



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**Aspectos histopatológicos e expressão de receptores  
hormonais (AR e ER $\alpha$ ) na próstata de ratos expostos  
ao Di-n-Butil-Ftalato (DBP) desde o período fetal,  
iniciados pela N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU)**

**Talita de Mello Santos**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas

**BOTUCATU – SP**

**2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**Aspectos histopatológicos e expressão de receptores hormonais (AR e ER $\alpha$ ) na próstata de ratos expostos ao Di-n-Butil-Ftalato (DBP) desde o período fetal, iniciados pela N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU)**

**Talita de Mello Santos**

Orientador: Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, para obtenção do título  
de Bacharel em Ciências Biológicas

**BOTUCATU – SP**

**2013**

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

Santos, Talita de Mello.

Aspectos histopatológicos e expressão de receptores hormonais (AR e ERα) na próstata de ratos expostos ao Di-n-Butil-Ftalato (DBP) desde o período fetal, iniciados pela N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU) / Talita de Mello Santos. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20600003

1. Reprodução - Toxicologia. 2. Carcinógenos - Estudos experimentais. 3. Próstata - Câncer. 4. Receptores hormonais.

Palavras-chave: Carcinogênese experimental ; Ftalatos; Próstata ; Receptores hormonais ; Toxicologia da reprodução.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, meu maior protetor, meu amigo, meu pai celeste. Que me deu a oportunidade de aprender e me proporcionar estudar para atuar na profissão que escolhi.

Agradeço a mulher da minha vida, minha mãe, Silvia de Mello. Mulher que me inspira. Exemplo de profissional, pessoa de caráter e uma mãe exemplar. Mamãe, obrigada pelo seu amor incondicional, pelos esforços sem medidas e por me proporcionar uma formação acadêmica de qualidade. Te amo!

Obrigada ao meu tio Júnior. Ou melhor, ao Biólogo que me inspirou e me orgulha como um excelente profissional. Ao Professor Dr. Wilson de Mello Jr. eu agradeço por me incentivar, apoiar e motivar a crescer pessoal e profissionalmente. És um modelo em que me espelho e espero que possa te orgulhar sempre neste caminho que segui. Te amo!

Agradeço também ao meu pai Jádi Santos, minhas irmãs Júlia e Luísa, minha vó Milxe e ao meu padrasto Edson Gimenis. Aos meus queridos e eternos amigos que fazem parte da minha família onde sei que sempre serei bem-vinda, acolhida e amada.

Obrigada ao meu namorado Dharlan Leme. Pela paciência, os momentos de conselhos, de carinho e de alegrias. Pela torcida e por todo o apoio. Você me acalma e me acalenta nos momentos difíceis. Grata por ser, além de meu namorado, meu grande amigo. Te amo meu amor!

Ao Professor Dr. Wellerson Scarano, sou muito grata pela oportunidade, pelos ensinamentos orientados e por todo o conhecimento que, como um incrível professor que és, me proporcionou. E é claro, com todo o apoio e ajuda do LabDeca. Este sensacional laboratório. Sou muito grata aos alunos e colegas que fazem dele um laboratório de excelência.

Gostaria de agradecer a Professora Dra. Selma Matheus, a qual foi a primeira professora que enxergou em mim o potencial de ser uma futura pesquisadora. E me concedeu a oportunidade de conhecer este meio científico.

Além de agradecer ao Instituto de Biociências e aos docentes que nele lecionam. Graças a estes excelentes profissionais que compartilharam seus conhecimentos e

contribuíram para a minha formação, hoje sou Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas.

Meu carinho e muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

## RESUMO

Tendo em vista a problemática mundial com relação à degradação dos materiais plásticos e sua dispersão no meio ambiente, e diante de estudo realizado anteriormente onde se observou alterações histopatológicas e bioquímicas na próstata de animais expostos ao DBP (Di-N-Butil-ftalato) no período perinatal, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial carcinogênico do DBP administrado desde o período fetal e após iniciação pelo MNU em um modelo de carcinogênese prostática. Ratas prenhes foram divididas em 4 grupos experimentais: 2 tratados: n=16/grupo (TDBP100 e TDBP500) e 2 controles: n=8/grupo (CN e CMNU). O grupo TDBP100 foi exposto ao DBP (100 mg/kg) e o TDBP500 a 500 mg/kg do 15º. dia de gestação (DG15) até a 21º. dia pós-natal (DPN21), enquanto que os animais controle receberam o veículo. Após o desmame, os machos foram separados e os grupos tratados e CMNU receberam dose única de MNU (50 mg/Kg, i.p.) na 6ª. semana pós-natal. Metade dos animais tratados (n=8/grupo) continuaram recebendo o DBP (DBP100+ e DBP500+) após o desmame em doses semanais até o dia do sacrifício (DPN180), enquanto os demais foram mantidos pelo mesmo período sem tratamento (DBP100- e DBP500-). Após a aplicação do MNU, os animais foram submetidos a injeções semanais de Cipionato de Testosterona (promotor) 2mg/aplicação. No dia do sacrifício, o sangue foi coletado, os órgãos reprodutores foram pesados e fragmentos do lobo ventral da próstata foram processados para inclusão em resina e Paraplast para as análises estruturais; e imunocitoquímicas para a detecção de AR e ER. Fragmentos de próstata ventral foram congelados e estocados a -80°C e após extração das proteínas, estas foram destinadas à reação de Western Blot para avaliar a expressão das mesmas proteínas. Houve diminuição na distância anogenital nos animais DBP500 no DPN1 quando comparado com o grupo controle apontando para o efeito efetivo do DBP sobre o desenvolvimento do aparelho urogenital. Não houve diferença estatística entre o peso corporal dos animais ou entre o peso absoluto da próstata na data do sacrifício. Quanto a análise estereológica dos componentes teciduais nos diferentes grupos experimentais, houve aumento do compartimento epitelial nos grupos DBP100- e DBP500- em relação CN e diminuição do compartimento luminal no grupo DBP500- em relação ao grupo CN e ao grupo DBP100-. Ao observar a incidência de lesões prostáticas através da análise histopatológica percebe-se que houve aumento na incidência de inflamação e hiperplasia/displasia nos grupos tratados com DBP, principalmente na próstata dorso-

lateral. A ocorrência de PIA (Proliferative Inflammatory Atrophy) e adenocarcinoma microinvasivo foram mais frequentes nos animais do grupo TDBP500. Interessante ressaltar que entre os animais tratados apenas durante a gestação (TDBP100- e TDBP500-) e os suplementados depois da amamentação (TDBP100+ e TDBP500+) não houve diferença na frequência de adenocarcinoma microinvasivo entre os grupos de mesma dose. A imunorreatividade para o AR foi predominantemente nuclear e pareceu mais intensa nos grupos DBP100- e 100+, quando comparado aos demais grupos. E a imunomarcagem para o ER $\alpha$  apareceu nas células estromais dos grupos experimentais. Quando olhado para os resultados para a expressão das proteínas estudadas pelo Western Blotting verifica-se que houve um aumento da expressão de AR nos grupos DBP100- e 100+, corroborando com as análises da imunohistoquímica. Porém, a expressão do ER $\alpha$  foi maior nos grupos DBP500+/- em relação ao grupo CN. Diante dos resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que a exposição perinatal ao DBP é capaz por si de ocasionar alterações teciduais e moleculares na próstata de ratos adultos expostos a pequenas e altas doses, e que a suplementação pós-natal deste composto não modificou o padrão observado nesses animais.



## INTRODUÇÃO

### A estrutura da próstata

Dentre as estruturas acessórias do aparelho reprodutor masculino, a próstata apresenta-se como a glândula mais volumosa e a de maior expressividade funcional (Netter, 1965). A próstata secreta um líquido fino de aspecto leitoso que aumenta o volume do sêmen. A secreção prostática apresenta propriedades importantes para que a fertilização tenha êxito; colaborando com a neutralização do meio e contribuindo sobremaneira para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (Guyton, 2006).

Histologicamente, a próstata constitui-se de glândulas túbulo-alveolares. O epitélio secretor que reveste os alvéolos assenta-se numa membrana basal que repousa sobre um estroma conjuntivo, contendo fibras musculares lisas que circundam os alvéolos e ductos, e inúmeros vasos. No estroma podem ser encontradas terminações nervosas de vários tipos, freqüentemente entre as células musculares lisas (Ichihara *et al.*, 1978) e associadas ao epitélio (PRICE, 1963). No homem, as unidades glandulares dispõem-se em três camadas de forma concêntrica ao redor da uretra prostática, onde se abrem os ductos individuais. Periféricamente, uma fina cápsula fibromuscular rica em células musculares lisas envolve a próstata, enviando septos que penetram na glândula (Junqueira & Carneiro, 2008).

Na maioria dos roedores, a glândula prostática apresenta-se como uma estrutura complexa composta de três lobos distintos, designados pela localização que cada um deles ocupa em relação à uretra. Assim, são identificados o lobo ventral, no istmo da bexiga, e os lobos dorsal e lateral que circundam dorsolateralmente, a uretra, a base da bexiga, a vesícula seminal e as glândulas coaguladoras (Price, 1963; Jesik *et al.*, 1982; Sugimura *et al.*, 1986). Assim como nas zonas da próstata humana, estes lobos diferem no que diz respeito à sua topografia, ao seu tamanho, à sua composição celular e sua organização estrutural, às suas secreções e aos respectivos processos secretórios (Jesik *et al.*, 1982; Aumuller & SITZ, 1990; Colombel & Buttyan, 1995).

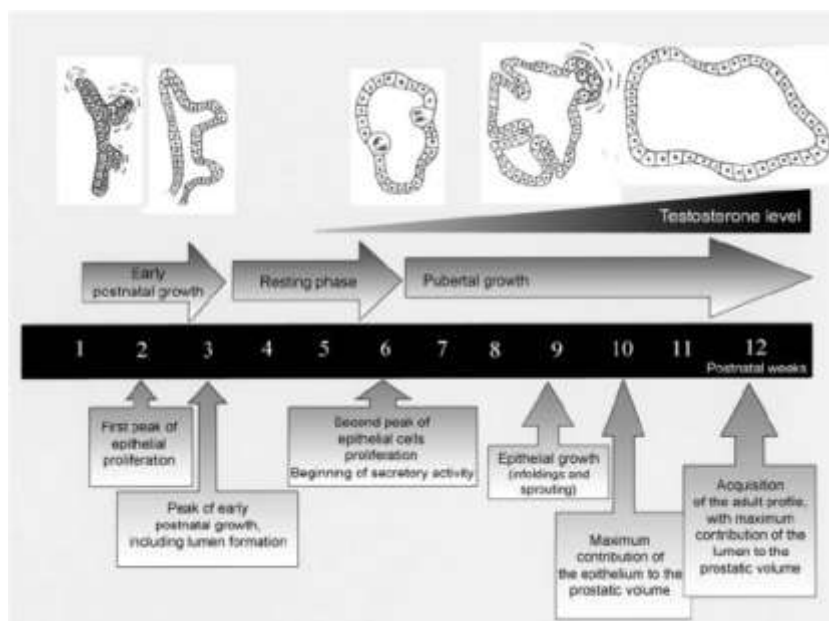
O epitélio das unidades secretoras e seus ductos são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas - as células epiteliais luminiais – e entre as bases destas podem estar distribuídas células menores, achatadas ou arredondadas – as células epiteliais basais (Ichihara *et al.*, 1978).

