Instituto de Biociências
unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu
PG-BGA

EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CÁDMIO E/OU À CAFEÍNA: ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS NA PRÓSTATA DO RATO

LÍVIA MARIA LACORTE

Botucatu – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO CÁDMIO E/OU À CAFEÍNA: ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS, ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS NA PRÓSTATA DO RATO

LÍVIA MARIA LACORTE

ORIENTADOR: Profº Drº SÉRGIO LUIS FELISBINO

CO-ORIENTADORA: Drª FLÁVIA KARINA DELELLA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Profº Drº Sérgio Luis Felisbino

Botucatu - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Lacorte, Lívia Maria.
Exposição crônica ao cádmio e/ou à cafeína : alterações estruturais, ultraestruturais e bioquímicas na próstata do rato / Lívia Maria Lacorte. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Sérgio Luis felisbino
Coorientador: Flávia Karina Delella
Capes: 20600003

1. Cádmio – Toxicologia. 2. Cafeína – Efeito fisiológico. 3. Próstata – Hiperplasia. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Cádmio; Cafeína; Morfologia; Próstata; Ultra-estrutura.

Botucatu, 23 de novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Sérgio Luis Felisbino _____

Profª Drª Isabel Cristina Cherici Camargo _____

Profª Drª Fernanda Cristina Alcantara dos Santos _____

Profª Drª Raquel Fantin Domeniconi _____

Profª Drª Arielle Cristina Arena _____

Profª Drª Glaura Scantamburlo Alves Fernandes _____

Profº Drº Wellerson Rodrigo Scarano _____

Profº Drº Luis Fernando Barbisan _____

Dedico:

Aos meus pais Maurício e Neide,

Queridos guerreiros, exemplo de vida, dedicação e perseverança!

Ao Guilherme,

Meu amado companheiro e incentivador. Amo você!

Agradecimento Especial

A Deus

Pela vida! Por ter permitido que eu concluísse mais este objetivo. Obrigada pelas pessoas maravilhosas que tenho ao meu lado e por todas aquelas que conviveram comigo nestes anos de aprendizagem. Abençoe a todos!

Ao orientador Sérgio,

A minha sincera gratidão por ter me orientado neste período.
Obrigada por todos os ensinamentos, compreensão, apoio e atenção que sempre me dedicou. Você será para sempre o meu Mestre! A minha referência de pesquisador e professor.
Muito obrigada!

A co-orientadora Flávia,

O meu sincero reconhecimento por todas as vezes que sentamos para fazer, analisar, repetir os resultados. A sua orientação foi determinante em algumas fases deste trabalho e para me apoiar em várias situações. Além de uma excelente profissional, muito ética, organizada se tornou uma amiga muito especial.
Flá, você tem muitas qualidades que levarei para a minha vida profissional e para sempre como Amiga.
Muito obrigada!!!

Agradecimentos

Ao Professor e colaborador Antônio Francisco Godinho, obrigada por sempre estar presente em todos os momentos. Você sempre será um grande exemplo para mim!

Aos professores membros da banca examinadora que disponibilizaram tempo e aceitaram o convite. Obrigada por contribuírem com a minha formação!

Aos professores Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dr. José Carlos Souza Trindade Filho e Dr. Wagner José Fávaro, pela participação na fase da minha qualificação e pelas contribuições científicas.

Ao professor Dr. Wagner José Fávaro pela nova oportunidade. Será muito gratificante trabalhar ao lado de um profissional tão exemplar.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu pela colaboração e pela agradável convivência. Especialmente à secretária Luciana, aos técnicos José Eduardo e Ricardo, D. Terezinha e Iolanda.

A coordenadoria e professores do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pelos ensinamentos e determinação para que o programa melhore sempre.

Aos secretários da seção de Pós-Graduação por todo o trabalho empregado para facilitar a execução dos parâmetros burocráticos.

Aos amigos do LabMec Jaqueline, Flávia, Carina, Carol, Marcela, Heloísa, Bruna, Amanda, Alexandre e Andrei. Grupo muito querido!!! Compartilhamos frustrações, sucesso, tristeza, alegria. Desejo sucesso a todos nós!

A Marcela Martins e Elisa Fortes por ter aprendido muito com vocês na colaboração de orientá-las e pela colaboração de vocês.

Aos colegas do Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu e aos que já passaram por lá: Marcão, Fernanda Carani, Rodrigo, Ivan, Luana, Bruno, Warley, Edson, Léo, Tatá, Nelci, Joyce, Dani, Carol, Ariane, Leticia, Kelly, Fernanda Losi e Glaura pelos momentos vividos no departamento e principalmente, pelos momentos de descontração.

As grandes amigas da minha querida cidade natal (Ibitinga) Paula, Priscila e Isabela e á Érica pela amizade sincera e eterna.

A Jaque, companheira de laboratório e que se tornou uma amiga confidente, fiel e para sempre!

A todos da minha família que torceram por mim e à querida família Simão. A torcida de vocês foi essencial para a conclusão desta etapa.

A FAPESP pela bolsa (09/50850-5) concedida e por me manter em dedicação exclusiva.

Aos animais experimentais.

> *"Foste para nós vítimas solicitadas pela ciência para benefício da humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre: Muito obrigado" autor desconhecido.*

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra, não menos importante que ninguém, estiveram comigo nesta jornada.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito." Chico Xavier

"Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino" Paulo Freire

Lista de Abreviaturas

AR: Receptor de Andrógeno

Br^{2+}: Bromo

Caf: Cafeína

Caff: caffeine

CaP: Câncer de Próstata

CAT:

Cd: Cádmio

CK: citoqueratinas

Co^{2+}: Cobalto

Col I – Colágeno tipo I

Col III – Colágeno tipo III

CT – Controle ou control

DHT: Dihidrotestosterona

DP: Dorsal prostate

EDC: Endocrine disruptor chemicals

EGF: "*Epidermal Growth Factor*" - Fator de Crescimento Epidermal

EROs: Espécie reativa de oxigênio

FGF: "*Fibroblast Growth Factor*" - Fator de Crescimento de Fibroblastos

GSTs: Glutationa S-transferase

HPB: Hiperplasia Prostatica Benigna

IARC: International agency for research on cancer

IGF: "*Insulin Growth Factor*" – Fator de Crescimento do tipo Insulina

MEC: Matriz extracelular

MEC: Matriz Extracelular

Mg^{2+}: Magnésio

MMP: Metaloproteinases de Matriz

Mn^{2+}: Manganês

MT: Metalotioneína

PA: Próstata anterior

PAP: fosfatase ácida prostática

PBS: Tampão Fosfato-Salina

PCNA: Antígeno Nuclear de Células Proliferativas

PD: Lobo prostático dorsal

PSA: antígeno prostático específico

PSA: Prostatic Specific Antigen

PV: Lobo prostático ventral

SOD: Superóxido dismutase

Sr^{2+}: Estrôncio

T: Testosterona

TGF-β: "*Transforming Growth Factor-beta*" - Fator Transformador de Crescimento-beta

VP: Ventral prostate

VS: Vesicula seminal

WHO: World Health Organization

Zn^{2+}: Zinco

Mg: micrograma

µL: microlitro

Resumo

Os efeitos adversos do cádmio, um contaminante ambiental e ocupacional, sobre a próstata do homem e de animais experimentais têm sido bastante investigados, entretanto, a maioria destes trabalhos experimentais *in vivo* utilizam doses altas. Além disso, a exposição concomitante do cádmio a outros compostos, como por exemplo, a cafeína, um alcalóide presente em várias bebidas e alimentos de consumo mundial, ainda não foram investigados. O período da puberdade pode representar um cenário comum desta co-exposição, pois os indivíduos aumentam a sua exposição ambiental ao cádmio pela fumaça do cigarro, ativamente ou passivamente, associada à ingestão de bebidas energéticas, as quais contêm relativamente alta concentração de cafeína. A fase da puberdade é importante para o desenvolvimento e crescimento prostático, na qual fatores exógenos, que ajam como desreguladores endócrinos, podem favorecer o surgimento de lesões na fase adulta. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do cádmio e/ou da cafeína no processo de maturação e crescimento prostático na puberdade e suas consequências para a morfofisiologia da próstata adulta. Para isto, foram empregadas análises citoquímicas, ultra-estruturais ao microscópio eletrônico de transmissão, análises imunoistoquímicas, bioquímicas de zimografia e western bloting. A exposição ao cádmio aumentou o nível do cádmio bio-acumulado na próstata, fígado, rim, testículo e epididímo. A cafeína reduziu os níveis do cadmio em todos os órgãos analisados. Ambos os tratamentos provocaram atrofia epitelial no lobo prostático ventral bem como hiperplasia epitelial focal. Não houve alteração estromais da próstata. Nossos resultados sugerem que a exposição ao cádmio durante a puberdade até a fase adulta pode induzir um ambiente modificado desregulando a homeostasia glandular e portanto conduzir ás afecções. A cafeína aumenta os níveis plasmáticos de andrógenos e pode ter relação com o desenvolvimento de hiperplasia prostática, entretanto, quando co-administrada com o cádmio apresentou efeito protetor quanto á acumulação do cádmio nos órgãos, diminuindo assim seus efeitos adversos.

Palavras chaves: cádmio, cafeína, epitélio glandular, estroma

Abstract

The cadmium is an environmental and occupational contaminant and its adverse effects on men and animals prostate have been widely investigated, however, the most of this experimental use high doses. Besides, the contaminant cadmium exposure to other components, for example, caffeine, an alkaloid present on a wide variety of beverages and food consumed worldwide, have not been investigated yet. The puberty can represent a common scenario of this co-exposure, since the people increase their environmental exposure to cadmium by the cigarette smoke, actively or passively, associated with the ingestion of energetic beverages, which contains relatively high caffeine concentrations. The puberty is important to the prostate development, and exogenous factors, which act as endocrine disrupters, may to induce the appearance of lesions on adulthood. Thus, the objective of this study was to analyze the effects of cadmium and/or caffeine, on the prostate, during puberty and its morphological consequences on adult age prostate. For this, were used cytochemical analysis, ultrastructural analysis, immunohistochemical analysis, biochemical zymography and western blotting. The exposure to cadmium has increased the bioaccumulated cadmium level on the prostate, liver, kidney, testicle and epididymis. Caffeine has reduced the cadmium levels on all analyzed organs. Both treatments resulted on epithelial atrophy on ventral prostate lobe as well as focal epithelial hyperplasia. Stromal alterations on the prostate were not observed. Our results suggest that cadmium exposure during puberty age until adulthood can induce a changed environment, disruptor the glandular homeostasis, leading to disorders. The caffeine increase the androgen plasmatic levels and may be related to the prostatic hyperplasia development, however, when co-administrated with cadmium showed protective effect regarding the cadmium accumulation on organs, decreasing the adverse effects.

Keywords: cadmium, caffeine, epithelium gland, stroma

SUMÁRIO

Agradecimentos

Agradecimentos Especiais

Epígrafe

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução..... 18

1.1 A Próstata..... 19

1.2 O Cádmio..... 25

1.3 A cafeína..... 29

2. Justificativa..... 35

3. Objetivos..... 37

3.1 Objetivo Geral..... 38

3.2 Objetivos específicos..... 38

4. Resultados..... 39

Effects of cadmium and/or caffeine exposure from puberty to adulthood on rat prostate morphology and homeostasis..... 41

Análise das metaloproteinases de matriz e do colágeno na próstata de ratos expostos ao cádmio e/ou à cafeína 86

Caffeine reduces cadmiumaccumulation in the organism and enhances the leves of antioxidant protein expression in the epidymis 118

5.Conclusão *141*

6. Referências Bibliográficas (introdução) *143*

1. Introdução

1.1 A Próstata

A próstata funcionalmente é uma glândula exócrina acessória do aparelho reprodutor masculino que secreta, para a uretra durante a ejaculação, um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolisina, enzimas específicas e outros nutrientes. Esta secreção é essencial para a mobilidade e fertilidade dos espermatozóides, pois liquefaz o ejaculado e alcaliniza o canal vaginal (Aumüller e Seitz, 1990).

É um órgão andrógeno dependente e o seu crescimento, manutenção estrutural e funcional necessita de níveis constantes de andrógenos circulantes (Isaacs, 1984). Desde o seu desenvolvimento, na vida fetal, a próstata é hormonalmente controlada (Risbrigder et al., 2005). Em humanos o desenvolvimento da próstata ocorre durante o segundo e terceiro trimestres e está completo ao nascimento (Prins, 1993).

Em todas as espécies, inclusive nos humanos, a glândula prostática se desenvolve através de um processo altamente conservado, denominado "morfogênese de ramificação", onde pequenos brotos se projetam a partir do epitélio do seio urogenital. Depois do nascimento, ocorre alongamento dos brotos que posteriormente se bifurcam formando uma rede de ductos com o tamanho final e o formato da próstata adulta (Risbridger et al., 2005). Neste mesmo período, tem-se início o processo de luminização e a diferenciação funcional das células epiteliais luminais (Prins and Birch, 1995). Concomitantemente, as células mesenquimais prostáticas condensam-se ao redor dos brotos formando uma camada periductal de células musculares lisas e interductal de fibroblastos (Hayward et al., 1996). A próstata permanece rudimentar até a puberdade, fase em que ocorre considerável aumento da produção de andrógenos e o processo de desenvolvimento e maturação da glândula é completado (Risbridger et al., 2005; Schauer e Rowley, 2011).

No homem adulto a próstata é uma glândula compacta, pesa aproximadamente 30g e mede 4 x 3 cm. Localiza-se no compartimento subperitoneal, entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal; mais especificamente posterior à sínfise púbica, anterior ao reto e inferior à bexiga (Lee et al., 2011). É composta por elementos glandulares e estromais, e pode ser dividida em três regiões glandulares (zonas): zona periférica, central e de transição além de uma região não glandular, o estroma fibromuscular anterior (Figura 1) (Roy-Burman et al., 2004; Lee et al., 2011). Este estroma se estende anterior e lateralmente formando uma cápsula, que separa a próstata da gordura periprostática (Roy-Burman et al., 2004). As zonas diferem-se quanto a origem embriológica, características histológicas, funções e susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças (Lee et al., 2011). A zona central contém

as junções do ducto ejaculatório, representa 25% do volume total da próstata, origina-se do ducto de Wolffian e representa a região de menor incidência de adenocarcinomas, assim como ocorre com outras estruturas derivadas do ducto de Wolffian como, por exemplo, a vesícula seminal (Lee et al., 2011). A zona periférica origina-se do seio urogenital, representa aproximadamente 70% do volume total da próstata e é a região mais acometida pela maioria dos adenocarcinomas (Lee et al., 2011). A zona de transição também se origina do seio urogenital e representa apenas 5% do volume da próstata, no entanto, é a região exclusiva para o desencadeamento da hiperplasia prostática benigna (HPB) (McNeal, 1981).

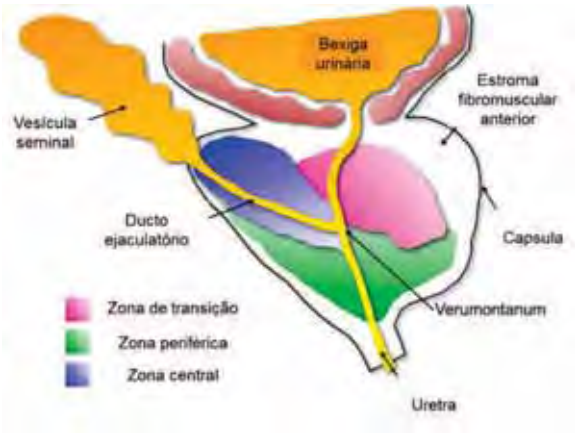


Figura 1: Figura representativa da próstata humana adulta, proposto por Schauer e Rowley (2011). Note a localização anatômica de cada região glandular, representadas por cores diferentes.

A testosterona (T) é o principal andrógeno (95%) circulante no organismo masculino, sendo produzida principalmente pelas células de Leydig no testículo. A zona reticular da glândula adrenal produz os andrógenos androstenediona e diidroepiandrosterona, contribuindo com 5% dos andrógenos circulantes (Aumüller e Seitz, 1990). Apesar da T ser o principal andrógeno circulante ela é convertida em um andrógeno mais potente na próstata, a diidrotestosterona (DHT), através da ação da enzima 5 α-redutase. A DHT tem uma afinidade 10 vezes maior ao receptor de andrógeno (AR) do que a testosterona (Deslypere et al., 1992). Embora cada um desses andrógenos se ligue ao mesmo receptor, cada um exerce efeitos biológicos distintos. No desenvolvimento prostático, por exemplo, quando a conversão da T em DHT é bloqueada, a testosterona é capaz de induzir a diferenciação do seio urogenital em próstata, mas o desenvolvimento e crescimento glandular são grandemente reduzidos (Marker et al., 2003).

As células estromais também são essenciais para a diferenciação e organização arquitetural do epitélio da próstata, pois na presença de andrógenos, mas ausência de células estromais, a organização epitelial e a função glandular são comprometidas (Hayward et al., 1992). Assim, a interação parácrina entre o epitélio e o estroma, mediada por andrógenos e outros fatores, tais como EGF, FGF, TGF-β, IGF, desempenham papel fundamental na regulação da atividade funcional e na manutenção da próstata (Lee et al., 1990; Marker et al., 2003). Um desequilíbrio na interação homeostática entre o epitélio e o estroma prostático pode iniciar e promover lesões na glândula (Sung e Chung, 2002). No período da senescência, a próstata é o órgão mais propenso de ser diagnosticada alguma doença entre os homens (Ho, 2004).

> *"Quando o cabelo torna-se escasso e acinzentado, quando partículas começam a ser depositadas nas túnicas das artérias e, quando uma película branca é formada na margem da córnea, neste mesmo período, a glândula prostática, geralmente, eu diria talvez invariavelmente, torna-se aumentada de tamanho". Benjamin Brodie, 1843 apud Timms e Hofkamp, 2011*

As alterações mais frequentes são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), que afetam os homens com idade avançada (Ho et al., 2004). Existe também a neoplasia intraepitelial prostática, considerada como lesão pré-maligna em humanos (Bostwick, 1995). O CaP é atualmente a neoplasia mais comum entre homens, representando 29 e 30 % de todos os novos casos de câncer nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (Siegel et al., 2012; INCA, 2012). Além disso, a próstata é um dos únicos órgãos internos que naturalmente não cessam o crescimento, mesmo depois dos períodos importantes do seu desenvolvimento (Risbridger et al., 2005). Os mecanismos específicos que regulam este aumento, bem como as alterações patológicas que levam ao fenótipo da HBP, são desconhecidos. A HPB é caracterizada por uma progressiva, mas descontínua, hiperplasia glandular tanto das células epiteliais quanto das estromais que levam à expansão da próstata, conduzindo aos sintomas clínicos (McNeal, 1990). Estudos sobre o perfil da expressão gênica de cada região da próstata revelou que há diferenças específicas entre as zonas periféricas (maior incidência para CaP) e de transição (região da HPB) dos produtos de genes que modulam a interação célula-célula e estroma-epitélio, o que sugere fortemente que a susceptibilidade para as doenças seja zona dependente (van der Heul-Nieuwenhuijsen et al., 2006).

Modelos experimentais são amplamente utilizados na pesquisa da fisiologia normal e patológica da próstata. Os roedores contituem o grupo de modelo *in vivo* mais utilizado nesta pesquisa (Roy-Burman et al., 2004), pois possuem similaridades embriológicas, anatômicas e histológicas que permitem a correlação. Estes modelos permitem explorar os mecanismos moleculares do desenvolvimento de doenças que podem desencadear o câncer de próstata, além de possibilitarem o desenvolvimento ou testes de novas drogas e novas terapias para serem usadas no tratamento e na prevenção do CaP.

Em ratos adultos a próstata é composta por um complexo sistema de ramificações de ductos, túbulos e alvéolos. Localiza-se caudal à bexiga e incompletamente ao redor da uretra (Roy-Burman et al., 2004). Diferentemente da próstata humana, é uma glândula multi lobular dividida em 4 lobos, classificados conforme a posição anatômica: lobo ventral, lobo dorsal, lobo lateral e lobo anterior (Figura 2) (Marker et al., 2003; Lee et al., 2011).

O lóbulo prostático ventral é composto por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, envolvidas por um estroma menos denso, em relação ao que envolve a próstata humana (Aümuller et al., 1990). Na próstata ventral do rato, cada lobo prostático consiste de oito conjuntos de ductos que se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples que se ramifica distalmente. Esse conjunto de ductos é dividido em três regiões morfológicas e funcionalmente distintas, denominadas distal, intermediária e proximal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee et al., 1990; Shabsigh et al., 1999). Na região distal, são encontradas células epiteliais colunares altas com atividade proliferativa, circundada por células musculares lisas que formam uma camada esparsa e descontínua, associada a um grande número de fibroblastos (Nemeth e Lee, 1996). Na região intermediária, as células epiteliais também são colunares altas, apresentando características de células secretoras, com baixa atividade proliferativa. Nessa região, a camada de células musculares lisas é delgada e contínua. Na região proximal, as células epiteliais são cúbicas e baixas, sendo frequentemente encontrado células apoptóticas, além das células musculares lisas que formam uma camada espessa. Tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os ductos, ocasionalmente intercalando-se com a camada de células musculares lisas (Lee et al., 1990). A próstata ventral não apresenta homologia com nenhuma das zonas da próstata humana (Roy-Burman et al., 2004).

O lobo prostático anterior, também conhecido como glândula de coagulação, tem forma tubular, aparência gelatinosa e é adjacente à vesícula seminal. As células epiteliais são colunares simples com núcleo central e podem apresentar padrão cribiforme por ser o lobo que apresenta maior número de dobras do epitélio, bem como o estroma mais desenvolvido ao

redor dos ácinos, sendo o mais notável dos 3 lobos. O produto de secreção do lobo anterior é abundante e homogêneo e é considerado homólogo á zona central da próstata humana (Roy-Burman et al., 2004).

A próstata dorsal origina-se da base da vesícula seminal, bilateralmente. O epitélio é cilíndrico simples com algumas dobras, o citoplasma das células secretoras é granular e claro. A próstata lateral apresenta epitélio cilíndrico simples mais baixo com núcleo basal, basofilia citoplasmática, menos dobras epiteliais e o estroma muito delgado. Estes lóbulos são frequentemente agrupados e recebem a terminologia de próstata dorsolateral. Juntos, são análogos à zona periférica da próstata humana (Roy-Burman et al., 2004).

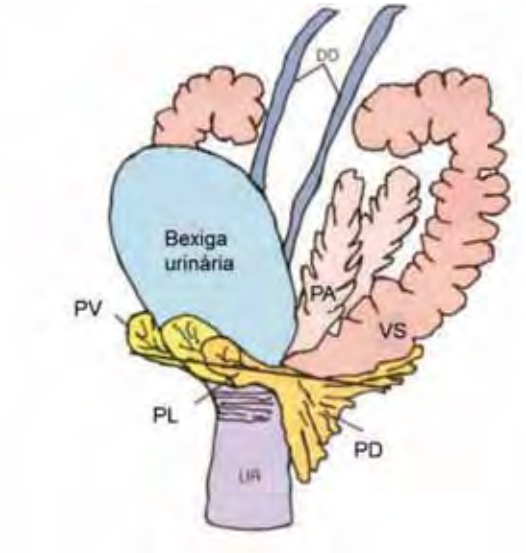


Figura 2: *Ilustração dos pares de lobos prostáticos de rato adulto (Shapell et al., 2004). Próstata anterior (PA), próstata ventral (PV), próstata dorsal (PD), próstata lateral (PL),vesícula seminal (VS), uretra (UR) e ducto deferente (DD).*

As diferenças e similaridades entre a morfologia prostática humana e de roedores devem ser levadas em consideração. Tanto na próstata humana como na dos roedores, o epitélio e ductos são constituídos por diferentes tipos celulares: as células epiteliais luminais, geralmente cilíndricas altas e diferenciadas com capacidade secretora; as células epiteliais basais, menores e achatadas ou arredondadas, com capacidade de proliferação; e um terceiro tipo celular, de localização intermediária, são as células neuroendócrinas (Hudson et al., 2001).

A célula epitelial luminal é o tipo mais frequente e é responsável pela secreção do antígeno prostático específico (PSA), da fosfatase ácida prostática (PAP) no homem (De Marzo et al., 1999) e pela prostateína e probasina no rato (Berry et al., 2008). Humanos possuem uma

camada contínua de células basais entre as células luminais e a membrana basal, enquanto os roedores possuem menos células basais que constituem uma camada descontínua ao redor da glândula (Marker et al., 2003). As células neuroendócrinas são escassas na próstata humana e raras nos roedores (Garabedian et al., 1998).

É possível distinguir estes diferentes tipos celulares do tecido prostático utilizando-se marcadores específicos. As células epiteliais luminais são andrógeno responsivas e podem ser distinguidas por marcação imunoistoquímica seletiva para o AR, para citoqueratinas (CK), tais como CK8 e CK18 (Hudson et al., 2001) ou antígenos de superfície, tais como os CD25, CD40 e CD147, dentre outros 25 sub-tipos (Liu e True, 2002) e para a atividade de enzimas específicas, como PAP, PSA (De Marzo et al., 1999; Custódio et al., 2004) ou prostateína e probasina (Berry et al., 2008). As células neuroendócrinas são identificadas pela expressão da cromogranina A, neurofisina, sinaptofisina e calcitonina e pela ausência do PSA e do AR (Signoretti et al., 2000; Berry et al., 2008). As células basais expressam a proteína nuclear p63 (Signoretti et al., 2000), podem ser identificadas pela expressão diferencial das citoqueratinas CK5 e CK14 (Prins et al., 1991; Hudson et al., 2001) e a expressão de AR nestas células basais é relativamente baixa comparada às células luminais (Leav et al., 1996). Há ainda uma possibilidade de se distinguir as células prostáticas em um quarto subtipo, as células intermediárias, que expressam, numa fase transitória, citoqueratinas comuns às células basais e luminais (Hudson et al., 2001).

Este epitélio é sustentado por um estroma composto por células musculares lisas, fibroblastos, mastócitos, macrófagos, nervos e vasos sanguíneos (Marker et al., 2003). Ao redor destas células estromais, existe uma complexa matriz extracelular composta principalmente de fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas (Vilamaior et al., 2000). A próstata humana tem um estroma fibromuscular denso, com abundância em células musculares lisas, fibroblastos e colágeno, que circundam os elementos glandulares (Nemeth e Lee, 1996; Mcneal, 1988). O estroma prostático dos roedores é menos fibromuscular e é grandemente preenchido por tecido conjuntivo frouxo (Roy-Burman et al., 2004).

A interação epitélio e estroma desempenha papel fundamental na regulação e manutenção da atividade funcional da próstata (Lee, 1990). Além das células musculares lisas e fibroblastos, outros tipos celulares também são encontrados no estroma, como mastócitos, células endoteliais e pericitos, juntamente com terminações nervosas. Cada célula desempenha um papel importante e específico na manutenção e função secretora da próstata.

As células musculares lisas representam 22% da área total da próstata humana (Shapiro et al., 1992), predominando ao redor dos ductos, onde se encontram em íntimo contato com a membrana basal das células epiteliais. Já na próstata ventral de ratos, ocupam cerca de 5% do volume total da glândula e cerca de 14% do estroma (Antonioli et al., 2004). As células musculares lisas têm papel preponderante nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999) e provavelmente também sobre as demais células estromais.

A função secretora do epitélio prostático é regulada por andrógenos, que participam na diferenciação e na manutenção do estado ativo da glândula (Cunha et al., 1985; Donjacour e Cunha, 1993). Nemeth e Lee (1996) sugerem que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a reação do epitélio mediada por fatores estromais. Além disso, tanto o seio urogenital quanto os brotos prostáticos não apresentam receptores androgênicos em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do seio urogenital e o estroma da próstata em formação apresentam grande quantidade desses receptores. Isso sugere que a ação de andrógenos na morfogênese prostática deva ser indireta, atuando via estroma, uma vez que parte significativa do crescimento epitelial (que é dependente do estímulo androgênico) ocorra na fase em que as células epiteliais não apresentam receptores para andrógenos (Donjacour e Cunha, 1993).

A próstata tem despertado grande interesse médico-científico, pois o aumento na expectativa de vida da população mundial refletiu diretamente no aumentado dos diagnósticos de lesões benignas, pré-malignas e malignas na próstata associadas ao envelhecimento. É extremamente relevante compreender as alterações hormonais, o crescimento prostático e suas alterações morfológicas para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas lesões. Sabe-se que, além do desequilíbrio na homeostasia entre o epitélio e o estroma prostático (Sung e Chung, 2002), outros fatores também podem iniciar e promover as lesões na próstata, como a desregulação dos hormônios androgênicos, susceptibilidade genética, estilo de vida, hábitos nutricionais (Hayward et al., 1997; Hsing et al., 2002; Ho et al., 2004) e exposição a contaminantes ambientais (Muir et al., 1991). Dentre os contaminantes ambientais com efeitos já conhecidos sobre a próstata destaca-se o cádmio.

1.2 O Cádmio

O cádmio é um elemento químico de símbolo Cd, cujo número atômico é 48 e massa atômica 112,4. Situado na Classificação Periódica dos Elementos no grupo 12 (2B), grupo dos elementos de transição e assim como o zinco e o mercúrio, apresenta subnível “d” completo,

diferindo dos demais elementos de transição. O cádmio apresenta características peculiares, tais como estado de oxidação 2+ (Cd^{+2}) e um pequeno raio iônico (0,95 Å), e estes dois fatores favorecem ligações com enzimas nos sistemas biológicos.

O cádmio (Cd) é classificado como um agente carcinogênico de categoria 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer (IARC, 1993), o que significa que existem evidências epidemiológicas suficientes para a ação carcinogênica em humanos e está em sétimo lugar no ranking da Lista das Substâncias mais perigosas divulgadas pela agência de saúde pública federal dos EUA, ATSDR (http://www.atsdr.cdc.gov/spl, ATSDR, 2011). Naturalmente, o Cd está presente na atmosfera durante as atividades vulcânicas, incêndios nas florestas ou carregado pelo vento sob a forma de partículas sólidas (Irwin et al., 1997). É usado na fabricação de baterias de veículos, de pedra-pome, pastas de limpeza, pisos, como componente em metalúrgicas, em pigmentos, acabamentos de peças, plásticos e vidros, além de compor os fertilizantes fosfatados (IARC, 1993).

A exposição a este metal se dá principalmente pelos contatos ocupacionais e ambientais. O cádmio foi responsável por um dos maiores desastres ecológico promovido por metais pesados. O desastre ocorreu em 1950 às margens do rio Jinzu (Japão), quando a água de irrigação das plantações de arroz foi contaminada por cádmio, oriundo de efluentes de uma mineração instalada próxima ao rio, e causou doença caracterizada por extrema dor, dano renal e fragilidade óssea. A doença, conhecida ficou conhecida como *Itai-Itai,* denominação da tradução da expressão *ouch-ouch* que significa “dor nos ossos”, é uma combinação de osteomalácia e osteoporose, e foi caracterizada pela observação de múltiplas fraturas espontâneas nos ossos (Inaba et al., 2005).

As exposições ocupacionais de maior risco são aquelas que afetam trabalhadores ligados diretamente com a produção e processamento do metal, fusão de metais e os que reciclam materiais eletrônicos (WHO, 1992). A principal exposição não ocupacional vem da fumaça do cigarro. Fumantes ativos e passivos estão expostos a concentrações de cádmio presente na fumaça do tabaco (Lewis et al., 1972; Jarup et al., 1998).

