra a Figura 10.

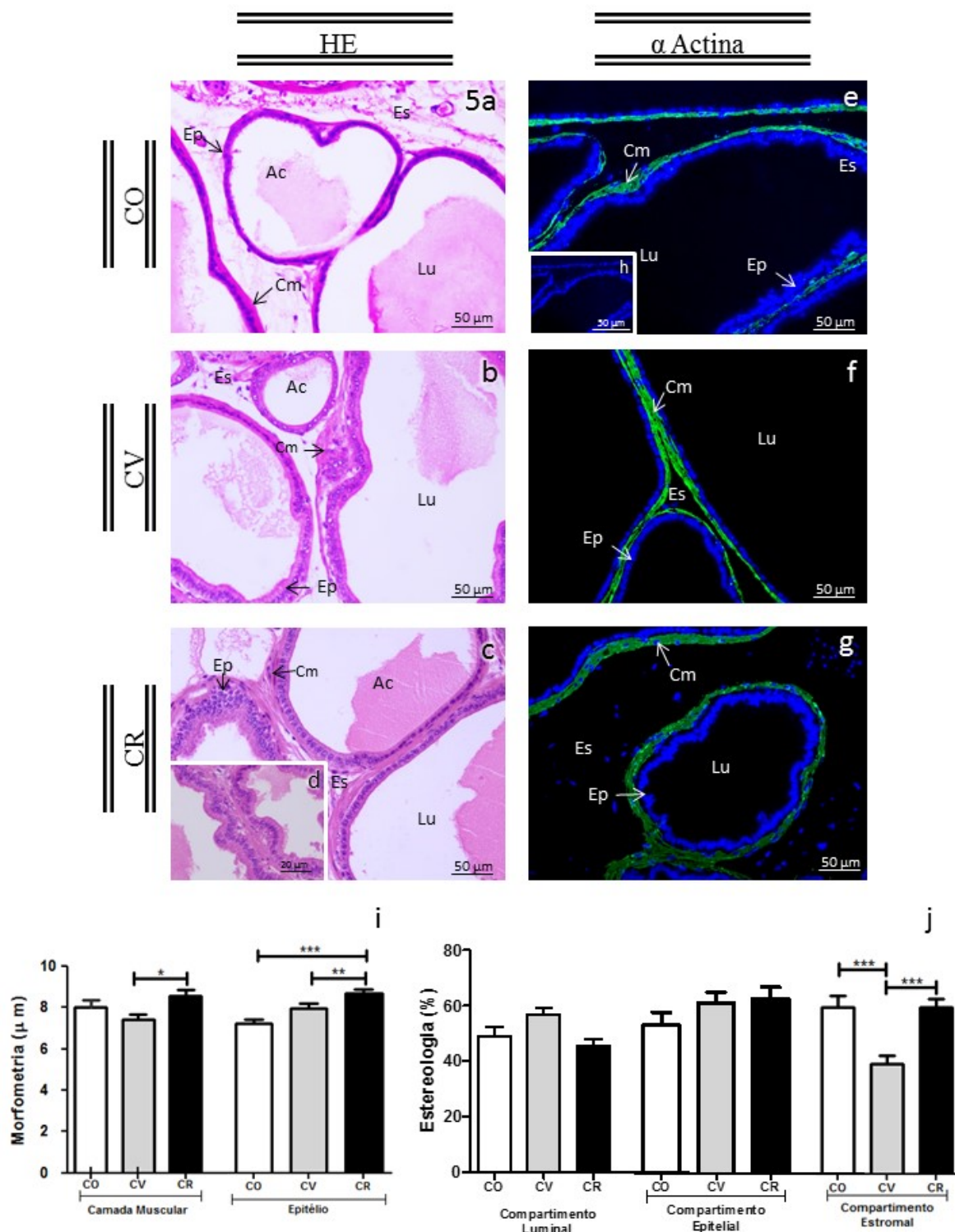


Figura 5. Cortes histológicos do lobo ventral da próstata de gerbilo s machos adultos corados por HE (a-d), marcados por imunofluorescência para α -actina (e-h). Ácinos (Ac); epitélio simples prismático (Ep); compartimento luminal (Lu), estromal (Es) e camada muscular (Cm). (d) detalhe para o epitélio pregueado. (h) Controle negativo. Histogramas representativos dos dados morfométricos (i) e estereológicos (j) da próstata ventral dos grupos experimentais dos gerbilos machos. CO: controle; CV: controle veículo e CR: crisina. (*), (**) e (***) indicam valores significantes ($p \leq 0,05$), ($p \leq 0,01$) e ($p \leq 0,001$), respectivamente. $n=5$ animais por grupo.