Na porção conjuntiva da próstata podem ser observados células musculares lisas, fibroblastos, macrófagos fixos e células endoteliais dos vasos, cada qual com seu importante e específico papel na viabilidade e função secretora do tecido como um todo (Franks, 1967 apud Prings et al., 1991). O termo estroma é empregado para designar, no adulto, o tecido conjuntivo frouxo associado ao epitélio, correspondendo ao componente “não epitelial” de um órgão. A manutenção da diferenciação epitelial na próstata adulta parece ser dependente de interações entre estroma e epitélio, sendo que a ativação de fatores de crescimento no estroma prostático pode ser responsável pelo aparecimento da hiperplasia benigna de próstata (Cunha et al., 1983).

### **Fisiologia e Considerações Experimentais**

Em todas as espécies de mamíferos, o desenvolvimento e o crescimento da próstata começam ainda na vida fetal e completam-se durante a maturidade sexual. Em humanos, o seio urogenital surge aproximadamente por volta da sétima semana de desenvolvimento intra-uterino e permanece indiferenciado até a décima ou décima segunda semana, quando então se inicia a morfogênese prostática, através e dependente dos andrógenos produzidos pelos testículos fetais. A formação da próstata em camundongos começa por volta do décimo sétimo dia de gestação e, em ratos, no décimo oitavo dia (Thomson, 2001).

Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento. Porém, na fase neonatal, como os ductos se alongam em direção ao mesênquima, eles se bifurcam. É este o processo de ramificação que, em ratos e camundongos, origina a subdivisão característica da próstata destes animais em próstata dorso-lateral, próstata ventral e próstata anterior. Após o nascimento são descritos picos de proliferação epitelial na segunda e sexta semanas pós-natal e picos de crescimento glandular com formação de lume na segunda semana (Vilamaior et al., 2006), vide **esquema 1**. Portanto, esse período torna-se importante em estudos do desenvolvimento e da influência de agentes epigenéticos sobre a glândula.



**Esquema 1:** Representação esquemática dos eventos morfológicos observados durante as doze semanas iniciais do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos (Vilamaior et al., 2006).

A estimulação por andrógenos é absolutamente necessária para o desenvolvimento da próstata, assim como para as demais estruturas sexuais masculinas (Cunha et al., 1987). A morfogênese prostática é dependente da produção de andrógenos pelos testículos do feto (Pointis et al., 1980). O desenvolvimento da próstata não é determinado pelo sexo genético, mas sim pela exposição aos andrógenos, tendo sido demonstrado que o seio urogenital (UGS) de fêmea ou macho pode formar tecido prostático funcional, caso eles sejam estimulados por andrógenos no período adequado (Takeda et al., 1986).

O brotamento prostático é iniciado pela ação androgênica pré-natal (Timms et al., 1994). As subseqüentes morfogêneses ductal, canalização e citodiferenciação epitelial também precisam de estimulação androgênica e estão associados a um aumento perinatal transitório na concentração de testosterona (Donjacour et al., 1988; Vilamaior et al., 2006).

A diferenciação do epitélio prostático ocorre paralelamente à maturação do estroma prostático. Andrógenos atuam sobre receptores de andrógeno (AR) no mesênquima urogenital (UGM) para induzir a proliferação epitelial, ramificação ductal e citodiferenciação nos subtipos celulares: basal e luminal (Cunha et al., 1987; 1992). Por sua vez, o epitélio prostático em desenvolvimento direciona os padrões de diferenciação do músculo liso prostático (Hayward et al., 1998). Nem o epitélio prostático, nem o

músculo liso da próstata, são capazes de se desenvolver na ausência do outro tecido (Hayward e Cunha, 2000).

Sabe-se que os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos exercem funções importantes na homeostasia da glândula, sendo que o equilíbrio entre esses dois hormônios é essencial para as atividades de crescimento, proliferação e secreção na glândula (Scarano et al., 2008).

Os efeitos androgênicos em células prostáticas-alvo resultam da interação do hormônio com o AR, sendo a produção de andrógenos regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Cunha et al., 2001). O principal andrógeno circulante é a testosterona e as células de Leydig são responsáveis pela produção de 95% desse esteroide e a adrenal, de 5% (Hsing et al., 2002). Na próstata, o hormônio dihidrotestosterona (DHT) é o andrógeno predominante, formado a partir da testosterona por ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase. A testosterona e a DHT se ligam ao mesmo tipo de receptor – o AR, porém possuem afinidades de ligação e distintas funções fisiológicas. A testosterona regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, já a DHT tem papel fundamental durante a virilização puberal, além de ser responsável pela funcionalidade da próstata do indivíduo adulto (Soronen et al., 2004).

O papel do AR vem sendo amplamente estudado, pois parte dos tumores prostáticos respondem ao tratamento anti-androgênico de forma satisfatória, no entanto grupos de células não respondem aos bloqueios e continuam a proliferar-se originando os tumores prostáticos independentes de andrógeno. Mecanismos de resposta dependentes do AR e independentes de andrógenos têm sido observados de modo especial, já que algumas substâncias podem agir como promotoras de proliferação e/ou inibidoras de apoptose pela ativação de vias de ativação do AR que não dependem dos andrógenos (Feldman & Feldman, 2001). As principais vias correspondem a via de ativação “promíscua”, onde o receptor responde a ativação por moléculas que interagem com os seus sítios de ligação, promovendo a fosforilação do AR e a ativação de vias efetoras; e os receptores denominados “outlaw” ou “bandidos” que são ativados por vias independentes da interação do andrógeno, ou outra molécula, nos seus sítios de ligação, envolvendo a ativação de receptores de proteínas quinases estimulados por fatores de crescimento. Os principais fatores envolvidos nessa via são o IGF-1 (Fator de crescimento ligado a insulina), o KGF (Fator de crescimento de queratinócitos) e o EGF (Fator de crescimento epidermal) (Feldman & Feldman, 2001).

Sabe-se que agentes toxicológicos de desregulação endócrina podem ter efeitos antagonísticos dependendo das doses as quais o indivíduo está exposto. Altas doses de DES (dietilestilbestrol) durante a gestação podem culminar na inibição do desenvolvimento dos ductos prostáticos, no entanto, baixas doses podem estimular a proliferação e o desenvolvimento prostático, como comprovado em fetos expostos ao DES onde se observou aumento na taxa de proliferação e de células basais nos ácinos prostáticos (Timms et al., 2005).

Nas últimas décadas, epidemiologistas e pesquisadores têm concentrado esforços para explicar como os vários fatores responsáveis pelas doenças que acometem a próstata somam-se e contribuem para a gênese e o desenvolvimento de patologias mais severas nesta glândula (Hsing & Devesa, 2001). Sabe-se que o ambiente e a dieta são prováveis responsáveis em induzir significativas mudanças na concentração e no metabolismo dos hormônios esteroides sexuais, o que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de próstata. Com base nisso, os hormônios e as vias de interação hormônio-célula podem ser considerados intermediadores dos fatores exógenos, como o ambiente ou a nutrição, e os alvos moleculares do processo de iniciação, promoção e progressão do câncer (Curruba, 2006).

Com o aumento significativo das neoplasias no perfil de mortalidade mundial, vem crescendo o interesse médico-científico acerca dos diferentes tipos de cânceres, dentre eles, o câncer de próstata (CaP), que é a segunda causa de óbitos por câncer entre homens. Em 2006, estimou-se a ocorrência de aproximadamente 47.000 novos casos de CaP no Brasil (<http://www.inca.gov.br>). O aumento observado nas taxas de incidência de CaP nos últimos anos pode ser parcialmente justificado pelo progressivo aumento da eficácia investigativa dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos programas de rastreamento e sistemas de informação do país, e pelo aumento na expectativa de vida da população mundial, uma vez que após os 50 anos, a incidência e a mortalidade devido ao CaP aumentam exponencialmente (Balducci & Lyman, 1997; Hsing and Chokkalingam, 2006).

Na próstata, as lesões epiteliais pré-malignas são comumente apontadas como precursores dos carcinomas (Bostwick, 1996; Brawer, 2005). A PIN, sigla em inglês para Neoplasia Intraepitelial é caracterizada como uma lesão epitelial proliferativa prostática, que potencialmente pode progredir para um carcinoma (Brawer, 2005).

Atualmente, a PIN é classificada em dois graus, de acordo com as alterações celulares observadas nestas lesões. Na LGPIN, sigla em inglês para a PIN de baixo grau, tanto a atipia celular como as alterações estromais são menos acentuadas e facilmente confundidas com áreas de tecido normal. Na HGPIN, sigla em inglês para PIN de alto grau, as células epiteliais adquirem um fenótipo parecido com as do carcinoma invasivo, evidenciado pela atipia celular, aumento do volume nuclear e principalmente do nucléolo (Brawer, 2005). Neste sentido, Calvo *et al.*, (2002) identificaram mais de 400 genes alterados tanto no HGPIN com no carcinoma invasivo, corroborando a hipótese de que a HGPIN representa um estágio intermediário entre lesão pré-maligna e o carcinoma invasivo.

### **Os Ftalatos**

Os ftalatos são ésteres utilizados na fabricação de plásticos transparentes empregados em indústrias e são amplamente encontrados como substâncias contaminantes no meio ambiente (Programa Internacional em Segurança Química [IPCS], 1992, 1997). Os ftalatos são aditivos químicos que, adicionados ao PVC, conferem-lhe maleabilidade. O PVC maleável é utilizado na fabricação de bolsas de sangue, de soro e de soluções intravenosas, cateteres, máscaras para inalação de oxigênio, luvas, tubos, dentre outros produtos médico-hospitalares, além de serem utilizados na fabricação de embalagens plásticas maleáveis de uso comercial como mamadeiras, brinquedos, garrafas de refrigerante e outros.

Os ftalatos constituem um grupo de contaminantes que, a princípio, tem baixa toxicidade em pequenas dosagens e necessitariam de altas doses para promover efeitos adversos em roedores (Foster, 2006). Examinando metabólitos urinários de ftalato, Blount *et al.* (2000) relataram que, de forma geral, a população está exposta a altos níveis de di-nbutil-ftalato (DBP) comparado a outros ftalatos.

Foram considerados agentes anti-androgênicos e estão associados à diminuição na produção intratesticular de testosterona, o que os diferenciam de outros agentes como a flutamida, que estão envolvidos no bloqueio de receptores androgênicos (Foster *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual o DBP causa redução nos níveis de testosterona parece estar envolvido com a diminuição na produção de andrógenos pelas células de Leydig fetais (Lambright *et al.*, 2003) e pode ter efeito potencial no processo de diferenciação

dos ductos mesonéfricos, além de alterar o balanço hormonal indispensável para o desenvolvimento normal dos órgãos e glândulas sexuais andrógeno-dependentes.

No entanto, Ren-Shan et al. (2007) demonstrou que o DEHP (Diethylhexylphthalate) possui uma ação bifásica sobre a função das células de Leydig, onde baixas doses (até 100 mg/Kg) promovem aumento na produção de testosterona e adiantam a puberdade em animais expostos durante a lactação. Em contrapartida, e de acordo com a maior parte dos dados da literatura, altas doses desse ftalato tem efeito anti-androgênico e atrasa a entrada dos animais na puberdade.

Dados resultantes de experimento realizado em nosso pós-doutoramento mostraram que o ftalato (DBP) na dose de 100 mg/Kg (dose relativamente baixa) promoveu alterações na estrutura da glândula prostática em animais adultos submetidos à exposição durante o período intra-uterino e lactação. Além disso, nossos resultados mostraram aumento na expressão de AR na próstata, presença de focos inflamatórios crônicos disseminados na próstata ventral, aumento na atividade de metaloproteinases, displasias epiteliais e atipias reativas inflamatórias (Scarano et al., 2009).

