

MARIANA MARCIELO DE JESUS

**“EFEITOS COMBINADOS DA EXPOSIÇÃO AO DI-N-BUTIL
FTALATO E DO AMBIENTE OBESOGÊNICO SOBRE A
RESPOSTA TECIDUAL DA PRÓSTATA DE GERBILOS
ADULTOS”**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Mariana Marcielo de Jesus

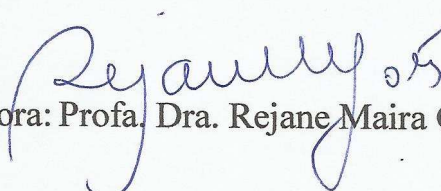
**“EFEITOS COMBINADOS DA EXPOSIÇÃO AO
DI-N-BUTIL FTALATO E DO AMBIENTE OBESOGÊNICO
SOBRE A RESPOSTA TECIDUAL DA PRÓSTATA DE
GERBILOS ADULTOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Mariana Marcielo de Jesus
Mariana Marcielo de Jesus

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra
em Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.


Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

J499e Jesus, Mariana Marcielo de, 1988-
Efeitos combinados da exposição ao di-n-butil ftalato e do ambiente
obesogênico sobre a resposta tecidual da próstata de gerbilos adultos / Mariana
Marcielo de Jesus. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Rejane Maira Góes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Próstata. 2. Gerbilo da Mongólia. 3. Dibutylftalato. 4. Dieta hiperlipídica. 5.
Alterações histopatológicas. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Combined effects of exposure to di-n-butyl phthalate and obesogenic environment on the prostate tissue response of adult gerbils

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Mongolian gerbil

Dibutyl phthalate

Diet, high-fat

Histopathological alterations

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Sérgio Luis Felisbino

Daniele Lisboa Ribeiro

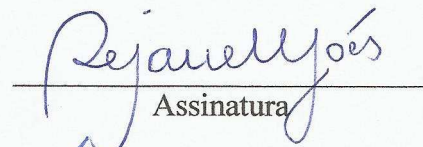
Data de defesa: 29-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

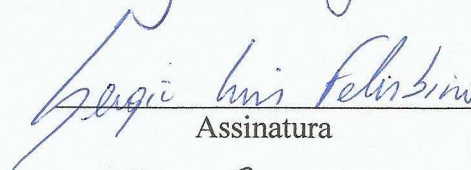
Campinas, 29 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

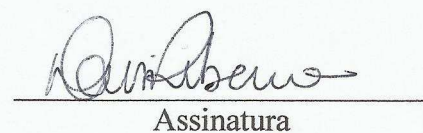
Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro


Assinatura

Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente susceptível a diversas alterações patológicas durante o envelhecimento. Vários fatores ambientais, como dieta e desreguladores endócrinos (EDC), podem alterar a homeostase hormonal e contribuir para o surgimento das patologias prostáticas. Os ftalatos, como o di-n-butil ftalato (DBP), são utilizados na fabricação dos mais variados produtos, como cosméticos, embalagens de alimentos, brinquedos e materiais de construção. Sua ação como EDC tem sido demonstrada principalmente em estudos experimentais de exposição gestacional em altas doses, quando ocorre comprometimento da formação dos órgãos andrógeno-dependentes. O consumo de dieta hiperlipídica, por sua vez, também afeta a homeostase dos hormônios esteroides, influenciando sua síntese e biodisponibilidade, podendo acarretar em sérios problemas de fertilidade e aumentar a incidência de câncer de próstata na idade adulta. Assim, esse estudo avaliou os efeitos combinados do consumo de dieta hiperlipídica e da exposição a doses baixas de DBP, desde a gestação até a maturidade sexual, sobre a resposta tecidual da próstata ventral de gerbilos machos na idade adulta. Gerbilos da Mongólia machos (4 semanas de idade), nascidos de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (20% de gorduras) ou balanceada (4% de gorduras), foram agrupados em quatro grupos experimentais: grupos Controle (C), Tratado com dieta hiperlipídica (HF), Tratado com DBP (Ph) e Tratado com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh). O DBP (5mg/kg/dia) foi administrado às mães prenhes ou aos filhotes na água de beber. Ao completarem 14 semanas de idade, os animais foram eutanasiados, sendo a próstata ventral processada para microscopia de luz, para análises histopatológicas e imunocitoquímicas. Nossos resultados revelaram aumento no peso corporal e no índice de adiposidade apenas nos animais Ph, indicando a ação obesogênica desse tratamento e a ineficiência do tratamento com dieta hiperlipídica na indução da obesidade. Não houve variação nos níveis de testosterona e estradiol entre os grupos. Os animais Ph apresentaram diminuição na frequência de células PCNA-positivas. Não foram verificadas alterações histológicas drásticas nas próstatas dos diferentes grupos, exceto pela grande incidência de atrofia epitelial nos grupos experimentais (HFPh>Ph>HF). A exposição à dieta hiperlipídica e ao

DBP aumentou o surgimento de lesões prostáticas. Contudo, o consumo isolado da dieta hiperlipídica foi responsável pelas mais severas alterações, como o surgimento de lesões malignas. O DBP diminuiu os focos inflamatórios presentes na próstata dos gerbilos e protegeu essa glândula contra as alterações provocadas pelo consumo da dieta hiperlipídica. Assim, nossos dados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica durante os períodos gestacional e pós-natal leva à hipertrofia prostática e favorece a instalação de processos inflamatórios e lesões pré-malignas e malignas. Além disso, os resultados mostraram que baixas doses de DBP possuem papel protetor na glândula prostática de gerbilos, diminuindo os danos causados pelo consumo da dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: próstata, gerbilo da Mongólia, di-n-butil ftalato, dieta hiperlipídica, alterações histopatológicas.