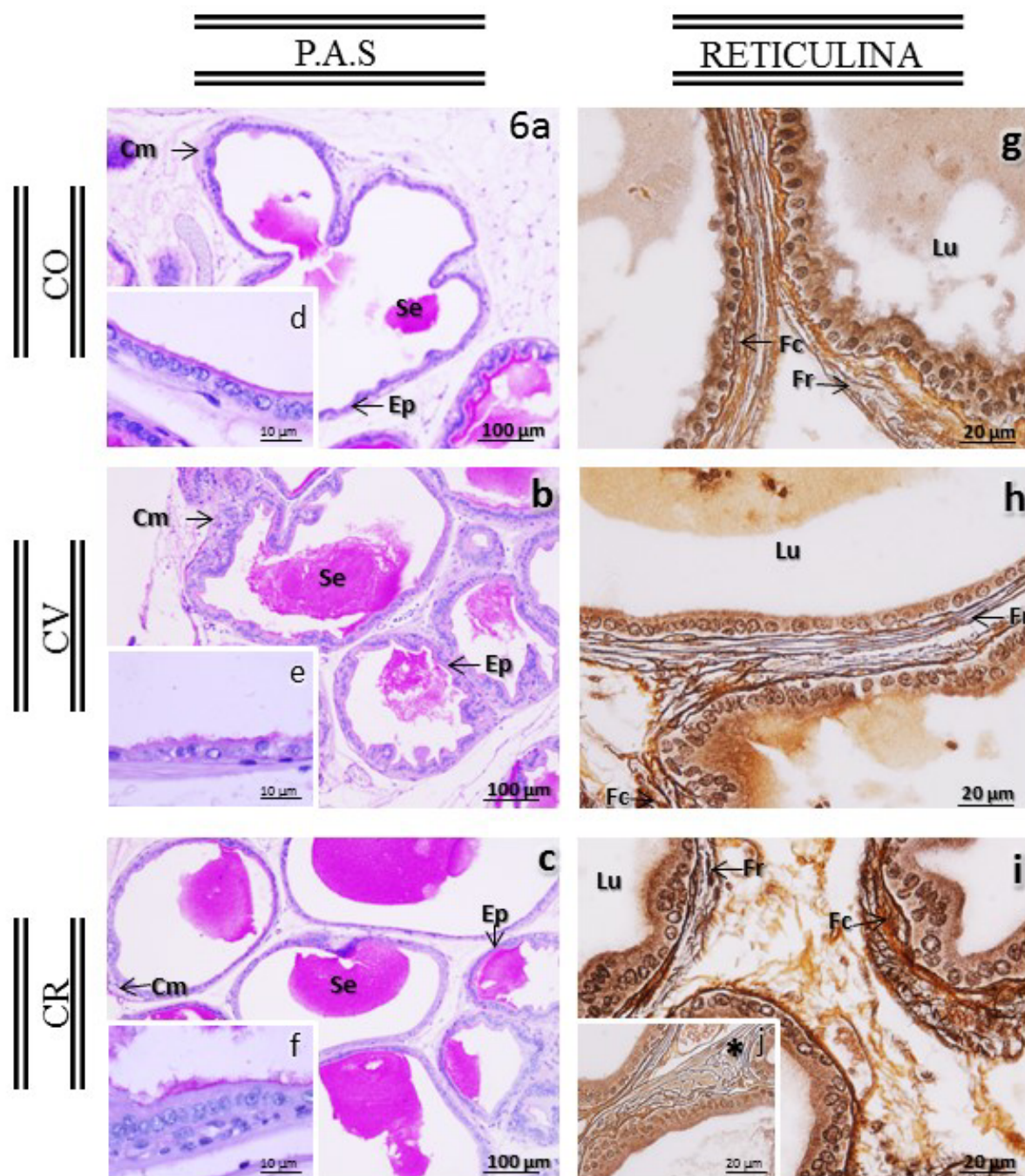


Figura 6. Cortes histológicos do lobo ventral da próstata de gerbilos machos adultos corados pelo ácido periódico de Schiff (P.A.S.) (a-f) e Reticulina de Gömöri (g-j). Epitélio simples prismático (Ep); compartimento luminal (Lu), camada muscular (Cm); secreção (Se); fibras reticulares (Fr) e fibras colágenas (Fc). (d-f) detalhe para o epitélio secretor. (j) detalhe para o desarranjo de fibras reticulares e colágenas em CR (*). CO: controle; CV: controle veículo e CR: crise.