Tendo em vista a característica “plastificante” desse agente químico, a ampla utilização destes em manufaturados plásticos, a exposição diária da população humana e animal a estes compostos, fazem-se indispensáveis estudos de cunho experimental, onde os delineamentos possam mimetizar situações cotidianas de exposição. Apesar de vários trabalhos utilizarem esses agentes plastificadores, pouquíssimos trabalhos se preocupam em avaliar o potencial citotóxico e carcinogênico dessas substâncias na próstata, bem como as vias de interferência destes na homeostasia da glândula.

## **OBJETIVOS**

- 1) Avaliar o imprinting gestacional do DBP, sobre a próstata de animais adultos;
- 2) Avaliar se a exposição a diferentes doses de DBP, durante o período gestacional e após a amamentação aumenta a susceptibilidade a lesões prostáticas em animais adultos iniciados com MNU;
- 3) Avaliar se a exposição gestacional e após a amamentação ao DBP altera os padrões de imunolocalização e expressão dos receptores de andrógeno (AR) e de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) nesse modelo experimental.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Delineamento Experimental e Obtenção de ratas prenhes**

Machos adultos (n=16) (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (n=32) (60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UNESP foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C) recebendo água e ração para roedores à vontade. Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG0) determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro. As ratas prenhes ou lactentes, mantidas em gaiolas individuais, foram pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume de fitalato a ser administrado e a investigação de sinais clínicos de toxicidade. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada fora reduzido para oito, preferencialmente do sexo masculino, e ninhadas com número de filhotes inferior a sete foram descartadas, ou seja, procedeu-se a eutanásia das mães e filhotes.

Os procedimentos experimentais foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Protocolo 202/2010.

Os resíduos químicos gerados pelos laboratórios do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências/UNESP, Botucatu, foram segregados, acondicionados e transportados adequadamente para o Entrepósito de Resíduos Químicos do Campus de Botucatu- UNESP, de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos Analíticos (PGRA), identificado por AMBICAMP PGRA no. AMB-A 014-0108-00399.

## **Tratamento**

As fêmeas prenhes foram divididas em 4 grupos experimentais assim denominados: CN (controle negativo); CMNU (controle MNU); TDBP100 (tratado com DBP-100 mg/kg e MNU); TDBP500 (tratado com DBP-500 mg/kg e MNU). Cerca de 6 fêmeas foram utilizadas para cada grupo experimental. As fêmeas do grupo TDBP100 e TDBP500 receberam doses diárias de *Di-n-butyl phthalate*-DBP (Supelco, Bellenfonte, PA, USA) (100 e 500 mg/Kg – gavage, respectivamente) do 15º dia de prenhez (DG 15) ao final da lactação (DPN 21), coincidente com o período fetal e perinatal do desenvolvimento da próstata, enquanto que as fêmeas dos grupos CN e CMNU receberam o veículo (óleo vegetal). Após o desmame, os machos foram separados e os grupos TDBP100 (n=20), TDBP500 (n=20) e CMNU (n=10) receberam dose única de MNU (N-Metil-N-Nitrosuréia- 50 mg/Kg, v.i.p.) na sexta semana pós-natal, período que, segundo a literatura, coincide com o segundo pico de proliferação epitelial na morfogênese prostática em ratos. Metade dos animais dos grupos tratados (TDBP100 e TDBP500), n=10/grupo, continuou recebendo o DBP após o MNU em doses semanais até o dia do sacrifício, enquanto os demais foram mantidos pelo mesmo período sem tratamento, visando avaliar apenas o efeito do DBP no período crítico de organogênese prostática. Após a aplicação do MNU, os animais foram submetidos a injeções semanais de Cipionato de Testosterona (Deposteron®, EMS, Brasil), 2mg/aplicação (v.subcutânea), visando a expansão dos clones celulares potencialmente mutados. Os animais foram eutanasiados por volta do 180º. dia pós-natal por decapitação para coleta de sangue e dos órgãos reprodutores.

### **Sacrifício dos machos e Coleta de materiais**

O sacrifício dos animais foi realizado no 180º. dia pós-natal. A eutanásia fora realizada por decapitação, procedendo-se a coleta do sangue dos vasos cervicais rompidos em tubo seco para dosagens hormonais. O testículo e epidídimo direitos de cada rato, juntamente com a próstata ventral foram retirados e pesados em balança analítica de precisão. As próstatas foram fragmentadas, sendo esses fragmentos destinados posteriormente a fixação (análise histopatológica, e imunohistoquímica e MET) e congelamento (-80°C).

### **Dosagem Hormonal Sérica**

Após a decapitação, foi coletado o sangue em tubos cônicos de 15 ml. Centrifugou-se o material a 3.000 r.p.m. por 15 minutos, o soro foi separado e congelado para posterior análise. A análise sérica para a dosagem de testosterona foi realizada por radioimunoensaio no Laboratório de Endocrinologia, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia da USP/Ribeirão Preto, com a colaboração da Profa. Dra. Janete A. Anselmo-Franci. O limite de detecção foi de 0.064 ng/mL, com um erro intra-ensaio de 4%.

### **Processamento Histológico**

Os fragmentos de próstata ventral e dorso-lateral removidos foram fixados por imersão em metacarn por 3 horas, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluído em Paraplast. Cortes de 5 µm foram feitos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados.

Após microtomia, os cortes foram submetidos à seguinte coloração:

Hematoxilina-Eosina (HE) : para estudo morfológico e morfométrico de ordem geral, análises dos tipos de lesão e frequências dessas lesões;

Impregnação pela prata para reticulina : para evidenciar fibras reticulares segundo (Gomori, 1937).

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando um sistema analisador de imagens (Image Pro-Plus) acoplado a fotomicroscópio Leica.

### **Análise Morfométrico-Estereológica**

Foi realizada a análise morfométrico-estereológica segundo Weibel, (1963), na qual se utilizou um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas. Assim, se obteve a proporção ocupada para cada grupo, para os seguintes componentes prostáticos: lúmen, epitélio e estroma.

### **Análise Histopatológica: Estimativa da Frequência de Lesões**

Os cortes histológicos das próstatas ventral e dorso-lateral coradas pela Hematoxilina e Eosina foram submetidas à análise de frequência das seguintes lesões: Inflamação, Atipia Inflamatória Reativa, PIA (Proliferative Inflammatory Atrophy), PIN (Prostatic Intraepithelial Neoplasia), Hiperplasia/Displasia e Adenocarcinoma Microinvasivo. Essa análise foi realizada conjuntamente com o orientador do projeto, e confirmada por um patologista veterinário, onde as lâminas foram pré-identificadas para uma análise do tipo “cega”. Considerou-se positiva para a identificação de determinada lesão a presença desta no corte histológico. Foram analisadas 8 lâminas por grupo experimental (1 lâmina/animal).

### **Análise Imunoistoquímica**

Fragmentos da próstata ventral dos animais foram incluídos em Paraplast conforme descrito anteriormente. Os cortes provenientes do material fixado em Methacarn, foram submetidos à recuperação antigênica em ambiente úmido a 100°C em tampão Citrato 0,1M por 30-45 minutos. Após a lavagem em tampão submeteu-se os cortes ao bloqueio da Peroxidase Endógena em Peróxido de Hidrogênio e Metanol, e ao bloqueio de Proteínas Inespecíficas (BSA 3% ou Background Sniper – Biocare®, USA). Após esses procedimentos se realizou as reações imunohistoquímicas para a identificação de:

- AR – (N-20: sc-816 Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)
- ER $\alpha$  - Estrogen Receptor (ab80922 Abcam Inc. Cambridge, MA, USA)

Após a incubação com os anticorpos primários, foi utilizado o kit Mach 4 Polymer (BioCare- USA) e a reação revelada com DAB.

### **Immunoblotting (Western Blot)**

As amostras da próstata foram mantidas a -80°C após o sacrifício até o início das análises. O tecido fora homogeneizado a 4°C em tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6 contendo 5 mmol/L EDTA, 0,25% de Triton X-100, 0,1M NaCl, 250 mmol/L sacarose e inibidores de proteases em homogeneizador do tipo Tureaux em 3 ciclos de 5 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos e o

sobrenadante coletado. A quantificação das proteínas foi realizada em placas de ELISA com 96 poços e leitura em leitor de ELISA. As alíquotas (70-150 µg de proteína) tratadas com solução tampão para corrida de gel (Laemli sample buffer – Bio-rad) e β-mercaptoetanol a 95°C por 1 minuto. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose. Os procedimentos de bloqueio, lavagem e incubação com os anticorpos primários e secundários foram realizados no SnapId, Millipore®. A ligação inespecífica de proteínas será bloqueada através da exposição das membranas em BSA a 5% em tampão TBST, em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com os anticorpos primários: AR (N-20: sc-816 Santa Cruz Biotechnology Inc), IGF1-R (Ab39398 Abcam Inc. Cambridge, MA 02139) e Estrogen Receptor (Ab80922 Abcam Inc. Cambridge, MA 02139), em BSA 1% diluído em PBST por 10 minutos, e a seguir lavadas em PBST 3 vezes. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído BSA 1% por 10 minutos, e posteriormente lavadas por 3x com PBST. Os componentes imunorreativos foram revelados a partir de substratos colorimétricos (DAB) ou quimioluminescentes (ECL). As bandas obtidas foram submetidas a análise semiquantitativa por densitometria óptica (Software Scion for Windows ®) e os resultados foram comparados entre os grupos. Para a comparação entre os grupos, foram utilizados 3 “pools” de amostras por grupo experimental (3 indivíduos/pool) para cada marcador, normalizados pela β-actina. As bandas dos “pools” foram comparadas entre os grupos e as bandas representativas de cada grupo estão sumarizadas nos resultados.

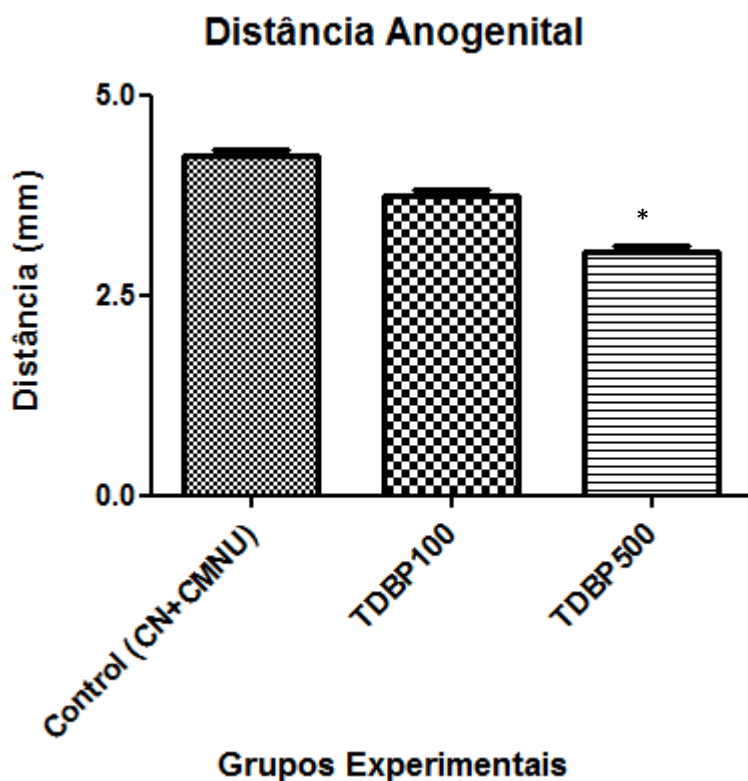
### **Análise Estatística dos Dados**

Os dados dos níveis hormonais séricos, índice de proliferação celular e densidade óptica das bandas provenientes do Western Blot foram comparados entre os grupos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis. A diferença estatística entre os parâmetros fora considerada para valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Distância Anogenital (DAG)