Prostate is an androgen-dependent gland susceptible to many pathological alterations during aging. Many environmental factors, as diet and endocrine disrupting chemicals (EDC), can alter the hormonal homeostasis and contribute to emergence of prostatic pathologies. Phthalates, as di-n-butyl phthalate (DBP), are used in many products, including cosmetics, food packing, toys and building materials. Its action as EDC has been demonstrated mainly in experimental studies of gestational exposure in high-doses, when there is the impairment of androgen-dependent organs formation. High-fat diet intake also affects the steroids hormones homeostasis, influencing its synthesis and bioavailability, and may cause serious problems of fertility and increased incidence of prostate cancer in adulthood. Thus, this study investigated the combined effects of high-fat diet intake and exposure to low doses of di-n-butyl phthalate, from gestation to sexual maturity, on the prostate tissue response of adult gerbils. Male gerbils (4 weeks old), were born from mothers fed with high-fat (20% fat) or balanced diet (4% fat), were divided into 4 experimental groups: Control (C), High-fat diet exposure (HF), DBP exposure (Ph) and High-fat diet plus DBP exposure (HFPh). DBP (5 mg/kg weight body/day) was administered to pregnant mothers or offspring in drinking water. The animals (14 weeks old) were killed and the ventral prostates were processed to light microscopy, histopathological and immunohistochemistry analyses. Our results revealed increase in body weight and adiposity index only in Ph animals, indicating the obesogenic action of this treatment and the inefficient induction of obesity by high-fat diet. There was no variation in testosterone and estradiol levels among the groups. Ph animals showed decrease in PCNA-positive cells frequency. There were no drastic histological alterations in prostates from different groups, except by the increase in epithelial atrophy among experimental groups (HFPh>Ph>HF). The high-fat diet intake and the DBP exposure increased the emergence of prostatic lesions. However, the high-fat diet intake was responsible for the most severe alterations, as malignant lesions. DBP decreased inflammatory foci in gerbil prostate and protected this gland against alterations caused by the high-fat diet. Thus, our data suggest that the high-fat diet intake during gestational and

postnatal periods causes prostatic hypertrophy and promotes the emergence of inflammatory processes and premalignant and malignant lesions. Furthermore, our results show that low doses of DBP have protective role in the gerbil prostate, decreasing the damages caused by high-fat diet intake.

Keywords: prostate, Mongolian gerbil, di-n-butyl phthalate, high-fat diet, histopathological alterations.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
INTRODUÇÃO	1
<i>Próstata: desenvolvimento e morfologia</i>	1
<i>A próstata do gerbilo da Mongólia</i>	2
<i>A próstata e os hormônios esteroides sexuais</i>	3
<i>Desreguladores endócrinos</i>	5
<i>Di-n-butil ftalato (DBP)</i>	6
<i>Dieta hiperlipídica</i>	9
<i>Associação entre o consumo de dieta hiperlipídica e a exposição ao DBP</i>	10
PROBLEMÁTICA DO ESTUDO.....	12
OBJETIVOS	14
RESULTADOS	15
LEGENDAS DAS FIGURAS	39
FIGURAS	41
CONCLUSÕES GERAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXOS.....	62

*Se procurar bem, você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida.
Mas a poesia (inexplicável) da vida.*

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Rejane Maira Góes, pela oportunidade, dedicação, confiança e por todos os ensinamentos recebidos durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por todas as sugestões para o aprimoramento do delineamento experimental.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro, Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, pela disponibilidade e pelas contribuições que auxiliaram a conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello, Profa. Dra. Maria Etelvina Pinto-Fochi e Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente, por toda a experiência compartilhada e sugestões recebidas durante meu exame de qualificação.

Aos docentes e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, por contribuírem para a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de Bolsa de Estudos CAPES/DS de Agosto de 2011 a Maio de 2012 e ao auxílio financeiro CAPES/PROAP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro concedido nas formas de Bolsa de Mestrado (Processo nº 2011/16316-1) e Reserva Técnica.

À Lílíam Panagio, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela disponibilidade, competência e carinho, principalmente nos momentos de maior correria.

À Profa. Dra. Raquel F. Domeniconi, pela imprescindível ajuda com os gerbilos. Sem os seus gerbilos esse estudo teria sido muito mais difícil.

À minha “companheirona”, Carol Negrin, por todos os problemas enfrentados juntas, como quando nossos animais brigavam e se matavam, ou não nasciam, pela companhia nas viagens e disciplinas em Campinas e por compreender que tínhamos que começar a sacrificar os animais logo cedo, para que eu não ficasse até muito tarde no lab processando metacarn. Obrigada por isso e por todo o resto que passamos juntas, Carol.

À Mãe que, mesmo não trabalhando com próstata, me auxiliou com a metodologia e demais técnicas envolvidas nesse trabalho. Obrigada Mãe pelo seu carinho, paciência, conselhos, dedicação e ensinamentos. E, principalmente, por todas as contas envolvendo diluição! ☺

À Bianca, por todos os conselhos, ajuda com a montagem das famílias e, principalmente, com as questões relacionadas às lesões.

À Cíntia, pela disposição em ir até Botucatu apenas para buscar animais. Nunca esquecerei esse seu gesto, Cí, nem as amoras comidas direto do pé e muito menos o gerbilo quase perdido no carro enquanto você cochilava.

À Aline, por sua imensa hospitalidade e confiança. Você tornou nossas noites de quintas-feiras muito mais prazerosas. Muito obrigada por ter disponibilizado sua casa para que pudéssemos descansar e aproveitar melhor as disciplinas do curso.