A meia vida do Cd no organismo é longa, sendo cerca de 15 anos nos humanos (Kjellström e Nordberg, 1978) e superior a 200 dias em ratos (Web, 1975). Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer ou continuar mesmo após a redução ou o encerramento da exposição ao metal. Além disso, é muito difícil de detectar algum sintoma se a exposição ao cádmio for crônica e em doses baixas, sinais de de intoxicação são detectados apenas quando ocorrem exposições agudas a altas doses (Ho, 2004).

O Cd pode se acumular em órgãos como o hipotálamo, hipófise e gônadas (Marquez et al., 1998). Por ter meia-vida longa, esta acumulação pode acarretar desordens do sistema endócrino, afetar a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (Antonio et al., 1999) e alterar o mecanismo de secreção de hormônios.

Geralmente, a toxicidade do cádmio ocorre depois de sua internalização para a célula. Após a exposição ao metal, ocorre a absorção intestinal, quando o metal se liga a proteínas ricas em cisteína como, por exemplo, a metalotioneína (MT), glutationa reduzida (GSH) e outras proteínas que tenham o grupo –SH (Waalkes et al., 2003). No sangue, complexado com estas proteínas, o Cd se liga à superfície das hemácias, onde é distribuído pelo corpo e se deposita nos órgãos, principalmente no fígado e no rim (Klassen et al., 2009). O fígado é o primeiro órgão a bioacumular Cd após exposições agudas e o rim é o órgão que mais acumula após exposições crônicas ao metal (Goering and Klaassen, 1983; Klassen et al., 2009). O cádmio não sofre nenhuma conversão metabólica direta como oxidação ou redução (WHO, 1992).

O cádmio pode substituir metais endógenos divalentes como o cálcio e o zinco (Johnson et al., 2003; Divekar et al., 2011) e pode utilizar as proteínas transportadoras destes metais para se acumular na célula (Leslie et al., 2002; He et al., 2009). Além disso, já foi evidenciado em camundongos *knockout* para os genes MT 1 e MT 2 que o cádmio foi bioacumulado no interior das células (Leslie et al., 2002).

Muito da toxicidade do cádmio se deve à capacidade de substituir o zinco em reações biológicas. O zinco é um metal essencial para a síntese de DNA, RNA e proteínas e para proceder à atividade enzimática de enzimas dependentes do metal (Cousins et al., 2003). O mecanismo celular e molecular implicado na carcinogenecidade do Cd ainda é desconhecido, no entanto sabe-se que ele é um fraco mutagênico direto, mas que afeta a estabilidade genômica por inibir o reparo do DNA, provocado por outros agentes ou que surgem espontaneamente (Bertin et al., 2006). Os prejuízos induzidos pelo cádmio podem evoluir para um carcinoma através da ativação de proto-oncogenes, inativação dos genes supressores de tumor, rompimento da adesão celular e inibição do reparo de DNA (Waalkes, 2003; Bertin et al., 2006), como demonstrado na Figura 3.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é indiretamente aumentada pelo cádmio que, mesmo não sendo um metal que participa de reações do tipo Fenton, diminui a atividade das enzimas antioxidantes (Waisberg et al., 2003; Ognjanović et al., 2010; Saïd et al., 2010). EROs ou radicais livres, como os ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^-), são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um

elétron não-pareado no orbital mais externo (Elsbach e Weiss, 1983). Essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares como proteínas, DNA e lipídios (Brown-Borg et al., 1999). EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar das etapas de iniciação, progressão e metástase das neoplasias (Eblin et al., 2008). As EROs geradas no ambiente intracelular podem produzir diretamente alterações no DNA, oxidando as bases pirimídicas, púricas e desoxirriboses, levando à mutagênese (Bayraktar et al., 2010), ativar protooncogenes ou desativar genes supressores de tumor (Badjatia et al., 2010), alterando assim a homeostase celular.

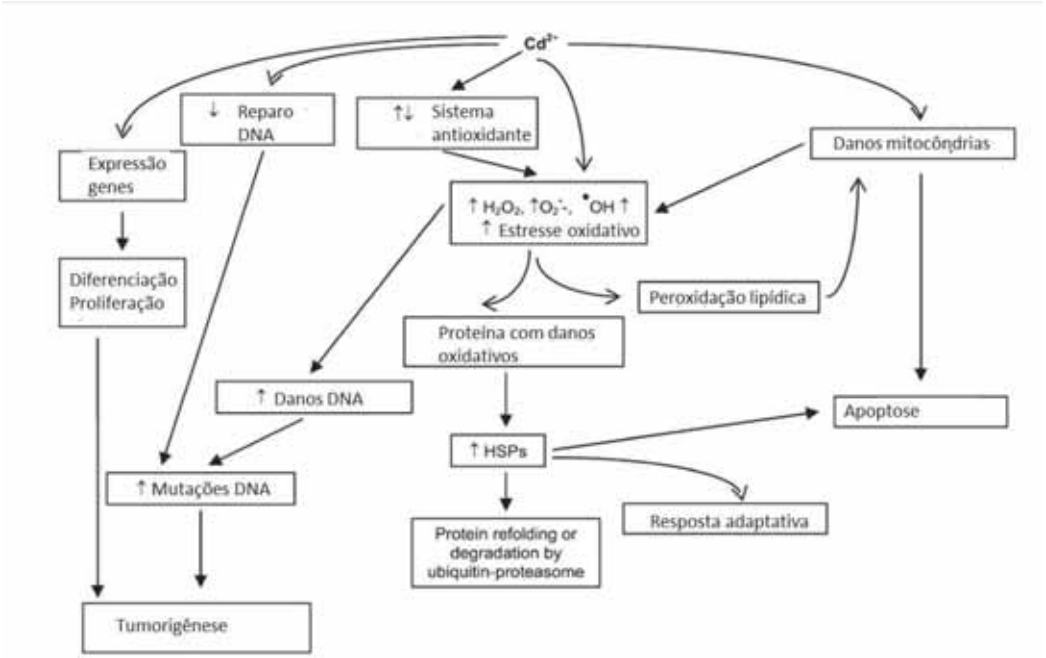


***Figura 3**: Esquema ilustrando as principais consequências biológicas que o cádmio pode promover (Bertin e Averbeck, 2006).*

As células possuem mecanismos de defesa antioxidante para controlar os níveis de EROs, que podem ser agrupados em não enzimáticos (vitaminas A, C, E e selênio) e enzimáticos. Dentre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2; catalase (CAT), que converte H_2O_2 em oxigênio molecular e água; e glutationa peroxidase (GSH-Px), que catalisa a degradação de H_2O_2 e hidroperóxidos (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Outras enzimas "secundárias", como a glutationa-S-transferase (GST) e a glutationa redutase (GR) atuam conjuntamente como a GSH-Px na desintoxicação de EROs (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). O desequilíbrio entre a formação e a remoção destes radicais livres no organismo

gera um estado pró-oxidante, o estresse oxidativo, que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares.

Estudos experimentais têm demonstrado que os órgãos do aparelho reprodutor masculino são vulneráveis aos efeitos prejudiciais do cádmio. A exposição ao metal provoca diminuição da concentração e motilidade espermática, aumento de espermatozóides mortos, redução do peso dos testículos e epidídimos (El-Demerdash et al., 2004), e estes efeitos se mantêm mesmo em ratos machos que foram expostos ao cádmio através da mãe durante a gestação e lactação (Banzato et al., 2012). A exposição ao metal altera a atividade das enzimas antioxidantes e aumenta os prejuízos lipídicos, confirmando ser um indutor de estresse oxidativo em diferentes órgãos como testículo, epidídimo, rim e próstata (Alvarez et al., 2004; Ognjanovic et al., 2010; Said et al., 2010). Em roedores o Cd reconhecidamente é capaz de induzir o desenvolvimento de alterações na próstata por diferentes vias de exposição. Uma única injeção subcutânea de 1, 2, ou 4 μmol/kg de Cd em ratos *Noble*, provocou alterações hiperplásicas proliferativas na próstata dorsolateral (Waalkes et al., 1999). Estudos mais recentes, utilizando a exposição ao metal por via oral pela água de beber (uma rota de grande importância nas exposições humanas) com concentrações de 60 ou 80 mg/L, encontraram lesões epiteliais pré-malignas na próstata ventral (Waalkes, 2000, Martín et al., 2001, Arriazu et al., 2006) e concentrações ainda mais baixas de 10 ou 15mg/L promoveram alterações prostáticas epiteliais (Lacorte et al., 2011; Alvarez et al., 2004). Outros estudos *in vitro*, demonstraram que o Cd aumenta a proliferação das células epiteliais da próstata (Bakshi et al., 2008) e é capaz de deixar as células transformadas resistentes à apoptose através da super expressão da molécula antiapoptótica Bcl-2 (Qu et al., 2007).

1.3 A cafeína

Fatores relacionados ao estilo de vida, particularmente à dieta, são considerados importantes contribuintes tanto para o desencadeamento quanto para a prevenção de doenças. Neste sentido, a cafeína que é consumida há muitos anos e é a substância farmacologicamente ativa mais freqüentemente ingerida no mundo, por todos os segmentos da população (IARC, 1991), necessita de estudos concernentes a sua segurança e às implicações da sua ingestão na saúde.

Os historiadores sugerem que a cafeína é consumida desde 2737 a.C. pelo imperador chinês Shen Nung que fervia água com as sementes de um arbusto desconhecido e tomava esta bebida que continha um aroma agradável (Arab e Blumberg, 2008). No final de 1800 as bebidas cafeinadas começaram a aparecer com a introdução de Dr. Pepper, seguido pela

Coca-Cola e em seguida Pepsi-Cola. O mercado de bebidas cafeinadas leves cresceu enormemente durante a segunda metade do século 20, devido ao aumento da popularidade entre as bebidas que contêm maiores quantidades de cafeína. A crescente popularidade inspirou a chegada de bebidas energéticas, que tornaram-se muito prevalentes. Hoje em dia, aproximadamente 80% da população mundial consome pelo menos um produto cafeinado ao longo do dia (Ogawa e Ueki, 2007). Acredita-se que tal popularidade esteja relacionada aos seus efeitos sobre o corpo e a mente. Ela tem propriedades que ajudam no estado de alerta do indivíduo e melhoram a agilidade mental (Nawrot et al., 2003).

A cafeína, um alcalóide identificado como 1,3,7-trimetilxantina, é uma substância branca, cristalina, inodora e de sabor amargo (IARC, 1991). As fontes naturais mais comuns de cafeína são: o café (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*), a semente de cacau (*Theobroma cacao*), a semente de cola (*Cola acuminate*), o fruto de guaraná (*Paullinia cupana*) e os chás (*Ilex paraguariensis*). Esse composto também é adicionado a medicamentos analgésicos e medicamentos utilizados para estimular a capacidade mental. Não há diferenças na composição química entre a cafeína sintética e a natural. A quantidade de cafeína nos alimentos varia dependendo do tamanho da porção, do tipo do produto e do método de preparo (Tabela 1). Além disso, em relação ao café, uma série de fatores como a variedade da planta, método de cultivo, condições de crescimento, aspectos genéticos e sazonais também podem influenciar na quantidade de cafeína (Camargo e Toledo, 1998).

Produto	Porção	Cafeína (mg)
Café expresso	60 mL	40 – 72
Café coado Pilão®	60 mL	25 - 50
Café solúvel 3 Corações®	60 mL	36 – 46
Coca-Cola®	355 mL	34
Coca-Cola light®	355 mL	46
Pepsi-Cola®	355 mL	38
Chá preto	150 mL	20
Chocolate	100 g	66
Energético Red Bull®	240 mL	80
Neosaldina®	1 comprimido	30
Dorflex®	1 comprimido	50

Tabela 1*: Quantidade de cafeína em mg, de acordo com o descrito no rótulo dos produtos, bula de medicamentos ou informações obtidas através do serviço de atendimento ao cliente.*

Bebidas com cafeína são consumidas frequentemente por diferentes segmentos da sociedade incluindo crianças, adolescentes e adultos de ambos os sexos, no entanto, dentro destes segmentos a quantidade da ingestão diária varia, bem como os tipos de produtos com cafeína. Foi proposto um limite de segurança para a ingestão de cafeína total por dia, onde o limite máximo é de 400 a 450 mg para adultos saudáveis, 300 mg para mulheres gestantes e de 45 mg para crianças (Nawrot et al., 2003).

Após a sua ingestão, a cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo que nos humanos, a absorção chega próximo dos 99% 45 minutos após sua ingestão (Blanchard e Sawers, 1983) e nos animais a absorção também é completa. Rapidamente é dispersada pelo corpo e facilmente passa pela membrana celular, barreira hemato-encefálica e placenta (Temple, 2009). Estudos demonstram que os efeitos farmacológicos da cafeína são passageiros. Ela não se acumula no organismo e é normalmente excretada dentro de algumas horas após o consumo. Foi demonstrado que por via oral, doses menores do que 10 mg/kg, a cafeína alcança o pico plasmático entre 2,5 a 4,5 horas em adultos saudáveis, 0,7 a 1,2 horas em camundongos e ratos e 3,0 a 5,0 horas em macacos (Arnaud, 1987).

A meia vida da cafeína em adultos pode sofrer alterações em fumantes, pois o cigarro aumenta o metabolismo da cafeína reduzindo este período de 30 a 50% (Joeres et al., 1988). Já em pessoas que apresentam doenças hepáticas ou em mulheres gestantes ou ainda que fazem uso de contraceptivo oral, a meia vida da cafeína dobra, pois há um atraso em sua metabolização (Chou, 1992). A cafeína é metabolizada no fígado, onde sofre demetilação resultando em paraxantina, teobromina e teofilina como produto metabólico. Estes metabólitos passarão por demetilação, oxidação e formação de uracil. A principal diferença entre a metabolização da cafeína entre os roedores e humanos é que nos ratos, 40% dos metabólitos da cafeína são derivados trimetil enquanto estes, não excedem 6% nos humanos. Do mesmo modo, em humanos a demetilação de trimetil conduz a formação de paraxantina que representa 72-80% do metabolismo da cafeína (Arnaud, 1987).

Uma vez absorvida, a cafeína exerce uma variedade de ações fisiológicas no organismo. Sabe-se que a cafeína atua como antagonista do receptor de adenosina, que basicamente é um inibidor geral da atividade neuronal (Fisone et al., 2004). Ao atingir o córtex cerebral, a cafeína como um antagonista do receptor de adenosina promove a estimulação psicomotora, diminui a fadiga e promove alterações comportamentais, tais como vigilância, atenção, humor e excitação (Nawrot et al., 2003; Fisone et al., 2004).

Ela exerce também ação indireta estimulando a liberação de neurotransmissores e de alguns hormônios tais como a adrenalina (Nawrot et al., 2003). Nestes casos, a ação da

cafeína ocorre pelo bloqueio da enzima fosfodiesterase, responsável pelo metabolismo intracelular do AMPc, ou seja, há aumento da concentração do AMPc intracelular (Mandel, 2002). Assim, os efeitos da adrenalina persistem por mais tempo e, com o aumento da atividade neuronal, a hipófise age liberando grandes quantidades de hormônios que levam à liberação de adrenalina pelas supra-renais.

A adrenalina circulante pode estimular a secreção de enzima lipase, uma lipoproteína que mobiliza os depósitos de gordura para utilizá-la como fonte de energia no lugar do glicogênio muscular. Esse efeito de poupar o glicogênio torna o corpo mais resistente à fadiga (Nawrot et al., 2003). Por esta razão, provavelmente, a cafeína é tão utilizada pelos atletas como substância ergogênica.

Com o consumo regular há o desenvolvimento de tolerância para os seus efeitos. Por exemplo, uma pessoa que consome cafeína regularmente pode beber vários copos de café em poucas horas e notar mínimos efeitos, enquanto outra pessoa que não é consumidora regular de café pode sentir os efeitos estimulantes após ingerir uma ou duas porções.

Os efeitos da cafeína sobre os sistemas do organismo humano têm sido extensivamente investigados, porém muitos dos dados destas pesquisas ainda são contraditórios.

A ingestão moderada de cafeína com dose de até 400 mg por dia (equivalente a 5,5 mg/kg de peso corpóreo em uma pessoa com 70 kg) não está associada com toxicidade ou efeitos adversos como danos cardiovasculares, prejuízos na massa óssea, no balanço de cálcio, mudanças de comportamento no adulto, aumento de incidência de câncer ou efeitos na fertilidade masculina (Nawrot et al., 2003). Entretanto, os dados também mostram que mulheres em idade reprodutiva e crianças são subgrupos de risco, que requerem alerta específico para controlar o seu consumo diário. No caso das crianças, com o avanço da idade os níveis plasmáticos vão se tornando normais (Nawrot et al., 2003).

Há autores que defendem o consumo da cafeína para o tratamento e prevenção de algumas doenças, tais como o mal de Parkinson, a diabetes mellitus do tipo 2 e a cirrose hepática (Higdon e Frei , 2006). Na diabetes mellitus do tipo 2, o café quando ingerido em doses moderadas parece melhorar o controle da glicose, como demonstrado em pesquisa com pacientes diabéticos (Ranhein e Halvorsen, 2005). O mecanismo foi atribuído a ação da cafeína como possível inibidor da enzima glucose-6-fosfatase, que controla o nível de glicose no sangue. Entretanto, exposições crônicas com altas doses de cafeína relaciona-se com o aumento da sensitividade à insulina (Ranhein e Halvorsen, 2005).

Um estudo epidemiológico demonstrou que o risco de desenvolvimento de câncer no pulmão aumentou entre homens fumantes que consumiam café e observaram ainda relação positiva proporcional à quantidade de copos de café ingeridos (Baker et al., 2005). Existem muitos trabalhos que defendem os efeitos benéficos da cafeína sobre o fígado. Estudos epidemiológicos relacionam a menor incidência de doenças crônicas no fígado com a ingestão de café e redução no risco de desenvolver hepatocarcinoma (Kurozawa et al., 2005; Shimazu et al., 2005) e estudos experimentais em ratos, demonstraram que a cafeína melhorou os efeitos prejudiciais ao fígado induzidos pela tioacetamida (Furtado et al., 2012).

Estudos *in vitro* revelam que a cafeína possui efeito protetor às células de carcinoma por inibir a proliferação celular por um mecanismo independente de apoptose celular, onde quinases responsáveis por sinalizar a parada do ciclo celular são ativadas (Okano et al., 2008); e ativação da proteína p53 que induz o processo de morte celular programada (Ito et al., 2003; He et al., 2005; Nomura et al., 2005).

Outro potencial que está sendo bastante investigado refere-se ao efeito antioxidante da cafeína e seus metabólitos. Estudos experimentais tem demonstrado que a cafeína aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e diminui os prejuízos lipídicos induzidos por agentes oxidantes em diferentes órgãos como fígado, rim, cristalino e cérebro, demonstrando efeitos benéficos contra o estresse oxidativo (Inkielewicz-Stepniak e Czarnowski, 2010; Varma e Hegde, 2010; Abreu et al., 2011).

A cafeína também parece atuar como um desregulador endócrino. Administração diária de cafeína em coelhos adultos por quatro semanas causou desequilíbrio nos hormônios esteróides e naqueles secretados pela hipófise anterior (Ezzat e El-Gohary, 1994), sugerindo desequilíbrio homeostásico. A ingestão de cafeína também causou aumento nos níveis de corticosterona e testosterona (Patz et al., 2006; Celec et al., 2010). Ratos que receberam cafeína, teobromina e teofilina na sua dieta alimentar demonstraram atrofia nos testículos, além de várias mudanças atróficas nos órgãos sexuais acessórios, incluindo a próstata. Dentre esses 3 compostos, a cafeína revelou maior toxicidade. Análises citogenéticas destes testículos demonstraram redução no número de células mitóticas e aumento no nível de testosterona, que foi correlacionado com a aparência hiperplásica das células intersticiais nos testículos atrofiados (Weinberger et al., 1978). Gans (1984) confirmou estes dados e também observou degeneração vacuolar nas células da linhagem espermatogênica.

A ingestão de alimentos contendo cafeína estimula a via simpática e a disfunção simpática parece ter efeito na aceleração de mitoses sobre a próstata, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HPB (Gass, 2002). Estudo de caso-controle com homens de 65 a

80 anos de idade realizado na Suíça, intitulado "*Sua próstata*", relacionou sintomas de HPB com o uso de álcool, cigarro e consumo de café. Foi encontrada relação positiva proporcionalmente direta entre consumo de café e o aparecimento de HPB (Gass, 2002). Apesar de estudos anteriores já sugeriarem esta correlação (Glynn et al., 1985; Morrisson, 1990). alguns estudos caso-controle não encontraram nenhuma relação entre o consumo de café e o risco de HPB (Signorello, 1999). Em contraste, um estudo de caso-controle encontrou diminuição do risco de desenvolver HPB em homens que tinham o hábito de tomar café (Morrison, 1992).

Em relação ao risco do câncer de próstata, há trabalhos que sugerem que correlação positiva entre o consumo regular do café e redução do risco do câncer de prótata agressivo (Shafique et al., 2012). Outros estudos que também encontraram esta correlação não atribuem este efeito benéfico do café à cafeína (Wilson et al., 2011).

Os dados ainda são conflitantes e pouco se conhece sobre a ingestão de alimentos contendo cafeína como fator de risco ou protetor para afecções prostáticas. Desta forma, mais estudos são necessários para o entendimento dos efeitos da cafeína sobre os diferentes sistemas do organismo, principalmente nas condições de doses crônicas que correspondem melhor à realidade dos hábitos das populações humanas.

2. Justificativa

Os indivíduos estão expostos a vários agentes químicos simultaneamente, os quais podem ser do tipo contaminante ambiental ou alimentar, fármacos, drogas lícitas e de abuso, etc., advindos das mais variadas fontes. Muitos destes agentes são capazes de, além das ações próprias, também interagir com outros compostos, provocando efeitos diversos e até potencializados, diferentemente dos que provocariam ao agir isoladamente no organismo. O cádmio tem se mostrado tóxico para vários tecidos e órgãos do organismo, podendo ter participação importante na carcinogênese prostática. A cafeína tem sido motivo de estudo entre os profissionais da saúde devido ao seu consumo em larga escala por vários segmentos da população, por exercer importantes efeitos farmacológicos sobre o organismo e por ser consumida livremente sem nenhuma orientação ou preocupação de risco.

Há indícios de que ambas as substâncias podem atuar como desregulador endócrino. Entretanto não há na literatura dados conclusivos sobre os seus efeitos individuais sobre o sistema reprodutor masculino e nenhum dado sobre seus efeitos concomitantes.

O fato de uma grande maioria da população humana estar exposta simultaneamente ao cádmio e à cafeína, por exemplo, o hábito de fumar está geralmente associado com o alto consumo de café ou jovens que convivem em ambientes com fumaça de cigarros e fazem uso de drinks energéticos, a investigação dos efeitos e consequências da interação entre esses dois agentes sobre a glândula prostática, bem como sobre os outros órgãos do aparelho reprodutor masculino, é de extrema importância.

Desta maneira, experimentalmente, investigamos os efeitos da baixa dose de cádmio e cafeína isolados e combinados, da fase pré-púbere à fase adulta, sobre a glândula prostática e epidídimo em rato *Wistar*. Este delineamento experimental foi dividido em 6 grupos e objetivou investigar: 1) o efeito da exposição ao cádmio por 20 semanas (grupo exposto ao cádmio por 20 semanas); 2) avaliar se as alterações induzidas pelo cádmio por 10 semanas persistiriam até o final do experimento (grupo exposto ao cádmio por 10 semanas, onde houve a interrupção da exposição e receberam água até o final do experimento); 3) avaliar o efeito da ingestão de dose moderada de cafeína (grupo que receberam cafeína por 20 semanas); 4) avaliar os efeitos da exposição simultânea ao cádmio e à cafeína (grupo co-exposto); 5) avaliar se a cafeína, após 10 semanas de exposição ao cádmio potencializaria ou reverteria os efeitos induzidos pelo cádmio (grupo exposto ao cádmio por 10 semanas, onde houve a interrupção da exposição e receberam cafeína até o final do experimento).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos isolados e combinados do cádmio e da cafeína, administrados via oral no início da puberdade, sobre os lobos prostáticos ventral e dorsal de ratos *Wistar* adultos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar alterações morfológicas em nível estrutural e ultra-estrutural no epitélio glandular e no estroma;

- Avaliar as alterações nos índices de proliferação e morte das células epiteliais;

- Avaliar e quantificar a atividade gelatinolítica das metaloproteinases-2 e -9 presentes no estroma;

- Avaliar e quantificar a expressão proteica e a localização tecidual da metalotioneína;

- Avaliar e quantificar a expressão proteica do receptor de andrógeno;

- Avaliar qualitativa e quantitativamente a incidência de lesões nos lobos prostáticos ventral e dorsal, tais como: hiperplasia, prostatites crônicas ou agudas, neoplasias intra-epitelial e adenocarcinomas.

4. Resultados

Os resultados obtidos nesta tese estão apresentados nos 3 artigos científicos a seguir:

1: "Effects of cadmium and/or caffeine exposure from puberty to adulthood on rat prostate morphology and homeostasis".

2: "Análise das metaloproteinases de matriz e do colágeno na próstata de ratos expostos ao cádmio e/ou à cafeína".

3: "Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis". Artigo aceito para publicação no periódico Reproductive Toxicology.

Effects of cadmium and/or caffeine exposure from puberty to adulthood on rat prostate morphology and homeostasis

Livia M. Lacorte[1], Jaqueline C. Rinaldi[1], Andrei Moroz[1,], Flavia K. Delella[1], Sérgio L. Felisbino[1]

[1]Department of Morphology, Institute of Biosciences – Univ Estadual Paulista.

This work was supported by FAPESP (grant 09/52747-7) and CAPES do Brazil is gratefully acknowledged. L.M.L. was recipient of a FAPESP fellowship (09/50850-5).

*Corresponding author: Sérgio L. Felisbino, Ph.D. Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brasil. Telephone/fax: +55 14 3880 0474 E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

Abstract

Endocrine disrupting chemicals have become a major public health issue and are involved with the emergence of various diseases in adulthood and senile, especially neoplasms of the male and female reproductive system. In this study, we investigated the rat ventral and dorsal prostates morphology from animals treated by caffeine (20 mg/L) and cadmium (15 mg/L) diluted in drinking water. The animals were treated from 5 weeks-old until 25 weeks-old, ventral and dorsolateral prostates were dissected, weighted, submitted to morphological, morphometrical, immunohistochemical, and biochemical analysis regarding cellular proliferation, apoptosis, androgen receptor (AR) and metallothionein (MT) tissue expression. The testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) concentrations were measured in the plasma and cadmium and zinc concentrations were measured in the prostatic lobes. Caffeine co-exposure reduced the cadmium concentration in the prostatic lobes and kidney. Epithelial atrophy and hyperplasia were the main alterations observed in the ventral lobe in all experimental groups. Cadmium did not alter T and DHT plasma levels, while caffeine alone increased these levels. Cadmium reduced the zinc concentration on the prostate. In conclusion, our results suggest the exposure of cadmium from the puberty to adulthood leads to a modified microenvironment in the prostate, that can be associated with adverse effects on the prostate gland. The caffeine intake increases the androgenic levels in the prostate gland and can be related with the development of prostatic hyperplasia, however, in the co-exposure scenario, caffeine showed a protective role reducing the levels of intraprostatic cadmium.

Keywords: atrophy, hyperplasia, cadmium, caffeine, puberty.

Introduction

The prostate is the most organ-prone susceptible to develop diseases in the aging men. Benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic adenocarcinoma, and prostatitis are common disorders found in the aged human gland (Ho, 2004; Timms and Hofkamp, 2011). The etiologies and pathological conditions of these prostatic diseases are poorly understood, but changes in endogenous hormonal milieu play an important role in the pathogenesis of the BPH and prostate cancer (Ho, 2004).

It is well established that prostate is an androgen dependent and sensitive organ that need constant levels of androgens in the gestation and puberty periods for the normal development, both in human (Andriolle et al., 2004; Risbridger et al., 2005) as in experimental model animals (Vilamaior et al., 2005). It is important to emphasize that endocrine disruptors can act in the prostate growth during both these critical periods and may influence the onset of prostate disease at aging (Risbridger et al., 2005; Prins, 2008). Endocrine disrupting chemicals (EDCs), including pesticides and industrial chemicals, are a class of environmental toxicants that interfere with endocrine signaling pathways. Animal models exposed to EDCs during organogenesis had an increased incidence of malformations of the male genital tract, besides developing neoplasms (Soto and Sonnenschein, 2010).

The heavy metal cadmium is known as the ligand to estrogen and androgen receptor and function as an androgenic and estrogenic agonist, respectively (Martin et al., 2002; Stoica et al., 2000; Byrne et al. 2009). Cadmium has shown to promote diverse toxicity effects in different organs of humans and animals, and is classified as a human carcinogen by the World Health Organization´s International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). People are exposed to cadmium during occupational activities, through cigarette smoking, consumption of food, and contaminated water (Satarug et al., 2011). Experimental studies using *in vitro* and *in vivo* models of cadmium administration by several routes have shown that this

exposure can produce deep alterations in the prostate gland (Waalkes et al. 1999; Martín et al., 2001; Achanzar et al., 2001; Bakshi et al., 2008; Qu et al., 2007; Arriazu et al., 2006). The severity of prostate alterations depends on timing, extension, dosage, and route of cadmium exposure (Waalkes et al., 1999; Lacorte et al., 2011). Furthermore, recent co-exposure studies have attracted special attention given their similarity to the real conditions of the organisms. In this sense, co-exposure studies allow to analyze antagonist or synergistic effects from EDC mixtures on the prostate structure and homeostasis.

Caffeine is one of the most widely consumed active food ingredient throughout the world. It is found in common beverages including coffee, tea, in products containing cocoa or chocolate, and in a variety of medications and dietary supplements (Nawrot et al., 2003). Besides, smokers have the habit to drink coffee while they smoke. Experimental studies have shown that caffeine can also act as an EDC by altering plasma testosterone levels (Weinberger et al., 1978; Pollard, 1988; Ezzat and Gohary, 1994; Sarobo et al., 2012). Epidemiological studies remain doubtful. Some studies have shown direct positive correlation between the appearance of BPH and the consumption of foods containing caffeine (coffee and tea) for men in adulthood (Glynn et al., 1985; Gass, 2002). However, other studies found no or negative correlation between coffee consumption and the risk of developing BPH (Signorello, 1999; Morrisson, 1992). Regarding the risk of prostate cancer, there are studies that suggest a positive correlation between regular consumption of coffee and a reduced risk of aggressive prostate cancer (Shafique et al., 2012),while other studies have found that this correlation does not attribute this beneficial effect of coffee to caffeine (Wilson et al., 2011).

In this sense, the effect of co-exposure to cadmium and caffeine on the prostate gland remains to be elucidated. Thus, this study was performed to determine the effects of long-term low-dose of cadmium and moderate dose of caffeine intake on the structure and ultrastructure of the rat ventral and dorsal prostatic lobes.

Material and methods

Animals and experimental design

Four-week-old male Wistar rats were housed in cages (3 rats/cage) under controlled temperature (20-22°C) and lighting conditions. Animals were obtained from the Central Stock breeder of São Paulo State University (UNESP; Botucatu, SP, Brazil). The animals were fed a standard pellet diet and water ad libitum. Experimental protocols met the "Guidelines of Animal Experimentation" approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation (Protocol number 139/2009-CEEA) at the Institute of Biosciences, UNESP. After 7 days of acclimatization, the animals were randomized into six experimental groups, each consisting of 12 animals: control group (Ct) that received tap water; caffeine group (Caff) that received 20 mg/L caffeine (Sigma™); cadmium group (Cd) that received 15 ppm of cadmium (administered as CdCl2·2.5H2O; Sigma™) by 20 weeks; group treated for 10 weeks of 15 ppm cadmium followed by tap water (Cd/Wt); group treated for 10 weeks of 15 ppm cadmium followed by 10 weeks of caffeine treatment 20 mg/L (Cd/Caff); and group treated by 15 ppm of cadmium plus 20 mg/L of caffeine simultaneously in drinking water (Cd+Caff). The cadmium dose was chosen based on literature data, which mimics environmental exposure (Alavarez et al., 2004; Lacorte et al., 2011). The caffeine dose was chosen to simulate a moderate human caffeine consumption of 1.5-5.0 mg/kg/day (Nawrot et al., 2003). All animals were observed daily for clinical signs of intoxication. The rats were weighed weekly, and their food and water consumption was measured daily.