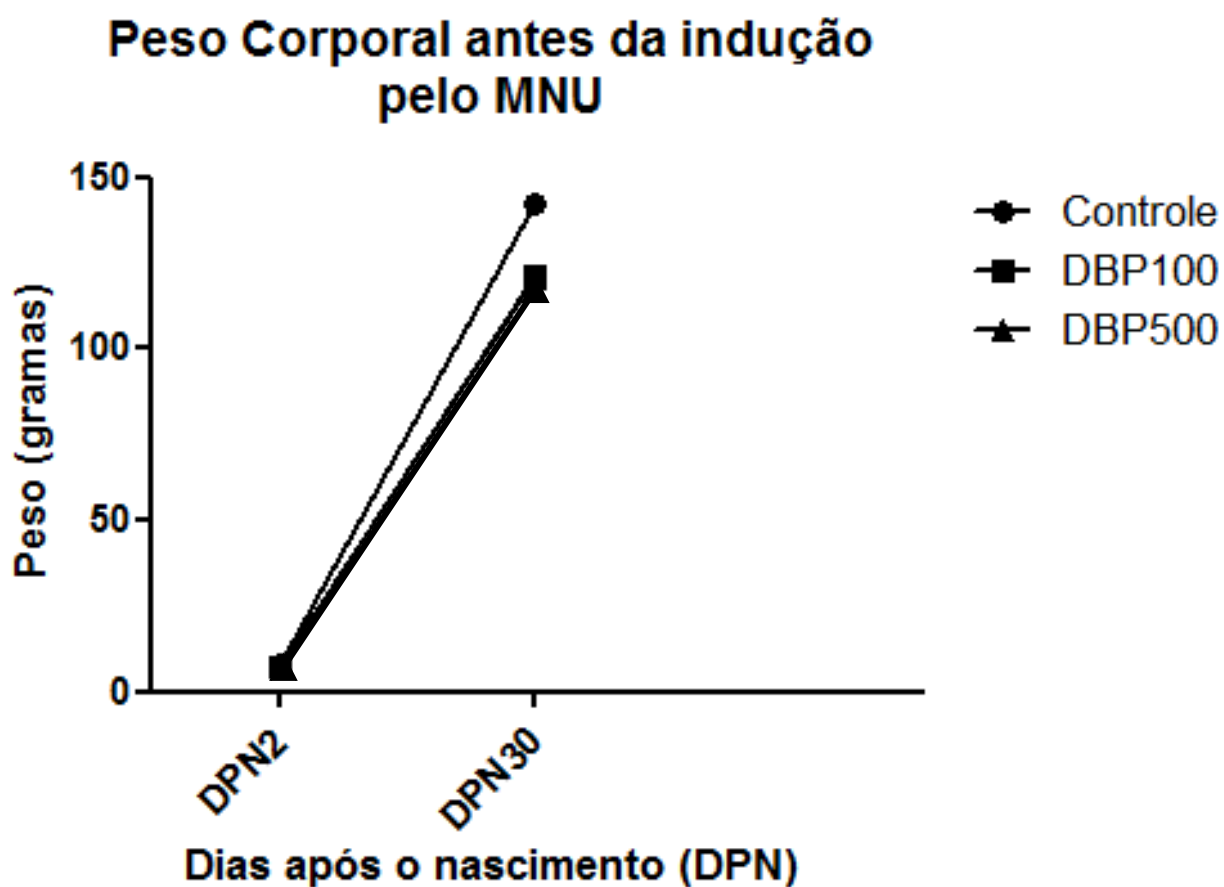
Foi observada uma diminuição na distância anogenital nos animais DBP100 e DBP500, sendo que somente nos animais DBP500 essa diferença foi significativa em relação aos animais controle (Fig.1). Essa diferença aponta para o efeito efetivo do DBP sobre o desenvolvimento do aparelho urogenital e concorda com os dados da literatura que serão abordados na Discussão.



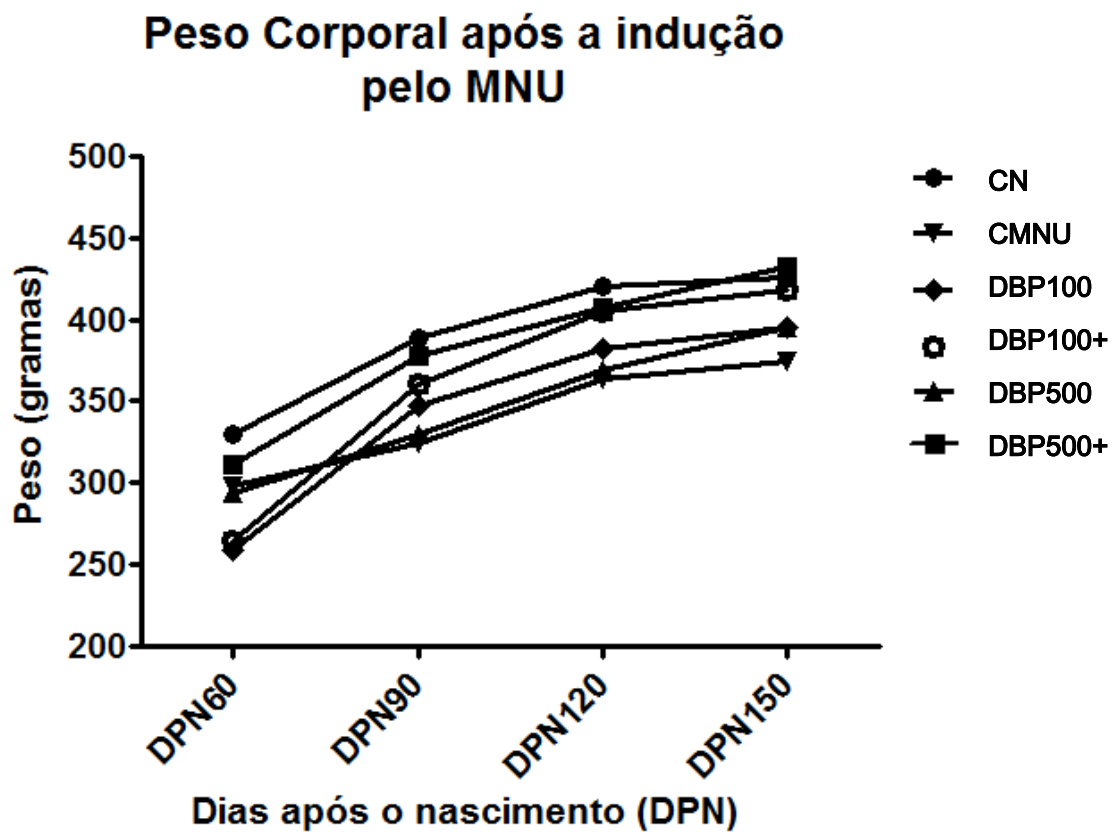
**Fig. 1:** Distância anogenital dos animais experimentais antes da iniciação pelo MNU. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, diferença estatística:  $*p \leq 0,05$ .

### Monitoramento do Peso Corporal durante o período experimental

Não houve diferença estatística entre o peso corporal dos animais durante o experimento, nem antes e nem após a iniciação pelo MNU, apesar de uma tendência inicial para menor ganho de massa corporal nos animais tratados com DBP (Figs. 2 e 3).



**Fig. 2:** Monitoramento do peso corporal dos animais experimentais antes da iniciação pelo MNU. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

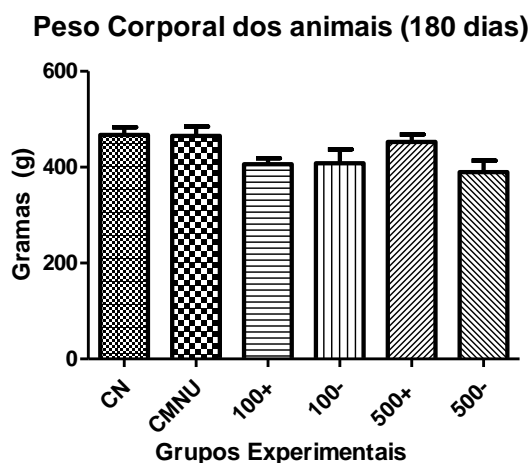


**Fig. 3:** Monitoramento do peso corporal dos animais experimentais após a iniciação pelo MNU. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

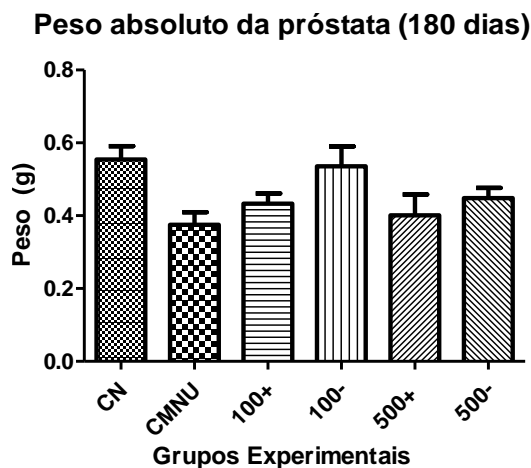


### Peso corporal e da próstata na data do sacrifício

Não houve diferença estatística entre o peso corporal dos animais ou entre o peso absoluto da próstata na data do sacrifício, no 180º dia pós-natal, apesar de um menor peso corporal nos animais dos grupos 100+, 100- e 500- e de um menor peso da próstata nos animais dos grupos CMNU+, 100+, 500- e 500+ (Figs. 4 e 5).



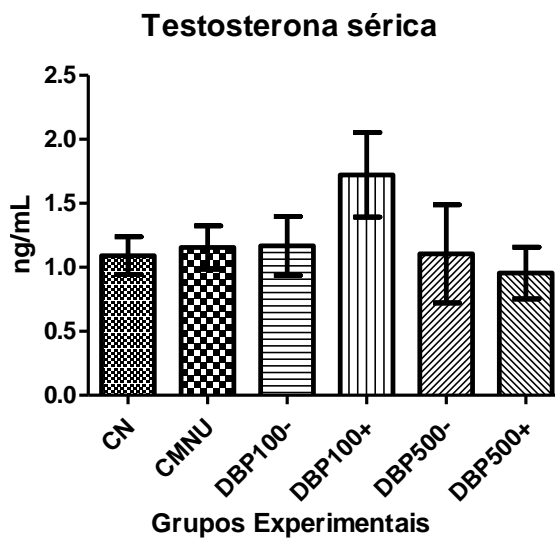
**Fig. 4:** Peso corporal dos animais na data do sacrifício. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.



**Fig. 5:** Peso absoluto da próstata no DPN180. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

### Níveis séricos de testosterona

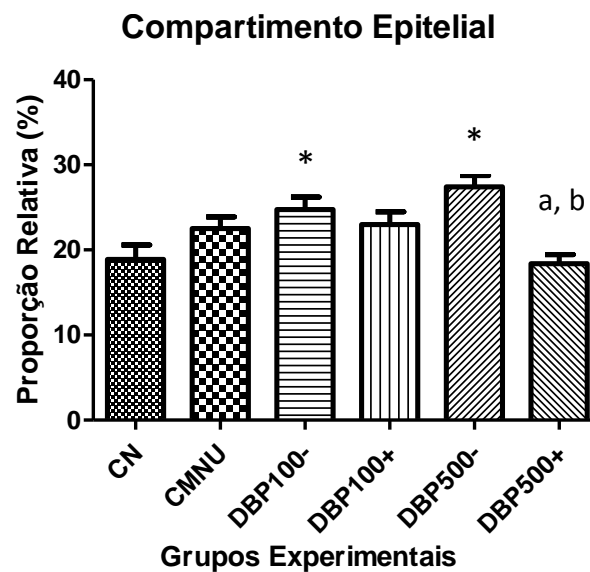
Não foi observada diferença estatística entre os níveis séricos de testosterona nos grupos experimentais no DPN180 (Fig.6), apesar de ter havido uma tendência na elevação dos níveis de testosterona nos animais do grupo DBP100+.