Ao técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise, Luiz Roberto Falleiros Júnior, por toda sua alegria, dedicação e capacidade de nos fazer rir. Serei sempre grata a você, Lóis, por não ter permitido que eu desistisse no início da minha jornada.

Ao Ricardo, por toda paciência e ajuda com as questões envolvendo computador, desde a instalação de programas até a formatação final dessa dissertação.

Aos meus outros queridos amigos do LMM que já seguiram seus caminhos ou que ainda me alegram com suas presenças. Ana Paula, Camila, Carol Christante, Carol Frandsen, Cássia, Diego, Eloísa, Fabiane, Júlia, Manoel, Mari Pulegio, Mari Zanatelli, Marina, Silvana, Simone, Thiago, Tião, Vanessa e Viviane. Muito obrigada por toda ajuda oferecida nos momentos difíceis, pela companhia, alegria e brincadeiras. Com vocês aprendi que não importa o quão ocupado você esteja, sempre há tempo para rir, jogar conversa fora e ajudar o “coleguinha” com seus problemas e dúvidas.

Aos meus pais, Ed e Sandra, pelo amor incondicional, apoio, oportunidades, paciência, confiança e dedicação. Obrigada por terem acreditado e me feito acreditar que sonhos podem ser realizados e por não terem me deixado desistir de seguir meus sonhos, mesmo quando eu não achava mais possível. Vocês serão os exemplos que levarei para a vida toda. Amarei vocês pela eternidade.

À minha irmã, Ana Paula, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e também me aturando. Amo você!

Ao meu namorado Gustavo que, mesmo sendo engenheiro, não reclamou de ir ao biotério em feriados e finais de semana, dar ração e água aos animais. Obrigada pelo amor, paciência, compreensão, companheirismo e por todos os finais de semana divididos entre estudos, artigos e namoro.

Ao Bochio, Bete e Bruna, por entenderem as inúmeras vezes que passei semanas sem ir à Uchoa, por conta dos afazeres com meu projeto, ou quando fui e fiquei com a cara nos livros e no computador.

Ao Adilson, por todas as discussões, às vezes um tanto quanto exaltadas, sobre projetos, pesquisas e vida acadêmica.

A Deus, por me guiar e por me dar forças para continuar trilhando meu caminho.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte e tornaram este trabalho possível.

5 α -r – enzima 5 α -redutase.

AR - receptor de andrógenos.

aro – enzima aromatase.

BBP – butil benzil ftalato.

C – grupo controle.

cml ou **smc** – célula muscular lisa.

DBP – di-n-butil ftalato.

DEHP – di-(2-etil-exil) ftalato.

DEP – dietil ftalato.

DHT – di-hidrotestosterona.

DMP – di-metil ftalato.

EDC – desreguladores endócrinos.

ER α – receptor de estrógeno tipo α .

ER β – receptor de estrógeno tipo β .

HF – grupo tratado com dieta hiperlipídica.

HFPh – grupo tratado com dieta hiperlipídica e di-n-butil ftalato.

HPB – hiperplasia prostática benigna.

MEC – matriz extracelular.

PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular.

Ph – grupo tratado com di-n-butil ftalato.

PIN – neoplasia intraepitelial prostática.

T – testosterona.

UGE – epitélio do seio urogenital.

UGS – seio urogenital.

Próstata: desenvolvimento e morfologia

A próstata é uma glândula acessória do aparelho genital masculino de mamíferos cujo papel está relacionado à reprodução interna, visto que sua secreção contém substâncias que aumentam a motilidade, a sobrevivência e a viabilidade dos espermatozoides. Essa glândula apresenta muitas variações morfológicas entre os marsupiais e eutérios, podendo apresentar organização compacta, multilobar ou difusa (Price, 1963; Setchell & Breed, 2006). A próstata não é exclusiva dos indivíduos do sexo masculino, sendo também encontrada em fêmeas adultas de roedores (Custódio et al., 2004; Santos & Taboga, 2006; Fochi et al., 2008; Biancardi et al., 2010) e humanos (Zaviačič et al., 2000). As características da próstata feminina não serão abordadas nesse estudo, mas estudos comprovam sua capacidade secretora, responsividade hormonal e envolvimento no surgimento de doenças (Zaviačič et al., 2000; Santos & Taboga, 2006; Custódio et al., 2008; 2010; Fochi et al., 2008; Santos et al., 2008).

O desenvolvimento prostático é direcionado por andrógenos produzidos pelos testículos fetais (Marker et al., 2003; Risbridge & Taylor, 2006). A próstata desenvolve-se a partir de uma subdivisão da cloaca, o seio urogenital (UGS), estrutura formada por uma camada epitelial derivada da endoderme e circundada por uma camada mesenquimal, de origem mesodérmica (Marker et al., 2003). O UGS é encontrado na base da bexiga urinária em desenvolvimento (Marker et al., 2003). Em machos e fêmeas de camundongos, o UGS surge após o 13º dia pós-concepção e permanece morfológicamente indistinguível até o 17,5º dia (Hamilton et al., 1959; Marker et al., 2003). Em humanos, a formação do UGS tem início na sétima semana de gestação, permanecendo indiferenciado até a 10ª-12ª semana de gestação, quando se inicia a morfogênese prostática (Hamilton et al., 1959; Marker et al., 2003).

A morfogênese ductal da próstata inicia-se com o crescimento de brotos epiteliais sólidos em direção ao mesênquima circundante, a partir do epitélio do seio urogenital (UGE; Marker et al., 2003). Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento. Contudo, durante o período neonatal, à medida que esses ductos crescem

em direção ao mesênquima, eles bifurcam-se em ramos laterais, dando origem aos três pares de lobos que se mantêm individualizados no adulto, resultando na próstata multilobar ou complexo prostático (Marker et al., 2003).