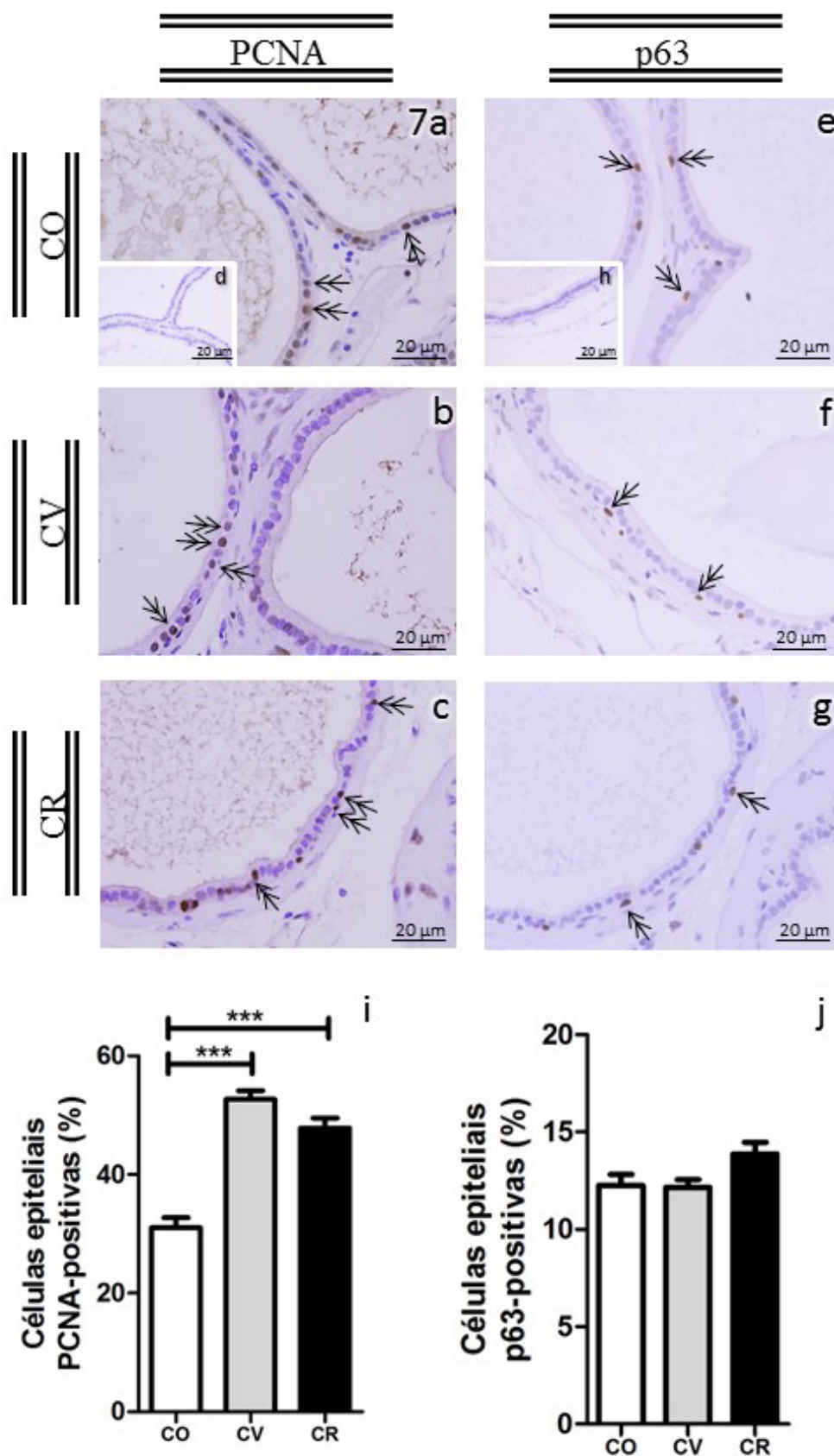


Figura 7. Cortes histológicos do lobo ventral da próstata de gerbilos machos adultos. Submetidos a técnica de imunohistoquímica para PCNA (a-d), p-63 (e-h). Indicando imunorreatividade no epitélio (setas duplas). Controle negativo das respectivas técnicas utilizadas (d,h). CO: controle; CV: controle veículo e CR: crisina. Histogramas representativos das frequências das células positivas para PCNA (i) e p63 (j) na próstata ventral dos grupos experimentais. (*), (**) e (***) indicam valores significantes ($p \leq 0,05$), ($p \leq 0,01$) e ($p \leq 0,001$), respectivamente. $n=5$ animais por grupo.