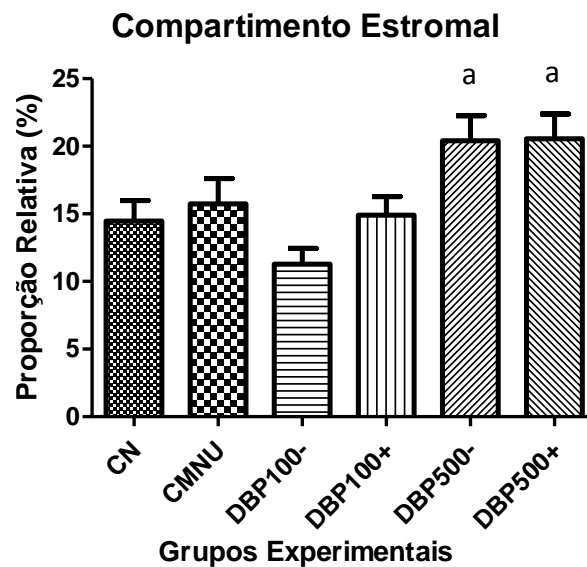
**Fig. 6:** Níveis séricos de testosterona no DPN180. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

### Análise Estereológica dos componentes prostáticos

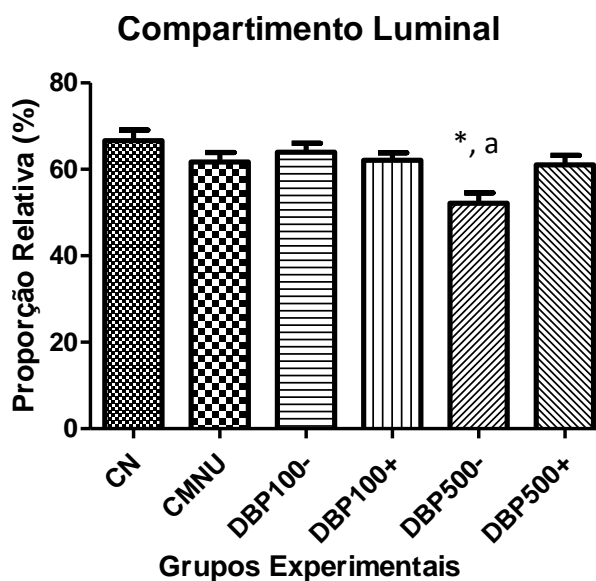
A análise estereológica dos componentes teciduais da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais mostrou um aumento do compartimento epitelial nos grupos DBP100- e DBP500- em relação ao controle negativo (CN) e diminuição no grupo DBP500+ em relação aos grupos DBP100- e DBP500- (Fig. 7). Com relação ao compartimento estromal, foi observado aumento nos grupos DBP500- e DBP500+ em relação ao grupo DBP100- (Fig. 8). Ademais, o compartimento luminal diminuiu no grupo DBP500- em relação ao grupo CN e ao grupo DBP100- (Fig. 9).



**Figura 7:** Proporção relativa do componente epitelial segundo análise estereológica. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. Diferença estatisticamente significativa: \*=diferença em relação ao grupo CN; a= diferença em relação ao grupo DBP100-; b= diferença em relação ao grupo DBP500-;  $p \leq 0,05$ .



**Figura 8:** Proporção relativa do componente estromal segundo análise estereológica. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. Diferença estatisticamente significativa: a= diferença em relação ao grupo DBP100-;  $p \leq 0,05$ .



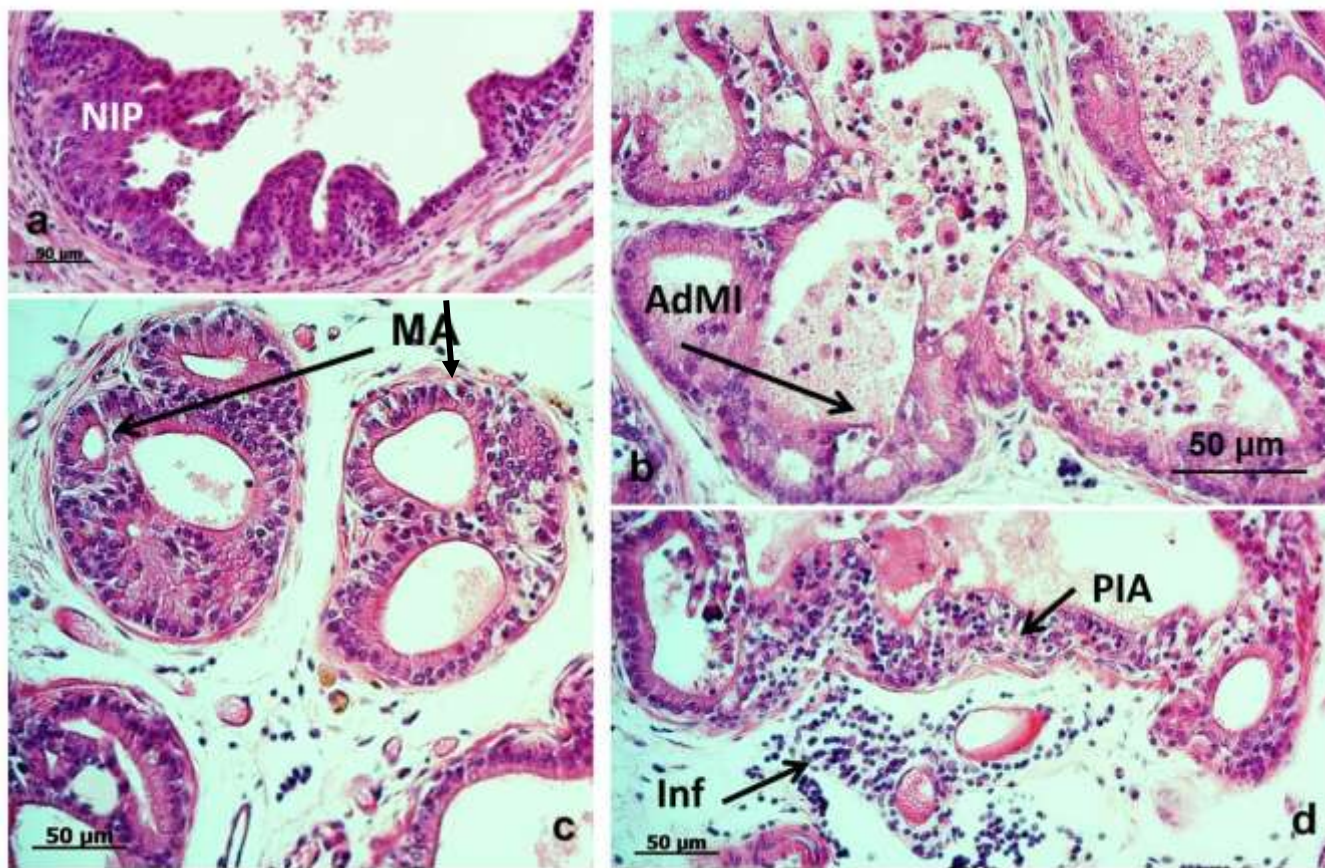
**Figura 9:** Proporção relativa do componente luminal segundo análise estereológica. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. Diferença estatisticamente significativa: \*=diferença em relação ao grupo CN; a= diferença em relação ao grupo DBP100-;  $p \leq 0,05$ .

### **Análise Histopatológica (incidência de lesões prostáticas)**

Houve aumento na incidência de inflamação e hiperplasia/displasia nos grupos tratados com DBP, principalmente na próstata dorso-lateral. A ocorrência de PIA (Proliferative Inflammatory Atrophy) e adenocarcinoma microinvasivo foram mais frequentes nos animais do grupo TDBP500 (Figs. 10d e 10b). Interessante ressaltar que entre os animais tratados apenas durante a gestação (TDBP100- e TDBP500-) e os suplementados depois da amamentação (TDBP100+ e TDBP500+) não houve diferença na frequência de adenocarcinoma microinvasivo entre os grupos de mesma dose (tabela 1). A figura 10 representa algumas das lesões observadas e descritas na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Frequência das lesões histopatológicas nos lobos ventral e dorso-lateral dos grupos experimentais.

	<b>Inflamação</b>	<b>Atipia reativa inflamatória</b>	<b>PIA</b>	<b>PIN</b>	<b>Hiperplasia/ Displasia</b>	<b>Adenocarcinoma Microinvasivo</b>
<b>CN</b>						
<b>PV</b>	0(8)/0	0(8)/-0	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0
<b>PDL</b>	1(8)/12.5%	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	2(8)/ 25%	0(8)/0
<b>CMNU</b>						
<b>PV</b>	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	1(8)/12.5%	0(8)/0
<b>PDL</b>	3(8)/37.5%	1(8)/12.5%	1(8)/12.5%	1(8)/12.5%	6(8)/75%	1(8)/12.5%
<b>TDBP100-</b>						
<b>PV</b>	2(8)/25%	1(8)/12.5%	0(8)/0	1(8)/12.5%	3(8)/37.5%	0(8)/0
<b>PDL</b>	4(8)/50%	2(8)/25%	0(8)/0	2(8)/25%	8(8)/100%	1(8)/12.5%
<b>TDBP100+</b>						
<b>PV</b>	2(8)/25%	1(8)/12.5%	0(8)/0	0(8)/0	3(8)/37.5%	0(8)/0
<b>PDL</b>	3(8)/37.5%	0(8)/0	1(8)/12.5%	3(8)/37.5%	5(8)/62.5%	1(8)/12.5%
<b>TDBP500-</b>						
<b>PV</b>	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	0(8)/0	2(8)/25%	0(8)/0
<b>PDL</b>	6(8)/75%	2(8)/25%	2(8)/25%	2(8)/25%	6(8)/75%	2(8)/25%
<b>TDBP500+</b>						
<b>PV</b>	2(8)/25%	2(8)/25%	1(8)/12.5%	1(8)/12.5%	2(8)/25%	0(8)/0
<b>PDL</b>	4(8)/50%	1(8)/12.5%	2(8)/25%	2(8)/25%	7(8)/87.5%	2(8)/25%