At the end of 20 weeks of exposure, the animals were anesthetized at a dose of 0.1 mL/100g weight body with ketamine hydrochloride at 50 mg/mL and xylazine hydrochloride at 20 mg/mL (solution 2:1 respectively). Blood samples were collected, half of the animals (n=6), by cardiac puncture in heparinized tubes, and plasma was separated by centrifugation at 2000 rpm for 20 min at 4ºC. Tubes without anticoagulant were used to collect whole blood.

Samples of plasma were frozen at -20°C until hormone analysis while whole blood samples were immediately processed for cadmium concentration. The ventral (VP) and dorsal (DP) prostates were removed and weighed. The left lobules were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the analyses to quantify Cd tissue concentration and the right lobules were used to obtain protein extracts. The others 6 animals of each experimental group were submitted to fixation by perfusion using 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS). The VP and DP were removed, weighed, fragmented, and processed for transmission electron microscopy (TEM) or for conventional photonic microscopy.

Histopathological analysis

The VP and DLP were post fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 24h. Fixed samples were washed in PBS for 24h, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in glycol metacrylate resin (Leica historesin embedding kit Image ProPlus, Germany) or were cleared in xylene and embedded in paraplast (Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA). Histological resin sections (3μm) were subjected to hematoxylin-eosin (H&E) staining for morphological and morphometric analysis. Paraplast sections (5μm) also were subjected to H&E staining e mainly to immunohistochemistry analysis. The histopathological classification of prostate lesions observed in the experimental animals was accomplished according to the Bar Harbor Classification System for the mouse prostate, developed by the National Cancer Institute's Mouse Models of the Human Cancers Consortium, Prostate Steering Committee (Shappell et al., 2004).

Morphometric and stereological analysis

Resin sections stained with H&E were subjected to the morphometric and stereological analysis using a Leica™ DMLB 80 microscope connected to a Leica™

DC300FX camera. The digitalized images, obtained by using the image analyzer Leica Q-win software Version 3 for Windows, were used for analysis.

The mean of epithelial height of the VP and DP was determined from a total of 1,200 measurements: at 10 points in 20 random microscopic fields per prostatic lobe (40X magnification). Stereological analyses were carried out using Weibel's (1966) multipurpose graticulate with 130 points and 60 test lines, to compare the volume fraction of each prostatic tissue component (epithelium, lumen and stroma). Random measurements were performed in 10 different fields (20X magnification) and from six different individual prostatic lobe sections. The volume fraction values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. To avoid erroneous interpretations all the measurements were performed in the intermediate regions of the prostates lobe, which represent the major portion of the prostatic ductal system in rats (Nemeth and Lee, 1996) and were performed in a blind manner.

Transmission electron microscopy

Fragments of prostatic tissue of six animals from each experimental group were post-fixed by immersion in 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer for 2 hr (Cotta-Pereira et al. 1976), washed with the same buffer and post fixed with 1% osmium tetroxide for 2 h. After wash, they were dehydrated in graded acetone series and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections were obtained with a diamond knife and contrasted with 2% uranil acetate for 30 min, followed by 2% lead citrate in 1N sodium hydroxide solution for 10 min. The samples were observed and evaluated using a Phillips transmission electron microscope, operating at 80 kV.

Immunohistochemistry

In all the groups, at least six selected slides of VP and DP from each experimental group were subject to detect androgen receptor (AR), proliferation cell (Ki-67), prostatein and metallothionein (MT) immunoreactivity. Deparaffinized and rehydrated tissue sections were pretreated by heat in citrate buffer, using a pressure cooker, by 35 min, and treated for 10 min with hydrogen peroxide 3.0% in PBS at 7.4 pH. The prostate sections were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature. These sections were then incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber with a monoclonal antibody anti-Ki-67 (Biomeda, Foster City, CA, USA) diluted at 1:50, with a polyclonal antibody against androgen receptor (AR) (SC-816; Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) diluted at1:100, with a polyclonal antibody against prostatein (Novocastra, Newcastle, UK) diluted at 1:200, and with a polyclonal antibody anti-metallothionein (MT) (ABCAM) diluted at 1:100. All primary antibodies were diluted in PBS at 7.4pH containing 1% bovine serum albumin (BSA). The respective secondary antibodies (complexed to HRP) were employed, diluted at 1:200 in PBS containing 1% BSA and incubated for 60 min at room temperature. Chromogen color was developed by incubation with 3.3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, USA). Slides were then counterstained with hematoxylin.

In situ cell apoptosis detection by TUNEL assay

The apoptosis detection was based on the assay of Terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) of fragmented DNA. This was essentially performed using the kit FragEL™ DNA (Calbiochem®, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's directions. Briefly, paraplast sections were deparaffinized, rehydrated and immersed in TBS buffer. The slides were treated with Proteinse K (1:100 in 10 mMTris-HClpH 8.0) for tissue permeabilization, at room temperature for 20 min. Endogenous peroxidase was blocked for 5 min in 3% H_2O_2 in

methanol. The sections were incubated in a reaction mixture containing TdT enzyme for 90 min at 37 ºC. The detection of TUNEL positive cells was performed with DAB for 5 min. The specimens were counterstained with hematoxylin and mounted in Permount.

The epithelial cells were counted in 10 random microscopic fields (X40 magnification) of the 6 VP and 6 DP sections of 6 different animals of each experimental group. The TUNEL index was expressed as a percentage of total cells counted (number of TUNEL positive cells x 100/total cell number). Image acquisition and quantitative measurements were performed by an investigator blind to the recognition the experimental group.

Ki-67 detection and proliferation index

The proliferation index was determined by counting the number of Ki-67 positive epithelial cells in 10 microscopic fields (x40 magnification) visualized from 6 VP and 6 DP sections of 6 different animals of each experimental group. The results are expressed as a percentage of Ki-67 positive cells (number of labelled nuclei x 100/total cell number). Approximately 6,000 cells were counted per experimental group. Image acquisition and quantitative measurements were performed by an investigator who had no prior knowledge of animal identity or experimental group.

Western Blot Analysis

Frozen samples from VP and DP from each experimental group were mechanically homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc.; Lucerne, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, plus 0.25% Triton-X 100 for 30 sec at 4°C and centrifuged. The protein was extracted from the supernatant and quantified using the Bradford assay (Bradford, 1976). A protein sample (70 µg) was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel under reducing

conditions. After electrophoresis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Sigma Co. Saint Louis, MO, USA). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 2 h. The blot was incubated at 4°C overnight with mouse primary antibodies against proliferation cellular nuclear antigen (PCNA) (Novocastra, Newcastle, UK) or with rabbit polyclonal antibodies against AR and MT (sc11377, Santa Cruz Biotechnology™) for all MT isoforms; and goat polyclonal anti-beta actin (Santa Cruz Biotechnology™) for VP or GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology™) for DP; all antibodies were diluted in 1% BSA to the manufacturer's recommended concentration (1:500, 1:750, 1:1000, 1:200 and 1:1000, respectively). The membranes were washed in TBS-T and incubated for 2 h at room temperature with respective peroxidase-conjugated secondary antibodies. After washing in TBS-T, the membranes were visualized using a chemiluminescence substrate kit (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent; Thermo Scientific™) according to the manufacturer's instructions, and the ECL signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare™). The integrated optical densities (IODs) of the targeted protein bands were measured using Image J, which was downloaded from the NIH website (http://rsb.info.nih.gov.ij/), to compare the protein levels. AR, PCNA and MT expression were normalized to the β-actin values for VP and to the GAPDH values for DP. The normalized data are expressed as the means ± SD.

Hormone Assay

Plasma testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) concentrations were determined using chemiluminescence (VITROS ECi-Johnson and Johnson Ultra-Sensitive Chemiluminescence analysis). The sensitivity of this assay was 0.02 ng/mL for T and DHT.

Measurement of the cadmium concentration

Samples of kidney and ventral and dorsolateral prostatic lobes were dried at 105 ºC for 24 h and weighted. Dried samples and 4 mL of blood were digested with concentrated nitric acid (Merck, 65%)at 120 °C in a microwave (PROVECTO™, Model DGT 100 Plus: 5 min at 450 W, 5 min at 600 W, 6 min at 750 W, 5 min at 400 W, and 5 min at 0 W). The cadmium and zinc concentration was determined using the flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) technique (spectrophotometer GBC™, Model 932 AA). Analyses were optimized by zincand cadmium hollow cathode lamps (LCO), and the equipment was calibrated using metal stock solution (1000 ppm).The concentration of cadmium or zinc was expressed as micrograms of metal per gram of dry tissue. All of the samples were analyzed in triplicate. The kidney was used as a positive control because in chronic exposure the cadmium primarily accumulates in the kidney (Roberts and Clark, 1986).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using an analysis of variance (ANOVA) performed using INSTAT software (version 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA). The data are expressed as the means ± standard deviation (SD). Comparisons were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Animals

Table 1 summarizes the average weight obtained in the 1st, 10th and 20th week of treatment, as well as the food and water ingestion by rats in these respective weeks. During the experiment, the animals did not show any behavioral or clinical signals related to systemic intoxication, such as weight loss, weakness, diarrhea, and dyspnea. No significant differences

were observed in the water and food intake along experimental period and the body weights were similar between all experimental animals. The mean daily intake of cadmium and caffeine (calculated based on water intake, Table 1) consumed by rats in the 1st, 10th and 20th weeks, were approximately 3.0, 1.6 and 1.3 mg cadmium/kg body weight and 4.5, 2.1 and 1.8 mg caffeine/kg body weight. These values were obtained using the following formula: water consumed per day (mL) × treatment dose ÷ rat weight (kg). The plasma testosterone and dihydrotestosterone level was significantly higher ($P< 0.05$) in the groups that received caffeine (Caff and Cd-Caff) than in the Ct, Cd and Cd/Wt groups (Table 1).

Cadmium and Zinc concentration

The level of cadmium increased significantly ($P< 0.01$) in the kidney, ventral and dorsal prostate of all groups exposed to cadmium (Table 2). The trace level of cadmium detected in the kidney and prostatic lobes in the Ct and Caff groups is most likely due to food and water contamination because the food and water are not free of trace amounts of heavy metals. Caffeine co-exposure significantly decreased ($P< 0.01$) cadmium concentrations compared to the Cd group (Table2). The zinc levels were higher in the prostatic dorsal lobe than ventral lobe; a significant reduction of Zn^{+2} in the groups that received cadmium compared to Ct and Caff groups, in both lobes, was observed (Table 2).

Histopathological and ultrastructural analysis

Morphologically, the VPs from animals of all experimental groups presented, predominantly, a regular glandular structure lined by tall columnar and polarized epithelial cells, surrounded by thin stromal tissue (Figure 1 A-C). In contrast, some VP from animals exposed to cadmium presented extended areas of glandular epithelium lined by atrophic epithelium (Figure 1 D-F), while other areas exhibited epithelial hyperplasia (Figure 1 G).

Vacuolized cells were also frequently observed in the epithelium of the experimental groups exposed to cadmium (Figure 1 K, O, W). Moreover, prostatitis incidence was found in 50% of the animals from Cd/Wt group (Figure 1 J).The incidence of these alterations in the VP were determined and are shown in Table 3. Regarding epithelial atrophy, this alteration was considered present only when committed more than 30% of the prostatic lobe section, while hyperplasia and prostatitis were considered when observed at least in 2 foci per prostatic lobe section.

Areas of atrophic epithelium (Figure 1 P, S) were also observed in the VP from animals exposed to caffeine as well as enlarged luminal spaces with reduced number of epithelial infoldings, resembling cystic hyperplasia (Figure 1 P). Furthermore, other areas of VPs from the caffeine-treated animals presented epithelial hyperplasia (Figure 1 Q, R). In these areas, hyperplasic epithelium presented a micropapillary pattern, and the cell nuclei exhibited prominent nucleoli, without signs of cellular atypia (Figure 1 R).

The DP did not exhibit significant morphological differences between the groups, and no dysplastic lesions or prostatitis were observed in this lobe from the different animals (Figure 2 – H&E). In both, VP and DP lobes, it was not observed neoplastic lesions or cancer incidence.

The ultrastructural analysis of secretory epithelium from VP of all groups showed tall columnar cells with basal nuclei. In the cellular cytoplasm, flattened rough endoplasmic reticulum cisternae and developed Golgi complex in the supranuclear and perinuclear area were observed (Figure 3). Also, secretory vesicles with granules, showing different electron density in the apical cytoplasm were distinguished (Figure 3 B, D, F). In the atypical areas it was observed a pale cytoplasm with fewer dilated RER cisterns than the Ct group (Figure 3 E). In the rats exposed to cadmium, it was observed higher presence of large lipofuscin bodies containing lipid droplets and dense granules (Figure 3 D, H). Atrophied secretory epithelium

with cuboidal cells and basal nuclei was more observed in this group than others. The microvilli were short and sparse in all groups (Figures 3 D, F).

In general, the dorsal prostate of the rodent consists of acini lined by low columnar epithelial cells with a well-developed system of granular endoplasmic reticulum consisting of both flattened and dilated cisterns (Figure 4 A, B, D, G). A prominent feature of the supranuclear region of the cell is a well-developed Golgi apparatus (Figure 4 B, F, H). Another characteristic of these epithelial cells is the numerous microvilli observed apically where there are also many membrane-bound vacuoles containing dense secretory granules (Figure 4 A, C). The ultrastructural features were similar in all groups.

Morphometric and Sterological analysis

The ventral and dorsal prostatic lobe absolute and relative weights were slightly higher in the animals exposed to cadmium and or caffeine compared with the control animals, however without statistical significance (Table 3).

The data regarding quantitative analyses are displayed in Table 3.The morphometric analysis confirmed a statistically significant reduction in epithelial cell height of the prostatic lobes from Cd, Cd/Caff and Cd+Caff groups compared to the Ct group. On the group co-exposed to cadmium and caffeine, this reduction was statistically significant compared to caffeine alone in the VP.

Stereological data in the VP showed a statistically significant reduction in epithelial volume fraction component in the Cd, Cd/Caff and Cd+Caff groups compared to the Ct group, and in the Cd+Caff compared to Caff group. These same groups also showed a statistically significant increase in lumen volume fraction component.

In the DP, the morphometric analysis showed a statistically significant reduction in epithelial cell height of the prostatic lobes from Caff and Cd+Caff groups compared to others

groups. Stereological data showed a statistically significant reduction in epithelial volume fraction component in all treated groups compared to Ct group, and also showed a statistically significant increase in lumen volume fraction component.

Epithelial cell proliferation and apoptosis

Figures 2 (Ki-67 column) and 5 (Ki-67 column) represent the Ki-67 immunostaining that has been detected in the nuclei of the DP and VP epithelium from different experimental groups, respectively. The number of positive nuclei from the treated groups was increased compared to the Ct group for both prostatic lobes. No positive staining was observed in the negative control (data not shown). Quantitative analysis (Table 3) showed higher proliferation index in the treated prostatic lobes, however, statistically significant differences from Ct group was found only in the VP from Cd, Cd/Wt and Cd+Caff groups.

The effect of caffeine and cadmium exposure on epithelial cell apoptosis was also assessed by analyzing the frequency of positive nuclei for TUNEL reaction in the VP and DP (Figure 6). This analysis revealed no significant changes in the epithelial cell apoptotic index in both prostatic lobes among experimental groups (Table 3).

Immunohistochemistry for AR and Prostatein

Immunostaining to AR was detected in the nuclei from columnar and basal epithelial cells of the DP (Figure 2, AR column) and VP (Figure 5, AR column) from both the control and treated animals. In the VP, a slightly higher intensity was found in the nuclei from treated groups, mainly in the hyperplasic areas (Figure 5 Cd/Wt, Cd/Caff and Caff). Apparently, no difference in the AR immunostaining in the DP on the experimental groups was found. Prostatein immunostaining has been detected mainly in the apical regions of epithelial cells from VP throughout all groups, and appeared slightly stronger in the treated groups than Ct

group (Figure 5, prostatein column). Dorsal prostate did not exhibit immunostaining for prostatein (data not showed).

Western blot

The western blotting results confirmed the increased expression of AR in the VP (Figure 7 B) and DP (Figure 8 B) from all treated groups compared to the Ct group. PCNA expression was increased only in Cd/Wt and Caff groups compared to Ct group, for both lobes (Figures 7 C and 8 C). The prostatic lobe expression of MT was not different among experimental groups (Figures 7 D and 8 D).

Discussion

Although many studies have reported the toxicity of cadmium in the male reproductive tract organs, and experimental studies have shown that depending on the time and route, cadmium exposure can produce dysplasic lesions and tumors of the prostate (Waalkes, 2003; Arriazu et al., 2005), there are few reports about the co-exposure that cadmium and others chemical agents exerts, despite this being a common situation. Thus, to our knowledge, this is the first study addressing the effects of cadmium and caffeine co-exposure to the rat ventral and dorsal prostatic lobes. The oral route chosen in this experiment is considered one of the most common forms of cadmium exposure in human populations (Waalkes et al., 1999).

The findings of the present study demonstrates that both cadmium and caffeine intake, alone and co-exposed, have induced alterations in the morphology and homoeostasis of gland prostatic, mainly in the ventral lobe. In a previous study, our group showed that caffeine exhibited a protective effect against cadmium accumulation and oxidative stress in the epididymis using the same experimental protocol (Lacorte et al., 2012). In this present study, our results demonstrate that caffeine also exhibited protective effects on prostatic tissue,

mainly when co-administered with cadmium, given that several analyzed parameters were similar between Cd/Caff and Cd groups. The lowest Cd^{+2} levels found in the Cd/Wt and Cd/Caff groups are due to exposure lasted 10 weeks. We believe that the findings in this report are related to the amount of Cd^{+2} bioaccumulated in prostate tissue, in addition to the individual effects of caffeine. Moreover, it is relevant to analyze the chronic exposure to cadmium and its continued accumulation in the organs, since cadmium has been shown to accumulate in the prostate with advancement of age due to its very long half-life in the organ (Ho, 2004).

A significant decrease in the epithelial component and a slight increase in the luminal component observed in the VP of cadmium-treated groups are supported by epithelial atrophy. Others areas exhibited epithelial hyperplasia. It is well known the cadmium exerts androgenic and estrogenic effects by activating the androgen and estrogen receptors through binding to their endogenous active sites (Johnson et al., 2003; Martin et al., 2002; Prins, 2008; Stoica et al., 2000; Lacorte et al., 2011). Normal prostate development is dependent on androgens (Prins, 2008), and in the rodent model castration leads to prostatic involution, however, androgen supplementation triggers the prostate regeneration, indicating a continued sensitivity and responsiveness to androgens, even in the adult prostate (Felisbino et al., 2007). In accordance to this, our study showed that although T and DHT concentrations remained unchanged in the plasma, the tissue AR expression, proliferation index, synthetic activity, and secretion were increased. Proteins secreted by the prostate are generally regulated by androgen levels, the prostatein being the major protein produced and secreted into the seminal fluid by the ventral prostate of rats (Forsgren et al., 1979; Fujimoto et al., 2009) and was confirmed that prostatein mRNA is regulated by androgen (Fujimoto et al., 2009). Together, these results suggest that at low-doses cadmium can mimic the effect of androgens in prostatic epithelial cells and increase their responsiveness.

A previous study of our group using the same experimental protocol showed that caffeine-treated rats exhibited higher glandular hyperplasia with different morphological patterns compared to control rats, and may be related with the increased plasma androgen levels (Sarobo et al., 2012). This observation is in agreement with previous studies (Weinberger et al., 1978; Ezzat and Gohary, 1994). Furthermore, our study also showed that the levels of AR in the tissue were increased, as well the synthetic activity and secretion. These findings demonstrate that caffeine is able to act as an endocrine disrupter, an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transportation, binding, action, or elimination of natural hormones in the body responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development and/or behavior. Furthermore, it was suggested that caffeine intake may cause BPH due to elevated sympathetic stimulation (Yun and Doux 2006). In agreement with this hypothesis, Huang et al. (2009) also have showed that exaggerated activity of the sympathetic nervous system by chronic stress induced hyperplasia in the ventral lobe of Wistar rats.

This changes induced by cadmium and caffeine have already being observed in experimental studies using other endocrine disruptor (Flora et al., 2011, Fossato da Silva et al., 2012, Scarano et al., 2009). It is well established that testosterone levels in men decrease with age (Kaufman et al., 2005) and alter the ratios of sex steroids (testosterone/estrogen) (Nakhla et al., 1994), increases oxidative stress (Aydin et al., 2006), metabolic syndromes (Ozden et al., 2007), and chronic inflammation. Previous authors showed molecular changes that follows advanced age in the expression of genes associated with energy metabolism, signal transduction, cellular defense against oxidative stress age-dependent, proteins associated with inflammation (Lau et al., 2003; Bianchi-Frias et al., 2010), showing that the microenvironment of the prostate gland undergoes natural changes. The morphological changes observed in our study, at the PV, such as epithelial atypia, intraepithelial vacuoles,

atypical hyperplasia, presence of lipofuscin granules, were described as spontaneous in senescent rats (Lau et al., 2003, Bianchi-Frias et al., 2010; Campos et al., 2010). In the normal life cycle of the cells, the accumulation of lipofuscin in lysosomal granules is associated with aging (Oberley et al., 2008).

Residual bodies are suggested to represent the final stages of lysosomes in which degradation derived products accumulate in the form of lipofuscin as a result of cell aging or stress exposure (Oberleyet al., 2008). Cadmium induces oxidative stress in the prostate and testis (Alvarez et al., 2004; Saïd et al., 2010; Ognjanović et al., 2010). Using this same experimental model, at the epididymis, cadmium induced changes in the antioxidant enzyme activity suggesting a pro-oxidative environment (Lacorte et al., 2012). Corroborating this pro-oxidative environment, our results demonstrated a significant reduction in zinc concentration at the prostate of the animals exposed to cadmium, as already demonstrated earlier in the testis (Said et al., 2010; Bonda et al., 2004). Zinc is a trace element essential for the normal function of cells growth and metabolism, besides its critical role as a cofactor for the structure and function of a wide range of cellular enzymes, playing an important role in transcription factors for gene regulation and as an intracellular signaling agent (Costello et al., 2011; Desouki et al., 2007). Zinc has been implicated as a major factor in the development and progression of many pathological conditions and diseases, including prostate cancer (Costello et al., 2011). Clinical studies have consistently demonstrated that prostate cancer tissue samples contain less zinc, about 65% of the normal prostate tissue contains(Costello and Franklin, 2006; Franklin and Costello, 2009). The accumulation of zinc in prostatic epithelial cells is dependent of zinc transporters (such as ZIP family transporter) (Franklin and Costello, 2009). It was demonstrated that cadmium uptake can to be through ZIP (He et al., 2009), due to the similarity in the characteristics between zinc and cadmium transporters (Waalkes, 2003), leading a zinc depletion seems at the prostate rat.

In conclusion, these results suggest that the exposure of cadmium from the puberty to adulthood leads to a modified microenvironment in the prostate, capable of anticipating the natural changes on senescence. Besides, it can be associated with adverse effects on the prostate gland. The caffeine intake increases the androgenic levels in the prostate gland and can be related with the development of prostatic hyperplasia, however, in the co-exposure scenario, caffeine showed a protective role reducing the levels of intraprostatic cadmium.

References

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP. 2001. Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial. Cells Cancer Res 61:455–458.

Alvarez SM, Gomez NN, Scardapane L, Zirulnik F, Martinez D, Gimenez MS. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. Toxicol Lett 2004; 153: 365-76.

Andriole G, Bruchovsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, Russell D, Tindall D. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. J Urol. 2004; 172: 1399-403.

Arriazu R, Pozuelo JM, Henriques-Gil N, Perucho T, Martı´n R, Rodríguez R, Santamaría L. Immunohistochemical study of cell proliferation. Bcl-2, p53, and caspase-3 expression on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the ventral rat prostate. J Histoch Cytoch. 2006; 54: 981–990.

Arriazu R, Pozuelo JM, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Quantitative and immunohistochemical evaluation of PCNA, androgen, receptors, apoptosis, and glutathione-S-transferase P1 on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the rat ventral prostate. The Prostate. 2005; 63: 347-57.

Aydin A, Arsova-Sarafinovska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O, Erten K, Ozgök Y, Dimovski A. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Clin Biochem. 2006; 39: 176-9.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RYS, Sartor MA, Medvedovic M, Hol S. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: Oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. Envir Health Persp 2008; 116: 769–776.

Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. PLoS One. 2010; 5 pii: e12501.

Bonda E, Włostowski T, Krasowska A. Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (Clethrionomys glareolus). Biometals. 2004; 17: 615-24.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. Cadmium: A metallohormone? Toxicol Appl Pharmacol 2009; 238: 266–271.

Campos SG, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. Int J Exp Pathol. 2010; 91: 394-407.

Costello LC, Fenselau CC, Franklin RB. Evidence for operation of the direct zinc ligand exchange mechanism for trafficking, transport, and reactivity of zinc in mammalian cells. J Inorg Biochem. 2011; 105: 589-99.

Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. Mol Cancer. 2006; 15: 10-17.

Cota-Pereira, G.; Rodrigo, F.G.; David-Ferreira, J.F.; The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. Stain Technol. 1976; 51: 7-11.

De Flora S, Micale RT, La Maestra S, Izzotti A, D'Agostini F, Camoirano A, Davoli SA, Troglio MG, Rizzi F, Davalli P, Bettuzzi S. Upregulation of clusterin in prostate and DNA damage in spermatozoa from bisphenol A-treated rats and formation of DNA adducts in cultured human prostatic cells. Toxicol Sci. 2011; 122: 45-51.

Desouki MM, Geradts J, Milon B, Franklin RB, Costello LC. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. Mol Cancer. 2007; 5:6-37.

Ezzat AR, Gohary ZM. Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabbits. Funct Dev Morphol. 1994; 4: 45–50.

Felisbino SL, Justulin Junior LA, Carvalho HF, Taboga SR. Epithelial-stromal transition of MMP-7 immunolocalization in the rat ventral prostate following bilateral orchiectomy. Cell Biology Int. 2007; 31: 1173–178.

Forsgren B, Gustafsson JA, Pousette A, Hogberg B:Binding characteristics of a major protein in rat ventral prostate cytosol that interacts with estramustine, a nitrogen mustard derivative of 17 beta-estradiol. Cancer Res 1979; 39: 5155–164.

Fossato da Silva DA, Barbosa F Jr, Scarano WR. Oral exposure to methylmercury modifies the prostatic microenvironment in adult rats. Int J Exp Pathol. 2012; 93: 354-60.

Franklin RB, Costello LC. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. J Cell Biochem. 2009; 106: 750-7.

Fujimoto N, Suzuki T, Ohta S, Kitamura S. Identification of Rat Prostatic Secreted Proteins Using Mass Spectrometric Analysis and Androgen-Dependent mRNA Expression. J Androl. 2009; 30: 669-78.

Gass R. Benign prostatic hyperplasia: the opposite effects of alcohol and coffee intake. BJU Int. 2002: 90, 649–654.

Glynn RJ, Campion EW, Bouchard GR, Silbert JE. The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Normative Aging Study. Am J Epidemiol 1985: 121, 78–90.

He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. Toxicol Appl Pharmacol 2009;238:250-7.

Ho SM. Metal Ions as Endocrine Disruptors: Implications for Prostate Cancer In: Raz NK. Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems. 2004, United States of America, 2nd ed.

Huang S., Fang X., Meng Y., Chen Y., Zhang X., Zhao S. (2009) Sympathetic nervous system overactivity in the Wistar rat with proliferative lesions of ventral prostate induced by chronic stress. Urol. Int. 83, 230–235.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum Available: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/index.php [accessed 10 September 2012] 1993;58:1-444.

Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. Nature Med 2003; 9: 1081–84.

Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. Endocr Rev. 2005;26(6):833–76.

Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Pinheiro PFF, Amorim RL, Felisbino SL. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. Microsc Res Tech 2011; 74: 988-97.

Lacorte LM, Seiva FRF, Rinaldi JC, Delella FK, Moroz A, Sarobo C, Godinho AF, Favaro WJ, Fernandes AAH, Felisbino SL. Caffeine reduces cadmium accumulation in the

organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis, Reproductive Toxicology 2012. *In Press, Accepted Manuscript*.

Lau KM, Tam NN, Thompson C, Cheng RY, Leung YK, Ho SM. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. Lab Invest. 2003; 83: 743-57.

Martín JJ, Martín R, Codesal J, Fraile B, Paniagua R, Santamaría L. Cadmium chloride induced displastic changes in the ventral rat prostate: An immunohistochemical and quantitative study. Prostate 2001, 46: 11–20.

Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, Lu J, Stoica E, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, Stoica A. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. Endocrinology 2002, 143: 263–275.

Morrison, A. S. Risk factors for surgery for prostatic hipertrofy. Am I. Epidemiol. 1992; 135: 974-80.

Nakhla AM, Khan MS, Romas NP, Rosner W. Estradiol causes the rapid accumulation of cAMP in human prostate. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91: 5402-5.

Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Addit Contam 2003; 20: 1-30.

Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. Prostate. 1996; 28: 124–128.

Oberley TD, Swanlund JM, Zhang HJ, Kregel KC. Aging results in increased autophagy of mitochondria and protein nitration in rat hepatocytes following heat stress. J Histochem Cytochem. 2008; 56: 615-27.

Ognjanović BI, Markovic SD, Đorđević NZ, Trbojević IS, Štajn AS, Saičić ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reprod Toxicol 2010; 29: 191-7.

Ogunlewe JO, Osegbe DN. Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. Cancer. 1989; 63: 1388-92.

Ozden C, Ozdal OL, Urgancioglu G, Koyuncu H, Gokkaya S, Memis A. The correlation between metabolic syndrome and prostatic growth in patients with benign prostatic hyperplasia. Eur Urol. 2007; 51: 199-203.

Pollard I. Increases in plasma concentrations of steroids in the rat after the administration of caffeine: comparison with plasma disposition of caffeine. J Endocrinol. 1988; 119: 275-80.

Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. Endocr Relat Cancer 2008; 15: 649–58.

Qu W, Ke H, Pi J, Broderick D, French JE, Webber MM, Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. Environ Health Perspect. 2007; 115: 1094–100.

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 CA, Clark JM. Improved determination of cadmium in blood and plasma by flameless atomic absorption spectroscopy. Bull Environ Contam Toxicol 1986; 36: 496-9.

Saïd L, Banni M, Kerkeni A, Saïd K, Messaoudi I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. Food Chem Tox 2010; 48: 2759-65.

Sarobo C, Lacorte L, Martins M, Rinaldi JC, Moroz A, Scarano WR, Delella FK, Felisbino, SL. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. Int J Exp Path. 2012 *(in press)*.

Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. Cien Saude Colet. 2011; 16: 2587-602.

Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, de Campos SG, Júnior LA, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas Wde G. 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.Toxicology. 2009; 262: 215-23.

Shafique K, McLoone P, Qureshi K, Leung H, Hart C, Morrison DS. Tea consumption and the risk of overall and grade specific prostate cancer: a large prospective cohort study of Scottish men. Nutr Cancer. 2012; 64: 790-7.