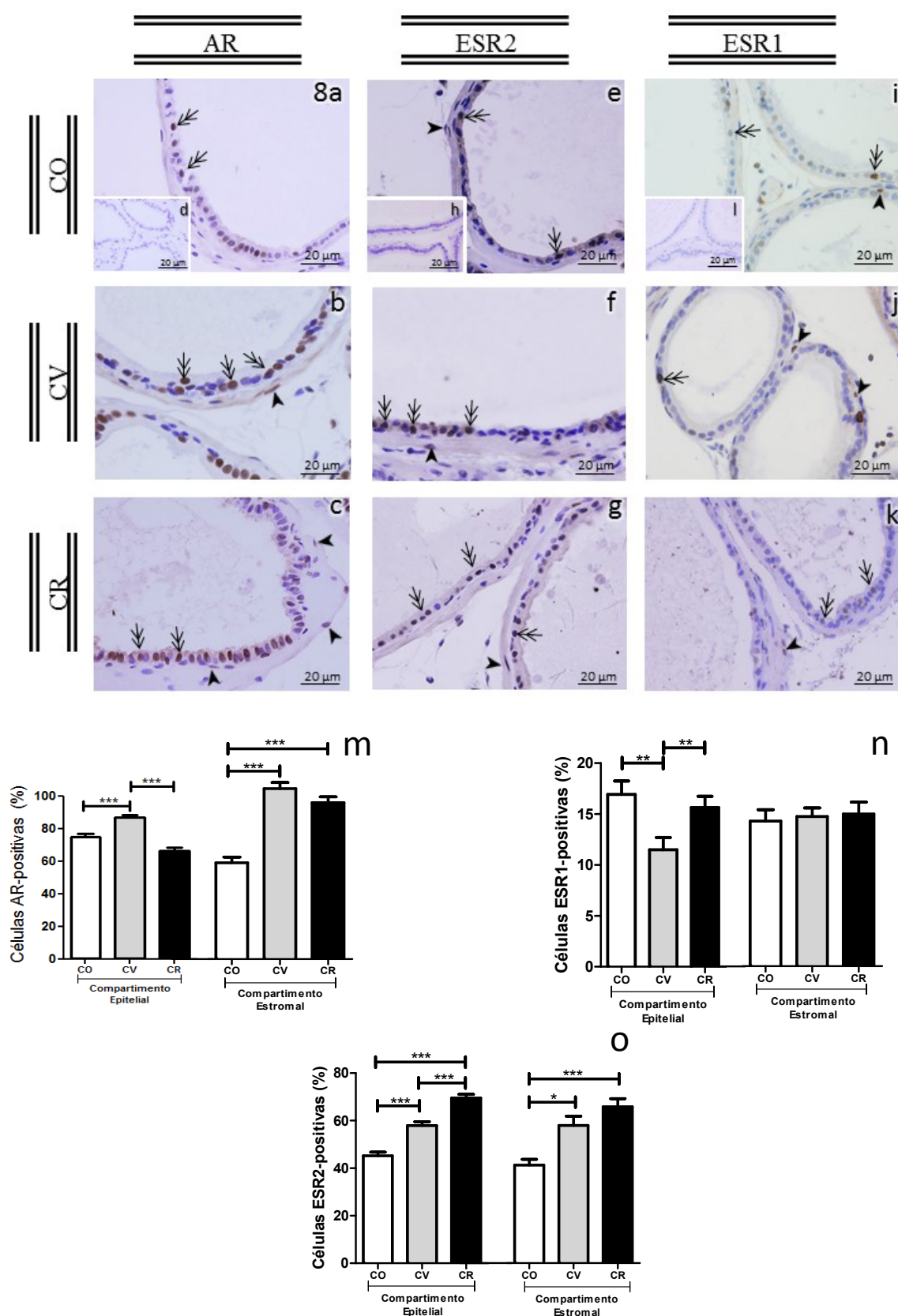


Figura 8. Cortes histológicas do lobo ventral da próstata de gerbilos machos adultos. Submetidos a técnica de imunohistoquímica para AR (a-d), ESR2 (e-h), ESR1 (i-l) e histogramas representativos da frequência de AR (m), ESR1 (n) e ESR2 (o). Indicando imunorreatividade no epitélio (setas duplas) e no compartimento estromal (cabeça de setas). Controle negativo das respectivas técnicas utilizadas (d,h,l). CO: controle; CV: controle veículo e CR: crisina. (*), (**) e (***) indicam valores significantes ($p \leq 0,05$), ($p \leq 0,01$) e ($p \leq 0,001$), respectivamente. $n=5$ animais por grupo.

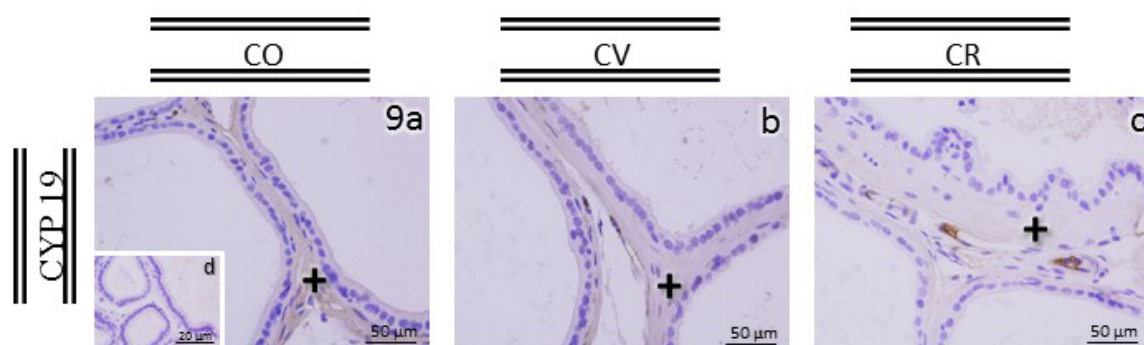


Figura 9. Cortes histológicos do lobo ventral da próstata de gerbilos machos adultos. Submetidos a técnica de imunohistoquímica CYP 19 (a-d) Indicando imunorreatividade citoplasmática estromal da enzima aromatase (+). Controle negativo das respectivas técnicas utilizadas (d). CO: controle; CV: controle veículo e CR: crisina.

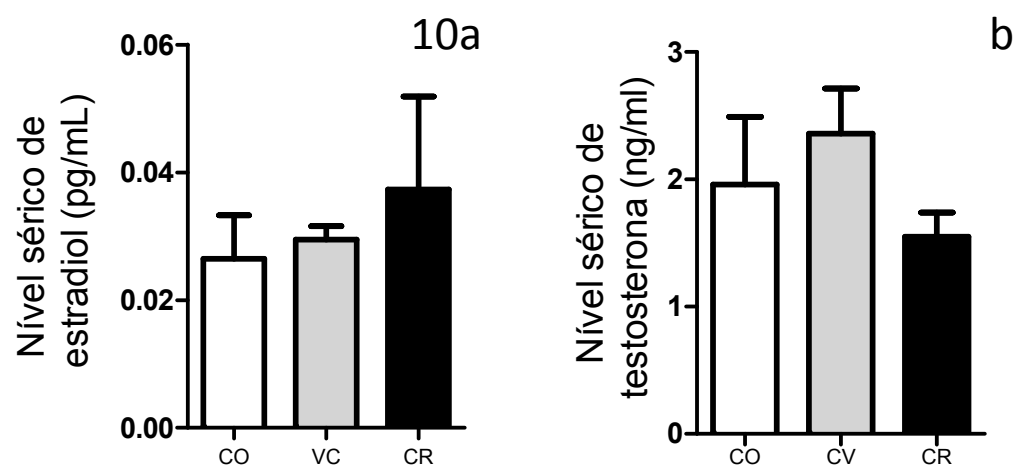


Figura 10. Histogramas representativos dos níveis séricos hormonais de estradiol (a) e testosterona (b) dos machos adultos dos grupos experimentais. CO: controle; CV: controle veículo e CR: crisina.

5. Discussão

Os roedores machos tem sido o principal modelo experimental utilizado para se compreender a biologia da próstata em laboratórios de pesquisa. A maioria dos roedores possui a próstata dividida em quatro lobos distintos: lobo ventral, lobo dorsal, lobo dorsolateral e, associado às vesículas seminais, o lobo anterior ou glândula de coagulação. Os três primeiros já foram estudados mais amplamente, por possuírem uma resposta epitelial mais sensível a tratamentos hormonais (ROCHEL et al., 2007; PEREZ et al., 2011). O presente experimento analisou o lobo ventral de gerbilos machos adultos devido ao seu maior tamanho, a sensibilidade a andrógenos e a incidência de hiperplasias e neoplasias nesta região (ROCHEL et al., 2007). Atualmente, a procura por uma alimentação saudável, rica em proteínas e vitaminas, tem aberto um novo leque para a pesquisa científica. O presente estudo utilizou a crisina, um flavonoide biologicamente ativo, encontrado em frutas e vegetais, com potente atividade anti-inflamatória e antioxidante (SAMARGHANDIAN; AFSHARI; DAVOODI, 2011), possuindo também efeitos antitumorais (LÉON et al., 2015). Além disso, esse composto tem se mostrado como um potente inibidor da enzima aromatase, que converte a testosterona em estradiol (CIFTCI et al., 2010).