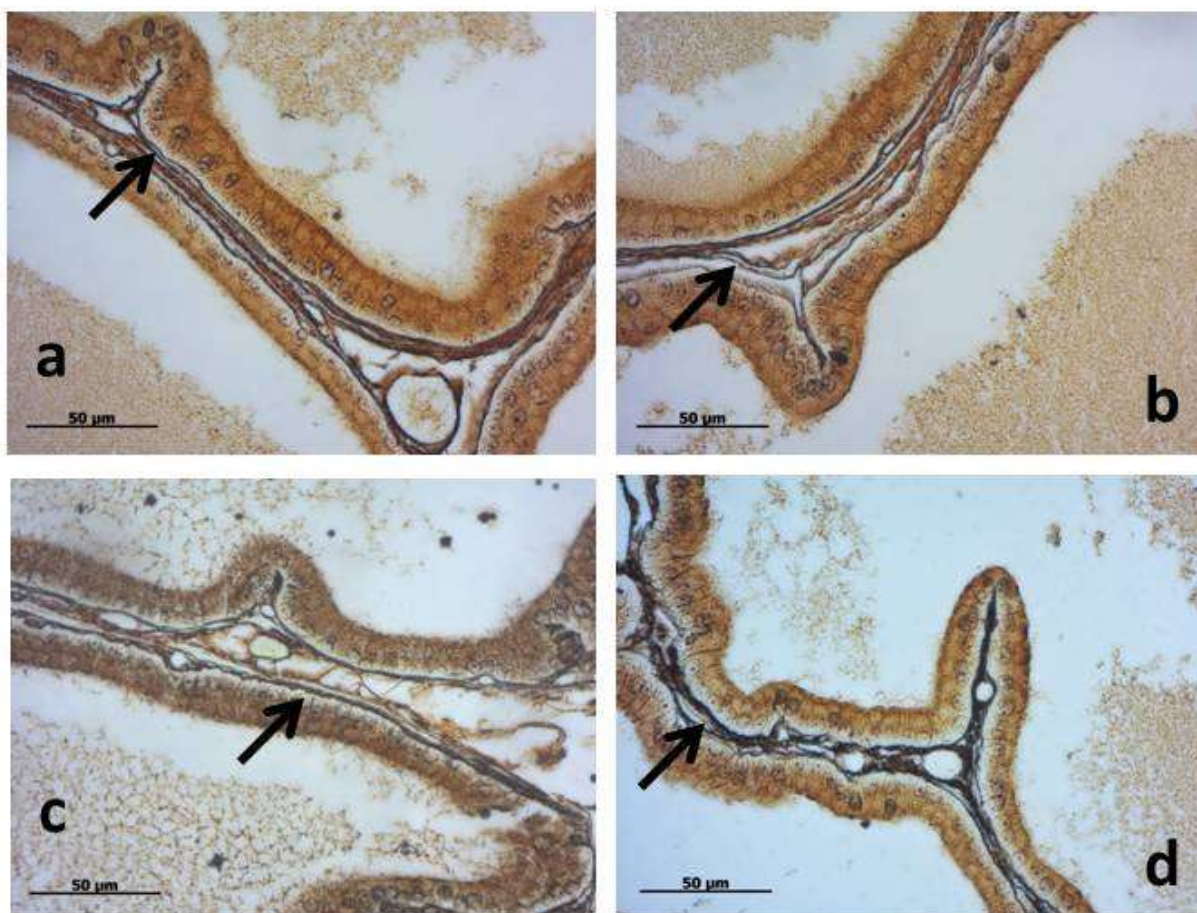


**Figura 10:** Cortes histológicas corados pela hematoxilina-eosina representando algumas das lesões observadas e quantificadas na tabela 1 nos diferentes grupos. Na figura 10a, foi apontado uma Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP) do tipo papilífera; em 10b foi apontado um adenocarcinoma microinvasivo (AdMI) com formação de microácinos, infiltração leucocitária e atipia epitelial diferenciada; em 10c, presença de microácinos (MA) com regiões hiperplásicas; em 10d presença de inflamação (Inf) próximo a um ácino com atipia reativa e PIA (atrofia inflamatória proliferativa).



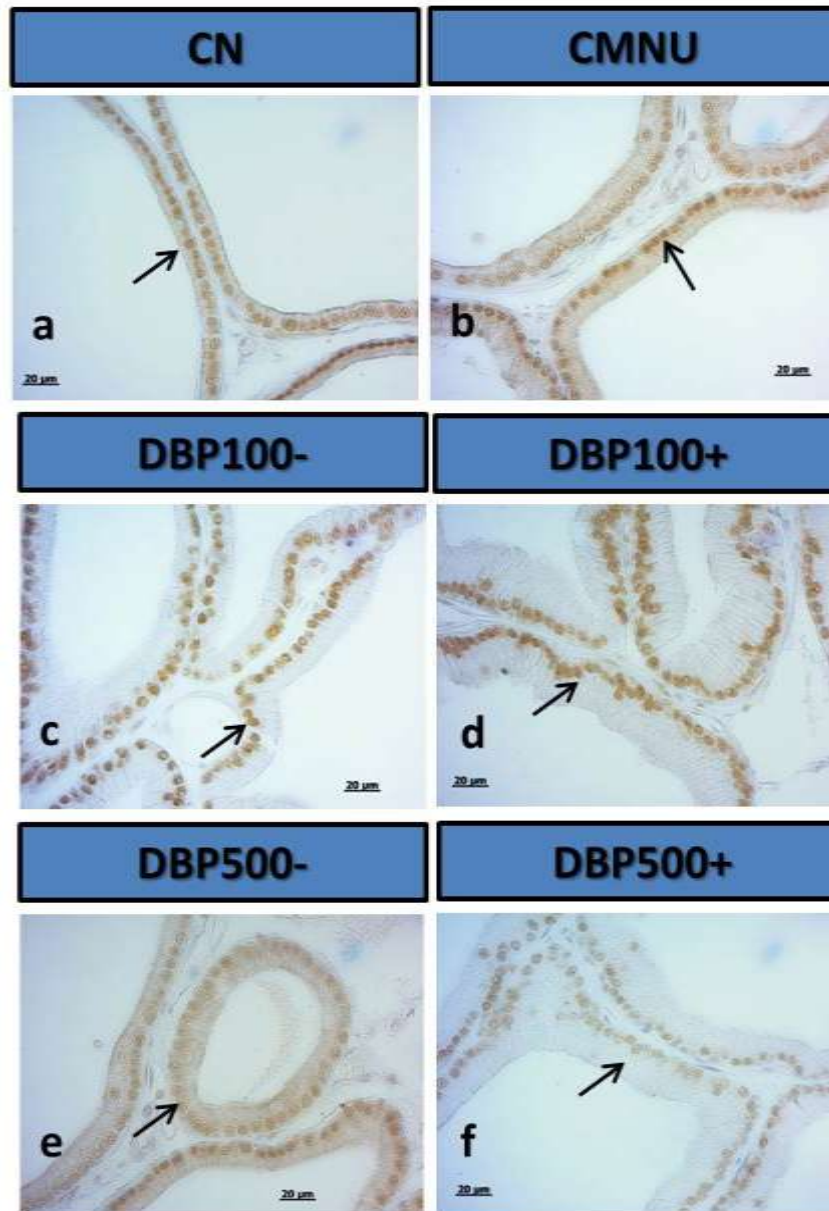
### Citoquímica e Imunoistoquímica

As análises citoquímicas para a marcação das fibras reticulares pela técnica de reticulina não apresentou diferenças na distribuição, espessura e arranjo entre os grupos experimentais, como pode ser evidenciado de forma representativa na figura 11.



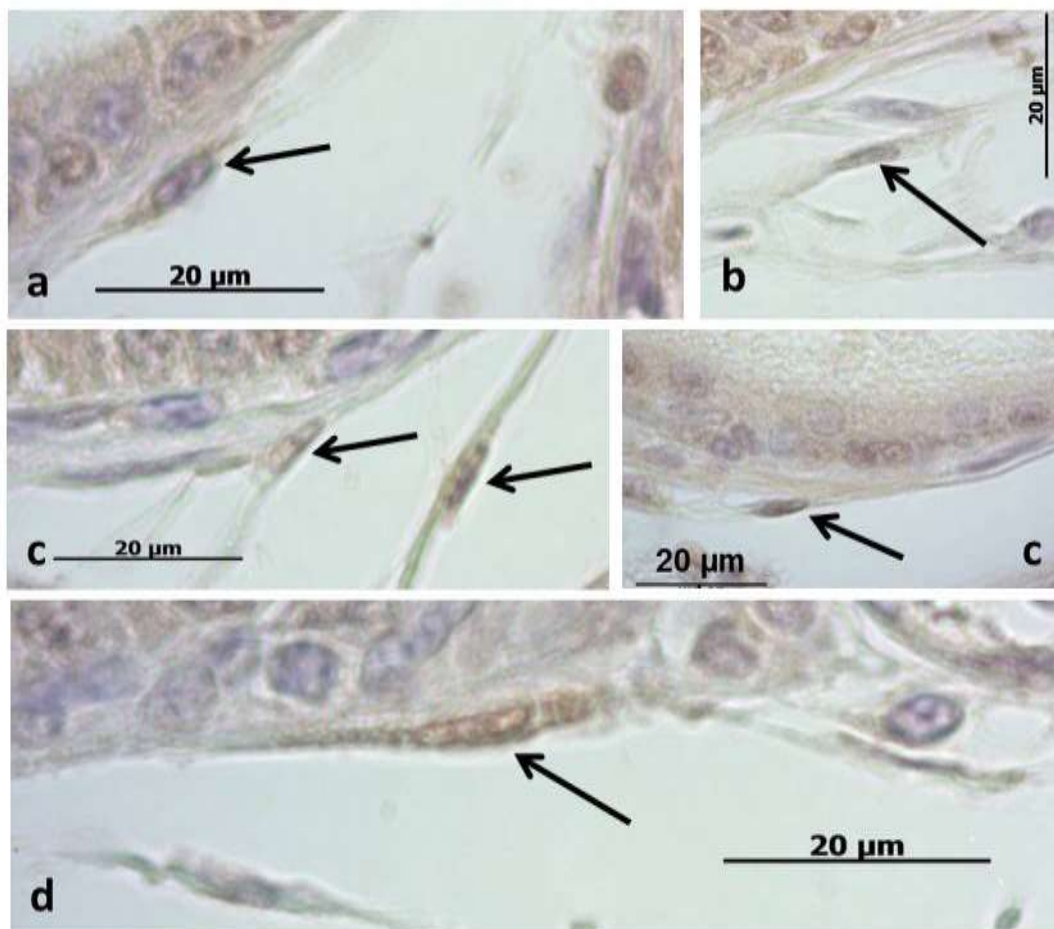
**Figura 11:** Cortes histológicos da próstata ventral de animais do grupo CN (a); CMNU (b); DBP100- (c); DBP500- (d); corados pela reticulina de Gömöri. As setas apontam para a marcação das fibras reticulares (marron escuro).

As figuras 12 e 13 representam a imunomarcção para AR e ER $\alpha$ , respectivamente. A imunorreatividade para o AR foi predominantemente nuclear e pareceu mais intensa nos grupos DBP100- e DBP100+ (12c e 12d), quando comparado aos demais grupos (Figs. 12a, b, e, f). A figura 13 mostra de forma representativa a imunomarcção para o ER $\alpha$  em células estromais dos grupos experimentais.



**Figura 12:** Cortes histológicas da próstata ventral de animais experimentais submetidos a imunohistoquímica para o AR (receptor de andrógeno). As setas apontam para as marcações positivas.