Histologicamente, os lobos prostáticos são compostos de unidades túbulo-alveolares envoltas por uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso (Abrahamsohn, 2008). Seu epitélio é composto por células basais, secretoras e neuroendócrinas (Peehl, 1996; Feldman & Feldman, 2001). O estroma prostático representa um compartimento tecidual complexo. É composto por fibroblastos e células musculares lisas (cml) imersos em uma matriz extracelular (MEC) contendo fibras colágenas e elásticas, que fornecem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, e proteoglicanos, dentre outras moléculas, que se associam a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas remodeladoras (Tuxhorn et al., 2001). Nesse compartimento há ainda macrófagos teciduais, células endoteliais vasculares e células do sistema imune (Tuxhorn et al., 2001; 2002).

A próstata do gerbilo da Mongólia

O roedor *Meriones unguiculatus* (Muridae, Gerbilinae), conhecido como gerbilo ou esquilo da Mongólia (Fig. 1a), tem sido amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas de pesquisa e é considerado um excelente modelo para o estudo de questões relacionadas ao sistema genital masculino (Pinheiro et al., 2003; Segatelli et al., 2004; Beu et al., 2009; Saltzman et al., 2009; Taboga et al., 2009; Juana et al., 2010; Pinto et al., 2010a; b).

O complexo prostático desse roedor tem sido foco de estudos do nosso grupo de pesquisa desde 2002. Devido à compacidade e aparente fusão de seus lobos, características ausentes no rato e no camundongo, o complexo prostático do gerbilo foi interpretado como exibindo maior semelhança anatômica com a próstata humana (Corradi et al., 2004). Porém, Rochel et al. (2007) demonstraram que cada lobo da próstata do gerbilo é delimitado por uma delicada cápsula de células mesoteliais, não se observando, dessa maneira, a completa fusão dos lobos como é notado em humanos (Fig. 1b-c). A Figura 1b-c ilustra a organização multilobar da próstata de gerbilos machos, composta por quatro pares de lobos, classificados de acordo com sua posição anatômica, em dorsais, dorsolaterais,

ventrais e anteriores ou glândulas coaguladoras (Pegorin de Campos et al., 2006; Rochel et al., 2007). Nos animais adultos, os lobos ou próstata ventral apresentam ácinos com epitélio cilíndrico simples e altamente secretório, imersos em um estroma com tecido conjuntivo vascularizado, com poucas fibras colágenas e elásticas e cml bem compactadas ao redor dos ácinos, muito semelhante ao observado na próstata humana (Pegorin de Campos et al., 2006).

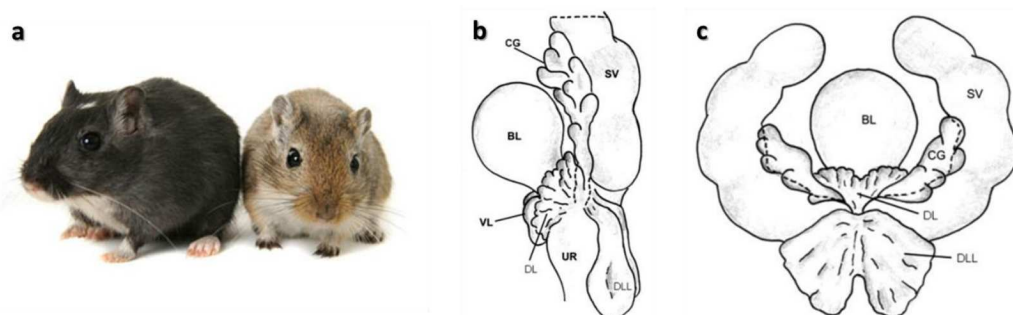


Figura 1. Gerbilo da Mongólia (a) e vistas lateral (b) e dorsal (c) do complexo prostático do gerbilo adulto. BL, bexiga urinária; CG, glândula coaguladora; DL, lobo dorsal; DLL, lobo dorsolateral; SV, vesícula seminal; VL, lobo ventral; UR, uretra pélvica e músculo uretral (retirado de Rochel et al., 2007).

Apesar das suas particularidades morfológicas, a próstata dos gerbilos comporta-se de modo semelhante à próstata humana frente à castração cirúrgica ou química, em especial no que se refere ao lobo ventral, mais sensível à supressão androgênica (Corradi et al., 2004; Góes et al., 2007; Oliveira et al., 2007). Outra vantagem desse modelo animal para os estudos da próstata é a maior incidência de lesões patológicas espontâneas decorrentes do envelhecimento em comparação com outros roedores de laboratório (Pegorin de Campos et al., 2006). Essa característica o tem tornado um modelo mais aplicável para estudos de carcinogênese experimental (Gonçalves et al., 2010; 2013).

A próstata e os hormônios esteroides sexuais

Os andrógenos são cruciais não apenas para o desenvolvimento e a diferenciação da próstata durante o desenvolvimento embrionário, mas também para sua manutenção e homeostasia durante a vida adulta (Huynh et al., 2001; Thomson, 2001; Prins & Putz,

2008). A testosterona (T) é o principal andrógeno circulante, sendo sintetizada em grande parte (95%) pelas células de Leydig e em menor proporção (5%) pela glândula adrenal (Hsing et al., 2002; Luu-The & Labrie, 2010). A forma de maior ação na próstata é a dihidrotestosterona (DHT), andrógeno mais potente formado a partir da redução da T pela enzima 5 α -redutase (5 α -r; Feldman & Feldman, 2001; Steers, 2001; McPherson et al., 2008). Os efeitos androgênicos em células prostáticas-alvo resultam da interação do hormônio com receptores específicos (receptores de andrógenos – AR) pertencentes à família de receptores nucleares (Cunha et al., 2001).