A próstata ventral dos gerbilos adultos expostos à crisina no período de lactação mostrou-se sensível a este composto, acarretando em alterações morfofisiológicas, que poderiam perdurar do período de exposição até a fase adulta, ou seja, não sofrer recuperação do tecido normal com o tempo, ou então serem revertidas com a idade, uma vez que a quantidade de grupos hidroxila livres da crisina, desencadeia a conjugação muito rápida, a glucuronidação e a sulfatação, processos estes que facilitam a degradação e, consequentemente a eliminação do composto (WEN; WALLE, 2006).

A análise morfométrica revelou que a altura do epitélio prostático de machos adultos, expostos à crisina durante o período de lactação, aumentou significativamente, onde foi possível observar um epitélio mais pregueado em relação ao CO e ao CV. Ademais, observou-se um aumento da espessura da camada muscular em CR, quando comparado ao CV, levando a uma alteração morfológica da próstata ventral. Estudos anteriores demonstraram que a exposição a importantes xenoestrógenos como o BPA (10 µg/kg/dia) (TAYLOR et al., 2011) e o EE (10 µg/kg/dia) (PEREZ et al., 2011; 2016) durante o período pré-natal, promoveram o aumento de displasia epitelial e neoplasia intraepitelial prostática (NIP) na fase adulta e durante o envelhecimento. A crisina, um fitoestrógeno, disponibilizada em importantes fases do desenvolvimento prostático, modificou a

morfologia prostática da glândula na fase adulta, diferente dos estudos com xenoestrógenos que promoveram o desenvolvimento de lesões prostáticas.

Por meio da análise estereológica foi possível notar que o compartimento estromal diminuiu consideravelmente nos animais adultos expostos no período de lactação ao óleo de milho, importante veículo para a diluição da crisina, em relação aos demais grupos experimentais. Sabe-se que o veículo utilizado neste experimento apresenta estrutura de um ácido graxo poli-insaturado. FURRIEL et al., (2014) demonstrou que a suplementação de gorduras poli-insaturadas em ratos Wistar durante a fase adulta, resultou no aumento do compartimento estromal da próstata ventral, dado discrepante com o encontrado no presente estudo, porém com delineamento experimental diferente quanto ao tipo de ácido graxo disponibilizado, modelos experimentais utilizados e tempo de exposição. FURRIEL manipulou a fonte de ácido graxo (14% de proteínas, 36% de carboidratos, 50% gordura) e expôs os ratos Wistar do 3º ao 7º mês de idade, fase adulta, à gordura poli-insaturada, enquanto que em nosso estudo, os gerbilos foram expostos, em períodos de desenvolvimento da glândula prostática, mais precisamente em fases da morfogênese glandular.

A proliferação de células epiteliais aumentou nos grupos expostos à crisina e ao veículo em relação ao CO, a alteração na quantificação dessas células pode resultar no aumento de lesões neoplásicas na próstata durante o envelhecimento (PEREZ et al., 2016) e no desenvolvimento de câncer de próstata (ZHANG et al., 2011). O PCNA está associado com a maquinaria de replicação, controle do ciclo celular e nos processos de reparação do DNA (ZHANG et al., 2011). Os dados obtidos no presente estudos coincidem com experimentos anteriores, tais como o de FURRIEL et al., (2014), onde foi possível verificar o aumento da frequência de PCNA em animais expostos a gorduras poli-insaturadas. Compostos naturais como a crisina podem levar a alteração na frequência de células epiteliais positivas para PCNA.

O p63, tem papel fundamental na morfogênese e na manutenção de todos os epitélios, incluindo o da próstata, sendo este gene, essencial para a função normal de células basais (SENOO et al., 2007). Por meio da imunorreatividade de p63, observamos que a camada basal foi levemente alterada frente a exposição à crisina. Porém BIANCARDI et al., (2012) demonstrou que a exposição a elevadas doses de testosterona durante o período pré-natal diminuiu a imunorreatividade de p63 em regiões com PIN na próstata ventral de gerbilos machos adultos. Estudos feitos com ratos demonstraram que flavonas metiladas possuem uma maior absorção oral, maior biodisponibilidade oral e distribuição nos tecidos, em

comparação com flavonas não metiladas, como a crisina (WALLE et al., 2007; TA; WALLE, 2007).

Hormônios sexuais, como andrógenos e estrógenos, cujos receptores foram aqui analisados, desempenham um papel importante tanto no desenvolvimento normal como anormal da glândula prostática. As variações nas enzimas que metabolizam estes hormônios durante a progressão do câncer podem significativamente alterar o seu conteúdo intracelular e desempenhar um papel fisiopatológico na regulação do crescimento e da função do órgão (CORRADI et al., 2009).