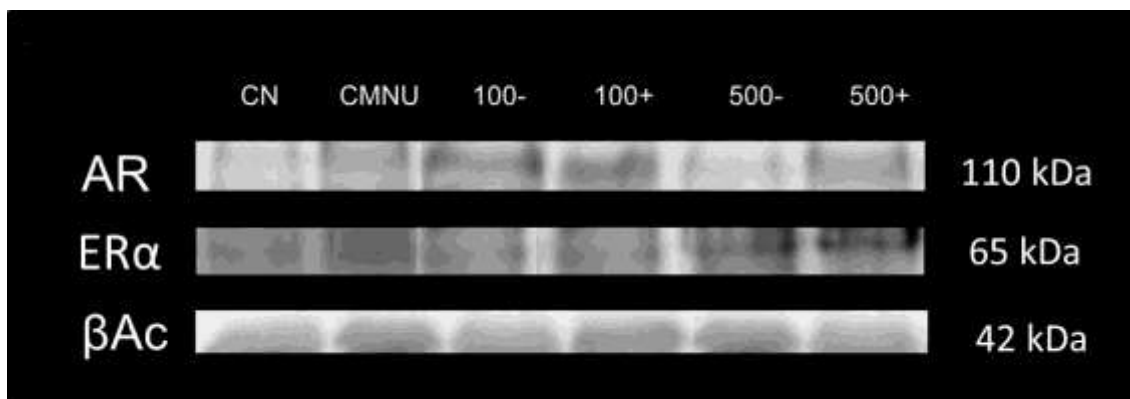




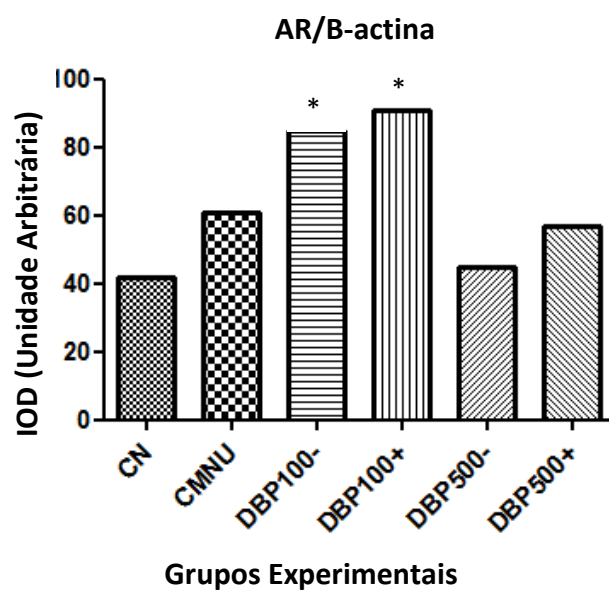
**Figura 13:** Cortes histológicas da próstata ventral de animais dos grupos CN (a), CMNU (b); DBP100- (c); DBP100+ (d) e DBP500- (e); submetidos a imunohistoquímica para o ER $\alpha$ . As setas apontam para células estromais marcadas para o receptor.

### Western Blotting

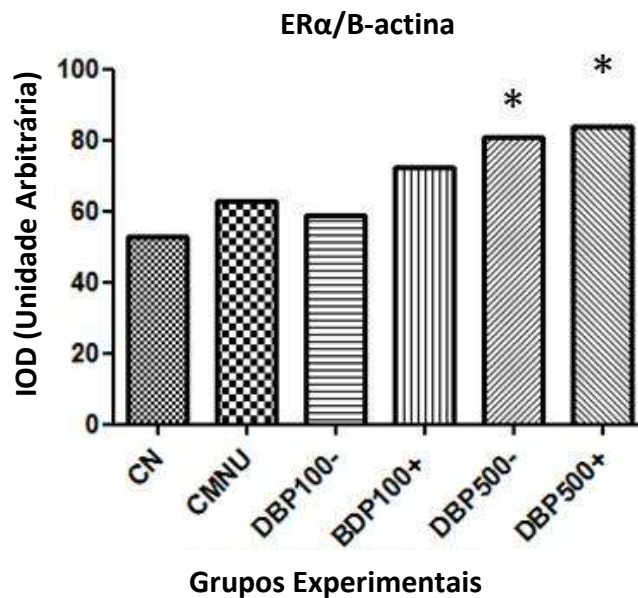
Os resultados para a expressão das proteínas estudadas pelo Western Blotting mostraram que houve aumento da expressão de AR nos grupos TDBP100- e TDBP100+ (Figs.: 14 e 15). A expressão do ER $\alpha$  foi maior nos grupos DBP500+/- em relação ao grupo CN (Figs. 14 e 16).



**Figura 14:** Análise por Western Blot das proteínas AR e ER $\alpha$  na próstata ventral de ratos dos grupos experimentais. Cada banda representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo, normalizadas pela  $\beta$ -actina e submetidas a leitura de densidade óptica para a comparação entre os grupos.



**Figura 15:** Expressão relativa de AR (IOD – densidade óptica integrada) da próstata ventral normalizada pela  $\beta$ -actina. Houve aumento da expressão de AR nos grupos DBP100-/+ em relação ao controle CN. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, diferença estatística:  $*p \leq 0,05$ . Valor expresso pela mediana.



**Figura 16:** Expressão relativa de ERα (IOD – densidade óptica integrada) da próstata ventral normalizada pela  $\beta$ -actina. Houve aumento na expressão de ERα nos grupos DBP500-/+ em relação ao CN. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, diferença estatística:  $*p \leq 0,05$ . Valor expresso pela mediana.

## DISCUSSÃO

O di- $\eta$ -butil-ftalato (DBP) é utilizado como plastificante e na fabricação de inúmeros produtos de consumo incluindo cosméticos, adesivos, brinquedos e tintas. Por causa desta ampla utilização há um potencial diário de exposição humana a este químico na população em geral (Lehmann et al. 2004). Estima-se que esta exposição esteja entre 0,84 a 113  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$  (Blount et al., 2000; Kohn et al., 2000).

A maioria dos estudos em roedores verte para utilização de doses altas de ftalatos -  $\geq 500\text{mg}/\text{kg}$  de DBP- (Mylchreest et al., 1998; Fisher et al., 2003; Jiang et al., 2007), onde os efeitos parecem ser mais pronunciados, principalmente em nível testicular e de malformações associadas ao desenvolvimento do sistema genital masculino, inclusive o epidídimo (Foster et al., 2001; Jarfelt et al., 2005). Com o intuito de observar os possíveis efeitos carcinogênicos do DBP sobre a próstata de ratos, e mais ainda, se a exposição pós-natal potencializa os efeitos da administração perinatal e do possível imprinting do DBP sobre a glândula, no presente estudo utilizamos duas doses de exposição gestacional e pós-natal (100 e 500  $\text{mg}/\text{kg}$ , por gavagem).

A distância anogenital, a regressão de aréolas/mamilos, a descida testicular e a separação prepucial em ratos machos são parâmetros andrógeno-dependentes que representam importantes fatores para a análise de alterações na diferenciação do sistema reprodutor masculino, causadas por efeitos tóxicos da exposição *in útero* a substâncias químicas (Korenbroet et al., 1977; US EPA, 1996; Carruthers & Foster, 2005). Alterações nestes parâmetros podem gerar atraso ou aceleração na instalação da puberdade, comprometimento do comportamento sexual ou na habilidade de produzir gametas normais, entre outros (US EPA, 1996).

A redução da distância anogenital tem sido observada em ratos machos expostos ao DBP durante o período gestacional (Mylchreest et al., 1999, 2000; Ema et al., 2000; Carruthers & Foster, 2005). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os machos provenientes de ninhadas expostas à dose de 100 $\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$  de DBP não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na DAG. No entanto, os machos expostos à dose de 500  $\text{mg}/\text{kg}$  por dia de DBP tiveram redução na DAG.

Esses resultados estão de acordo com Mylchreest et al. (1999) e Scarano et al. (2009) que demonstraram que 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$  de DBP administrado a ratas prenhes durante o 12º ao 21º dias de gestação também não provocou redução da distância

anogenital, enquanto que Jiang et al. (2007) demonstraram redução na DAG em doses relativamente altas ( $\geq 500\text{mg/kg/dia}$ ).

No presente trabalho não houve alteração na evolução do peso corpóreo das fêmeas prenhes, no peso corporal ao nascer dos filhotes machos, nem na evolução corporal dos animais experimentais, iniciados ou não, até o DPN180, sugerindo que o tratamento com DBP nas doses utilizadas não provocou sinais de toxicidade metabólica que poderiam ter interferido com o desenvolvimento intrauterino da prole e dos animais experimentais no período pós-natal.

Segundo a literatura o tratamento de fêmeas prenhes com diferentes doses do DBP durante o período gestacional não produz efeitos significativos nos parâmetros reprodutivos maternos, considerando desta forma que o DBP não é tóxico para as progenitoras (Mylchreest et al., 1999; Zhang et al., 2004).

Esses dados corroboram com os resultados obtidos em relação ao peso corpóreo dos filhotes machos ao nascimento que foi semelhante entre os grupos experimentais.

Ao compararmos o peso absoluto da próstata ventral entre os grupos no DPN180, verificamos não terem ocorrido alterações estatisticamente significantes, mesmo considerando os diferentes protocolos experimentais. Desta forma, verificou-se que a exposição pós-natal ao DBP não influenciou no peso da glândula, sendo esse semelhante entre os grupos expostos ou não no período pós-lactacional. Resultados semelhantes foram encontrados por Scarano et al. (2009) que não verificaram alteração no peso da próstata de animais adultos expostos no período perinatal.

A maioria dos estudos que associou a exposição gestacional, pré-natal ou pós-natal ao DBP, ou outros ftalatos, à toxicidade reprodutiva masculina utilizaram doses de 250, 500, 750 ou 1,000 mg/kg/d (Dibutylphthalate (DBP): Mylchreest et al., 2000; Fisher et al., 2003; Zhang et al., 2004; Diethylhexylphthalate (DEHP): Wilson et al., 2004; Borch et al., 2005). Em contraste com exposição a altas doses que reduzem os níveis de testosterona no período perinatal, elevações no nível de testosterona ocorreram em ratos expostos oralmente à doses de 10 ou 100mg/kg/d DEHP por 28 dias durante a puberdade (Akingbemi et al., 2004; Ljungvall et al., 2005; Ge et al., 2007).

De acordo com Parks et al. (2000), o efeito do ftalato na produção de testosterona pelas células de Leydig parece ser transitório e ocorre exclusivamente durante as fases fetal e perinatal, uma vez que os níveis de testosterona não estão diminuídos em animais expostos quando adultos. Por essa razão acredita-se que mesmo que alterações nos níveis de testosterona tenham ocorrido nos animais tratados durante a

exposição, esses níveis se normalizaram como consequência do experimento, se tornando equivalentes nos grupos experimentais quando adultos, como observado pela quantificação sérica dos níveis de testosterona obtida no presente estudo.

Os achados estereológicas apontaram para um aumento na proporção do compartimento estromal nos animais dos grupos DBP500+/- em relação aos animais do grupo DBP100-. Além disso, houve um aumento do compartimento epitelial nos grupos DBP100- e DBP500- relação ao grupo CN, e diminuição do compartimento luminal no grupo DBP500- em relação ao grupo CN. Tais alterações na proporção dos componentes teciduais podem estar envolvidas com distúrbios na morfogênese prostática ocasionados pela alteração dos níveis de testosterona (Parks et al., 2000, Jiang et al., 2007). Outra questão seria o aumento de alterações histopatológicas, o que altera o ambiente tecidual, principalmente nos grupos mais afetados.

Em relação às lesões histopatológicas encontradas é importante salientar que a indução de carcinogênese pelo MNU foi satisfatória, tendo em vista que os animais iniciados apresentaram maior incidência de lesões quando comparados aos animais do controle CN. Em estudo anterior (Scarano et al. 2009) foram observadas lesões proliferativas adaptativas e inflamação em ratos adultos (90 dias) submetidos à exposição perinatal (DBP - dose de 100mg/kg). Apesar do processo de indução carcinogênica não ter sido efetivo no sentido de induzir a formação de carcinomas de médio e alto grau de invasibilidade e indiferenciação, observamos a presença de lesões adaptativas, pré-malignas e carcinomas microinvasivos diferenciados. Essa característica de menor incidência de carcinomas após a indução pelo MNU provavelmente se deve ao fato de que a linhagem Wistar seja menos susceptível a carcinogênese química urogenital, quando comparada às linhagens Sprague-dawley, Fisher e Lewis (Oliveira et al. 2006).

Conforme observado anteriormente por Scarano et al. (2009), os resultados apresentados mostraram aumento na incidência de focos inflamatórios, atipias epiteliais reativas e hiperplasia/displasia nos animais tratados com DBP nas diferentes doses. Porém, foi observado que nos animais TDBP500+ e - houve um aumento na incidência de PIA e adenocarcinoma microinvasivo. Esse aumento na incidência de lesões com maior potencial de malignidade nos animais TDBP500 pode estar relacionado com um aumento na instabilidade gênica (genotoxicidade) provocada pela dose administrada (Kleinsasser et al. 2001).