Além dos andrógenos, os estrógenos também possuem papel fundamental no desenvolvimento normal da próstata e na sua diferenciação (Marker et al., 2003; Härkönen & Mäkelä, 2004; McPherson et al., 2008). O principal estrógeno, o 17 β -estradiol, é sintetizado a partir da aromatização da T pela enzima aromatase (aro). Este processo ocorre preferencialmente no tecido adiposo, porém o 17 β -estradiol também é sintetizado em tecidos como o fígado, a próstata, os ossos, o cérebro e os testículos (Ekman, 2000; Härkönen & Mäkelä, 2004; Matsumoto & Bremner, 2011).

Os estrógenos agem via dois tipos de receptores específicos (McPherson et al., 2007). Na próstata, o receptor de estrógeno tipo α (ER α) localiza-se principalmente no estroma, enquanto o receptor de estrógeno tipo β (ER β) está presente no epitélio e também no compartimento estromal (Weihua et al., 2001; Carruba, 2007; Rochel-Maia et al., 2013). O ER α possui papel proliferativo, carcinogênico e inflamatório, estimulando o desenvolvimento de lesões; o ER β possui papel oposto, ou seja, ele exerce papel protetor na glândula prostática, sendo antiproliferativo, anti-inflamatório e anticarcinogênico (Risbridger et al., 2007). O aumento nos níveis de estrógenos pode suprimir a síntese de T, privando a próstata de estimulação androgênica e induzindo a atrofia e regressão desta glândula (McPherson et al., 2008).

Alta incidência de alterações patológicas nessa glândula, como prostatite, hiperplasia prostática benigna (HPB) e adenocarcinoma, são descritas para a população humana, principalmente durante o envelhecimento, tendo seus efeitos refletidos na qualidade de vida do indivíduo (Kim, 2011). Vários fatores ambientais, incluindo a dieta, podem alterar significativamente os níveis e o metabolismo dos hormônios esteroides,

contribuindo eventualmente para o desenvolvimento dessas doenças (Strom et al., 2005; Carruba, 2006; Chan et al., 2006; Prins, 2008). Em função disso, a próstata é um órgão bastante susceptível à ação de desreguladores endócrinos.

Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos (EDC) são substâncias capazes de interferir em diferentes etapas do metabolismo ou ação hormonal, tais como síntese, liberação, transporte, eliminação, ligação e ativação de vias intracelulares (Olujimi et al., 2010; Schug et al., 2011). A interferência em alguma dessas etapas pode desregular processos dependentes de hormônios e comprometer o desenvolvimento, a homeostase e a função de vários órgãos (Kavlock et al., 1996; Santamarta, 2001; Loureiro, 2002; Queiroz & Waissmann, 2006; Bila & Dezotti, 2007; Schug et al., 2011). Os EDC agem pela ativação de diferentes tipos de receptores (receptores de hormônios esteroides nucleares e não nucleares, receptores não esteroides e receptores órfãos) e de vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo de esteroides (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Outros mecanismos de ação dos EDC pouco conhecidos incluem efeitos diretos nos genes (Moral et al., 2008) e seu impacto epigenético (Anway & Skinner, 2008). Esses efeitos são particularmente problemáticos, uma vez que alterações no programa genético durante os estágios iniciais de desenvolvimento podem resultar em sérios efeitos posteriormente (Schug et al., 2011).

Os EDC abrangem um amplo espectro de substâncias naturais ou sintéticas, geralmente encontradas em baixas concentrações no meio ambiente (de $\mu\text{g/L}$ a ng/L ; Bila & Dezotti, 2007). Entre os EDC naturais, destacam-se os estrogênios naturais e os fitoestrogênios; entre os sintéticos, diferentes fármacos, pesticidas, bisfenol A e ftalatos (Loureiro, 2002; Bila & Dezotti, 2007). Tem havido um interesse crescente nas últimas décadas nos prejuízos à saúde humana e animal causados pela exposição aos EDC. A esse respeito têm sido levantadas as seguintes questões: i) se tais substâncias são capazes de produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; ii) quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; iii) se os EDC estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; e

iv) se existe uma concentração limiar abaixo da qual os EDC podem ser considerados como seguros (Bila & Dezotti; 2007).

Di-n-butil ftalato (DBP)

Os ésteres de ácidos ftálicos, mais comumente denominados ftalatos, são substâncias orgânicas derivadas do composto ácido 1,2-benzeno dicarboxílico, e geralmente apresentam baixa toxicidade (Loureiro, 2002; Foster, 2006). Alguns exemplos dessa categoria de EDC (Fig. 2) são dimetil ftalato (DMP), di-n-butil ftalato (DBP), di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP), butil benzil ftalato (BBP) e dietil ftalato (DEP). Estruturalmente, os ftalatos apresentam dois grupos éster ligados a um anel benzeno. As configurações *meta* e *para* são conhecidas, respectivamente, como isoftalatos e teraftalatos. A configuração *orto*, contudo, é conhecida genericamente como éster de ftalato, ou apenas ftalato (Kluwe, 1982). Os ftalatos são metabolizados a monoésteres por enzimas presentes em diversos tecidos do organismo, como no fígado (Fig. 3; Tanaka et al., 1978; Kluwe, 1982).