Shappell S.B., Thomas G.V., Roberts R.L. et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of thmouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. Cancer Res. 2004; 64: 2270–2305

Signorello LB, Tzonou A, Lagiou P, Samoli E, Zavitsanos X, Trichopoulos D. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia: a study in Greece. BJU Int. 1999; 84: 286-91.

Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. Nat Rev Endocrinol. 2010; 6: 363-70

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. Mol Endocrinol. 2000; 14: 545–553.

Timms BG, Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. Differentiation. 2011; 82: 173-83.

Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. Anatomic Rec. 2006; 288: 885–892.

Waalkes MP, Anver M, Diwan BA. Carcinogenic effects of cadmium in the noble (NBL/Cr) rat: induction of pituitary, testicular, and injection site tumors and intraepithelial proliferative lesions of the dorsolateral prostate. Toxicol Sci. 1999; 52: 154-61.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. Mutat Res 2003; 533: 107-20.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol 1966; 30: 23–38.

Weinberger M.A., Friedman L., Farber T.M. et al. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. J. Environ. Pathol. Toxicol. 1978; 1: 669–688.

Wilson K.M., Kasperzyk J.L., Rider J.R. et al. Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. J. Natl Cancer Inst. 2011; 103, 1–9.

Yun AJ, Doux JD. Opening the floodgates: benign prostatic hyperplasia may represent another disease in the compendium of ailments caused by the global sympathetic bias that emerges with aging. Med. Hypotheses 2006; 67: 392–394.

Table 01 – Cadmium and caffeine effects on body weight, food and water intake and in the plasma androgens levels (last week).

	Experimental Groups					
	Ct	Cd	Cd/Wt	Cd/Caff	Caff	Cd+Caff
Body weight (g)						
1st week	128.31 ± 9.8	129.60 ± 9.9	127.60 ± 8.5	129.83 ± 8.1	130.58 ± 10.2	130.35 ± 7.9
10th week	356.75 ± 11.2	356.83 ± 12.9	344.58 ± 13.1	373.42 ± 11.2	373.92 ± 17.8	369.58 ± 14.1
20th week	499.79 ± 35.9	505.13 ± 32.9	499.92 ± 48.6	513.35 ± 50.0	520.90 ± 56.2	522.45 ± 47.9
Food intake (g/day)						
1st week	23.9 ± 1.9	23.5 ± 1.8	24.5 ± 1.3	23.9 ± 1.8	24.9 ± 2.2	23.7 ± 1.9
10th week	25.6 ± 2.3	25.8 ± 1.9	24.9 ± 1.7	25.9 ± 1.9	25.8 ± 1.8	24.9 ± 1.3
20th week	26.1 ± 1.7	26.0 ± 1.8	28.1 ± 1.6	28.1 ± 2.1	27.6 ± 1.6	26.6 ± 1.5
Water intake (mL/day)						
1st week	28.9 ± 2.3	26.6 ± 1.8	27.8 ± 2.8	28.5 ± 2.4	28.9 ± 2.8	27.1 ± 2.9
10th week	36.9 ± 4.3	37.8 ± 3.9	35.9 ± 4.0	38.1 ± 3.7	38.7 ± 4.8	37.5 ± 3.3
20th week	42.9 ± 7.3	39.9 ± 5.1	43.2 ± 5.6	45.2 ± 5.9	46.4 ± 6.8	41.8 ± 6.3
Plasma androgens (ng/mL)						
Testosterone	1.34 ± 0.68 [a]	1.49 ± 0.30 [a]	1.17 ± 0.53 [a]	2.63 ± 0.83 [b]	2.26 ± 0.42 [b]	1.89 ± 0.48 [ab]
Dihydrotestosterone	0.21 ± 0.03 [a]	0.21 ± 0.05 [a]	0.25 ± 0.08 [a]	0.37 ± 0.07 [b]	0.33 ± 0.07 [b]	0.24 ± 0.03 [a]

Values are expressed as median ± SD. Different superscript letters means statistically significant difference with $p < 0.05$. Control (Ct); Exposed to cadmium (Cd); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by pure water for ten weeks (Cd/Wt); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by caffeine for ten weeks (Cd/Caff); Exposed to caffeine (Caff); Co-exposed to cadmium and caffeine for 20 weeks (Cd+Caff).

Table 02 - Cadmium and zinc levels in the rat ventral and dorsolateral prostatic lobes and kidney from different experimental groups.

	Experimental Groups					
	Ct	Cd	Cd/Wt	Cd/Caff	Caff	Cd+Caff
Ventral Prostate						
Cadmium (μg/g)	0.047 ± 0.01 [a]	0.237 ± 0.03 [b]	0.117 ± 0.02 [c]	0.105 ± 0.05 [c]	0.051 ± 0.01 [a]	0.058 ± 0.02 [a]
Zinc (μg/g)	0.48 ± 0.01 [a]	0.24 ± 0.03 [b]	0.35 ± 0.04 [c]	0.28 ± 0.08 [bc]	0.44 ± 0.11 [a]	0.22 ± 0.03 [b]
Dorsolateral Prostate						
Cadmium (μg/g)	0.061 ± 0.01 [a]	0.308 ± 0.01 [b]	0.245 ± 0.01 [bc]	0.210 ± 0.04 [bc]	0.064 ± 0.01 [a]	0.175 ± 0.03 [c]
Zinc (μg/g)	5.18 ± 0.09 [a]	4.54 ± 0.19 [bc]	4.10 ± 0.07 [c]	4.64 ± 0.03 [bc]	5.04 ± 0.07 [a]	4.82 ± 0.03 [ab]
Kidney						
Cadmium (μg/g)	0.22 ± 0.03 [a]	7.21 ± 0.10 [b]	5.89 ± 1.54 [c]	5.13 ± 0.03 [c]	0.18 ± 0.07 [a]	4.43 ± 0.50 [d]

Values are expressed as median ± SD. Different superscript letters means statistically significant difference with $P < 0.05$. Control (Ct); Exposed to cadmium (Cd); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by pure water for ten weeks (Cd/Wt); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by caffeine for ten weeks (Cd/Caff); Exposed to caffeine (Caff); Co-exposed to cadmium and caffeine for 20 weeks (Cd+Caff).

Table 03 – Cadmium and caffeine effects on biometric and morphometric parameters from rat ventral and dorsal prostatic lobes

	Experimental Groups					
	Ct	Cd	Cd/Wt	Cd/Caff	Caff	Cd+Caff
Ventral Prostate						
Weight (g)	0.55 ± 0.09	0.69 ± 0.11	0.67 ± 0.18	0.68 ± 0.16	0.71 ± 0.09	0.69 ± 0.18
Relative weight	0.11 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.03
Epithelial height (μm)	26.10 ± 2.83 [a]	24.25 ± 5.44 [b]	23.83 ± 5.37 [bc]	22.16 ± 4.09 [c]	24.10±4.05 [bc]	20.27 ± 3.51[c]
Volume fraction (%)						
Ephithelium	34.04 ± 8.39 [a]	25.54±11.50 [b]	30.59±9.07 [ab]	26.03 ± 9.65 [b]	35.65±10.40 [a]	26.19± 9.08 [b]
Lumen	48.94 ± 11.40 [ac]	58.94 ± 18.58 [bc]	52.71±10.60 [c]	56.80±14.57 [bc]	48.07±12.54 [ac]	58.11 ± 11.73 [bc]
Stroma	15.34 ± 8.21	14.63 ± 8.54	16.70 ± 5.40	17.17 ± 8.03	18.28 ± 6.86	15.68 ± 6.19
Ki-67 index (%)	0.54 ± 0.27 [a]	1.44 ± 0.53 [b]	1.31 ± 0.37 [b]	1.25 ± 0.56 [ab]	1.11±0.42 [ab]	1.38 ± 0.19 [b]
TUNEL index (%)	0.41 ± 0.22	0.72 ± 0.06	0.57 ± 0.27	0.39 ± 0.05	0.57 ± 0.13	0.41 ± 0.02
Prostatitis incidence	0/12 [a]	2/12 [a]	8/12 [b]	4/12 [a]	0/12 [a]	0/12 [a]
Focal epithelial hyperplasia	0/12 [a]	10/12 [b]	12/12 [b]	12/12 [b]	12/12 [b]	8/12 [b]
Incidence of epithelial atrophy >30% of total glandular area	0/12 [a]	8/12 [b]	6/12 [b]	4/12 [a]	8/12 [b]	6/12 [b]
Dorsal Prostate						
Weight (g)	0.47 ± 0.12	0.44 ± 0.08	0.45 ± 0.08	0.48 ± 0.06	0.50 ± 0.09	0.46 ± 0.08
Relative weight	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Epithelial height (μm)	15.17 ± 3.51 [a]	14.91 ± 3.91 [a]	15.64 ± 2.93 [a]	15.16 ± 3.51 [a]	12.67 ± 2.76 [b]	13.47 ± 2.67 [b]
Volume fraction (%)						
Ephithelium	29.47 ± 8.84 [a]	21.50 ± 7.36 [b]	22.36 ± 7.74 [b]	20.83 ± 6.40 [b]	23.96 ± 4.5 [b]	21.36 ± 7.37 [b]
Lumen	51.09 ± 10.22 [a]	60.06 ± 13.70 [b]	59.81± 9.87 [b]	57.29±15.96 [b]	61.40 ± 8.41 [b]	60.27 ± 8.04 [b]
Stroma	19.94 ± 6.63	18.78 ± 7.84	18.17 ± 6.36	20.22 ± 6.14	18.64 ± 5.11	17.59 ± 5.11
Ki-67 index (%)	0.77 ± 0.16	1.4 ± 0.61	1.28 ± 0.58	1.43 ± 0.32	1.32 ± 0.84	1.47 ± 0.62
TUNEL index (%)	0.67 ± 0.31	0.93 ± 0.24	1.17 ± 0.66	0.83 ± 0.11	0.85 ± 0.37	0.62 ± 0.12

Values are expressed as median ± SD. Different superscript letters means statistically significant difference with $P < 0.05$. Control (Ct); Exposed to cadmium (Cd); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by pure water for ten weeks (Cd/Wt); Exposed to cadmium for 10 weeks followed by caffeine for ten weeks (Cd/Caff); Exposed to caffeine (Caff); Co-exposed to cadmium and caffeine for 20 weeks (Cd+Caff).

Figure 1. Morphological aspects of the rat ventral prostate (VP) from control (Ct), cadmium (Cd), cadmium/water (Cd/Wt), cadmium/caffeine (Cd/Caff), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups stained with hematoxylin-eosin. **A-C)** VP from the Ct group showing the acini structures with large lumen (L) lined by regular tall columnar epithelium (ep). **D-G**) VP from the Cd group showing the acini structures with large lumen (L) lined by both tall columnar (D, G) and athophic epithelium (ep) (E, F-arrow). **H-K**) VP from the Cd/Wt group showing the acini structures with large lumen (L) lined by tall columnar (H, I) epithelium (ep). Chronic prostatitis in the stroma (J) and vacuolized cells (arrows) in the epithelium (K) were frequently observed in this group. **L-O**) VP from the Cd/Caff group showing the acini structures with large lumen (L) lined by tall columnar (L and M) epithelium (ep). Focal epithelial hyperplasia (N-O) and vacuolized cells (O - arrows) were frequently observed in this group. **P-S**) VP from the Caff group showing the acini structures with large lumen (L) lined by both tall columnar (P-R) and athophic epithelium (ep) (S-arrow). Focal epithelial hyperplasia (arrows) (Q, R) was frequently observed in this group. **T-X**) VP from the Cd+Caff group showing the acini structures with large lumen (L) lined by both tall columnar and athophic (U, V) epithelium (ep). Vacuolized cells (W - arrows) were frequently observed in this group. Scale bars: **A**, **D**, **H**, **L, P**and**T**= 200 μm;**B,E**, **I**, **M**, **Q**and**U** = 50 μm; C, F, G, J, K, N, O, R, S, V and W= 25μm.

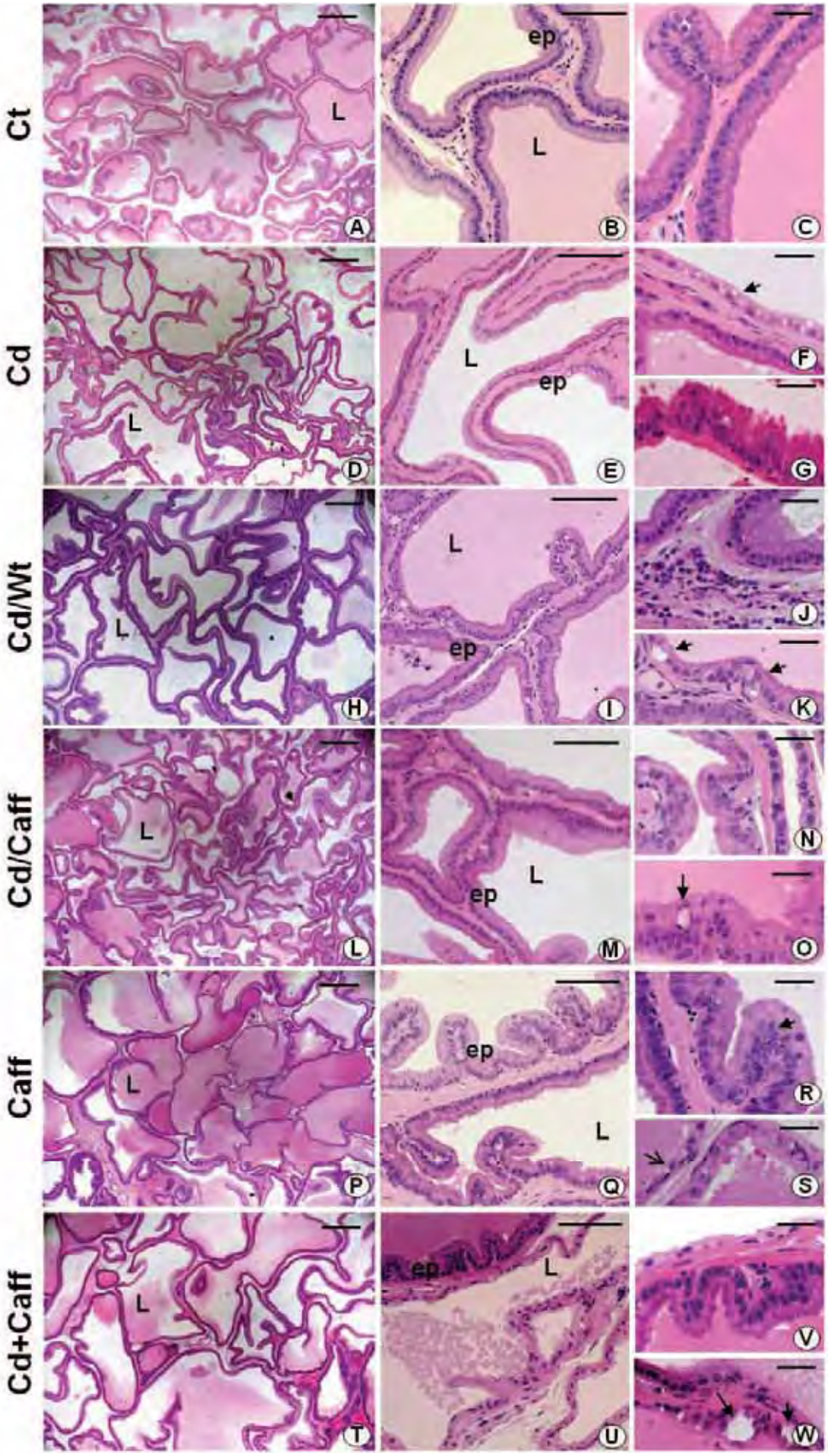

Ct
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff
L
ep
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W

Figure 2. Representative sections of the rat dorsal prostate (DP) from control (Ct), cadmium (Cd), cadmium/water (Cd/Wt), cadmium/caffeine (Cd/Caff), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups. Morphological aspects stained with hematoxylin-eosin (H&E column) showing the acini structures with lumen (L) lined by regular low columnar epithelium (ep)**.** Immunostaining for androgen receptor (AR column). Note a similar low intensity of AR immunostaining in the nuclei (arrows) of the epithelial cells from all experimental groups. Immunostaining for nuclear protein of the proliferation cell (Ki-67 column). Note a higher number of positive nuclei (arrows) in the epithelium from treated groups compared to Ct group. Scale bars: H&E column = 100 μm; AR column = 50 μm; Ki-67 column = 25μm.

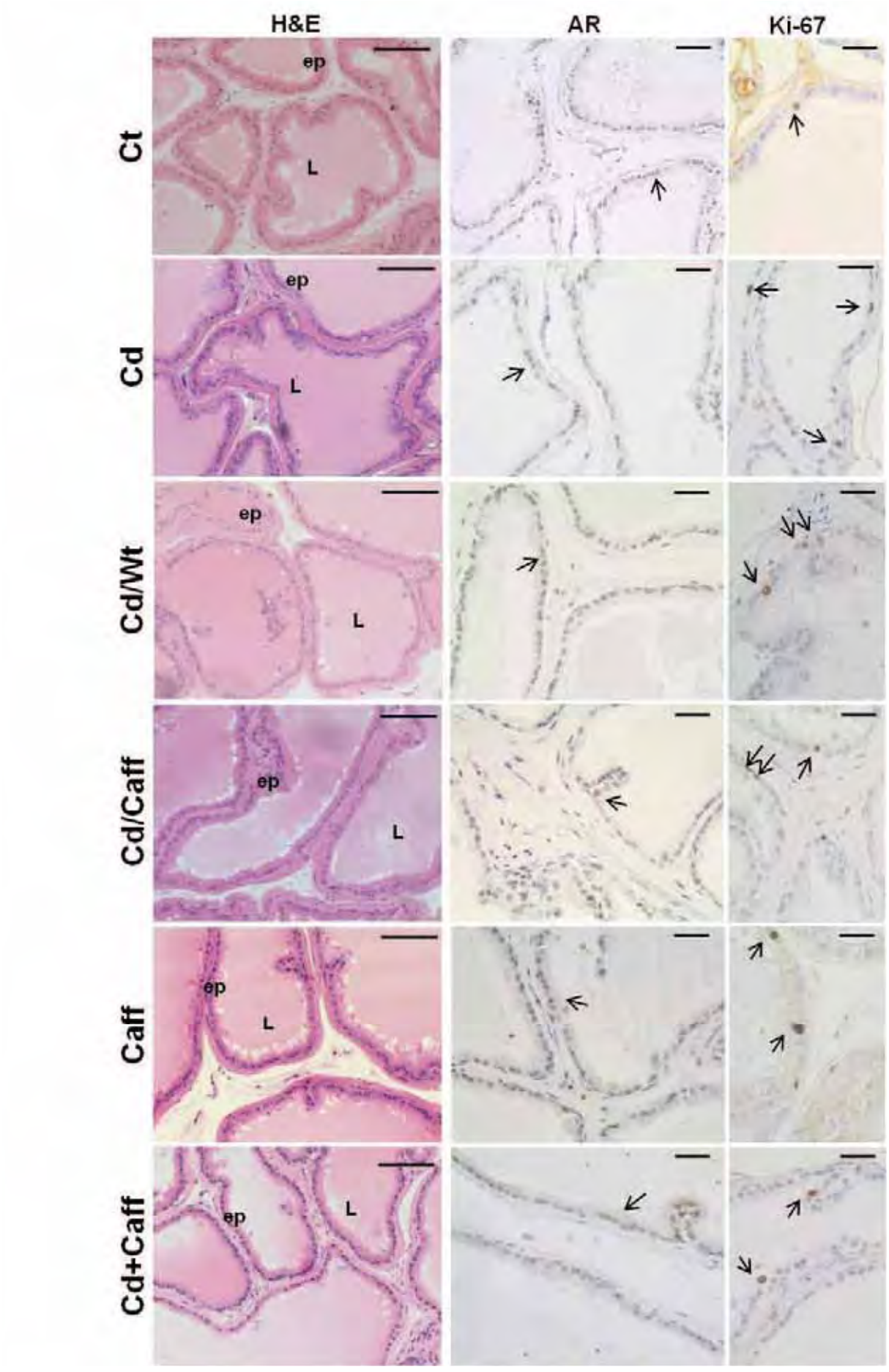

H&E
AR
Ki-67
Ct
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff
ep
L

Figure 3. Electron micrographs of the ventral lobe of the prostate from the control (Ct, **A-B**), Cadmiun (Cd, **C-D**), caffeine (Caff, **E-F**) and Cadmiun plus caffeine (Cd+caff, **G-H**) groups. (**A,C,E,G**) Secretory epithelium showing typical organization. Inset in (**A**) and (**E**) are showing parallel and flattened Golgi complex cisternae (GC) and rough endoplasmic reticulum cisternae (RER) respectively. (**B,D,F,H**) Supranuclear region with lipofucsin granules (Li) and apical region with microvilli and occasional secretory vesicles with different eletrondensities (dotted circle) of epithelial cells. N, nuclei of the epithelial cells. A,G=3,400x; B=5,800x; C=4,600x; D,H=19,000x; E=2,600x; F=10,500x; Insets=11,800x.

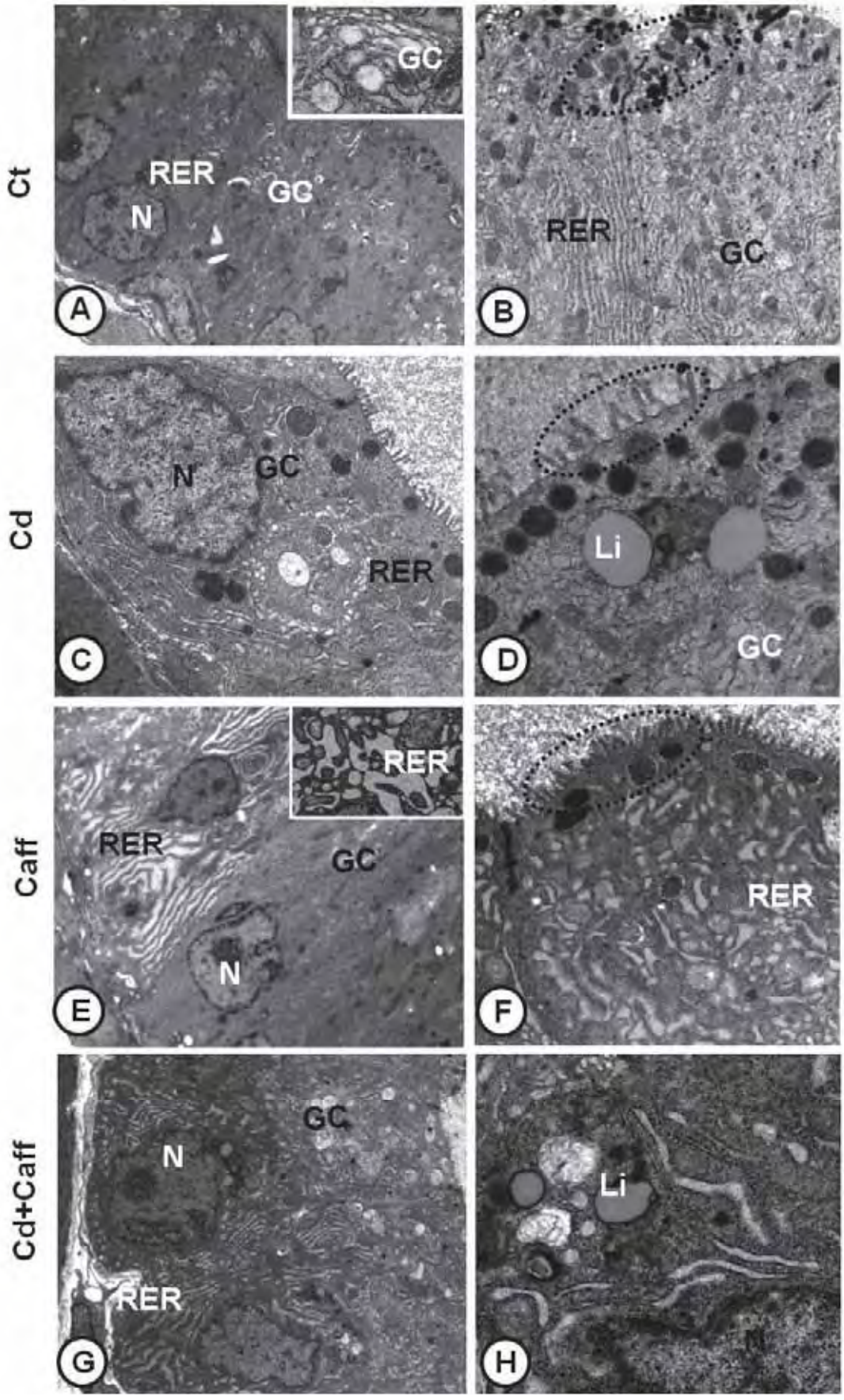

Ct
Cd
Caff
Cd+Caff
A
B
C
D
E
F
G
H
GC
RER
N
Li

Figure 4. Electron micrographs of the dorsal lobe of the prostate from the control (Ct, **A-B**), Cadmiun (Cd, **C-D**), caffeine (Caff, **E-F**) and Cadmiun plus caffeine (Cd+caff, **G-H**) groups. The secretory epithelium with basal nuclei (N), flattened rough endoplasmic reticulum cisternae (RER) with some points of dilatation in **A,B,D,G**. Supranuclear and perinuclear region containing developed Golgi complex (GC) in **B,F,H** and secretory vesicles showing different electrondensity (dotted circle) in the apical cytoplasm from **A,C,E**. A,C=2,600x; B,G,F=4,600x; D=10.500x; E=1,900X; H=25.000x.

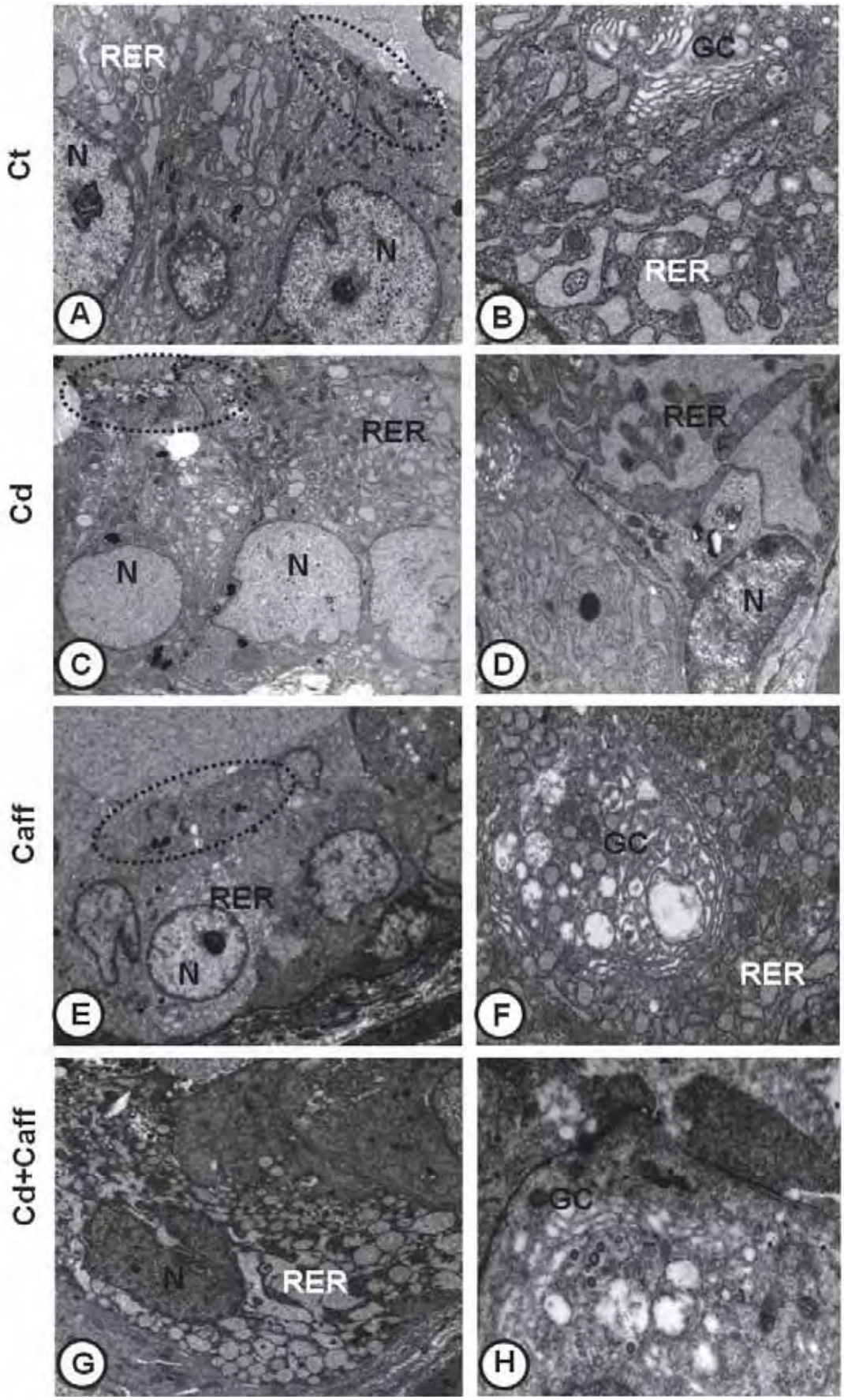

Ct
Cd
Caff
Cd+Caff
RER
N
GC
A
B
C
D
E
F
G
H

Figure 5. Representative immunohistochemistry reactions in the rat ventral prostate (VP) from control (Ct), cadmium (Cd), cadmium/water (Cd/Wt), cadmium/caffeine (Cd/Caff), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff). Immunostaining for androgen receptor (AR column): Note an uniform and higher intensity of the positive immunostaining nuclei (arrows) from treated group compared with the control group. Note also a higher intensity in the hyperplasic areas in the Cd/Caff and Caff groups. Immunostaining for nuclear protein of the proliferative cells (Ki-67 column): Note a higher number of positive nuclei (arrows) of the epithelial cells from treated groups compared to Ct group. Immunostaining for prostatein (prostatein column): Note positive immunostaining in the apical regions of secretory epithelial cells (arrows) and a more intense immunoreaction in the prostate from treated groups compared to Ct group. Scale bars: AR column = 50μm; Ki-67 and Prostatein columns = 25 μm.