Estudos epidemiológicos, histopatológicos e moleculares em humanos apresentaram evidências de causa e efeito de inflamação no processo de patogênese do câncer de próstata (De Marzo et al., 2004; Palapattu et al., 2005; De Marzo et al., 2007). Inflamações crônicas como fenômeno isolado, ou secundário a processos infecciosos, podem desempenhar papel importante na indução de crescimento prostático e progressão de hiperplasia benigna prostática. Em associação a PIA (Proliferative Inflammatory Atrophy), a perda da função da GSTP1 e danos por estresse oxidativo, o processo inflamatório aumenta a vulnerabilidade ao desenvolvimento de câncer (Sciarra et al., 2009). Apesar das evidências mostrarem que deve existir uma associação entre a inflamação e o câncer de próstata, provavelmente a maioria dos casos de câncer prostático devem estar associados a fatores genéticos e epigenéticos independentes de inflamação.

Tendo em vista que grande parte das alterações epiteliais adaptativas em ambos os grupos tratados com DBP possa estar associado ao aumento na incidência de inflamação (Scarano et al. 2009), o aumento da ocorrência de lesões com potencial de malignidade associados à inflamação (PIA) e adenocarcinoma microinvasivo em indivíduos TDBP500 em relação ao grupo TDBP100 podem estar associadas a um possível aumento na genotoxicidade do DBP nesta dose (Kleinsasser et al. 2001).

Ainda com relação à histopatologia, é importante ressaltar que a incidência de lesões nos grupos expostos durante o período perinatal (gestação e amamentação) e os suplementados com DBP no período pós MNU não foram consideravelmente diferentes, quando analisados na mesma dose. Essa constatação nos permite inferir que a suplementação pós-lactacional não alterou o padrão de susceptibilidade a carcinogênese química estabelecida pelo MNU. Entretanto, pode-se propor que as alterações observadas no DPN180 tenham sido predominantemente resultado da exposição perinatal ao DBP, durante a fase de organogênese da glândula prostática, configurando um cenário de imprinting característico de outros desreguladores endócrinos como o etinilestradiol, o dietilestilbestrol e o bisfenol-A (Prins et al. 2007).

As análises de expressão protéica por Western Blotting apontaram para um aumento na expressão de AR nos grupos TDBP100+/- . De forma similar, o estudo de Scarano et al. 2009 demonstrou aumento na expressão de AR no grupo exposto à 100mg/kg de DBP no período perinatal. Tendo em vista que a expressão do receptor androgênico pode ser dada de forma multifatorial: ligação da DHT e da testosterona, estímulo da fosforilação pela MAPK e AKT devido à ativação por fatores de

crescimento tecidual e outras vias associadas; o aumento da expressão do receptor de andrógeno nesses animais, pode refletir a mobilização da via da MAPK ativando vias de controle sobre a sobrevivência, proliferação e morte celular (Feldman & Feldman, 2001). No entanto para um melhor entendimento de como a mobilização da via da MAPK atua nesses animais, e mais ainda, se existe relação entre a mobilização dessa via e alterações no processo de morte celular neste modelo, se faz necessário um estudo envolvendo proteínas pró e anti-apoptóticas, bem como um índice quantitativo para avaliação de morte celular, propostos em outro estudo em andamento.

Os receptores de estrógenos do tipo  $\alpha$  estão envolvidos nos processos de desenvolvimento, proliferação e manutenção do ambiente prostático em condições fisiológicas (Cunha et al., 2002). Além disso, a proliferação epitelial durante o desenvolvimento de lesões prostáticas parece envolver esses receptores, que através de sinais parácrinos controlam vias de proliferação e morte celular epitelial (Cunha et al., 2002; Teixeira et al., 2012).

No nosso estudo houve um aumento na expressão de receptores ER $\alpha$  nos grupos DBP500+/- em relação aos animais do grupo CN. Vale a pena ressaltar que a expressão desse receptor não foi estatisticamente menor nos outros grupos iniciados pelo MNU. O aumento na expressão de ER $\alpha$  foi associado em vários trabalhos que descreveram o aumento na incidência de lesões como: metaplasia escamosa, displasia e PIN; onde os animais experimentais foram estimulados por hormônios exógenos (Risbridger et al., 2001; Scarano et al., 2004; Scarano et al., 2008), provocando alterações no equilíbrio homeostático hormonal.

Outro aspecto é o de que a ativação do receptor ER $\alpha$  e sua atuação nas vias de sinalização intracelular pode estar associada às vias de controle intrínseco de proliferação e morte celular como, por exemplo, as vias MAPK, AKT e PKA (Barone et al. 2010). Tais vias estão sendo estudadas em outro trabalho do nosso grupo e apontaram para um aumento na expressão de MAPK nos animais tratados com DBP. Por isso, a compreensão desses mecanismos deverão ser melhor avaliados quando os dados de outros estudos em andamento forem completados.



## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que a exposição perinatal ao DBP é capaz por si de ocasionar alterações teciduais e moleculares na próstata de ratos adultos expostos a pequenas e altas doses, e que a suplementação pós-natal deste composto não modificou o padrão observado nesses animais. Porém, os dados apontam para uma maior efetividade da exposição perinatal a menor dose (100 mg/kg de DBP), o que confirmam os dados já obtidos pelo grupo, podendo ser considerado como fator aditivo na promoção da carcinogênese em ratos expostos ao DBP durante a gestação e amamentação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akingbemi, B.T., Ge, R., Klinefelter, G.R., Zirkin, B.R., Hardy, M.P. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 775–780; 2004.

Barone, I.; Brusco, L.; A.W. Fuqua, S.A.W. Estrogen Receptor Mutations and Changes in Downstream Gene Expression and Signaling. *Clin Cancer Res*; 16(10) May 15, 2010.

Blount, B.C.; Silva, M.J.; Caudill, S.P.; Needham, L.L.; Pirkle, J.L.; Sampson, E.J.; Lucier, G.W.; Jackson, R.J and Brock, J.W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 108: 979-982, 2000.

Borch, J., Dalgaard, M., Ladefoged, O. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA—apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod. Toxicol.* 19: 517–525; 2005.

Carruthers, C. M.; Foster, P.M.D. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. *Birth Defects Res B*, 74: 277-285, 2005.

Cunha, G.R.; Hayward, S.W.; Wang, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70, 473–485; 2002.

De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Platz, E.A., Meeker, A.K., Nakayama, M., Epstein, J.I., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: Implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J. Cell Biochem.* 91: 459 –477; 2004.

De Marzo, A., Platz EA, Sutcliffe S, Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev.* 7: 256–69; 2007.

Ema, M.; Miyawaki, E.; Kawashima, K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol Lett*, 111:271-278, 2000.

Feldman, B.J., Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews* 1: 34-4; 2001.

Fisher, J.S.; Macpherson, S.; Marchetti, N.; Sharpe, R.M. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction* 18: 1383-1394,2003.

Foster, P.M.D.; Mylchreest, E.; Gaido, K.W.; Sar, M. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update*, 7: 231-235, 2001.

Ge, R. S.; Chen, G. R.; Dong, Q.; Akingbemi, B.; Sottas, C. M.; Santos, M.; Sealfon, S. C.; Bernard, D. J.; Hardy, M. P. Biphasic effects of postnatal exposure to Diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J Androl*, 28 (4): 513-520; 2007.

Jarfelt, K.; Dalgaard, M.; Hass, U.; Borch, J.; Jacobsen, H. and Ladefoged, O. Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di (2-ethylhexyl) phthalate and di (2-ethylhexyl) adipate. *Reprod Toxicol*, 19: 505-515, 2005.

Jiang, J., Ma, L., Yuan, L., Wang, X., Zhang, W. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP). *Toxicology* 232: 286–293; 2007.

Kleinsasser, N.H.; Wallner, B.C.; Kastenbauer, E.R.; Weissacher, H.; Harréus, U.A.: Genotoxicity of Di-Butyl-Phthalate and Di-Iso-Butyl-Phthalate in Human Lymphocytes and Mucosal Cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 21:189–196; 2001.

Kohn, M.C.; Parham, F.; Masten, S. A., Portier, C. J.; Shelby, M. D.; Brock, J.W.; Needham, L.L. Human exposure estimates for phthalates. *Environ Health Perspect*, 108: 440-442, 2000.

Korenbrot, C. C.; Huhtaniemi, I. T.; Weiner, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod*, 17:298–303, 1977.

Lehmann, K.P.; Phillips S.; Sar, M.; Foster, P. M. D.; Gaido, K. W. Dosedependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di- $\eta$ -butyl-ftalato. *Toxicoll Sci*, 81: 60-68, 2004.

Ljungvall, K., Karlsson, P., Hulten, F., Madej, A., Norrgren, L., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H., Magnusson, U. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di(2-ethylhexyl) phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology* 64: 1170–1184; 2005.

Mylchreest, E.; Cattley, R. C.; Foster, P. M. D. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci*, 43:47-60, 1998.

Mylchreest, E.; Sar, M.; Cattley, R.C. and Foster, P.M.D. Disruption of androgenregulated male reproductive development by di (n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Phamacol*, 156: 81-95, 1999.

Mylchreest, E.; Wallace, D.G.; Cattley, R.C. and Foster, P.M.D. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di (n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci*, 55: 143-151, 2000.

Oliveira, P.A.; Colaco, A.; De la Cruz, L.F.P.; Lopes, C.: Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp Oncol*, 28, 1,2 –11, 2006.

Palapattu, G.S., Sutcliffe, S., Bastian, P.J., Platz, E.A., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights. *Carcinogenesis* 26: 1170 – 81; 2005.

Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., Gray, L.E. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58: 339–349; 2000.

Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol.* 23 374-82; 2007.

Risbridger, G.; Wang, H.; Young, P. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- alpha mediates effects of estrogen on prostate epithelium. *Dev. Biol.* 229, 432–442; 2001.

Scarano, W.R., Cordeiro, R.S., Goes, R.M., Taboga, S.R. Intraepithelial alterations in the guinea pig lateral prostate after estradiol treatment at different ages. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 36, 141–148; 2004.

Scarano, W.R.; de Sousa, D.E., Campos, S.G., Corradi, L.S., Vilamaior, P.S., Taboga, S.R. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J Exp Pathol.* Feb;89(1):25-37; 2008.

Scarano, W.R.; Toledo, F.C.; Guerra, M.T.; Pinheiro, P.F.; Domeniconi, R.F.; Felisbino, S.L.; Campos, S.G.; Taboga, S.R.; Kempinas, W.G. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A.*;73(13-14):972-84; 2010.

Sciarra A. Editorial comment on: Shifting the paradigm of testosterone and prostate cancer: the saturation model and the limits of androgen-dependent growth. *Eur Urol.* Feb;55(2):320-1; 2009.

Teixeira, G.R; Fávoro, W.J; Pinheiro, P.F; Chuffa, L.G; Amorim, J.P; Mendes, L.O; Fioruci, B.A; Oba, E; Martins, O.A; Martinez, M.; Martinez, F.E; Physical exercise on the rat ventral prostate: Steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports*;22(5):e86-92; 2012.

US Environmental Protection Agency (EPA). Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009 Washington DC, 1996.

Wilson, V.S., Lambright, C., Furr, J., Ostby, J., Wood, C., Held, G., Gray, L.E.Jr. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol. Lett.* 146: 207–215; 2004.

Zhang, Y., Jiang, X., Chen, B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod Toxicol*, 18:669-676; 2004.