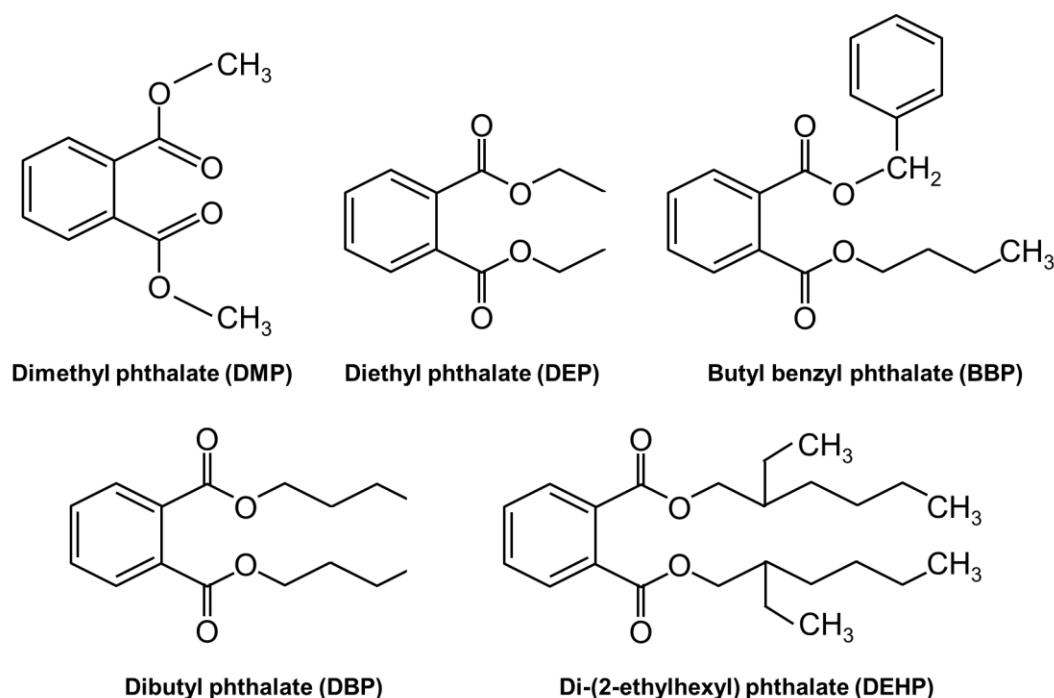


Figura 2. Estrutura química de alguns ftalatos (retirado e modificado de Olujimi et al., 2010).

Os ftalatos são utilizados como ingredientes na fabricação de diversos produtos. Fazem parte da composição de cosméticos e produtos de higiene pessoal, tais como hidratantes, esmaltes, shampoos e protetores solares (Environmental Working Group, 2000; Loureiro, 2002; Koniecki et al., 2011). Também são encontrados em equipamentos médicos, embalagens de produtos alimentícios, brinquedos infantis e materiais de construção (Environmental Working Group, 2000; Bila & Dezotti, 2007). Os ftalatos ainda são usados em tintas industriais, corantes, pisos vinílicos, lubrificantes e também como plastificantes, principalmente na produção de PVC, a fim de conceder maior flexibilidade ao produto (Mylchreest et al., 2000; Loureiro, 2002; Bila & Dezotti, 2007; Wittassek et al., 2011). As principais fontes de exposição humana aos ftalatos são a ingestão de alimentos e líquidos que tenham tido contato com plástico, tintas e outros constituintes das suas embalagens (Blount et al., 2000; Mylchreest et al., 2000; Loureiro, 2002), bem como a inalação e o contato dérmico. A exposição aos ftalatos também pode ocorrer através da rota intravenosa (Blount et al., 2000). Esses compostos químicos são lançados no ambiente a partir de despejos domésticos e industriais, efluentes aquosos e emissões atmosféricas (Loureiro, 2002).

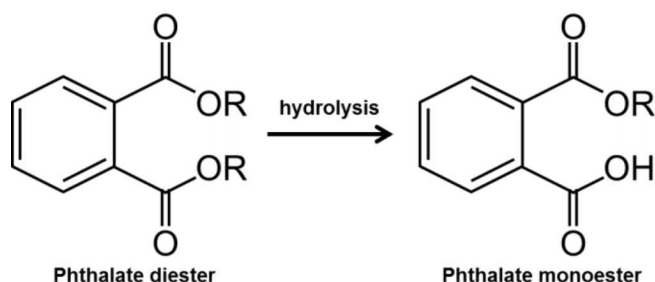


Figura 3. Estrutura química genérica de ésteres de ftalatos e seu metabólito (retirado e modificado de Hauser & Calafat, 2005).

Além de serem encontrados em amostras de urina humana (Blount et al., 2000; Koch et al., 2003; 2007; Kondo et al., 2010; Frederiksen et al., 2011), estudos revelaram a presença de metabólitos de ftalatos no leite materno (Mortensen et al., 2005; Main et al.,

2006), no fluido amniótico (Silva et al., 2004; Calafat et al., 2006) e também em alimentos, como pães, frutas, carnes e vegetais (Bradley et al., 2013).

A determinação de um panorama universal para a ingestão diária média de ftalatos é extremamente difícil, uma vez que essa estimativa depende, dentre outros fatores, da idade, do sexo e dos níveis de exposição ambiental a que a população está sujeita. Por exemplo, na Alemanha, estudo realizado com 85 adultos mostrou que a ingestão média diária dos ftalatos DEP, DBP e DEHP é 2,32 µg/kg/dia, 5,22 µg/kg/dia e 10,3 µg/kg/dia, respectivamente (Koch et al., 2003). Já entre os japoneses, esses valores são menores. Calcula-se que a ingestão diária média seja de 0,29 µg/kg/dia para o DEP, 1,47 µg/kg/dia para o DBP e 5,69 µg/kg/dia para o DEHP (Kondo et al., 2010). Recentemente, Frederiksen et al. (2011) estimaram a ingestão diária média de DEP, DBP e DEHP, dentre outros, por crianças e adolescentes dinamarqueses. Os valores encontrados foram 1,09 µg/kg/dia (DEP), 4,29 µg/kg/dia (DBP) e 4,04 µg/kg/dia (DEHP).