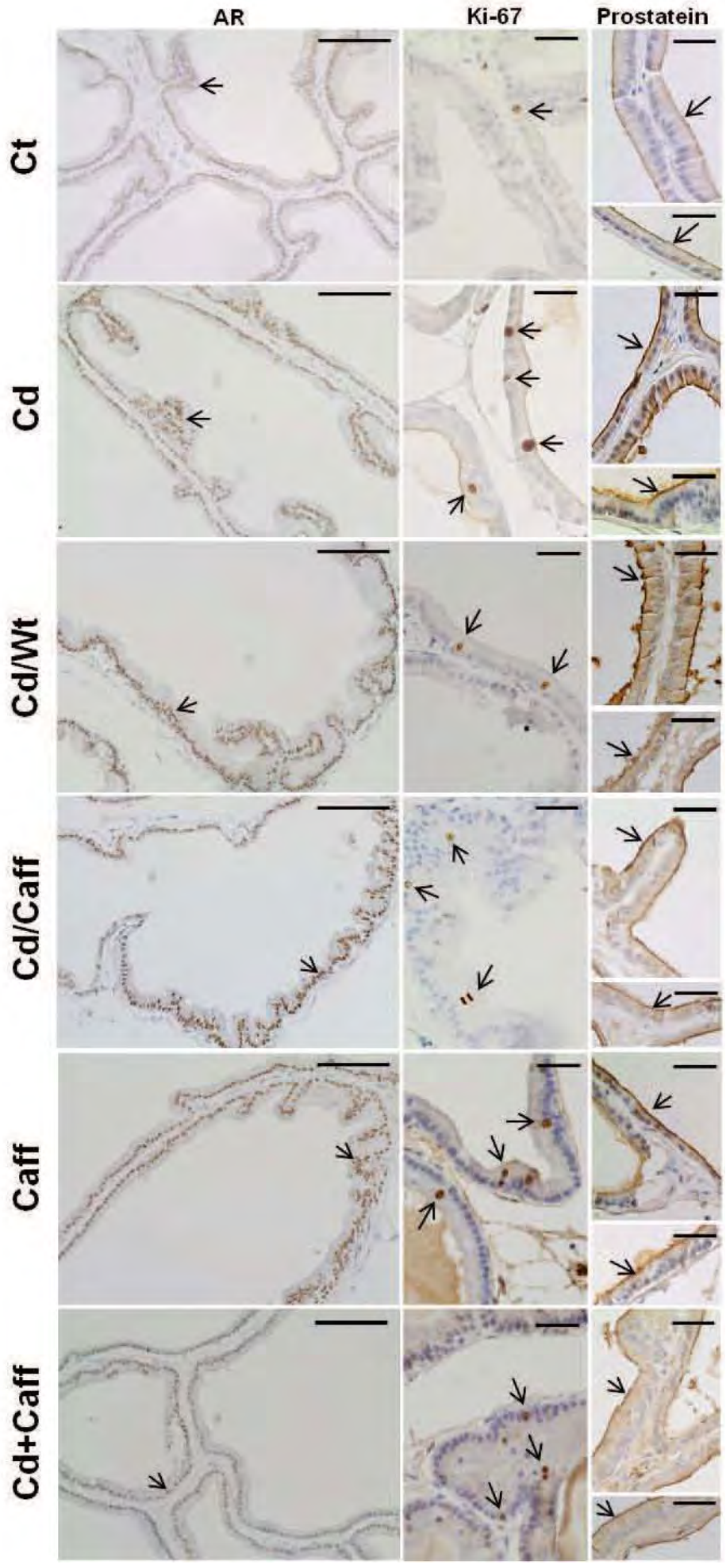

AR
Ki-67
Prostatein
Ct
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff

Figure 6. Representative sections of ventral and dorsal prostatic lobes from control (Ct), cadmium (Cd), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups submitted to the TUNEL reaction. The arrows indicate typical positively stained apoptotic epithelial cells that were used to determine the TUNEL index. Scale bars: 20 μm.

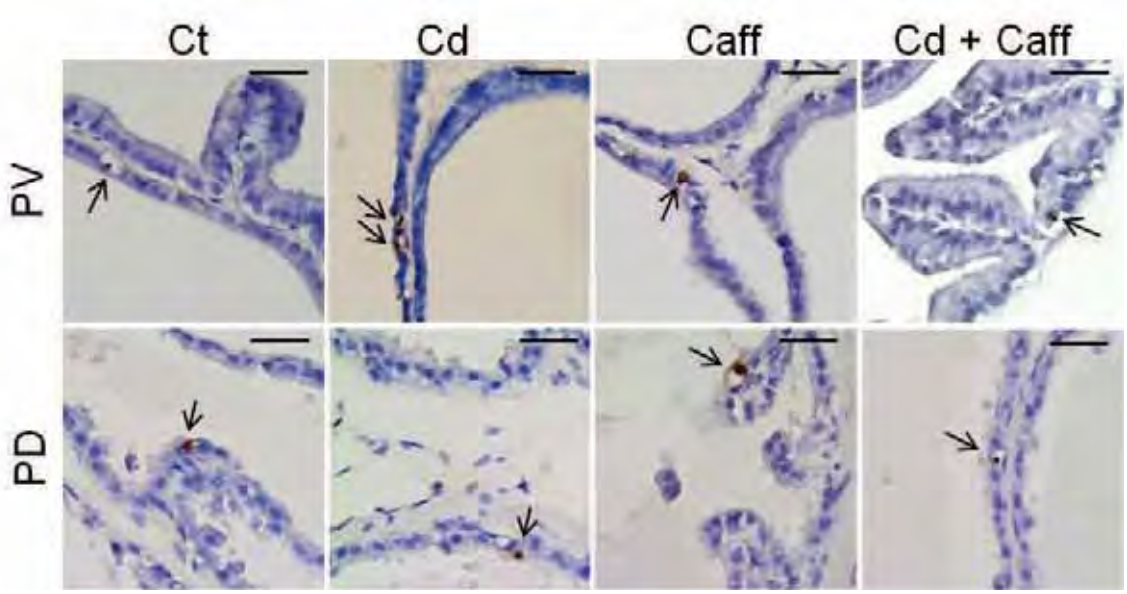

Ct
Cd
Caff
Cd + Caff
PV
PD

Figure 7. A) Representative western blot for androgen receptor (AR), proliferation cellular nuclear antigen (PCNA), metallothionein (MT) and beta-actin (β-actin) expression in the ventral prostate from control (Ct), cadmium (Cd), cadmium/water (Cd/Wt), cadmium/caffeine (Cd/Caff), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups. B-D) Using a densitometry analysis, AR, PCNA and MT expression were normalized to β-actin expression and showed a significant increase of AR in all treated groups and PCNA in the Cd/Wt and Caff groups. The results are expressed as a fold increase normalized to the Ct group values.

* indicates statistically significant differences from the control group with $P<0.05$.

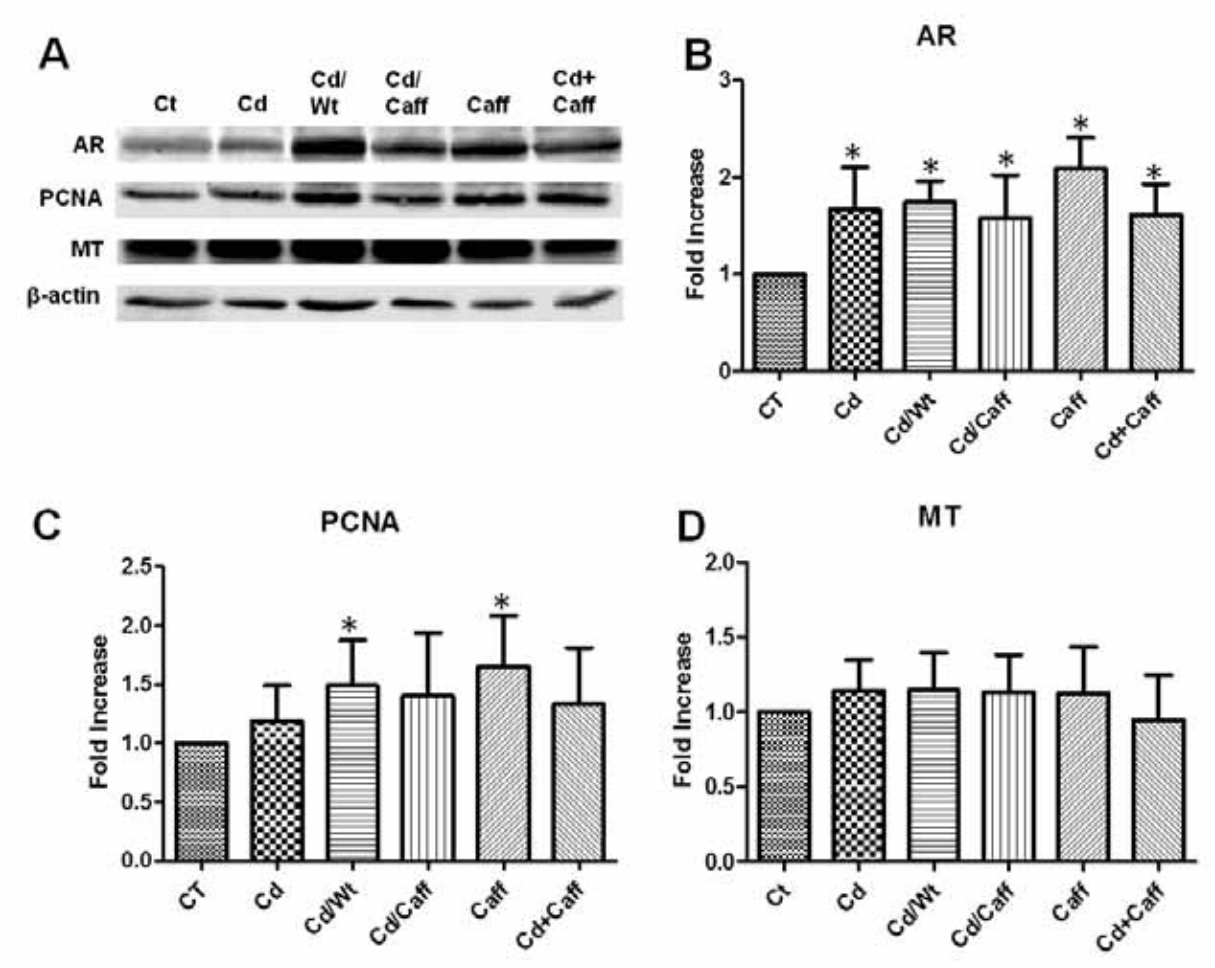
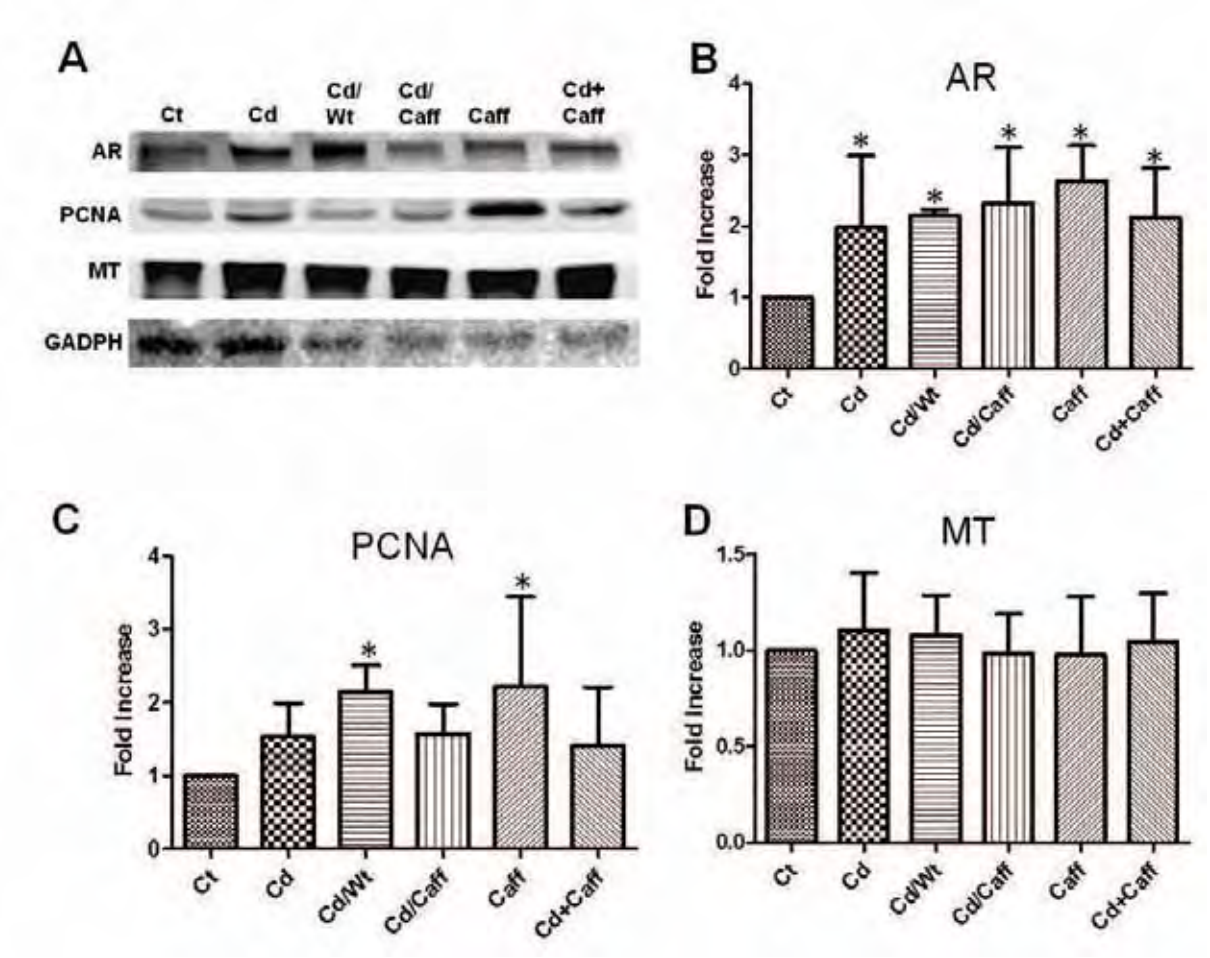

A
Ct
Cd
Cd/ Wt
Cd/ Caff
Caff
Cd+ Caff
AR
PCNA
MT
β-actin
B
AR
Fold Increase
CT
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff
C
PCNA
Fold Increase
CT
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff
D
MT
Fold Increase
Ct
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff

Figure 8. A) Representative western blot for androgen receptor (AR), proliferation cellular nuclear antigen (PCNA), metallothionein (MT) and Glyceraldehyde 3-phosphaste dehydrogenase (GAPDH) expression in the dorsal prostate from control (Ct), cadmium (Cd), cadmium/water (Cd/Wt), cadmium/caffeine (Cd/Caff), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups. **B-D)** Using a densitometry analysis, AR, PCNA and MT expression were normalized to GAPDH expression and showed a significant increase of AR in all treated groups and PCNA in the Cd/Wt and Caff groups. The results are expressed as a fold increase normalized to the Ct group values.

* indicates statistically significant differences from the control group with $P< 0.05$.


A
Ct
Cd
Cd/ Wt
Cd/ Caff
Caff
Cd+ Caff
AR
PCNA
MT
GADPH
B
AR
Fold Increase
Ct
Cd
Cd/Wt
Cd/Caff
Caff
Cd+Caff
C
PCNA
Fold Increase
D
MT
Fold Increase

Análise das metaloproteinases de matriz e do colágeno na próstata de ratos expostos ao cádmio e/ou à cafeína

Livia M. Lacorte[a], Jaqueline C. Rinaldi[a], Flávia K. Delella[a], Sérgio L. Felisbino[a]

[a]Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil

Suporte Financeiro Processo FAPESP Número 09/52747-7, 08/50204-6

*Correspondente: Dr. Sérgio L. Felisbino, Departamento de Morfologia, Instituto de Biosciências, Univ Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3811 6264

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

RESUMO

O estroma desempenha papel fundamental no suporte, manutenção e diferenciação das células epiteliais prostáticas e qualquer desregulação nestes compartimentos podem desencadear lesões na próstata. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de metais divalentes, principalmente zinco e cálcio, capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular. O cádmio é metal exógeno capaz de substituir outros metais divalentes. A cafeína, antagonista da adenosina, parece interferir na ativação das MMPs. Entretanto não há estudos conclusivos e nem da interação destas substâncias sobre o estroma da próstata. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a distribuição das fibras de colágeno dos tipos I e III e a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 nos lobos prostáticos ventral e dorsal de ratos. Para isto, foram realizadas análises estruturais, ultra-estruturais, imunoistoquímicas para detecção de fibras colágenas e zimografia para avaliar a atividade gelatinolítica das MMPs. Não houve diferença na organização e na atividade das MMPs entre os grupos experimentais. Adicionalmente, avaliou-se o efeito do cádmio na atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 *in vitro*, e demonstrou de maneira concentração-dependente inibição da atividade das MMPs. Em conclusão, nestas condições experimentais, os resultados mostram que o cádmio e a cafeína quando utilizados isoladamente ou associados, não alteram a síntese de novas fibras de colágeno ou a organização das fibras pré-existentes. Porém, *in vitro* o cádmio revelou inibir a atividade de MMPs. São necessários estudos *in vivo* que avaliem diferentes períodos de exposição e dose, pois os efeitos tóxicos deste metal na próstata podem estar relacionados com as alterações na renovação dos componentes da matriz extracelular via inibição da atividade de MMPs nestes tecidos

Palavras chave: **Próstata, Metaloproteinases de Matriz; Cádmio; Zimografia;**

Introdução

A glândula prostática é composta por epitélio secretor organizado em alvéolos glandulares, sustentados por estroma fibromuscular composto por complexa rede de matriz extracelular (MEC). O estroma é composto principalmente por células musculares lisas, fibroblastos, vasos sanguíneos, nervos e componentes do sistema imunológico. Os fibroblastos e as células musculares lisas sintetizam, organizam e mantêm a integridade da MEC (Vilamaior et al., 2000; Delella et al., 2012). De maneira interativa, cada um destes componentes epiteliais, estromais e da MEC estabelecem relação de comunicação através dos fatores parácrinos e autócrinos que são responsáveis pela manutenção da homeostasia da glândula prostática (Cunha, 1994; Marker et al., 2003). Os principais tipos de colágenos encontrados no estroma prostático são colágenos do tipo I, III, IV, VI e VII (Sinha et al., 1991; Knox et al., 1994; de Carvalho et al., 1997; Vilamaior et al., 2000; Taboga and Vidal, 2003).

Sabe-se que alterações na homeostasia glandular da próstata geram microambiente propício para o desenvolvimento de lesões (Cunha, 1994; Schauer e Rowley, 2011). Ocorrem modificações estruturais no compartimento estromal da próstata normal, que passa a ser chamado de estroma reativo, encontrado em tumores e na hiperplasia prostática benigna (Taylor and Risbridger, 2008; Schauer e Rowley, 2011). Durante a transformação para o estroma reativo, ocorrem mudanças fenotípicas nas células estromais (Tuxhorn et al., 2002) que induzem a liberação de fatores de crescimento e novas moléculas estruturais e responsáveis pela remodelação da MEC, como por exemplo os colágenos I e III (Untergasser et al., 2005) e as metaloproteinases 2 e 9 (Wilson et al., 1999) .

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, capazes de degradar os componentes da MEC, como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos (Visse & Nagase, 2003; Nagle, 2004). Essas

enzimas são secretadas na forma de um precursor latente, chamadas de zimógeno ou pró-MMPs. As MMPs latentes são previamente ativadas antes de se tornarem capazes de clivar os elementos da MEC (Matrisian, 1990; Sternlicht and Werb, 2001). Esse processo de ativação ocorre no espaço extracelular através da participação de outras enzimas, tais como a plasmina, triptase, quimase e também através de outras MMPs ou por autoclivagem e auto-ativação (Stamenkovik, 2000).

As MMPs 2 e 9 (gelatinases) são enzimas importantes por contribuírem no processo invasivo metastático e angiogênico de vários tumores, incluindo o câncer de próstata (Nagakawa *et al*., 2000). Essa contribuição deve-se, principalmente, à degradação do colágeno do tipo IV, principal constituinte das membranas basais. Na próstata normal, as principais MMPs presentes no tecido são as MMP-2 e MMP-9 (Bruni-Cardoso et al., 2008; Delella et al., 2010; Justulin et al., 2010).

Várias proteases, incluindo as MMPs, são inibidas por diferentes cátions divalentes. Estudo realizado por Wilson e colaboradores (1992) demonstrou que os metais Zn^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, Br^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} na concentração de 2mM inibem a atividade de MMPs. Em estudo anterior, foi demonstrado que o cádmio *in vitro* na concentração de 110 μM inibe a atividade de proteases de 43 e 25 kDa presentes no esmalte dentário (Gerlach *et al*., 2000). Entretanto, nenhum estudo anterior avaliou o possível efeito do cádmio, também um cátion divalente com reconhecido efeito tóxico e carcinogênico para o sistema reprodutor masculino e para a próstata (Waalkes, 2003), sobre a atividade de metaloproteinases de matriz. Os seres humanos estão frequentemente expostos ao cádmio por água e alimentos contaminados e pela fumaça do cigarro, além da exposição ocupacional (Satarug et al., 2012), sendo a próstata um órgão que bioacumula o cádmio (Lindegaard et al., 1990; Lacorte et al., 2011, Lacorte et al., 2012).

A co-exposição a diferentes substâncias faz parte de um cenário comum do cotidiano da população, principalmente quando relacionado à dieta alimentar, como a ingestão de

cafeína. Estudos experimentais demonstram que a cafeína está associada com a redução da deposição de colágeno, exercendo papel protetor contra a indução de fibrose no fígado (Chan et al., 2006; Furtado et al., 2012). A cafeína é conhecida por ser antagonista dos receptores de adenosina (Cronstein, 2011). A ligação da adenosina com seus receptores promove a inibição da atividade das metaloproteinases (Chan et al., 2006, Cronstein, 2011).

Neste contexto, estudos que avaliem os efeitos do cádmio e da cafeína isolados e combinados sobre os componentes da matriz extracelular da próstata são de extrema importância para compreender se existe alguma correlação destas substâncias com alterações nas principais moléculas da MEC. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a distribuição das fibras de colágeno dos tipos I e III e a atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 nos lobos prostáticos ventral e dorsal de ratos. Adicionalmente, avaliamos o efeito do cádmio na atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 *in vitro*.

Material e Métodos

Animais

Ratos *Wistar*, machos pré-puberes (5 semanas), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, foram adaptados e mantidos no Biotério do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, de acordo com o código de ética do uso de animais de laboratório, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (protocolo número 139/2009). Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais: CT (controle) = receberam apenas água; Cd (cádmio) = receberam 15 ppm de cádmio ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$; Sigma™) por 20 semanas; Caf (cafeína) = receberam 20 mg/L de cafeína (Sigma™) por 20 semanas; Cd/Ag = receberam cádmio por 10 semanas seguidos por 10 semanas de água; Cd/Caf = receberam cádmio por 10 semanas seguidos por 10 semanas de cafeína e Cd+Caf = receberam 15 ppm de cádmio + 20 mg/L de cafeína, dissolvidos na água. A dose de cádmio

escolhida para ser utilizada neste experimento foi de 15 ppm, baseada em dados da literatura (Alvarez et al., 2004), sendo considerada semelhante a uma exposição ambiental e a dose de cafeína de 20 mg/L foi escolhida para simular uma dose moderada consumida por humanos saudáveis (Nawrot et al., 2003). Após o período de exposição, os lobos prostáticos ventral (PV) e dorsal (PD) dos animais dos diferentes grupos experimentais foram removidos, os lóbulos esquerdo foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a extração das enzimas e os lóbulos direito foram processados, para as análises morfológicas, morfométricas, citoquímicas e imunoistoquímicas.

Extração das enzimas e zimografia

Lóbulos da PV e da PD de cada grupo experimental foram utilizados para a extração de proteínas totais. A extração foi realizada seguindo a proporção de 30 mg de tecido para 0,1 ml de uma solução de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo 0,25% de Triton X-100, 10mM $CaCl_2$ e coquetel inibidor de proteases (P-8849 - Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA), por trituração em homogeneizador do tipo Politron. O homogeneizado foi centrifugado a 14000 RPM por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford (1976).

Amostras de proteínas extraídas (28 μg) da PV e PD dos diferentes grupos experimentais e de MMP-2 e MMP-9 purificadas (Calbiochem e ABCAM, respectivamente) foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0,1% de gelatina purificada (Sigma). Após a eletroforese, os géis foram submetidos a duas lavagens de 15 minutos em solução de 2,5% de Triton X-100 para a remoção do SDS e a duas lavagens de 5 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Posteriormente, os géis foram incubados em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM $CaCl_2$ por 20 horas a 37^{o}C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie

Brilliant Blue R-250. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™, BIO-RAD) e das enzimas comerciais utilizados na eletroforese.

Experimentos de inibição in vitro

Adicionalmente, géis de zimografia de animais controle com intensa atividade das MMPs conhecidas, foram incubados durante 20 horas a 37°C em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, contendo somente 5 mM de $CaCl_2$ ou contendo 5 mM de $CaCl_2$ e 2 mM $CdCl_2$ ou 5μM $CdCl_2$. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™, BIO-RAD) e das enzimas comerciais utilizados na eletroforese.

Análises citoquímicas e morfométricas

Cortes em historesina foram corados pelo Picrossírius, para a análise das fibras colágenas (Junqueira et al., 1979); e pela Reticulina de Gömori (Gömori, 1937, modificado, em Taboga & Vidal 2003) para análise das fibras reticulares. Os cortes foram observados em luz normal e fotomicrografados em microscópio Leica DMLB.

A análise morfométrica da área ocupada por fibras colágenas foi efetuada em cortes de historesina corados pelo Picrossírius. Foram realizadas 10 medidas automáticas (por detecção automática da cor vermelha pelo software). As detecções foram feitas na objetiva de 20X, em pelo menos 10 campos microscópicos de cada lobo prostático de 6 animais de cada grupo, totalizando aproximadamente 60 medidas por lobo prostático por grupo experimental.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos dos lobos prostáticos ventral e dorsal foram fixados em tampão Millonig pH 7,3 contendo glutaraldeído a 3% e ácido tânico a 0,25% durante 2 horas (Cotta-Pereira et al., 1976). O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluído em Araldite. Cortes semifinos foram produzidos com navalha de vidro e corados pelo Azul de toluidina. Cortes ultrafinos, produzidos com navalha de diamante foram contrastados pelo acetato de uranila 2% por 30 minutos, seguidos pelo citrato de chumbo 2% por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram observados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips (Centro de Microscopia Eletrônica – UNESP – Campus de Botucatu).

Imunoistoquímica

Cortes congelados com 7um foram coletados em lâminas silanizadas e fixados em metanol a 4ºC por 10 minutos. Os cortes foram lavados 1x em PBS e mergulhados em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol, por 15 minutos, para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados por 60 minutos em solução contendo 3% de albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente, os cortes foram incubados, por 2 horas em temperatura ambiente, com o anticorpo primário anti-colágeno I Ab 6308 (diluição 1:100 em BSA 1%) e anti-colágeno III Ab 6310 (diluição 1:100 em BSA 1%). Os cortes foram lavados em PBS e incubados, por 1 hora, com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (diluição 1:200 em BSA 1%). A imunomarcação foi revelada pela 3.3'-diaminobenzidina (Sigma) e os cortes foram contra corados com hematoxilina. Os resultados foram analisados em microscópio e foto documentados.

Análises estatísticas

Para análise dos dados numéricos obtidos será utilizado o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com o teste "a posteriori" de Tuckey-Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P<0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Instat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

Análise estrutural e ultraestrutural do estroma dos lobos prostáticos ventral e dorsal

Fibras do sistema colágeno foram observadas no estroma da PV e da PD, evidenciadas em vermelho pela coloração do picrossírius. No lobo ventral (Figura 1 A-F), localizam-se ao redor das estruturas acinares, associadas à base do epitélio, ao redor das células musculares lisas e no interstício entre as estruturas glandulares. Nos grupos tratados são observadas camadas mais delgadas de colágeno abaixo do epitélio atrófico e ao redor das células musculares lisas (Figura 1 B, D, F). Entranto as análises morfométricas não demonstraram alteração na área ocupada pelas fibras colágenas nas PV e PD dos animais tratados (Figura 2 A). A impregnação por prata pela técnica de Reticulina de Gömori evidenciou as fibras reticulares (principalmente colágeno do tipo III, em castanho) organizadas ao redor da base das estruturas alveolares preenchendo o estroma presente nas dobras epiteliais, assim como ao redor das células musculares lisas e as fibras colágenas do tipo I (coradas em dourado) concentradas principalmente nos espaços intersticiais (Figura 1 G-L). A reação imunoistoquímica específicas para os colágenos I e III também confirmaram que não houve alteração da organização e distribuição destas fibras (Figura 3).

A análise ultraestrutural revelou que a arquitetura do estroma da PV foi semelhante entre os animais controle e tratados. Foi possível identificar feixes de fibras colágenas abaixo do epitélio, entremeados às células musculares lisas e aos fibroblastos. Também foram

observadas algumas fibras elaunínicas com deposição irregular de elastina e terminações axônicas de fibras nervosas amielínicas distribuídas no estroma intersticial. A ultraestrutura das duas principais células presentes no estroma demonstrou que as células musculares lisas apresentaram sarcolema retilínio, poucas organelas de síntese e abundância de corpos/placas densas e que os fibroblastos revelaram típico fenótipo secretor (Figura 4). Eventualmente, foram observados mastócitos e outras células inflamatórias (dados não ilustrados).

O lobo prostático dorsal apresenta estroma mais espesso que o encontrado na PV, caracterizado por conter mais camadas de células musculares lisas e maior quantidade de elementos da matriz extracelular, que também se organizam ao redor das estruturas epiteliais glandulares e no espaço intersticial (Figura 1 M-X). As análises quantitativas mostraram que a área relativa de fibras do sistema colágeno no estroma da PD dos animais tratados não difere do grupo controle (Figura 2 B). A distribuição e organização das fibras reticulares e colágenas da PD, evidenciadas pela coloração de reticulina, seguem as mesmas características descritas anteriormente para a PV. (Figuras 1 S-X). A reação imunoistoquímica, específica para a detecção dos colágenos I e III também evidenciou que não houve diferença na disposição destas fibras nas PDs dos diferentes grupos experimentais (Figura 3).

A análise ultraestrutural confirmou que o estroma da PD foi mais espesso que o da PV, e revelou que a arquitetura estromal foi similar entre os diferentes grupos experimentais. Adjacente ao epitélio glandular foi observado uma espessa camada de células musculares lisas entremeadas a feixes de fibras colágenas. No estroma intersticial, foi frequentemente observado fibroblastos com típico fenótipo secretor e células musculares lisas com sarcolema irregular e ocasionalmente repleto de cavéolas (Figura 5). Assim como na PV, mastócitos e outras células inflamatórias também foram observados (dados não ilustrados).

Análise da atividade das MMPs -2 e -9

- Análise *in vivo*

A análise da atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 na PV revelou a presença das típicas formas pró (latente, 72 kDa), intermediária (67 kDa) e ativa (59 kDa) da MMP-2e não apresentou níveis detectáveis pela zimografia da MMP-9 (Figura 6). Não houve diferença significativa da atividade da MMP-2 total entre os grupos.

Para a PD, apenas a forma (67 kDa) foi detectada pela técnica de zimografia. A atividade da enzima MMP-9, assim como para a PV, não foi detectada neste lobo prostático (Figura 6). Não houve diferença significativa da atividade da MMP-2 total entre os grupos.

- Análise *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados com duas diferentes concentrações do cádmio, 2mM e 5µM, para compreender a ação desse elemento químico sobre a atividade das MMPs -2 e -9 presentes no extrato proteico da PV e da PD de animais do grupo controle. De maneira dose dependente, o cádmio inibiu a atividade das MMPs -2 e -9 presentes nesses dois lobos prostáticos (Figura 7). Estas concentrações foram escolhidas baseadas em estudos anteriores com outros metais divalentes como o Zn^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, Br2+, Mn2+, Mg2+ (Wilson et al., 1992). Na menor concentração (5µM), equivalente a 10^{-3} da concentração de cloreto de cálcio utilizada para ativar as MMPs no protocolo padrão de zimografia, o cádmio produziu inibição de aproximadamente 80% dà atividade das MMPs analisadas.