De acordo com o presente estudo, os receptores de andrógenos do compartimento estromal, aumentaram significativamente com a exposição à crisina. Os tecidos prostáticos expressam vários tipos de enzimas metabolizadoras de esteroides, como por exemplo, a 5 α -redutase (5 α -R), responsável por converter T em um metabólito de andrógeno mais ativo, a di-hidrotestosterona (DHT), que possui maior afinidade pelos ARs (CORRADI et al., 2009). Essas informações sugerem que o aumento da expressividade de AR no grupo CR, se deu pelo aumento de DHT, pois através da quantificação dos níveis hormonais séricos, verificou-se uma diminuição de T em CR. Já no compartimento epitelial, não houve grandes diferenças entre o grupo exposto ao composto e o grupo controle, no entanto observou-se um aumento significativo de células AR positivas em CV. Estudos anteriores demonstraram que gorduras poli-insaturadas, são susceptíveis à peroxidação lipídica, podendo aumentar a expressão enzimática da 5 α -R, com consequente aumento de DHT, a qual possui maior afinidade ao receptor de hormônios androgênicos (FURRIEL et al., 2014).

A crisina parece afetar o estado de diferenciação das células epiteliais secretoras em relação ao CO, este fato é observado pelo aumento significativo da proliferação celular, através da imunomarcção com células PCNA positivas, um discreto aumento na frequência de células basais, quantificadas pela imunomarcção com p63 positivas e a diminuição não significativa de células AR positivas no compartimento epitelial. A longo prazo essas alterações podem levar a um microambiente instável e no desenvolvimento de lesões proliferativas. Este composto também parece estar relacionado com o aumento da atividade secretora da glândula prostática, pois por meio da coloração com P.A.S. foi possível notar um aparente aumento da secreção na próstata de gerbilos expostos a crisina durante crítico período de desenvolvimento prostático, concomitantemente também apresentaram um epitélio mais espesso em relação ao CO, sugerindo assim, possuírem uma maior atividade secretora. A exposição à crisina, durante o período de lactação, levou a um aparente surgimento de alterações no arranjo das fibras reticulares e colágenas da próstata de gerbilos

machos adultos, favorecendo a remodelação do compartimento estromal da glândula prostática em fases posteriores, como a idade adulta, período em que as interações entre estroma prostático e epitélio são relevantes para manter a diferenciação nos compartimentos epiteliais e estromais (CUNHA et al., 2004; CORRADI et al., 2009).

Durante o período de lactação, é predominante a expressão do receptor ESR1, seguido por baixos níveis de testosterona. Alterações nas vias desse receptor durante o desenvolvimento, resulta em efeitos permanentes e irreversíveis na fase adulta e durante o envelhecimento (MCPHERSON; ELLEM; RISBRIDGER, 2008). A maior frequência de ESR1 ($ER\alpha$) é observado na maioria das vezes nas células estromais prostáticas de gerbilos adultos (ROCHEL-MAIA et al., 2013). Os dados do presente estudo revelaram a presença do ESR1 no epitélio e no compartimento estromal. No estroma, não foram observadas alterações de frequências para este receptor entre os grupos experimentais, no entanto, no compartimento epitelial, observamos uma menor marcação no grupo exposto ao óleo de milho. Segundo ROCHEL-MAIA et al., (2013) a expressão do ESR1 é maior nas células epiteliais prostáticas durante o envelhecimento, período o qual se observa aumento de distúrbios prostáticos (CAMPOS et al., 2008), fato que não foi evidenciado no grupo veículo, desta forma podemos inferir que o veículo utilizado para diluir a crisina, não promoveu alterações marcantes na arquitetura dos tecidos da glândula.

O ESR1 está relacionado à proliferação celular aberrante, à inflamação e ao desenvolvimento de lesões pré-malignas (PEREZ et al., 2011), a ausência de alterações na expressão deste receptor nos grupos CO e CR pode estar relacionado com a atividade anticancerígena e anti-inflamatória da crisina (KASALA et al., 2015).

Outro receptor analisado foi o ESR2 ($ER\beta$), por meio da técnica de imunoistoquímica. Esse receptor é expresso tanto em células secretoras quanto nas células basais do compartimento epitelial e, em células da musculatura lisa e fibroblastos do compartimento estromal da glândula prostática (ROCHEL-MAIA et al., 2013). Estudos mostram que o ESR2 apresenta vias relacionadas à ação anti-inflamatória na próstata (HARRIS et al., 2003) e possui ação antiproliferativa, neste mesmo tecido (WEIHUA et al., 2002). Machos expostos à crisina durante o período de lactação apresentaram uma maior imunorreatividade para ESR2, nos compartimentos epiteliais e estromais. Estudos sugerem que a atividade de ESR2 pode ser útil na prevenção do câncer de próstata, evidenciando assim a atividade anticancerígena do composto utilizado (WEIHUA et al., 2002).

Por meio da ação inibitória da aromatase, poderia se esperar um nível elevado de T no grupo exposto a crisina (CIFTCI et al., 2010), no entanto este dado não foi observado no

presente estudo, onde foi possível analisar uma diminuição não significativa de T no grupo CR em relação ao CO, podendo estar relacionado com uma menor absorção do composto por via oral (WALLE et al., 2007; TA; WALLE, 2007) além do mais, em tecidos corporais específicos, os níveis de andrógenos e estrógenos podem diferir do plasma, uma vez que estes hormônios são estritamente dependentes da expressão de enzimas específicas, residentes do tecido prostático (CORRADI et al., 2009). Pode-se também observar um aumento de estradiol nos gerbilos expostos a crisina, em concordância com o aumento dos receptores para este hormônio, entretanto este dado não obteve significância estatística.

A exposição à crisina durante o período de lactação, um período crítico para o desenvolvimento prostático de roedores, promoveu alterações no padrão morfológico da próstata de gerbilos adultos, gerando uma instabilidade entre as células epiteliais, o que pode ser verificado pelo aumento da marcação para o PCNA, seja em termos de proliferação ou de reparo. Entretanto, não foi possível observar o desenvolvimento de desordens prostáticas, dado importante quando observado o aumento na frequência dos receptores de ESR2, o qual apresenta ação antiproliferativa sobre a próstata. Como se trata de um composto com ações farmacológicas ainda pouco conhecidas, novos estudos devem ser realizados para se somar a este aqui apresentado e, assim ampliar e aprimorar a discussão dos efeitos da crisina sobre a próstata ventral adulta de gerbilos da *Mongólia*.