O composto DBP (Fig. 2), juntamente com o DEHP, é o principal ftalato encontrado nos alimentos embalados em plástico, como bolos, biscoitos, gordura vegetal, salsichas e queijos (Loureiro, 2002). Esse composto também é muito usado na produção de repelente de insetos, esmaltes, produtos capilares e para limpeza de pele e shampoos para bebês (Loureiro, 2002; Koniecki et al., 2011).

O metabolismo, a absorção e a excreção de DBP na urina e nas fezes, assim como de outros ftalatos, são considerados rápidos. Em ratos Wistar machos, por exemplo, mais de 90% do DBP administrado intravenosa ou oralmente foi excretado na urina e nas fezes dos animais dentro de 48h após sua administração (Tanaka et al., 1978). Em humanos, foi observada taxa de excreção renal de aproximadamente 70% do monobutil ftalato (MBP), principal metabólito obtido a partir da metabolização do DBP (Tanaka et al., 1978; Anderson et al., 2001).

Os efeitos prejudiciais da exposição ao DBP durante a gestação e a lactação sobre o desenvolvimento dos sistemas genitais masculino e feminino são bem conhecidos. O tratamento de ratos Sprague-Dawley com diversas doses de DBP (0,5 a 750mg/kg/dia) durante os períodos gestacional e lactacional afetou o desenvolvimento dos órgãos genitais e das glândulas acessórias masculinas dos animais expostos a doses superiores a

100mg/kg/dia, acarretando hipoplasia do pênis, do epidídimo, da próstata e das vesículas seminais (Mylchreest et al., 1998; 2000). Em alguns animais esse EDC resultou em agenesia desses órgãos. Outras anomalias decorrentes da exposição a doses elevadas ao DBP foram hipospadia, criptorquismo, redução na distância anogenital, diminuição na produção de espermatozoides, degeneração dos túbulos seminíferos e hiperplasia das células de Leydig (Mylchreest et al., 1998; 2000; Foster, 2006).

Carruthers & Foster (2005) estudaram o período crítico para o desenvolvimento do trato genital masculino da exposição a intervalos curtos (dois dias) a 500mg DBP/kg/dia durante a gestação de ratos Sprague-Dawley. Segundo os autores, mesmo um período curto de exposição ao DBP foi capaz de provocar profundas e irreversíveis anomalias no sistema genital dos animais tratados. Para os autores desse estudo, o período crítico no qual ocorrem as mais severas respostas ao tratamento com DBP é entre o 16º e o 18º dias de gestação (Carruthers & Foster, 2005). Esses dados, juntamente com uma série de outros estudos experimentais com roedores, mostraram que a exposição *in utero* ao ftalato produz uma série de efeitos adversos na prole masculina (Mylchreest et al., 1998; 2000; Foster, 2006). O prejuízo para o desenvolvimento dos órgãos andrógeno-dependentes seria devido à ação antiandrogênica dos ftalatos (Mylchreest et al., 1998; 2000; Foster, 2006).

Dieta hiperlipídica

A obesidade é um grave problema de saúde pública devido à crescente incidência mundial e os prejuízos resultantes para diversos sistemas orgânicos (Wilborn et al., 2005), sendo o aumento do consumo de lipídios saturados um dos fatores responsáveis por esse aumento (Lichtenstein et al., 1998). Estudos clínicos e experimentais comprovam a relação entre o consumo desse tipo de gordura e o surgimento de determinadas doenças, como as cardiovasculares, por exemplo, e diferentes tipos de cânceres. A dieta rica em gordura tem sido apontada como um dos fatores envolvidos no surgimento do câncer de próstata. Assim, a incidência desse tipo de câncer é seis vezes maior em países ocidentais que nos orientais, e uma das hipóteses versa sobre a diferença existente entre a dieta consumida (Masko et al., 2013). Os países ocidentais possuem uma dieta contendo elevado teor calórico, gorduras saturadas e proteína animal, além de baixo consumo de fruta, vegetais e grãos integrais. Por

outro lado, a dieta oriental é rica em peixes, frutas, vegetais, produtos a base de soja e grãos integrais.

A influência da dieta no câncer de próstata pode ser devido a ácidos graxos particulares (Fleshner et al., 2004; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2008), sendo a qualidade da gordura, mais que a quantidade, um fator chave para essa questão (Escobar et al., 2009). Estudos apontam que dietas contendo reduzido teor lipídico, mas elevada quantidade de ácidos graxos ômega-3, reduziriam o desenvolvimento e a progressão de câncer prostático, enquanto dietas hiperlipídicas ricas em ácidos graxos ômega-6 promoveriam o crescimento de células cancerígenas nesse órgão (Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2008).

Estudo recente investigou a relação entre a ingestão de gorduras e a incidência de câncer de próstata em humanos. Foi observada uma associação entre o consumo elevado de gorduras saturadas e o aumento no risco de câncer de próstata (Pelser et al., 2013). Os autores também notaram uma tendência, embora não significativa, de diminuição no risco de câncer de próstata com o aumento da ingestão de gorduras monoinsaturadas (Pelser et al., 2013).