Discussão

O cádmio é um importante contaminante ocupacional e ambiental, presente na fumaça de cigarro e apresenta reconhecido potencial carcinogênico sobre a próstata (Waalkes, 2003). Entretanto, os mecanismos pelos quais este metal interfere a homeostasia celular não são completamente conhecidos. A cafeína está presente no café, refrigerantes, remédios,

energéticos e é a droga psicoativa mais utilizada por todos os segmentos da população (Nawrot et al., 2003). Estudos experimentais têm demonstrado que a cafeína exerce efeito protetor sobre a indução da fibrose hepática (Arauz et al., 2012; Furtado et al., 2012). Apesar disso, não há estudos que avaliassem o papel isolado da cafeína ou os efeitos da co-exposição da cafeína e do cádmio sobre o estroma e as moléculas da MEC da próstata.

Nossos resultados demonstraram que a exposição à baixa dose de cádmio ou à cafeína, bem como a co-exposição não alteraram a disposição e organização dos colágenos fibrilares na PV nem na PD. Em estudo prévio, o nosso grupo detectou que a exposição ao cádmio por 4 semanas reduziu o volume absoluto das fibras colágenas do estroma da PV e PD (Lacorte et al., 2011) corroborando com estudos *in vitro* realizados com células de pulmão incubadas com cádmio que demonstraram redução na síntese de colágeno do tipo I e elastina (Chambers et al., 1998; Zhao et al., 2006). Tais alterações ocorreram via inibição da enzima lisil oxidase, enzima dependente de cobre, necessária para a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno e entre as moléculas de elastina no meio extracelular. (Lucero e Kagan, 2006).

Estudos científicos também sugerem a ação da cafeína na redução de áreas ocupadas pelas fibras do sistema colágeno. Chan e colaboradores (2006), em trabalho realizado com camundongos induzidos por tetra cloreto de carbono para a promoção do desenvolvimento de cirrose hepática, encontraram, nos animais que receberam cafeína pela água de beber, redução da área ocupada pelo colágeno. Os autores atribuem este papel protetor, contra a cirrose hepática, pelo fato da cafeína funcionar como receptor antagonista não seletivo da adenosina. Esses resultados são confirmados por outros estudos (Sharp e Benowitz, 1995; Ruhl & Everhart, 2005; Furtado et al., 2012). Em situação normal, a ligação da adenosina com os seus receptores promove a inibição da atividade das MMPs, além disso, a adenosina é um

importante regulador endógeno de processos inflamatórios e de reparo tecidual (Chan et al., 2006).

Estas diferenças podem estar relacionadas ao protocolo experimental, bem como à idade dos animais. Sabe-se que com o avanço da idade o estroma da próstata sofre alterações moleculares e morfológicas que refletem em fenótipo alterado. Entre as alterações moleculares foi demonstrada uma diminuição da expressão do gene dos colágenos *Col1a1* e *Col3a1* (Bianchi-Frias et al., 2010).

O nosso estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do cádmio e/ou da cafeína sobre a atividade das MMPs, especificamente as MMPs -2 e -9, duas importantes enzimas envolvidas na degradação e renovação dos componentes da MEC, principalmente a membrana basal (Matrisian, 1990; Nagle, 2004). Estas enzimas têm papel fundamental em vários processos celulares normais e no desenvolvimento, progressão e invasão tumoral (Nagle, 2004). Nas condições experimentais do presente estudo, o cádmio e a cafeína não alteraram a atividade das MMPs dos lobos prostáticos ventral e dorsal. Entretanto, os resultados da análise *in vitro* demonstraram que o cádmio é capaz de inibir a atividade das MMP-2 e MMP-9, mesmo na menor concentração (5 μM).

As MMPs -2 e -9 já foram descritas por serem inibidas por Zn e Cu em concentrações próximas a 100 μM (Souza et al., 2000). Concentrações maiores como 2mM de Zn e de outros metais, tais como Sr2+, Co2+, Br2+, Mn2+, Mg2+ também demonstraram efeitos inibitórios sobre a atividade de MMPs *in vitro* (Wilson et al., 1992). O mecanismo de inativação destas enzimas pelo excesso de metais tem sido associado a mudanças conformacionais que inativam a sua função catalítica (Auld, 1995). Os nossos resultados destacam a importância de novos estudos sobre os efeitos deste metal sobre o organismo e sobre outras metaloproteinases e proteases dependentes de metais como o cálcio, zinco e magnésio.

Sabe-se que a próstata é um dos principais órgãos que acumulam cádmio no organismo, depois do fígado e dos rins (Waalkes, 2003; Lacorte et al., 2011). Desta forma, futuros estudos deverão avaliar se os efeitos inibitórios do cádmio sobre proteases podem afetar a renovação dos componentes da matriz extracelular da próstata e interferir com o processo de carcinogênese prostática atribuída a este metal (Waalkes, 2003).

Além de ser uma glândula comumente acometida por alterações malignas no homem adulto e senil, a próstata contribui com a síntese de importantes constituintes do fluído seminal, principalmente enzimas (proteases) que irão liquefazer o sêmen. Sabe-se que as MMPs também estão presentes no sêmen (Wilson et al., 1995) e podem desempenhar papel importante na motilidade dos espermatozoides e na fecundação. Desta forma, outro mecanismo pelo qual o cádmio pode afetar o sucesso reprodutivo seria via inibição da atividade das proteases prostáticas no fluido seminal.

Em conclusão, nestas condições experimentais, os resultados mostram que o cádmio e a cafeína quando utilizados isoladamente ou associados, não alteram a síntese de novas fibras de colágeno ou a organização das fibras pré-existentes. Porém, o cádmio revelou inibir a atividade de MMPs *in vitro,* mesmo em concentrações mil vezes menores que o cálcio. São necessários estudos *in vivo* que avaliem diferentes períodos de exposição e dose, pois os efeitos tóxicos deste metal na próstata podem estar relacionados com as alterações na renovação dos componentes da matriz extracelular via inibição da atividade de MMPs nestes tecidos.

Referências

Alvarez SM, Gómez NN, Scardapane L, Zirulnik F, Martínez D, Giménez MS. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. Toxicol Lett. 2004; 153: 365-376.

Arauz J, Moreno MG, Cortés-Reynosa P, Salazar EP, Muriel P. Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF-β and CTGF in a murine model of liver damage. J Appl Toxicol. 2012. *In Press, Accepted Manuscript*.

Auld DS. Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. Meth Enzymol 1995; 248: 228-242.

Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. PLoS One 2010; 5(9): pii: e12501.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

Bruni-Cardoso A, Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. Histochem Cell Biol. 2008; 129:805-15.

Chambers RC, Laurent GJ, Westergren-Thorsson G. Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998; 19:498-506.

Chan ES, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, et al.. Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. Br J Pharmacol. 2006; 148:1144-1155.

Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. Stain Technol. 1976; 51:7-11.

Cronstein BN. Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. F1000 Biol Rep. 2011; 3:21.

Cunha GR. Role of mesenchymal–epithelial interactions in normal and abnormal development of mammary gland and prostate. Cancer 1994; 74:1030–44.

de Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PS. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. Tissue Cell 1997;29:163–70.

Delella FK, Justulin LA Jr, Felisbino SL. Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate. Int J Androl. 2010; 33:114-22.

Delella FK, Lacorte LM, Almeida FL, Pai MD, Felisbino SL Fibrosis-related gene expression in the prostate is modulated by doxazosin treatment. Life Sci. 2012. *In Press, Accepted Manuscript.*

Furtado KS, Prado MG, Aguiar E Silva MA, Dias MC, Rivelli DP, Rodrigues MA, Barbisan LF. Coffee and Caffeine Protect against Liver Injury Induced by Thioacetamide in Male Wistar Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012. *In Press, Accepted Manuscript.*

Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. Eur J Oral Sci. 2000; 108: 327-334.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. 1979; 11:447-55.

Justulin LA Jr, Della-Coleta HH, Taboga SR, Felisbino SL. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. Int J Androl. 2010; 33:696-708.

Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, et al. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. Am J Pathol 1994;145:167–74.

Lacorte LM, Seiva FRF, Rinaldi JC, Delella FK, Moroz A, Sarobo C, Godinho AF, Favaro WJ, Fernandes AAH, Felisbino SL. Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis, Reproductive Toxicology 2012. *In Press, Accepted Manuscript*.

Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Felipe Pinheiro PF, Amorim RL, Felisbino SL. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. Microsc. Res. Tech. 2011; 74: 988-997.

Lindegaard PM, Hansen SO, Christensen JE, Andersen BB, Andersen O. The distribution of cadmium within the human prostate. Biol Trace Elem Res. 1990; 25: 97-104.

Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. Cell Mol Life Sci. 2006; 63: 2304-2316.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Dev Biol 2003; 253: 165-174.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genetics. 1990; 6: 121–125.

Nagakawa O, Murakami K, Yamaura T, Fujiuchi Y, Murata J, Fuse H, Saiki I. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. Cancer Lett. 2000; 155:173-9.

Nagle, R. B. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. J Cell Biochem. 2004; 91:36–40.

Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Addit Contam. 2003; 20:1-30.

Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and tea consumption are associated with a lower incidence of chronic liver disease in the United States. Gastroenterology. 2005; 129:1928-1936.

Satarug S. Long-term exposure to cadmium in food and cigarette smoke, liver effects and hepatocellular carcinoma. Curr Drug Metab. 2012; 13:257-71.

Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Differentiation. 2011; 82:200-210.

Sharp DS, Benowitz NL. Alcohol, smoking, coffee, and cirrhosis and coffee and serum gamma-glutamyltransferase: a study of self-defense officials in Japan. Am J Epidemiol. 1995; 141:480-482.

Sinha AA, Gleason DF, DeLeon OF,Wilson MJ, Limas C, Reddy PK, et al. Localization of type IV collagen in the basement membranes of human prostate and lymph nodes by immunoperoxidase and immunoalkaline phosphatase. Prostate 1991;18:93-104.

Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and 9) by metal salts. Dent Mater 2000; 16: 103-108.

Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol. 2000;10:415-33.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

Taboga SR, Vidal BC. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. J Submicrosc Cytol Pathol 2003;35:1–6.

Taylor RA, Risbridger GP. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. Curr Can Drugs Targets. 2008, 8: 490-97.

Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. Clin Cancer Res. 2002; 8:2912-2923.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. Exp Gerontol. 2005; 40:121-128.

Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. Prostate 2000;45:253–58.

Visse R. & Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circulat Res. 2003; 92:827–839.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. Mutat Res. 2003; 533:107-20.

Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. Biol Reprod. 1992; 47:683-91.

Wilson CL, Heppner KJ, Rudolph LA, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. Mol Biol Cell. 1995; 6:8518-69.

Wilson MJ, Casey C, Woodson M, Sinha AA. Reverse zymography studies of protease inhibitors in the secretions of different lobes of rat prostate. Arch Androl 1999;42:109-18.

Zhao Y, Gao S, Chou IN, Toselli P, Stone P, Li W. Inhibition of the expression of lysyl oxidase and its substrates in cadmium-resistant rat fetal lung fibroblasts. Toxicol Sci. 2006; 90:478-489.

Figura 1. Fotomicrografias dos lobos prostáticos ventral (PV) e dorsal (PD) dos animais controle (Ct), e tratados com cádmio (Cd), cádmio/água (Cd/Ag), cádmio/cafeína (Cd/Caf), cafeína (Caf) e cádmio mais cafeína (Cd+Caf). **(A-F)** e **(M-R):** Fotomicrografias dos lobos prostáticos corados pelo picrossírius. Observe as fibras colágenas que destacam-se coradas em vermelho (setas) e preenchem o estroma abaixo do epitélio e o estroma intersticial. As células epiteliais (ep) estão coradas em amarelo na PV (A-F) e na PD (M-R) nos diferentes grupos experimentais. **(G-L)** e **(S-X):** Fotomicrografias dos lobos prostáticos corados pela reticulina de Gömori. Detalhes dos alvéolos prostáticos do lobo ventral (G-L) e do lobo dorsal (S-X) dos animais controle e tratados. Observe as fibras reticulares (principalmente do tipo III) que estão coradas em castanho, localizadas, preferencialmente, no estroma abaixo do epitélio (setas) e as fibras colágenas, coradas em dourado, localizadas preferencialmente no estroma intersticial (cabeças de seta). O tratamento não alterou a distribuição e organização dessas fibras em ambos os lobos. Barras A-F, M-R = 50 μm; G-L, S-X = 25 μm.

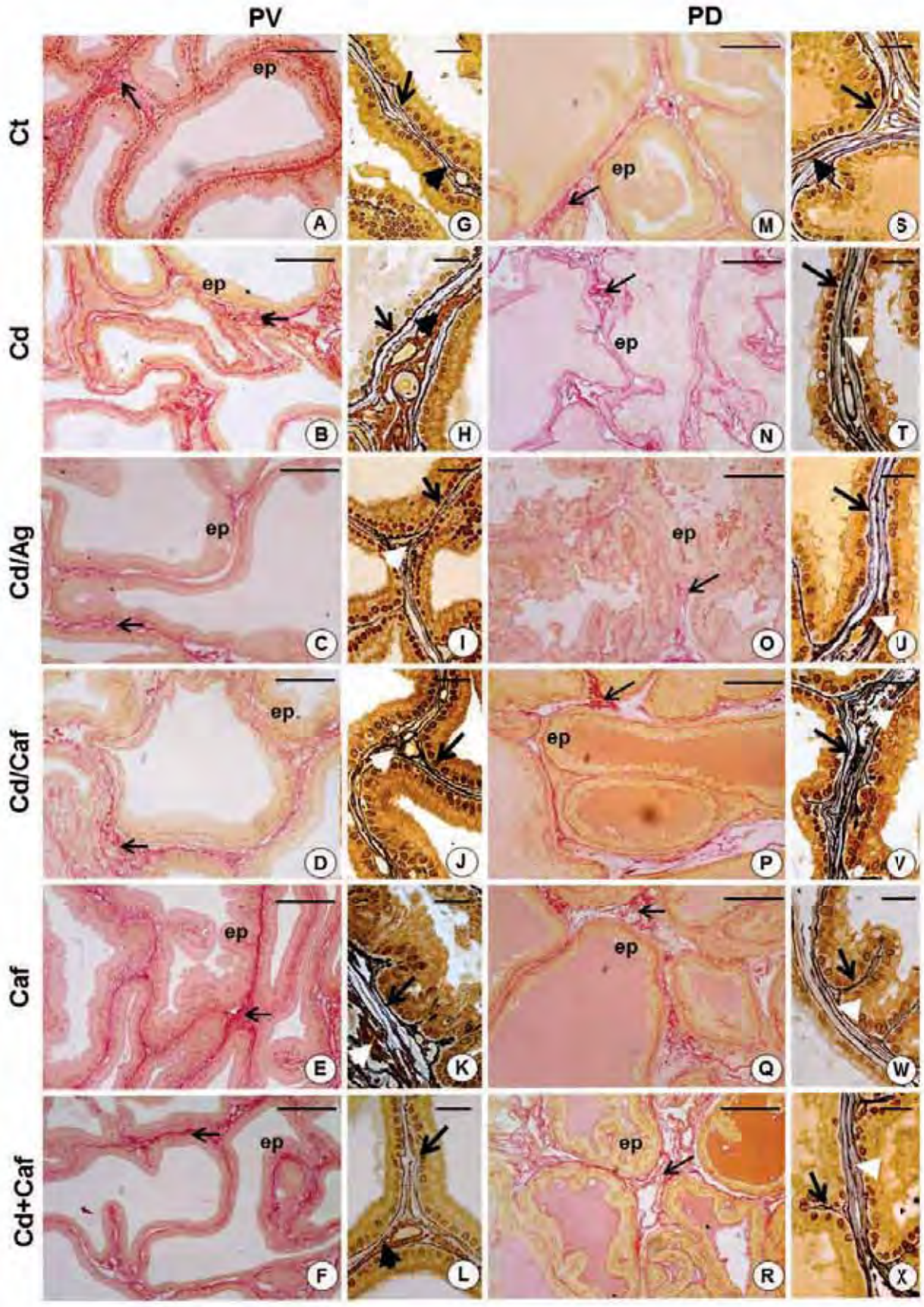
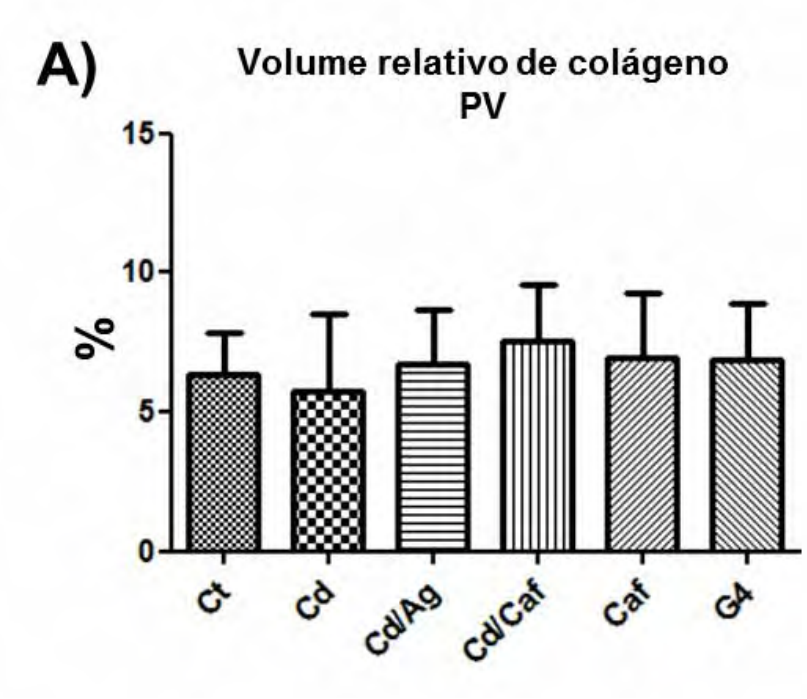

PV
PD
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caf
Caf
Cd+Caf
ep
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X

Figura 2: Gráfico representativo da quantificação do volume relativo de fibras colágenas nos lobos prostáticos ventral (PV) e dorsal (PD) dos animais controle (Ct), e tratados com cádmio (Cd), cádmio/água (Cd/Ag), cádmio/cafeína (Cd/Caf), cafeína (Caf) e cádmio mais cafeína (Cd+Caf). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.


A)
Volume relativo de colágeno
PV
15
10
5
0
%
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caf
Caf
G4

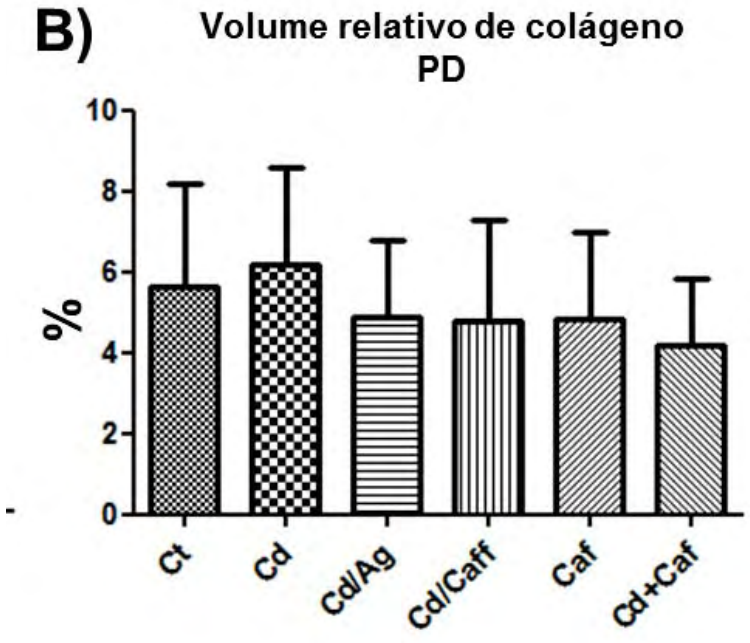

B)
Volume relativo de colágeno
PD
10
8
6
4
2
0
%
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caff
Caf
Cd+Caf

Figura 3: Fotomicrografias representativas da imunoistoquímica para a detecção dos colágenos do tipo I e do tipo III no lobo prostático ventral (PV) e dorsal (PD) dos animais controle (Ct), e tratados com cádmio (Cd), cádmio/água (Cd/Ag), cádmio/cafeína (Cd/Caf), cafeína (Caf) e cádmio mais cafeína (Cd+Caf). Observe a reação imunoistoquímica para o colágeno do tipo I identificada no estroma intersticial (setas) na PV e PD. Do mesmo modo, a reação imunoistoquímica para o colágeno do tipo III concentrada na base do epitélio e das células de musculo liso (*) na PV e PD, não apresentou diferenças entre os grupos experimentais. Barras A-X = 25 μm.

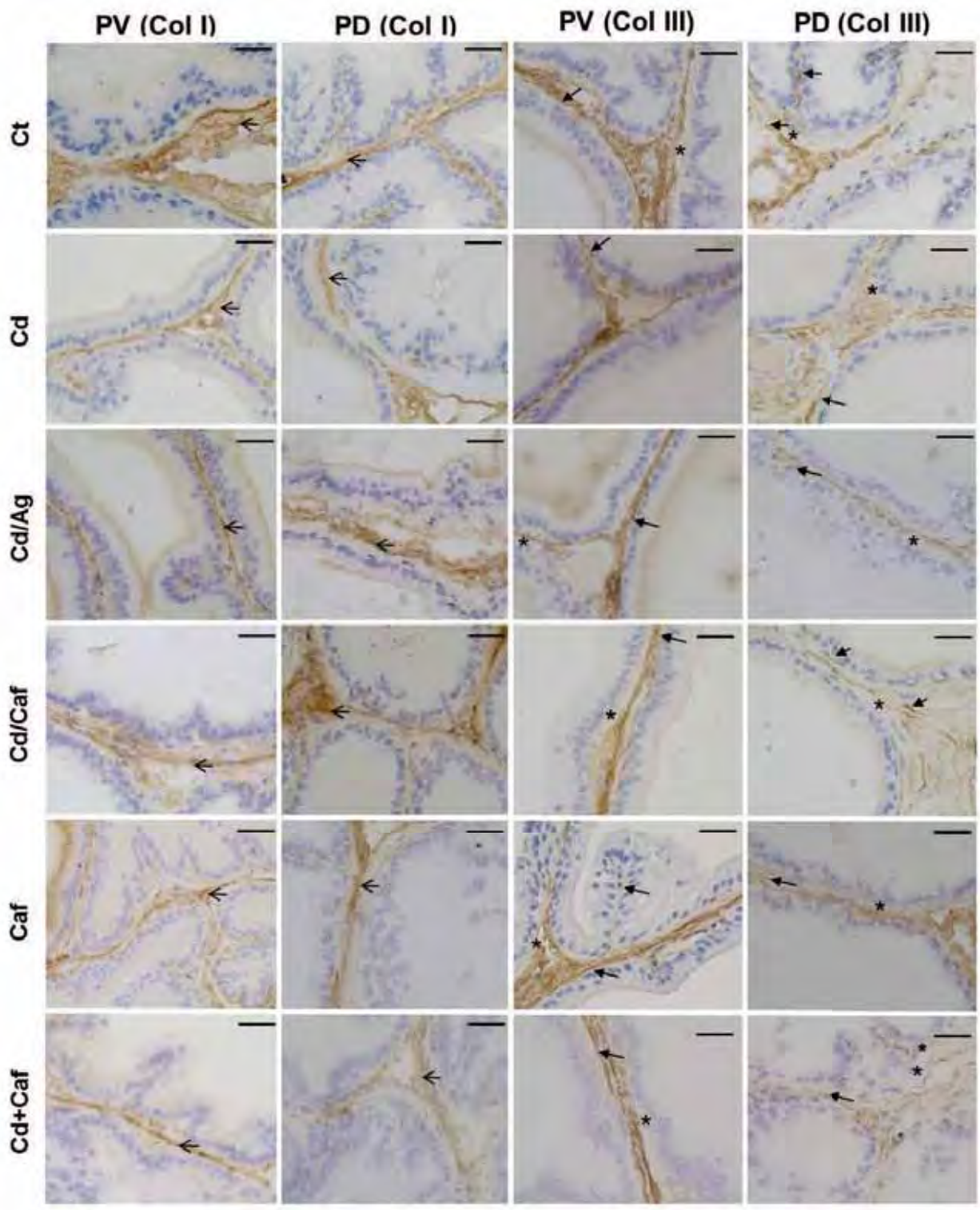

PV (Col I)
PD (Col I)
PV (Col III)
PD (Col III)
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caf
Caf
Cd+Caf

Figura 4. Eletromicrografias da região do estroma do lobo prostático ventral (PV) dos animais controle **(A,D)**, e tratados com cádmio **(C,E)**, cafeína **(F)** e cádmio mais cafeína **(B,G)**. (**A)** Observe a compacta camada de células musculares lisas (CML) com pouca ou nenhuma organela de síntese, corpos/placas densas (cabeça de seta) e com sarcolema retilíneo. Feixes de fibras colágenas (Col) e escassas fibras elaunínicas (setas) são observadas adjacentes ao fibroblasto (Fb) **(B-C)** e adjacentes à CML **(D-E)**. Fibras nervosas amielínicas (FA) **(E)**. **F-G** Feixes de fibras colágenas espessos na região intersticial. A ultra-estrutura do estroma da PV foi semelhante entre os grupos experimentais. (*), membrana basal; Ep, epitélio; N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso. Aumentos: A: 10.500X; B: 34.000X; C: 15.500X; D: 18.400X; E: 13.500X; F: 8.400X; G: 21.500X.

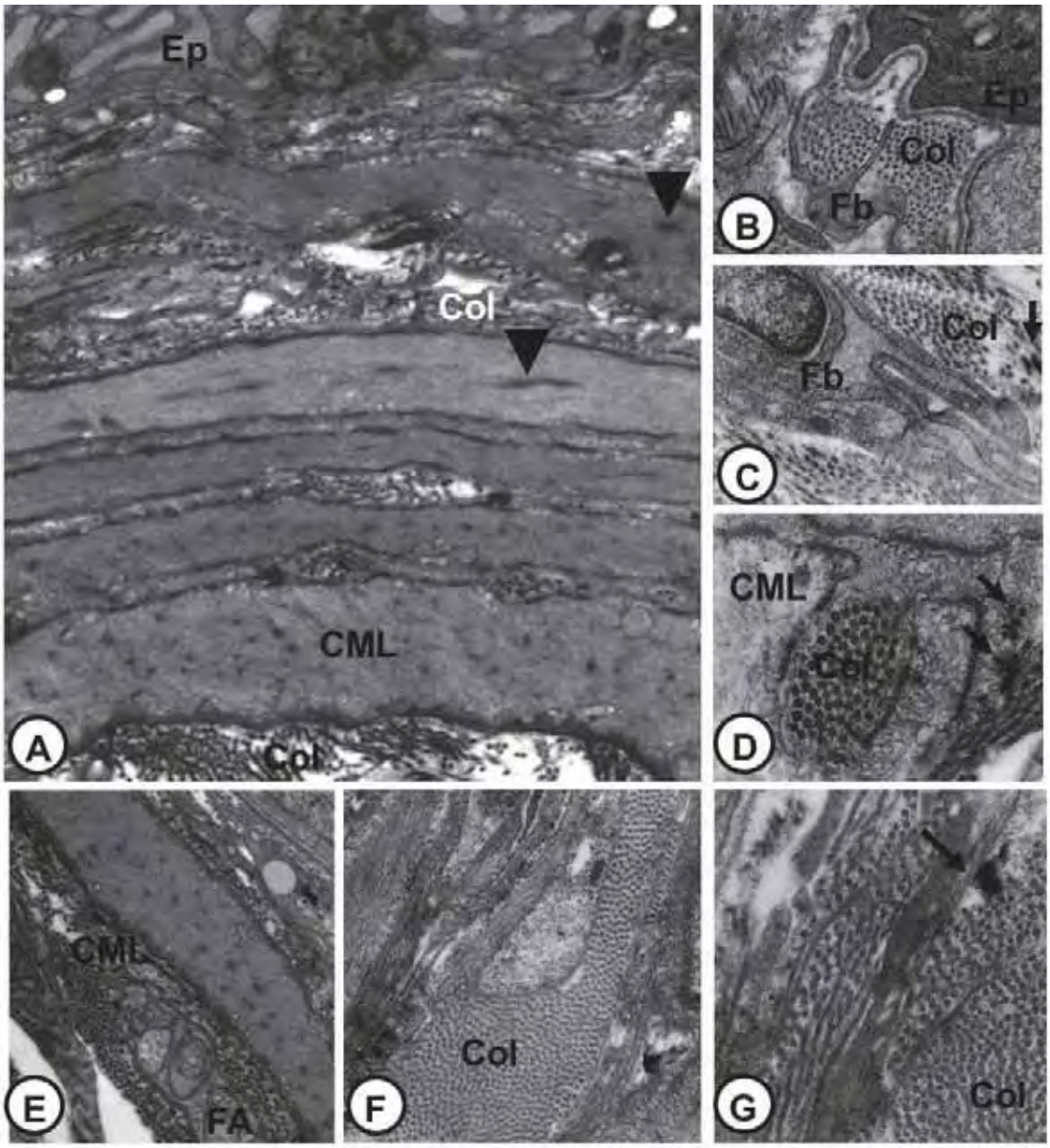

Ep
Col
CML
Col
A
Ep
Col
Fb
B
Col
Fb
C
CML
Col
D
CML
FA
E
Col
F
Col
G

Figura 5. Eletromicrografias da região do estroma do lobo prostático dorsal (PD) dos animais controle **(B)**, e tratados com cádmio **(C)**, cafeína **(D)** e cádmio mais cafeína **(A)**. **(A)** Observe a camada espessa de células musculares lisas (CML) sobrepostas. Entremeados às CML foram frequentes a presença de feixes de fibras colágenas (Col) além de fibroblastos (Fb) com típico fenótipo secretor. CML com sarcolema irregular **(B)**. **(C)** Fibra elaunínica com deposição de elastina distribuída entre os feixes de fibras colágenas e fibroblastos. **(D)** Cavéolas (setas) das CML e fibras colágenas. A ultra-estrutura do estroma da PD foi semelhante entre os grupos experimentais. N, núcleo com cromatina descondensada; RER, retículo endoplasmático rugoso; cabeça-da-seta, corpo/placa densa da CML. Aumentos: A: 4600X; B: 2700X; C: 11.500X; D: 18.500X.