6. Conclusão

A exposição a altas doses de crisina durante o período de lactação, fase crucial para o desenvolvimento da próstata de gerbilos da Mongólia, não promoveu o surgimento de lesões prostáticas nestes animais, a longo prazo, como na fase adulta. Este resultado pode ser interpretado como um efeito protetor e que pode ser regulado pelo ESR2, para o qual se observou um aumento da imunorreatividade nos compartimentos estromal e epitelial dos animais tratados com o composto. Entretanto, a exposição precoce à crisina resultou em alterações nos padrões morfológicos da próstata, mais precisamente nos compartimentos epitelial, estromal e luminal e, aumento na proliferação das células epiteliais, fatores que não permitem descartá-lo como um composto com ação de desregulador endócrino.

Referências

- BEHMER AO; TOLOSA EMC; NETO AGF. 1976. Manual de práticas para histologia normal e patológica. **Edart-Edusp**, sp.329p.
- BIANCARDI MF, PEREZ AP; GÓES RM; SANTOS FC; VILAMAIOR PS; TABOGA SR. 2012. Prenatal testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil prostate. **Exp Biol Med (Maywood)**. 237:1298-309.
- CAMPOS S.G., ZANETONI C., SCARANO W.R., VILAMAIOR P.S., TABOGA S.R. 2008. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **Int. J. Exp. Pathol.** 89:13–24.
- CIFTCI O; OZDEMIR I; AYDIN M; BEYTUR A. 2010. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. **Andrologia**, 44(3):181-6.
- COLLETA SJ; ANTONIASSI JQ; ZANATELLI M; SANTOS FC; GÓES RM; VILAMAIOR OS; TABOGA SR. 2015. Acute exposure to bisphenol A and cadmium causes changes in the morphology of gerbil ventral prostates and promotes alterations in androgen-dependent proliferation and cell death. **Environ Toxicol**. doi: 10.1002/tox.22211.
- CORRADI LS; GÓES RM; VILAMAIOR PS; TABOGA SR. 2009. Increased Androgen Receptor and Remodeling in the Prostatic Stroma After the Inhibition of 5-Alpha Reductase and Aromatase in Gerbil Ventral Prostate. **Microscopy research and technique**, 72:939–950.
- CUNHA GR; RICKE W; THOMSON A; MARKER PC; RISBRIDGER G; HAYWARD SW; WANG YZ; DONJACOUR AA; KURITA T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 92:221-36.
- CUNHA GR; HAYWARD SW; WANG YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. 2002. **Differentiation**, 70:473–485.
- EDMUNDS KM; HOLLOWAY AC; CRANKSHAW DJ; AGARWAL SK; FOSTER WG. 2005. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. **Reprod Nutr De**, 45:709-20
- FURRIEL A; CAMPOS-SILVA PAMELLA; SILVA PCGP; COSTA WS; SAMPAIO FJB; GREGÓRIO BM. 2014. Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids Induce Morphological Alterations in the Rat Ventral Prostate. **Plos One** doi:10.1371/journal.pone.0102876.
- HARRIS HA; ALBERT LM; LEATHURBY Y; MALAMAS MS; MEWSHAW RE; MILLER CP; KHARODE YP; MARZOLF J; KOMM BS; WINNEKER RC; FRAIL DE; HENDERSON RA; ZHU Y, KEITH JCJ. 2003. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. **Endocrinology** 144:4241–4249.

HODEK P, TREFIL P, STIBOROVÁ M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions** 139: 1–21

HUTTUNEN E, ROMPPANEN T, HELMINEN HJ, 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **J Anat**, 3:357-370

KASALA ER; BODDULURU LN; BARUA CC; MADHANA RM; DAHIYA V; BUDHANI MK; MALLUGARI RR; MARAMREDDY SR; GOGOI R. 2015. Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pharmacological Reports**, 68: 310–318

LEÓN IE; CADAVID-VARGAS JF; TISCORNIA I; PORRO V; CASTELLI . 2015. Oxidovanadium (IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. **J Biol Inorg Chem**, 20:1175–1191

Li X. 2010. Aromatase over expression transgenic murine models for aromatase inhibitor studies. **Mol Hum Reprod.**, 16:80-6.

LÓRÁND T, VIGH E, GARAI J. 2010. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Current Medicinal Chemistry**, 17:3542-74.

MAFFINI MV; RUBIN BS; SONNENSCHN C; SOTO AM. 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 254–255: 179–186

MCPHERSON SJ; ELLEM SJ; RISBRIDGER GP. 2008. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**.76:660-70

NABAVI SF; BRAIDY N; HABTEMARIAM S; ORHAN IE; DAGLIA M; MANAYI A; GORTZI O; NABAVI SM. 2015. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**. 90: 224-231

NASO L; FERRER EG; LEZAMA L; ROJO T; ETCHEVERRY SB; WILLIAMS P. 2010. Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl (IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: relationship with the radical scavenger activity. **J Biol Inorg Chem** 15:889–902.

PEREZ AP; BIANCARDI MF; CAIRES CR; FALLEIROS-JUNIOR LR; GÓES RM; VILAMAIOR PS; SANTOS FCA; TABOGA SR. 2016. Prenatal exposure to ethinylestradiol alters the morphologic patterns and increases the predisposition for prostatic lesions in male and female gerbils during ageing. **Int J Exp Pathol**. doi: 10.1111/iep.12153.