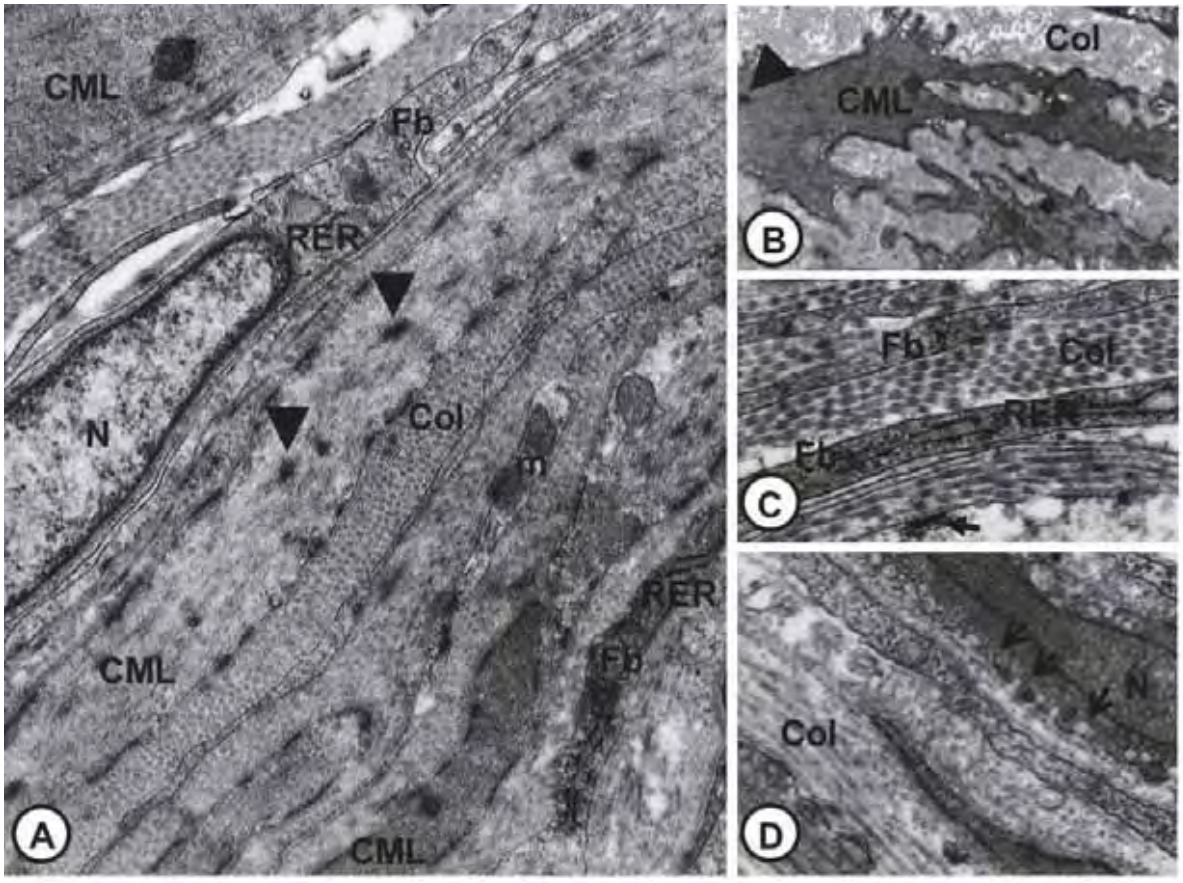
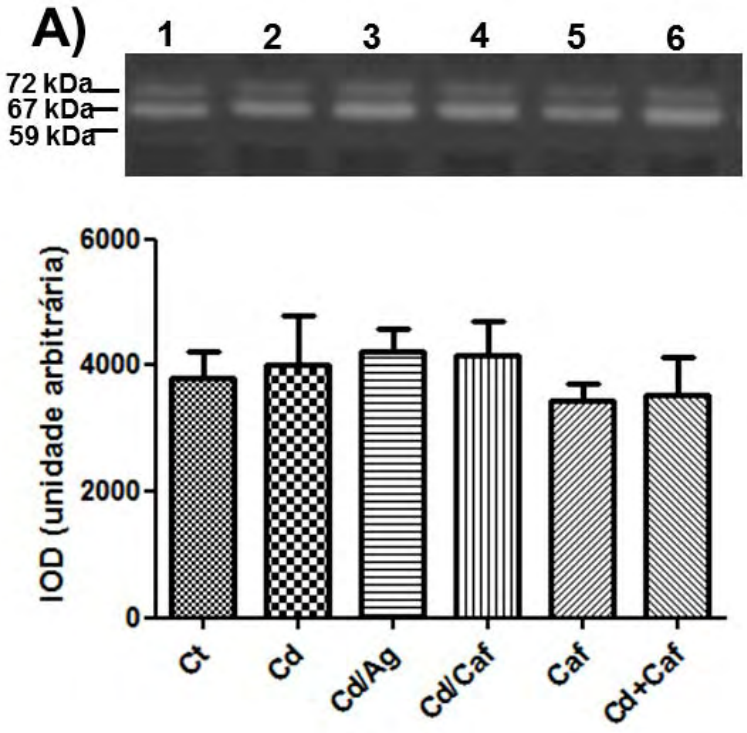

CML
Fb
RER
N
Col
m
RER
Fb
CML
CML
A
Col
CML
B
Fb
Col
RER
Fb
C
N
Col
D

Figura 6. Zimografia representativa da atividade da MMP -2 nos lobos prostático ventral (PV) e dorsal (PD) de animais controle (1) e tratados com cádmio (2), cádmio/água (3), cádmio/cafeína (4), cafeína (5) e cádmio mais cafeína (6). **(A)** Extratos de PV mostrando atividade das formas pró-MMP-2 com 72 kDa, intermediária da MMP-2 com 67 kDa e ativa da MMP-2 com 59 kDa. . **(B)** Extratos de PD mostrando atividade da forma intermediária da MMP-2 com 67 kDa. Também para a PD, não houve diferença significativa na densitometria da MMP-2 entre os grupos experimentais.


A)
1
2
3
4
5
6
72 kDa
67 kDa
59 kDa
IOD (unidade arbitrária)
6000
4000
2000
0
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caf
Caf
Cd+Caf

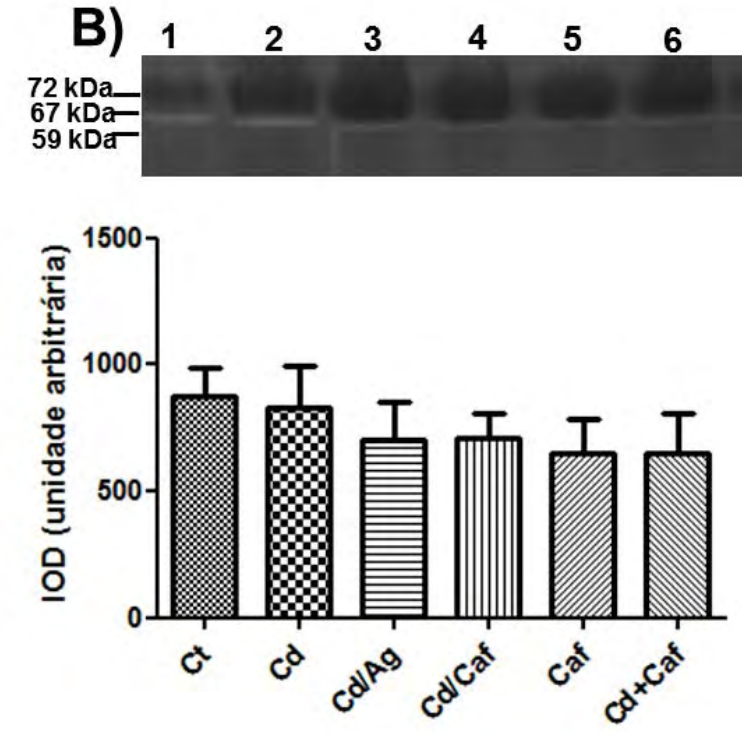
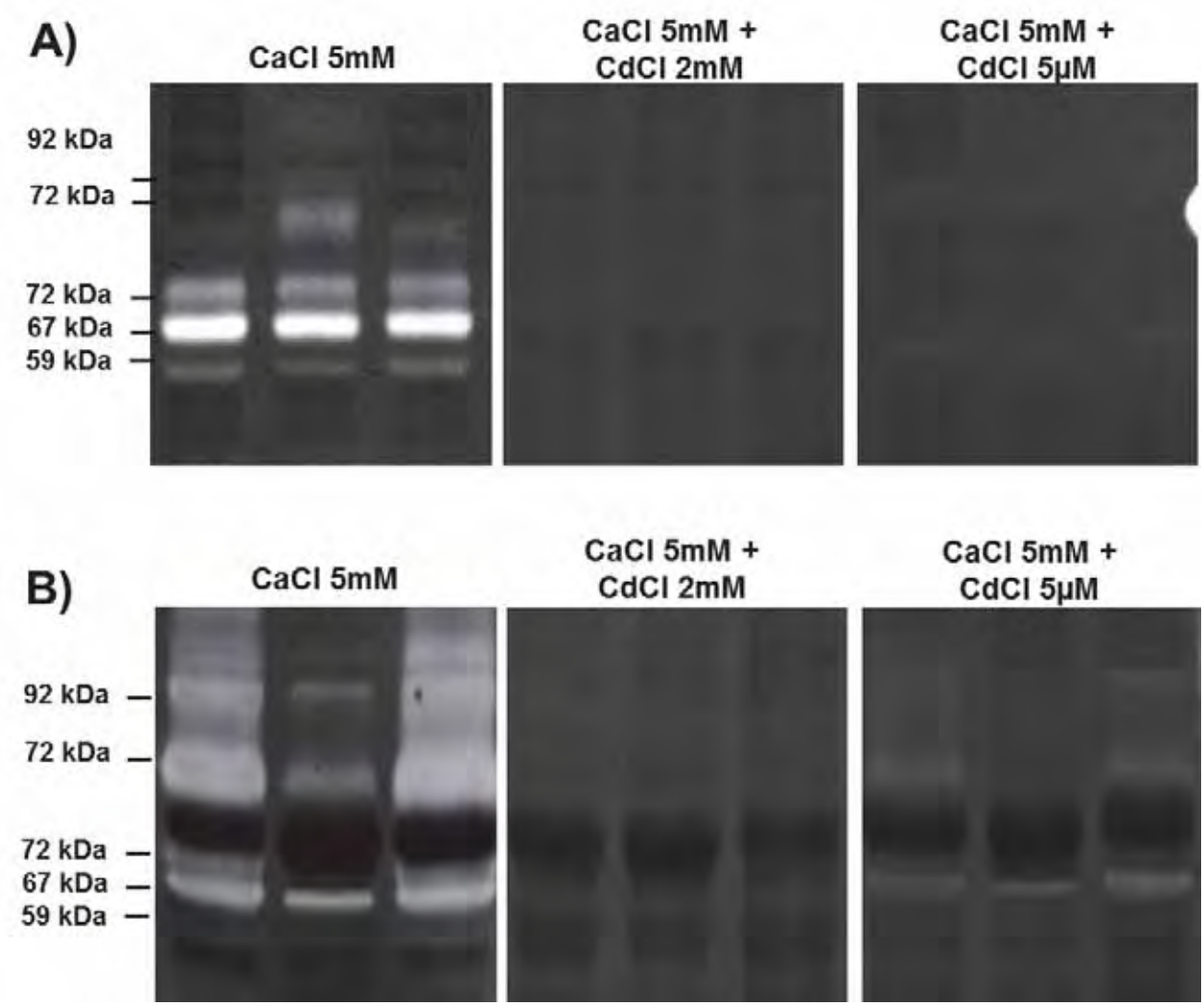

B)
1
2
3
4
5
6
72 kDa
67 kDa
59 kDa
IOD (unidade arbitrária)
1500
1000
500
0
Ct
Cd
Cd/Ag
Cd/Caf
Caf
Cd+Caf

Figura 7. Zimografia representativa de extratos protéico da PV e da PD (B) de animais controle. Os géis foram incubados com diferentes concentrações de cloreto de cádmio. Diferentes Padrões de bandas das enzimas MMP -2 e -9 são encontrados quando os géis de zimografia são incubados com o tampão padrão contendo apenas cloreto de cálcio a 5mM ou quando são incubados com o cádmio a 5mM (ausência de atividade gelatinolítica) ou a 5μM (menor atividade das enzimas) (setas).


A)
CaCl 5mM
CaCl 5mM +
CdCl 2mM
CaCl 5mM +
CdCl 5µM
92 kDa
72 kDa
72 kDa
67 kDa
59 kDa
B)
CaCl 5mM
CaCl 5mM +
CdCl 2mM
CaCl 5mM +
CdCl 5µM
92 kDa
72 kDa
72 kDa
67 kDa
59 kDa

ACCEPTED MANUSCRIPT

Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis

Livia M. Lacorte [1], Fabio R. F. Seiva[3], Jaqueline C. Rinaldi[1], Flavia K. Delella[1], Andrei Moroz[1], Carolina Sarobo[1], Antonio F. Godinho[2], Wagner J. Fávaro[4], Ana A. H. Fernandes[3], Sérgio L. Felisbino[1]

[1]Department of Morphology, Institute of Biosciences – Univ Estadual Paulista [2]CEATOX, Institute of Biosciences – Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil

[3]Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences – Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil

[4]Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology – University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo, Brazil

Financial support from FAPESP (grans 09/52747-7) and CAPES do Brazil is gratefully acknowledged. L.M.L. was the recipient of a FAPESP fellowship (09/50850-5).

*Corresponding author: Sérgio L. Felisbino Ph.D., Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3880 0474

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of caffeine (20 mg/L) intake on cadmium (15 mg/L) accumulation in the rat blood, testes, epididymis and prostate as well as cadmium-induced changes to the antioxidant defense system of the epididymis. Caffeine reduced the cadmium concentration in all tissues analyzed. Meanwhile, cadmium reduced catalase activity and increased superoxide dismutase (SOD) activity in the epididymis. Caffeine increased SOD activity, catalase and glutathione tissue expression and sustains the cadmium's effect on catalase and GSP-Px activity. No differences in the expression of metallothionein and lipid peroxidation were observed among the different treatments in the epididymis. In conclusion, low doses of cadmium alter the antioxidant enzymatic profile of the epididymis, but not induced oxidative lipid damage. Caffeine intake reduces overall cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis, thus exerting a protective effect against this metal.

Keywords: cadmium, caffeine, accumulation, oxidative stress, male reproductive tract.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

1. Introduction

Cadmium is a heavy metal that has shown diverse toxicity in various organs of humans and animals and is classified as a human carcinogen by the World Health Organization´s International Agency for Research on Cancer [1]. Cadmium is an industrial and environmental pollutant that is widespread due to an increasing use of cadmium in mining, smelting, electroplating, battery manufacturing, pigments and plastics [1] besides contaminants also are found in drinking water, food and in the tobacco smoke [2].

It is known that long-term cadmium exposure is harmful to the male reproductive tract organs, and cadmium exposure is associated with reduced male fertility because cadmium has been shown to reduce sperm count and cause poor semen quality in men [3]. Experimental studies have demonstrated that cadmium treatment causes a significant decrease in the weight of the testes and epididymis, reduces sperm concentration and motility [4] and induces prostatic epithelial neoplasia [5-7]. These studies illustrate the vulnerability of the male reproductive tract organs to cadmium toxicity; however, the mechanisms of cadmium-induced toxicity are still not well understood.

In general, cadmium toxicity occurs after cellular uptake and accumulation in the tissue. Cadmium forms complexes with small peptides and proteins through sulfhydryl groups (-SH), such as glutathione (GSH) [8], or with high affinity metal binding proteins, such as metallothionein (MT) [9], following intestinal (or pulmonary) absorption. In the blood, these complexes bind to the surface of red cells and are transported throughout the organism [10]. Other mechanism responsible for cadmium accumulation inside the cell is found when cadmium replaces homologous functional divalent cations in calcium channels [11] and zinc transport proteins [10].

Although cadmium has been demonstrated to be a weak direct mutagenic agent, it might induce tumors indirectly by interfering with the tight regulation of the cellular redox potential and

ACCEPTED MANUSCRIPT

antioxidant defense system, which protects the cell against free radical and reactive oxygen species (ROS) that can cause oxidative damage to lipids, proteins and DNA [4,12,13]. The components of these defense systems can be divided into two categories: antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and small endogenous antioxidant molecules, such as glutathione (GSH) [14]. Some studies have shown that cadmium induces an increase in lipid peroxidation in rat testes and decreases the activity of antioxidant enzymes, which implicates cadmium in oxidative stress [14-15].

Therefore, it is reasonable to hypothesize that dietary components that improve the activity of the antioxidant defense system or reduce metal absorption may decrease cadmium-induced toxicity in the organism.

Caffeine (1,3,7-trimethylxantine) is a natural stimulatory compound that is ubiquitously present in many plants, including cocoa beans, coffee beans, cola nuts and tea leaves. Caffeine is commonly used as a stimulant to prevent sleepiness and is found in several pain medicines. Because of its frequent and common consumption in tea, coffee and soft drinks, caffeine is likely the most ingested neuroactive drug in the world [16]. Caffeine intake has been associated with protection against cardiovascular disease, diabetes mellitus, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and DNA damage [17]. Some studies have shown that caffeine acts as an antioxidant in the liver, kidney, lens and brain because it reduces lipid peroxidation and increases the concentration and activity of antioxidant enzymes [18-20].

However, others studies have shown controversial effects of caffeine on mineral homeostasis and on the retention and balance of essential elements. For example, caffeine consumption has been reported to decrease bone mineral density [21], increase the risk of hip fracture, and negatively influence calcium retention [22]. In contrast, other studies have not supported these effects on calcium metabolism [23]. In rats, caffeine led to a negative metabolic

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

balance of potassium, zinc, sodium and phosphorus, which was concluded because these minerals were increased in the urine, while the metabolic balance of calcium was unaffected [24].

Because co-exposure is a natural condition in most organisms, our study is the first one to evaluate the effects of caffeine intake on the tissue accumulation of cadmium and on cadmium-induced oxidative stress in the epididymis. The epididymis was chosen because it plays a major role in sperm maturation and storage and accumulates high concentrations of cadmium.

2. Material and methods

2.1 Animals and treatment

Four-week-old male *Wistar* rats were housed in cages (3 rats/cage) under controlled temperature (20-22°C) and lighting conditions. Animals were obtained from the Central Stock breeder of São Paulo State University (UNESP; Botucatu, SP, Brazil). The animals were fed a standard pellet diet and water *ad libitum*. Experimental protocols met the "Guidelines of Animal Experimentation" approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation (Protocol number 139/2009-CEEA) at the Institute of Biosciences, UNESP. After 7 days of acclimatization, the animals were randomized into four experimental groups, each consisting of 6 animals. The control rats (Ct group) received tap water, and the other groups of rats received 15 ppm of cadmium (administered as $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$; Sigma™) (Cd group), 20 mg/L caffeine (Sigma™) (Caff group) or 15 ppm of cadmium + 20 mg/L of caffeine (Cd+Caff group) dissolved in tap water. The cadmium dose was chosen based on literature data, which mimics environmental exposure [6-7]. The caffeine dose was chosen to simulate moderate human caffeine consumption [16]. All animals were observed daily for clinical signs. The rats were weighed weekly, and their food and water consumption was measured daily.

After 20 weeks of exposure, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of a 2:1 solution of ketamine hydrochloride at 50 mg/mL and xylazine hydrochloride at 20 mg/mL

ACCEPTED MANUSCRIPT

at a dose of (0.1 mL/100g). Blood samples were collected by cardiac puncture in heparinized tubes and plasma was separated by centrifugation at 2000 rpm for 20 min at 4ºC. Tubes without anticoagulant were used to collect whole blood. Samples of plasma were frozen at -20°C until hormone analysis and whole blood samples were immediately processed for cadmium concentration. The testes, epididymis and ventral and dorsolateral prostates were removed and weighed. The left and right organs were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the analyses were performed. The liver was used as a positive control because cadmium primarily accumulates in the liver [25].

2.2 Hormone Assay

Plasma testosterone (T) concentrations were determined using chemiluminescence (VITROS ECi-Johnson and Johnson Ultra-Sensitive Chemiluminescence analysis). The sensitivity of this assay was 0.02 ng/mL for T.

2.3 Measurement of the cadmium concentration

Samples of the liver, testes, epididymis and ventral and dorsolateral prostatic lobes were dried at 105 ºC for 24 h and weighted. Dried samples and 4 mL of blood were digested with concentrated nitric acid (Merck, 65%) at 120 °C in a microwave (PROVECTO™, Model DGT 100 Plus: 5 min at 450 W, 5 min at 600 W, 6 min at 750 W, 5 min at 400 W, and 5 min at 0 W). The cadmium concentration was determined using the flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) technique (spectrophotometer GBC™, Model 932 AA, cadmium detection limit = 0.01 ppm) according to previously described methods [26]. Analyses were optimized by cadmium hollow cathode lamps (LCO), and the equipment was calibrated using metal stock solution (1000 ppm). The limit of quantification (LOQ) for cadmium was 0.015 µg/g calculated based on the analytical solution quantification limit (ASQL) of the analytical portion and dilution of the

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

analytical portion. The concentration of cadmium was expressed as micrograms of metal per gram of dry tissue and as micrograms per mL in the blood. All of the samples were analyzed in triplicate.

2.4 Antioxidant enzyme activity assessment

Epididymis samples (200 mg) were homogenized in 5 mL of a cold 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. Tissue homogenates were prepared in a motor-driven teflon glass Potter Elvehjem, tissue homogenizer (1 min at 100 g). The homogenate was centrifuged at 10000g for 10 min. The supernatant was analyzed for total protein [27], lipid hydroperoxide (LH), and antioxidant enzyme levels.

Lipid hydroperoxide was determined using 100 µL of sample and 900 µL of a reaction mixture containing 0.25 mM $FeSO_4$, 25 mM H_2SO_4, 0.1 mM xylenol orange, and 4 mM butylated hydroxytoluene in 90% (v/v) methanol [28]. The absorbance, at 560nm, was obtained using Pharmacia Biotech spectrophotometer with temperature-controlled (UV/visible Ultrospec 5,000 with Swift II applications software to computer control, 97-4213, Cambridge, England, UK).

Glutathione peroxidase (E.C.1.11.1.9.) activity was assayed using phosphate buffer 0.15 M, pH 7.0, 5 mM EDTA, 0.0084 M NADPH, 4 µg GSSG-reductase, 1.125 M NaN3 (sodium azide) and 0.15 M GSH in a total volume of 0.3 mL [29]. Catalase (E.C.1.11.1.6.) activity was determined using 50 mM phosphate buffer pH 7.0 and 10 mM hydrogen peroxide at 240 nm [30]. Superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1.) activity was measured using ($O_2^{\bullet -}$) mediated nitro blue tetrazolium (NBT) by $O_2^{\bullet -}$ to blue formazan, which was measured at 560. The complete reaction system consisted of 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 50 µM NBT, 78 µM NADH, and 3.3 µM phenazine methosulfate (PMS). One unit of SOD was defined as the amount of protein needed to decrease the reference rate to 50% of maximum inhibition [31].

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Enzyme activities were measured at 25°C using a microplate reader (μQuant-MQX 200 with Kcjunior software; Bio-Tec Instruments, Winooski, VT). All chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.5 Western Blot Analysis

Frozen samples from epididymis from each experimental group were mechanically homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc.; Lucerne, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, plus 0.25% Triton-X 100 for 30 sec at 4°C and centrifuged. The protein was extracted from the supernatant and quantified using the Bradford assay [32]. A protein sample (70 μg) was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Sigma Co. Saint Louis, MO, USA). The membrane was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 1 h. The blot was incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies: SOD, rabbit polyclonal ab13533 (Abcam™); CAT, rabbit polyclonal ab16731 (Abcam™); GSH, mouse monoclonal ab19534 (Abcam™); MT, rabbit polyclonal sc11377 (Santa Cruz Biotechnology™) for all MT isoforms; and goat polyclonal anti-beta actin (Santa Cruz Biotechnology™); all antibodies were diluted in 1% BSA to the manufacturer's recommended concentration (1:500, 1:750, 1:1000, 1:200 and 1:1000, respectively). The membranes were washed 5 times for 5 min in TBS-T and incubated for 2 h at room temperature with respective peroxidase-conjugated secondary antibodies. After washing in TBS-T, the membranes were visualized using a chemiluminescence substrate kit (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent; Thermo Scientific™) according to the manufacturer's instructions, and the ECL signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare™). The integrated optical densities (IODs) of the target protein bands were measured using ImageJ, which was downloaded from the NIH website (http://rsb.info.nih.gov.ij/), to

ACCEPTED MANUSCRIPT

compare the protein levels. Catalase, GSH and SOD expression were normalized to the β-actin values. The normalized data are expressed as the means ± SD.

2.6 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using an analysis of variance (ANOVA) performed using INSTAT software (version 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA). The data are expressed as the means ± standard deviation (SD). Comparisons were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Food and water consumption

No significant differences were observed in the water and food intake for the 20 weeks of the study, and final body weights were similar between experimental animals (Table 1). The mean daily intake (calculated based on water intake) for the 1st, 10th and 20th weeks were 3.0, 1.6 and 1.3 mg cadmium/kg body weight and 4.5, 2.1 and 1.8 mg caffeine/kg body weight, respectively. These values were obtained using the following formula: water consumed per day (mL) × treatment dose ÷ rat weight (kg). During the experiment, the cadmium-treated rats did not show behavior or clinical signals related to systemic intoxication, such as weight loss, weakness, diarrhea and dyspnea. The plasma testosterone level was not significantly different in the Cd group than in the Ct group, but it was significantly increased in the Caff group ($p < 0.05$) and slightly increased in Cd-Caff group (Table 1).

3.2 Cadmium concentration

Exposure to low doses of cadmium for 20 weeks was adequate to accumulate cadmium in all organs analyzed. Figure 1 shows that oral exposure to cadmium significantly ($p < 0.01$) increased the accumulation of cadmium in the blood, liver, testes, epididymis and prostatic lobes.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

The trace level of cadmium detected in the blood plasma, liver, testes, epididymis and prostatic lobes in the Ct and Caff groups is most likely due to food and water contamination because the feed and water are not free of trace amounts of heavy metals.

In the group of rats that was subjected to cadmium and caffeine, the cadmium concentrations were significantly decreased ($p < 0.01$) in all organs studied compared to the Cd group (Figure 1). The cadmium concentrations in the blood plasma, liver, testes, dorsolateral and ventral prostatic lobes and epididymis from the Cd+Caff group were approximately 35%, 35%, 35%, 55%, 22%, 35%, respectively, of the cadmium concentrations observed in the Cd group (Figure 1).

3.3 Epididymal oxidative stress

The lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities of SOD, CAT and GSH-Px in the epididymis are listed in Table 2. Cadmium exposure significantly ($p < 0.05$) decreased the total protein concentration and CAT activity and increased the SOD activity compared to the Ct group. Caffeine exposure significantly increased ($p < 0.05$) SOD activity compared to the Ct group and CAT activity compared to the Cd group. No significant differences were detected in GSH-Px activity or LH among the experimental groups.

3.4 Western Blotting

The expression of CAT, GSH SOD and MT in the epididymal tissue from the different experimental groups was evaluated by western blot (Figure 2). The expression levels of CAT and GSH in the epididymis were significantly increased in the Caff and Cd+Caff groups (Figures 2B-C), and SOD was increased in the Cd and Caff groups (Figure 2D) while MT were unchanged (Figure 2E).

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

4. Discussion

This study was designed to assess the effects of caffeine intake on cadmium accumulation in rat tissues and on cadmium-induced oxidative damage in the rat epididymis after long-term exposure to low doses of this metal. Our results demonstrate that caffeine coadministration reduced the levels of cadmium in all organs studied, as well as in the blood, exhibiting a protective effect against cadmium accumulation. Studies have demonstrated that caffeine can bind and maintain interactions with some divalent ions, such as cadmium, mercury, strontium and barium, through bonds with O and N atoms [33,34]. Thus, caffeine could reduce cadmium accumulation levels by binding directly to cadmium, reducing its cellular uptake and increasing its urinary excretion. However, further studies are needed to determine whether caffeine increases the excretion of cadmium in urine.

Caffeine co-administration suppressed the effect of cadmium-induced fetal ectrodactyly [35]. Although these authors did not measure tissue cadmium concentration or tissue MT expression, they suggested that caffeine might indirectly increase the levels of MT synthesis in liver and kidney via increased corticosterone release. In fact, MT expression has been reported to be increased by various hormones [36, 37], and caffeine intake increases levels of corticosterone and testosterone [38,39]. However, a previous study showed that caffeine treatment decreases the zinc and metallothionein levels in the hearts of newborn and adult rats but not in the liver [40]. In our study, caffeine increased the testosterone plasma levels, but MT expression was not increased in the epididymis tissue. In this sense, the effects of caffeine, whether direct or indirect, on MT expression are inconsistent and appear to be tissue specific. In contrast to the results of other studies, we found no increase in MT expression in the epididymis of cadmium-treated animals [37]. This result highlights the importance of the route, dose and duration of the cadmium exposure and tissue analyzed, which vary greatly across studies. However, we cannot rule out the

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

possibility that MT expression was increased at early time points in the experiment or in other tissues, such as the liver, kidney and blood plasma, among the different experimental groups.

Similarly to MT, GSH plays an important role in several cellular functions, including detoxification [41]. Our results demonstrated that caffeine intake increased the tissue expression of the GSH in the epididymis in both the Caff and Cd+Caff groups. Cadmium can form a complex with GSH, and this complex is readily eliminated by the multidrug resistance protein (MRP) transporter [8, 42]. Thus, caffeine could decrease cadmium tissue accumulation by increasing GSH expression, as observed in the epididymis, which may be the main mechanism of its protective effect against cadmium accumulation. Future studies should address whether caffeine increases GSH expression in other tissues.

Cadmium is known to induce the production of ROS such as hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$), superoxide anion radicals ($O_2^{\bullet -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [13-15]. We chose to analyze the lipid hydroperoxide and antioxidant enzyme activities in the epididymis because a high level of cadmium accumulated in this organ despite the presence of the blood-testicular/epididymal barrier [37]. Furthermore, because spermatozoa are stored in the epididymis, toxic agent-induced ROS can cause serious reproductive damage [37]. Acute cadmium exposure causes a significant increase in lipid peroxidation in the liver, kidney, testes and blood from rats and decreases SOD, GSH-Px and CAT activity [14,15]. Our results showed no significant differences in lipid hydroperoxide concentrations in the epididymis after long-term exposure to low doses of cadmium. However, consistent with a previous similar study [6], our results showed a significant increase in SOD activity and tissue expression and a significant decrease in CAT activity. SOD is an important defense enzyme that catalyzes the dismutation of $O_2^{\bullet -}$, which produces H_2O_2 that is converted to H_2O and molecular oxygen by catalase [43]. Although CAT activity has been inhibited by cadmium, its expression appeared not to be altered. It is possible that the inhibited activity may be correlated with the displacement of endogenous metals (co-factors from the active

ACCEPTED MANUSCRIPT

sites) by cadmium [25]. However, even with diminished catalase activity, the LH content remained similar to that in the Ct group, suggesting that most of the H_2O_2 produced had been neutralized by available CAT and GSH-Px. Another possibility is that non-enzymatic defenses, such as glutathione, α-tocopherol (vitamin E), and ascorbate (vitamin C), are able to compete with oxidizable substrates and thus delay or inhibit the oxidation of these substrates [12].

Glutathione peroxidase (GSH-Px) is a known H_2O_2 and hydroperoxide scavenger, and in conjunction with other enzymes, such as glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), these enzymes play an important role in the detoxification of ROS [44-45]. Our results showed no statistically significant alterations in GSH-Px activity among the experimental groups, although lower activity was observed in the Cd group than in the control animals. It is possible that a decreased GSH-Px activity is related to cadmium binding to free –SH groups, which reduces the bioavailability of glutathione, a necessary substrate for GSH-Px activity [45].

Caffeine has also been investigated as an $OH^{\bullet}$ radical scavenger [19]. In our study, which used a moderate dose of caffeine to simulate the daily caffeine ingestion common in humans; we showed that caffeine alone increases SOD, CAT and GSH tissue expression and SOD activity; in the co-administration with cadmium, caffeine increases CAT and GSH tissue expression and also sustains CAT and GSP-Px activity. Together, these results suggest that caffeine also exhibits a protective antioxidant action against cellular damage induced by cadmium. This suggestion is consistent with the findings of previous studies from other groups [18-20].

In conclusion, long-term exposure to low doses of cadmium alters the antioxidant enzymatic profile of the epididymis but does not induce oxidative damage. In the co-administration with cadmium the caffeine intake reduces cadmium accumulation, sustains antioxidant enzymes activity and enhances the levels of antioxidant protein expression, exerting a protective effect against cadmium toxicity.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Acknowledgments

This study was supported by São Paulo Research Foundation, grants n° 09/52747-7 and 09/50850-5. This article represents part of the PhD thesis developed by LML to the Institute of Biosciences (UNESP), Brazil.

References

[1] IARC (International Agency for Research on Cancer). Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum Available: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol58/index.php [accessed 10 January 2012] 1993;58:1-444.

[2] Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. Environ Health Perspect 2010;118:182-90.

[3] Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. Mutat Res 2003;533:107-20.

[4] El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. Food Chem Toxicol 2004;42:1563-71.

[5] Arriazu R, Pozuelo JM, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Quantitative and immunohistochemical evaluation of PCNA, androgen, receptors, apoptosis, and glutathione-S-transferase P1 on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the rat ventral prostate. The Prostate 2005;63:347-57.

[6] Alvarez SM, Gomez NN, Scardapane L, Zirulnik F, Martinez D, Gimenez MS. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. Toxicol Lett 2004;153:365-76.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

[7] Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Pinheiro PFF, Amorim RL, Felisbino SL. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. Microsc Res Tech 2011;74:988-97.

[8] Leverrier P, Montigny C, Garrigos M, Champeil P. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited. Anal Biochem 2007;371:215-28.

[9] Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. Cell Mol Life Sci 2002;59:627-47.

[10] He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. Toxicol Appl Pharmacol 2009;238:250-7.

[11] Leslie EM, Liu J, Klaassen CD, Waalkes MP. Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel cacnα1G in cadmium uptake. Mol Pharmacol 2002;69:629-39.

[12] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002;82:47-95.

[13] Waisberg M, Joseph P, Hale B, and Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology 2003;192:95-117.

[14] Ognjanović BI, Markovic SD, Đorđević NZ, Trbojević IS, Štajn AS, Saičić ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reprod Toxicol 2010;29:191-7.

[15] Saïd L, Banni M, Kerkeni A, Saïd K, Messaoudi I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. Food Chem Tox 2010;48:2759-65.

[16] Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Addit Contam 2003;20:1-30.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

[17] Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. Crit Rev Food Sci Nutr 2011;51:363-73.

[18] Inkielewicz-Stepniak I, Czarnowski W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. Food Chem Toxicol 2010:48:1607-11.

[19] Varma SD, Hegde KR. Prevention of oxidative damage to lens by caffeine. J Ocul Pharmacol Ther 2010;26:73-7.

[20] Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. Pharmacol Biochem Behav 2011;99:659-64.

[21] Barrett-Connor E, Chang JC, Edelstein SL. Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. JAMA 1994;271:280-3.

[22] Cumming RG, Klineberg RJ. Case-control study of risk factors for hip fractures in the elderly. Am J Epidemiol 1994;139:493-3.

[23] Hannan MT, Felson DT, Dawson-Hughes B, Tucker KL, Cupples LA,Wilson PW, Kiel DP. Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. J Bone Miner Res 2000;15:710-20.

[24] Yeh JK, Aloia JF, Semla HM, Chen SY. Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. J Nutr 1986;116:273-80.

[25] Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. Toxicol Appl Pharmacol 2003;186:163-88.

[26] Roberts CA, Clark JM. Improved determination of cadmium in blood and plasma by flameless atomic absorption spectroscopy. Bull Environ Contam Toxicol 1986;36:496-9.

[27] Lowry OH, Rosebrough NI, Fahr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

[28] Seiva FRF, Chuff LGA, Ebaid GMX, Silva T, Fernandes AAH, Novelli ELB. Calorimetry, morphometry, oxidative stress, and cardiac metabolic response to growth hormone treatment in obese and aged rats. Horm Metab Res 2011;43:1-7.

[29] Nakamura W, Hojoda S, Haayshi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidase. Biochem Biophys Acta 1974,358:251-60.

[30] Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editors. Methods of enzymatic analysis, New York: Academic Press; 1974, p. 673-677.

[31] Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. Anal Biochem 1995;232:243-8.

[32] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

[33] Nafisi S, Sadjadi AS, Zadeh SS, Damerchelli M. Interaction of metal ions with caffeine and theophylline: stability and structural features. J Biomol Dyn 2003;21:289-96.

[34] Farias RF, Silva AO, Silva Jr. UG. Synthesis, characterization and TG–DSC study of cadmium halides adducts with caffeine. Thermochim Acta 2003;406:245-8.

[35] Lutz J, Beck SL. Caffeine decreases the occurrence of cadmium-induced forelimb ectrodactyly in C57BL/6J mice. Teratology 2000;62:325-31.

[36] Waalkes MP, Goering PL. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. Chem Res Toxicol 1990; 3:281-8.

[37] Cyr DG, Dufresne J, Pillet S, Alfieri J, Hermo L. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. J Androl 2001;22:124-35.

[38] Patz MD, Day HEW, Burow A, Campeau S. Modulation of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis by caffeine. Psychoneuroendocrinology 2006;31:493-500.

[39] Celec P, Behuliak M. Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. J Psychopharmacol 2010;24:1569-72.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

[40] Rossowska MJ, Nakamoto T. Caffeine decreases zinc and metallothionein levels in heart of newborn and adult rats. Pediatr Res 1992;32:330-2.

[41] Shen Y, Sangiah S. Na+, K(+)-ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice. Arch Environ Contam Toxicol 1995;29:174-9.

[42] Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. Toxicol Appl Pharmacol 2005;204:238-55.

[43] Seiva FRF, Ebaid GMX, Castro AVB, Okoshi K, Nascimento A, Rocha KKH, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli ELB. Growth hormone and heart failure: Oxidative stress and energetic metabolism in rats. Growth Horm IGF Res 2008;18:275-83.

[44] Matés M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 2000;153:83-104.

[45] Shelly CL. Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspec Med 2009;30:42-59.

Legends of the Figures

Figure 1. Bar graphs showing the cadmium concentration in the blood (A), liver (B), testes (C), epididymis (D), ventral prostate (E) and dorsal prostate (F) of the different experimental groups. Similarly low concentrations of cadmium were detected in the control (Ct) and caffeine (Caff) groups in all tissues analyzed. As expected, high concentrations of cadmium were detected in the cadmium group (Cd) in all tissues analyzed. Notably, caffeine significantly reduced the cadmium concentration in all tissues in the animals in the cadmium plus caffeine group (Cd+Caff). The results are expressed as the means ! SD. Different superscript letters indicate statistically significant differences with $p < 0.05$.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 2. A) A representative western blot for catalase (CAT), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), metallothionein (MT) and beta-actin (β-actin) expression in the epididymis from control (Ct), cadmium (Cd), caffeine (Caff) and cadmium plus caffeine (Cd+Caff) experimental groups. B-D) Using a densitometric analysis, CAT, GSH, SOD and MT were normalized to β-actin and showed increased expression of CAT and GSH in the Caff and Cd+Caff groups. The expression of SOD appeared to increase in the Cd and Caff groups. The results are expressed as a fold increase.

* indicates statistically significant differences from the control group with $p < 0.05$.

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1. Biometric parameters of animals from different experimental groups.

Parameters	Experimental Groups			
	Ct	Cd	Caff	Cd+Caff
Body weight (g)				
1st week	128.31 ± 9.8	129.6 ± 9.9	130.58 ± 10.2	130.35 ± 7.9
10th week	356.75 ± 11.2	356.83 ± 12.9	373.92 ± 17.8	369.58 ± 14.1
20th week	499.79 ± 35.9	505.13 ± 32.9	520.90 ± 56.2	522.45 ± 47.9
Food intake (g/day)				
1st week	23.9 ± 1.9	23.5 ± 1.8	24.9 ± 2.2	23.7 ± 1.9
10th week	25.6 ± 2.3	25.8 ± 1.9	25.8 ± 1.8	24.9 ± 1.3
20th week	26.07 ± 1.7	26.04 ± 1.8	27.57 ± 1.6	26.61 ± 1.5
Water intake (mL/day)				
1st week	28.9 ± 2.3	26.6 ± 1.8	28.9 ± 2.8	27.1 ± 2.9
10th week	36.9 ± 4.3	37.8 ± 3.9	38.7 ± 4.8	37.5 ± 3.3
20th week	42.9 ± 7.3	39.9 ± 5.1	46.4 ± 6.8	41.8 ± 6.3
Plasma Testosterone (ng/dL)	134.17 ± 68.58[a]	149.0 ± 30.1[ab]	226.6 ± 41.57[b]	187.62 ± 72.1[ab]

Means ± SD. Different superscript letters means statistically significant difference with $p < 0.05$. Control (Ct); Exposed to cadmium (Cd); Exposed to caffeine (Caff); Co-exposed to cadmium and caffeine (Cd+Caff).

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

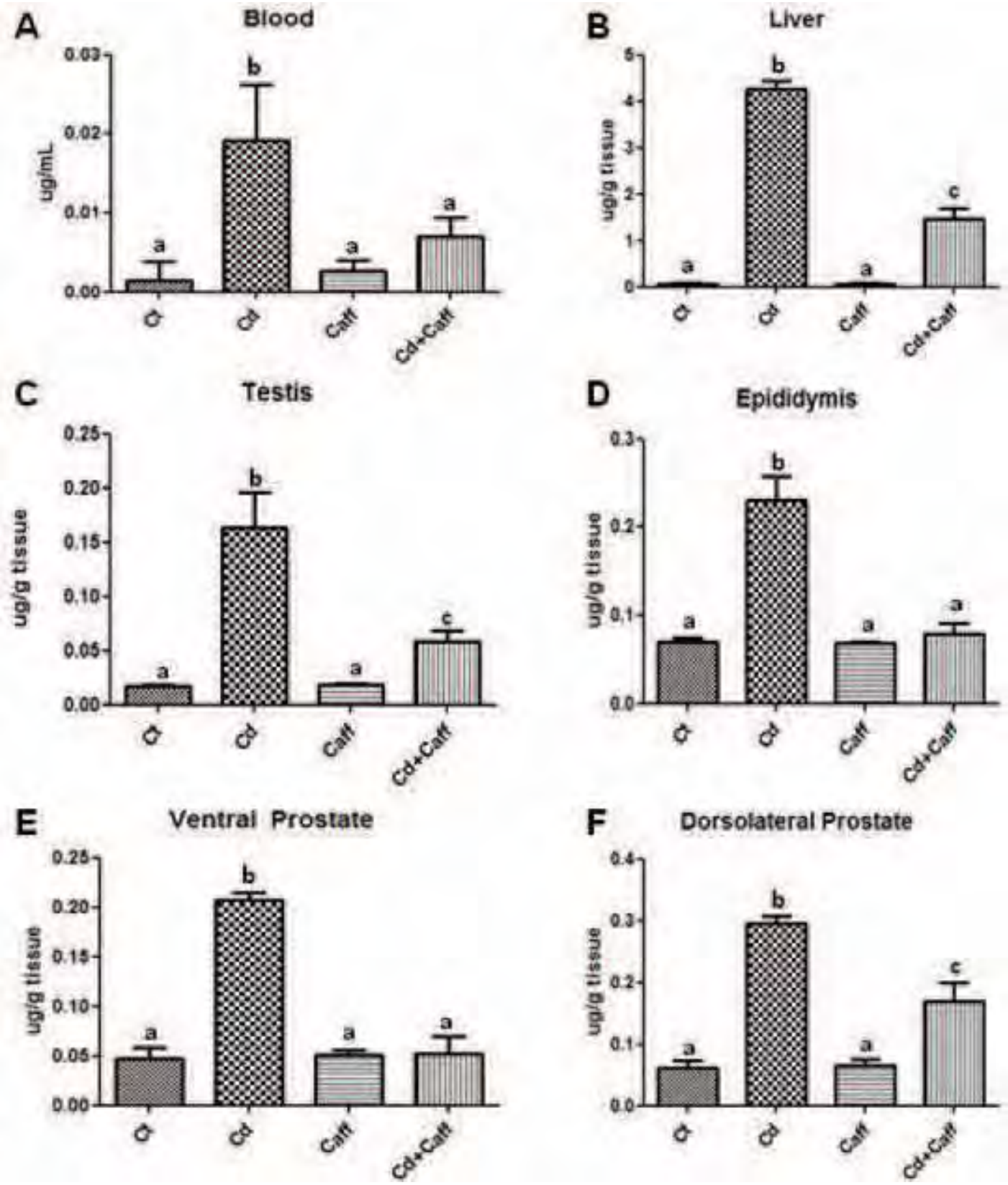
Table 2. Lipid hydroperoxide (LH) content and catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the rat epididymis from different experimental groups.

Parameters	Experimental Groups			
	Ct	Cd	Caff	Cd+Caff
LH (nmol/g tissue)	594.32 ± 49.89	586.78 ± 66.66	644.24 ± 78.62	630.65 ± 95.88
CAT (umol/g protein)	51.80 ± 9.34^{a}	32.56 ± 6.46^{b}	49.18 ± 4.76^{a}	39.87 ± 9.92^{ab}
SOD (nmol/mg protein)	2.04 ± 0.39^{a}	2.91 ± 0.42^{b}	2.95 ± 0.19^{b}	2.78 ± 0.3^{b}
GSH-Px (nmol/g protein)	4.89 ± 0.98	3.49 ± 1.39	4.43 ± 2.96	4.52 ± 1.31

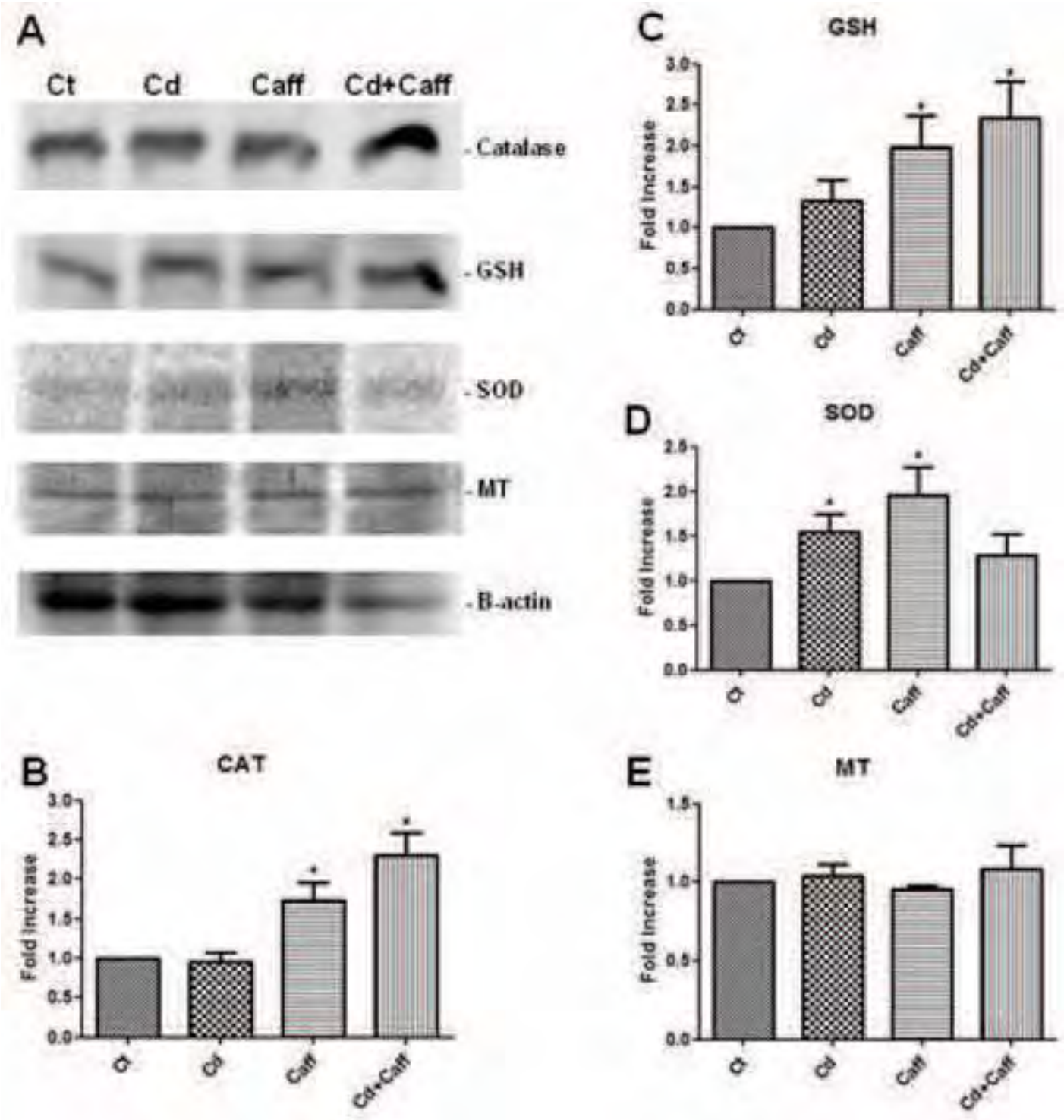
The values are presented as means ± SD. Different superscript letters indicate statistically significant differences with $p < 0.05$. Control (Ct); Exposed to cadmium (Cd); Exposed to caffeine (Caff); Co-exposed to cadmium and caffeine (Cd+Caff).

Accepted Manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT



ACCEPTED MANUSCRIPT



5. Conclusão

- O cádmio acumulou-se em todos os órgãos analisados, e diminuiu a acumulação do zinco nos lobos prostáticos ventral e dorsal. A cafeína exerceu um efeito protetor contra a acumulação do cádmio, quando co-administrados.

- A cafeína aumentou os níveis plasmáticos androgênicos. Futuros estudos para compreender estes efeitos em longo prazo são necessários.

- Nenhum dos tratamentos induziram neoplasias intra-epitelial e adenocarcinomas e não alteram a dinâmica dos elementos estromais celulares (células musculares lisas e fibroblastos) e fibrilares (fibras de colágeno). Entretanto, houve alterações morfológicas no epitélio glandular, da expressão proteica dos receptores de andrógeno.

6. Referências Bibliográficas (introdução)

Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MFD, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. Pharmacol Biochem Behav 2011; 99: 659-664.

Alvarez SM, Gomez NN, Scardapane L, Zirulnik F, Martinez D, Gimenez MS. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium. Toxicol Lett 2004;153: 365-376.

Antonio MT, Corpas I, Leret ML. Neurochemical changes in newborn rats' brain after gestational cadmium and lead exposure. Toxicol Lett 1999; 104: 1-9.

Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. J Androl. 2004; 25: 50-6.

Arab L, Blumberg JB. Introduction to the Proceedings of the Fourth International Scientific Symposium on Tea and Human Health. J Nutr. 2008; 138:1526S-1528S.

Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. Progr Drug Res 1987, 31; 273-313.

Arriazu R, Pozuelo JM, Henriques-Gil N, Perucho T, Martín R, Rodríguez R, Santamaría L. Immunohistochemical study of cell proliferation. Bcl-2, p53, and caspase-3 expression on preneoplastic changes induced by cadmium and zinc chloride in the ventral rat prostate. J Histoch Cytoch. 2006. 54:981–990.

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. The Priority List of Hazardous Substances. Disponível em http://www.atsdr.cdc.gov/spl, acessado em 20 de agosto de 2012.

Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory Sex gland. Int Ver of Citol 1990; 121: 127-231.

Badjatia N, Satyam A, Singh P, et al. Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. Urol Oncol 2010; 28:360-367.

Baker JA, McCann SE, Reid ME, Nowell S, Beehler GP, Moysich KB. Associations between black tea and coffee consumption and risk of lung cancer among current and former smokers. Nutr Cancer. 2005; 52: 15-21.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RYS, Sartor MA, Medvedovic M, Ho SM. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: Oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. Environ Health Perspct 2008; 116: 769-776.

Banzato TP, Godinho AF, Zacarin ECMS, Perobelli JE, Fernandez CDB, Favareto AAA, Kempinas WG. Sperm Quality in Adult Male Rats Exposed to Cadmium in Utero and Lactation. J Toxicol Environ Health A 2012; 75: 1047-1058.

Bayraktar N, Kilic S, Bayraktar MR, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. J Clin Lab Anal 2010; 24: 25-30.

Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. Mol Cell Endocrinol 2008; 288: 30–37.

Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie. 2006; 88: 1549-59.

Blanchard J, Sawers SJA. The absolute bioavailability of caffeine in man. Eur. J. Clin. Pharmacol 1983; 24: 93-98.

Bostwick DG. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. The most likely precursor of prostate cancer. Cancer 1995; 75: 1823-1836.

Brown-Borg HM, Bode AM, Bartke A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. Endocrine 1999; 11: 41-48.

Camargo MCR, Toledo MCF. Teor de cafeína em cafés brasileiros. Ciênc Tecnol Aliment 1998; 18: 4.

Celec P, Behuliak M. Behavioural and endocrine effects of chronic cola intake. J Psychopharmacol 2010; 24: 1569-1572.

Chou T. Wake up and smell the coffee. Caffeine, coffee, and the medical consequences. West J Med. 1992; 157: 544-53.

Cousins RJ, Blanchard RK, Moore JB, Cui L, Luizzi JP, Cao J, Bobo JA. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. J Nutr 2003; 133: 1521S-1526S.

Cunha GR, Bigsby RM, Coople PS, Sugmura Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. Cell Diff 1985; 17: 137-148.

Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. Acid phosphatase activity in gerbil (meriones unguiculatus) prostate: comparative study in female and male glands during postnatal development. Cell Biol Int 2004; 28: 335-344.

De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol 1999; 155: 1985-1992.

Deslypere JP, Young M, Wilson JD, MCaPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihdortestosterone interact with the androgen reCaPtor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. Moll Cell Endocrinol 1992; 88: 15-22.

Divekar SD, Storchan GB, Sperle K, Veselik DJ, Johnson E, Dakshanamurthy S, Lajiminmuhip YN, Nakles RE, Huang L, Martin MB. The role of calcium in the activation of estrogen receptor-alpha. Cancer Res 2011; 71: 1-11.

Donjacour AA, Cunha GR. Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-intensive mice. Endocrinol 1993; 132: 2342-2350.

Eblin KE, Hau AM, Jensen TJ, et al. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: acute studies. Toxicology 2008; 250: 47-54.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. Food Chem Toxicol 2004; 42: 1563-1571.

Elsbach P, Weiss P. A revaluation of the roles of O2- dependent and O2- independent microbicidal systems of phagocytes. Rev Infect Dis 1983; 5: 843-853.

Ezzat AR, El-Gohary ZM. Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabits. Funct Dev Morphol 1994; 4: 45-50.

Farnsworth WE. Prostate stroma: physiology. Prostate. 1999; 38: 60-72.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Cell Mol Life Sci. 2004; 61: 857-72.

Furtado KS, Prado MG, Aguiar E Silva MA, Dias MC, Rivelli DP, Rodrigues MA, Barbisan LF. Coffee and Caffeine Protect against Liver Injury Induced by Thioacetamide in Male Wistar Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012; 111: 339-47.

Gans JH. Comparative toxicities of dietary caffeine and theobromine in the rat. Food Chem Toxicol 1984; 22: 365-369.

Gass R. Benign prostatic hyperplasia: the oposite effects of alchol and coffee intake. BJU International 2002; 90: 649-654.

Glynn RJ, Campion EW, Bouchard GR, Silbert JE. The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Noprmative Aging Study. Am J Epidemiol 1985; 121: 78-90.

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 1996; 155: 81-93.

Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. Br J Urol 1997; 2: 18-26.

He L, Wang B, Hay EB, Nebert DW. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 238: 250-257.

He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode CS, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, bax, and caspase 3 pathways. Cancer Res 2005; 63: 4396-4401.

Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr 2006; 46: 101-123.

Ho E, Boileau TW, Bray TM. Dietary influences on endocrine-inflammatory interactions in prostate cancer development. Arch Biochem Biophys 2004; 428: 109-117.

Ho SM. Metal Ions as Endocrine Disruptors: Implications for Prostate Cancer In: Raz NK. Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems. 2004, United States of America, 2nd ed.

Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. Prostate 2002; 52: 213-235.

Hudson DL, Guy AT, Fry P, O´Hare MJ, Watt FM, Masters JRW. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: Identification of intermediate phenotypes by keratin expression. J Histochem Cytochem 2001; 49: 271-278.

Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M, Nakagawa H, Nogawa K. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai–itai disease. Toxicol Lett 2005; 159: 192-201.

Inkielewicz-Stepniak I, Czarnowski W. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. Food Chem Toxicol 2010; 48: 1607-1611.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. Câncer de próstata. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=339. Acesso em: 20 de setembro de 2012.

International Agency for Research on Cancer Monografhs, coffea, tea, mate, methilxantines and methilglyoxal. IARC Monograf. Eval Carcinogen Riskis Human 1991; 51: 1-513.

International Agency for Research on Cancer Monographs. Cadmium, IARC Press, Lyon 1993; 58: 119-238.

Irwin RJ, VanMouwerik M, Stevend L, Seese MD, Basham W,. Environmental Contaminants Encyclopedia 1997; National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Disponível em http://www.nature.nps.gov/toxic/cadmium.pdf , acessado em 15 de agosto de 2012.

Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. The Prostate, v.5, p. 545-57, 1984.

Ito K, Nakasato Y, Miyakawa K, Yamato Y, Ikeda M, Kisaki M. Caffeine induces G2/M arrest and apoptosis via a movel p53-dependent pathway in nb-4 promyelocytic leukemia cells. J Cell Physiol 2003; 196: 276-283.

Jarup P, Berglund J, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. Health effects of cadmium exposure – A review of the literature and a risk estimate. Environ Health 1998; 24: 1-51.

Joeres R, Klinker H, Heusler H, Epping J, Zilly W, Richter E. Influence of smoking on caffeine elimination in healthy volunteers and in patients with alcoholic liver cirrhosis. Hepatology 1988; 8: 575-579.

Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. Nature Med 2003; 9: 1081-1084.

Kjellström T, Nordberg GF. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. Environ. Res 1978; 16: 248-269.

Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, Sakata R, Fujita Y, Ichikawa S, Iwai N, Tamakoshi A. Coffee and risk of death from hepatocellular carcinoma in a large cohort study in Japan. Br J Cancer. 2005; 93: 607-10.

Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Pinheiro PFF, Amorim RL, Felisbino SL. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. Microsc Res Tech 2011; 74: 988-97.

Leav I, McNeal JE, Kwan PW, Komminoth P, Merk FB. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Prostate 1996; 29: 137-145.

Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka,S, Liao S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morfological and functional activities. Biol Reprod 1990; 43: 1079-1086.

Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. Endocrinol Metab Clin N Am 2011; 40: 565-575.

Leslie EM, Liu J, Klaassen CD, Waalkes MP. Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel cacnα1G in cadmium uptake. Mol Pharmacol 2002; 69: 629-639.

Lewis GP, Coughlin LL, Jusko WL, Hartz S. Contribuition of cigarret smoking to cadmium accumulation in man. The Lancet 1972; 299: 291-292.

Liu AY, True LD. Characterization of the prostate cell types by CD cell surface molecules. Am J Pathol 2002; 160: 37-43.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Develop Biol 2003; 253: 165-174.

Marquez N, Alvarez-Demanuel E P, Esquifino S, Lafuente AI. Chronic alternate or dialy cadmium exposure differentially affects its accumulation within the tissues. Effects of age. Toxicol Lett Suppl 1998; 95: 125.

Martín JJ, Martín R, Codesal J, Fraile B, Paniagua R, SantamaríaL. Cadmium chloride induced displastic changes in the ventral rat prostate: An immunohistochemical and quantitative study. Prostate 2001; 46: 11-20.

Mcneal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 1988; 12: 619-633.

McNeal JE. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. Urol Clin North Am. 1990; 17: 477-86.

Morrison AS. Risk factors for surgery for prostatic hypertrophy. Am J Epidemiol. 1992; 135: 974-80.

Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribuition and time-trends. Acta Oncol 1991; 30: 133-140.

Nawrot P, Jordan EJ, Rotstein J, Hughenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. Food Addit. Contam 2003; 20: 1-30.

Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. Prostate 1996; 28: 124-128.

Nomura M, Ichimatsu S, Moritani S, Koyama I, Dong Z, Yokogawa K, Myiamoto K. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and akt activation by the caffeine. Mol. Carcinog 2005; 44: 67-76.

Nordberg M. Studies on metallothionein and cadmium. Environ Res 1978; 15: 381-404.

Ogawa N, Ueki H. Clinical importance of caffeine dependence and abuse. Psychiatry Clin Neurosci. 2007; 61: 263-8.

Ognjanović BI, Markovic SD, Đorđević NZ, Trbojević IS, Štajn AS, Saičić ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reprod Toxicol 2010; 29: 191-197.

Okano J, Nagahara T, Matsumoto T, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008; 102: 543-551.

Patz MD, Day HEW, Burow A, Campeau S. Modulation of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis by caffeine. Psychoneuroendocrinology 2006; 31: 493-500.

Prins CG, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. Endocrinol 1991; 129: 3187-3199.

Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. Endocrinology. 1995; 136: 1303-14.

Qu W, Ke H, Pi J, Broderick D, French JE, Webber MM, Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells: Bcl-2 overexpression blocks the activation of JNK signal transduction pathway. Environ Health Perspec 2007; 115: 1094-1100.

Ranheim T, Halvorsen B. Coffee consumption and human health--beneficial or detrimental?--Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. Mol Nutr Food Res. 2005; 49: 274-84.

Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. Cell.Tissue Res 2005; 322: 173-181.

Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocr Relat Cancer 2004; 11: 225-254.

Saïd L, Banni M, Kerkeni A, Saïd K, Messaoudi I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. Food Chem Tox 2010; 48: 2759-2765.

Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Differentiation 2011; 82: 200-210.

Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R. Vascular anatomy of the rat ventral prostate. Anat Rec 1999; 256: 403-411.

Shafique K, McLoone P, Qureshi K, Leung H, Hart C, Morrison DS. Coffee consumption and prostate cancer risk: further evidence for inverse relationship. Nutr J 2012; 11: 42-49.

Shapiro E, Hartanto V, Lepor H. Quantifying the smooth muscle content of the prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis. J Urol. 1992; 147: 1167-70.

Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. Cancer Res 2004; 64: 2270-2305.

Shimazu T, Tsubono Y, Kuriyama S, Ohmori K, Koizumi Y, Nishino Y et al. Coffee consumption and the risk of primary liver cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. Int J Cancer 2005; 116: 150-154.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012; 62:10–29.

Signoretti S, Waltrengny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. Am J Pathol 2000; 157: 1769-1775.

Sung SY, Chung W. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. Differentiation 2002; 70: 506-521.

Temple JL. Caffeine use in children: What we know, what we have left to learn,

Timms BG, Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. Differentiation 2011: 82: 173-183.

van der Heul-Nieuwenhuijsen L, et al. Gene expression profiling of the human prostate zones. BJU Int 2006; 98: 886-897.

Varma SD, Hegde KR. Prevention of oxidative damage to lens by caffeine. J Ocul Pharmacol Ther 2010; 26: 73-77.

Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. Prostate 2000; 45:253-258.

Waalkes MP, Anver M, Diwan BA. Carcinogenic effects of cadmium in the noble (NBL/Cr) rat: induction of pituitary, testicular, and injection site tumors and intraepithelial proliferative lesions of the dorsolateral prostate. Toxicol Sci. 1999; 52: 154-61.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. J Inorg Biochem 2000; 79: 241-244.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. Mutat Res 2003; 533: 107-120.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicol 2003; 193: 95-117.

Web M. Cadmium. Br Med Bull 1975; 31: 246-50.

Weinberger MA, Friedman L, Farber TM, Moreland FM, Peters EL, Gilmore CE, Kham MA. Testicular atrofy and impairment spermatogenesis in rats fed hight levels of the methylxantines caffeine, theobromine, or theofhyline. J Environ Parhol Toxicol 1978;1: 69-88.

Wilson KM, Kasperzyk JL, Rider JR, Kenfield S, van Dam RM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Mucci LA. Coffee consumption and prostate cancer risk and

progression in the Health Professionals Follow-up Study. J Natl Cancer Inst 2011; 103: 876-884.

World Health Organization – WHO. Environmental Health Criteria, 134 Cadmium. Geneva: 1992. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm. Acesso em 28 de dezembro 2007.