PEREZ AP; BIANCARDI MF; VILAMAIOR PS; GÓES RM; SANTOS FCA; TABOGA SR. 2012. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. **Microsc Res Tech.**, 75:1084-92.

PEREZ AP; BIANCARDI MF; GÓES RM; SANTOS FCA; TABOGA SR. 2011. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. **Int J Exp Pathol.**, 92:121-30.

PRINS GS; PUTZ O. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, 76:641-59.

ROCHEL-MAIA SS; SANTOS FCA; ALONSO-MAGDALENA P; GÓES RM; VILAMAIOR PSL; WARNER M; GUSTAFSSON JA; TABOGA SR. 2013. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Male and Female Gerbil Prostates. **Biology of reproduction**, 88(1):7, 1-7.

ROCHEL SS; CARDOSO AB; TABOGA SR; VILAMAIOR OS; GÓES RM. 2007. Lobe Identity in the Mongolian Gerbil Prostatic Complex: A New Rodent Model for Prostate Study. **The anatomical record**, 290:1233-1247.

SAMARGHANDIAN S; AFSHARI T; DAVOODI S. 2011. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. **BASIC RESEARCH**, 66(6):1073-1079.

SANCHES BD; ZANI BC; MALDARINE JS; BIANCARDI MF; SANTOS FC; GÓES RM; VILAMAIOR PS; TABOGA SR. 2016. Postnatal development of Mongolian gerbil female prostate: An immunohistochemical and 3D modeling study. **Microsc Res Tech.** doi: 10.1002/jemt.22649.

SANCHES BD; BIANCARDI MF; SANTOS FC; GÓES RM; VILAMAIOR PS; TABOGA SR. 2014. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in Mongolian gerbil. **Microsc Res Tech.**, 77:458-66.

SANTOS FCA; LEITE RP; CUSTÓDIO AMG; CARVALHO KP; MONTEIRO-LEAL LH; SANTOS AB; GÓES RM; CARVALHO HF; TABOGA SR. 2006. Testosterone stimulates growth and secretory activity of the adult female prostate of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Biol Reprod.**, 75:370-379.

SANTOS FC; CARVALHO HF; GÓES RM; TABOGA SR. 2003. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. **Tissue Cell**, 35:447-457.

SENOO M; PINTO F; CRUM CP; MCKEON IF. 2007. p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia. **Cell**, 129, 523-536.

SUGIHARA N; TAKAYUKI A; OHNISHI M; FURUNO K. 1999. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radic Biol Med** 27:1313-1323.

TA N; WALLE T. 2007. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, 107:127-9.

TAHIR M; SULTANA S. 2011. Chrysin Modulates Ethanol Metabolism in Wistar Rats: A Promising Role against Organ Toxicities. **Pharmacology and Cell Metabolism**. doi: 10.1093/alcalc/agr038.

TAYLOR JA; RICHTER AC; RUHLEN RL; VOM SAAL FS. 2011. Estrogenic Environmental Chemicals and Drugs: Mechanisms for Effects on the Developing Male Urogenital System. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 127:83-95.

TIMMS BG; HOWDESHELL KL; BARTON L; BRADLEY S; RICHTER CA; VOM SAAL FS. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 102:7014-9.

TOMSON AA. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. 2001. **Reprod.**; 121, 187-195.

WALLE T; TA N; KAWAMORI T; WEN X; TSUJI PA; WALLE K. 2007. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids -methylated versus unmethylated flavones. **Biochem Pharmacol**. 73(9): 1288–1296.

WANG X; MORRIS ME. 2007. Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: potential involvement of ABCG2. **Drug metabolism & disposition** 35:268–274.

WEN X; WALLE T. 2006. Methylated Flavonoids Have Greatly Improved Intestinal Absorption and Metabolic Stability. **Drug metabolism & disposition** 34:1786–1792

WEIBEL ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, 12:131-155.

WEIHUA Z; WARNER M; GUSTAFSSON J. 2002. Estrogen receptor betain the prostate. **Mol Cell Endocrinol** 193:1–5.

ZHANG W; QIN Z, ZHANG X; XIAO W. 2011. ROLES of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. **FEBS Letters**, 585: 2786–2794.

ZHENG X; MENG WD; XU YY; CAO JG; QING FL. 2003. Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives. **Bioorg Med Chem Lett** 13:881–884.

Anexo

Anexo A. Certificado emitido pelo Comitê de ética, referente ao presente estudo.



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

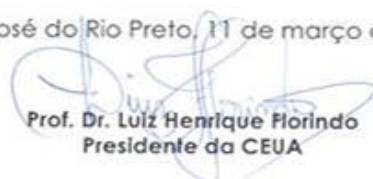
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto/disciplina de pesquisa intitulado "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À CHRISINA DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO SOBRE A PRÓSTATA VENTRAL DE GERBILOS (*Meriones unguiculatus*) ADULTOS" (protocolo nº. 107/2015 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Patrícia Simone Leite Vilamaior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 11 de março de 2015.

CERTIFICATE

Certify that the project / discipline research entitled "EFFECTS OF EXPOSURE CHRYSINE DURING LACTATION PERIOD ON PROSTATE GERBILS VENTRAL (*Meriones unguiculatus*) ADULTS" (protocol no. 107/2015 - CEUA), under the responsibility of Professora Doutora Patrícia Simone Leite Vilamaior, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, at the meeting of March 11, 2015.

São José do Rio Preto, 11 de março de 2015.



Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel: (17) 3221-2428 / 3221-2563

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 29/08/2016.

Cássia Regina Suzuki Caires