Associação entre o consumo de dieta hiperlipídica e a exposição ao DBP

Segundo dados da literatura, existem evidências de que a exposição a certos EDC, como o dietilestilbestrol, o bisfenol A e os ftalatos, está associada com o aumento de peso corporal (Hatch et al., 2010; Newbold, 2010; Tang-Péronard et al., 2011). Assim, alguns EDC também possuem efeito de desregulador metabólico, atuando como agentes obesogênicos (Hatch et al., 2010; Schug et al., 2011; Hao et al., 2012). Em uma recente revisão sobre o assunto, Tang-Péronard et al. (2011) relataram que a exposição a alguns EDC pode ainda estar associada à obesidade em humanos, sugerindo que os EDC teriam papel significativo na epidemia da obesidade atual.

Diversos estudos epidemiológicos e com animais têm demonstrado que a exposição pré-natal a baixas doses de EDC como os ftalatos está associada com o desenvolvimento de obesidade em fases posteriores da vida (Newbold, 2010; Tang-Péronard et al., 2011). Acredita-se que a exposição uterina a esses compostos altere o desenvolvimento normal do tecido adiposo, em relação ao número, ao tamanho e à distribuição dos adipócitos (Hatch et

al., 2010). A exposição aos ftalatos, assim como a outros EDC, provoca ganho de peso corporal. Porém esse ganho de peso tende a ocorrer apenas quando há exposição a baixas doses de ftalatos (Newbold, 2010; Tang-Péronard et al., 2011). Em exposições a doses mais elevadas, observa-se perda de peso corporal (Tang-Péronard et al., 2011).

Conforme salientado em uma revisão sobre esse assunto (Hatch et al., 2010), alguns dos mecanismos responsáveis pelos efeitos obesogênicos dos EDC têm sido sugeridos a partir de estudos clínicos, mas devido à diversidade de resultados torna-se difícil esboçar uma conclusão sobre a relação exposição aos EDC/obesidade.

Embora existam estudos acerca da influência da exposição excessiva aos ftalatos durante a gestação sobre o sistema genital masculino, pouco é conhecido sobre seu impacto no desenvolvimento da próstata. A maioria dos estudos a esse respeito avalia apenas o efeito sobre o peso dessa glândula (Sharpe et al., 1995; Christiansen et al., 2010; Scarano et al., 2010). Recentemente, Scarano et al. (2009) observaram que a exposição de ratos Wistar a altas doses de DBP durante a gestação e a lactação influencia os padrões de desenvolvimento da próstata e leva a respostas celulares adaptativas devido à vulnerabilidade do tecido prostático à toxicidade provocada por esse EDC. Esses autores notaram que as alterações histológicas causadas nessa glândula, pela exposição ao DBP, foram acompanhadas de remodelamento da MEC e ocorrência de focos inflamatórios e neoplasias intraepiteliais prostáticas (Scarano et al., 2009). Esses dados, bem como de outros estudos de nosso laboratório, apontam a próstata como um importante indicador de toxicidade reprodutiva (Perez et al., 2011; Biancardi et al., 2012). Contudo, os efeitos da exposição a baixas doses de DBP por períodos prolongados sobre a histofisiologia prostática permanecem desconhecidos. Esse é um dos propósitos do presente estudo.

É conhecido que a obesidade ou o consumo de dieta hiperlipídica durante (Escobar et al., 2009) ou após (Ribeiro et al., 2012a; b) a maturação sexual altera os processos de proliferação e morte celular na próstata ventral de ratos. Contudo, os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica sobre a próstata do gerbilo ainda não foram investigados e merecem ser esclarecidos. Sabe-se que a alimentação materna inadequada durante o desenvolvimento fetal e/ou neonatal pode levar ao desenvolvimento de indivíduos obesos e com síndrome metabólica (McMillen & Robinson, 2005; Plagemann, 2005). Assim, distúrbios nutricionais ou endócrinos ocorridos durante a gestação podem provocar alterações metabólicas, endocrinológicas ou vasculares, alterando a função e a estrutura de diversos órgãos do recém-nascido durante a vida adulta, um processo conhecido como programação do desenvolvimento (Symonds & Budge, 2009). Apesar dessas evidências, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos gestacionais causados por alterações no consumo de alimentos sobre a histofisiologia prostática na idade adulta (Rinaldi et al., 2013) e o excesso de

gorduras ainda não foi examinado em gerbilos da Mongólia. Essa é a segunda questão a ser analisada no presente estudo.

Estudos relataram os efeitos prejudiciais da exposição isolada à dieta hiperlipídica (Escobar et al., 2009; Ribeiro et al., 2012a; b; Pelsner et al., 2013) e ao DBP (Scarano et al., 2009) sobre a glândula prostática, e também mostraram a existência de evidências indicando que a exposição a certos EDC, como os ftalatos, está associada ao aumento do peso corporal (Hatch et al., 2010; Newbold, 2010; Tang-Péronard et al., 2011). Assim, tendo em vista que tanto o consumo de dieta hiperlipídica como a exposição aos EDC aumentam a susceptibilidade a lesões patológicas na próstata na vida adulta, torna-se relevante avaliar os efeitos e possíveis interferências da ação conjunta desses dois fatores, questão ainda desconhecida na literatura.

Consideramos que a análise dessas três questões, tendo o gerbilo da Mongólia como modelo experimental, trará novas informações sobre a resposta prostática em termos da exposição aos EDC e padrão alimentar da sociedade atual.

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos combinados do consumo de dieta hiperlipídica e da exposição a doses baixas do desregulador endócrino di-n-butil ftalato (DBP), desde a gestação até a maturidade sexual, sobre a resposta tecidual da próstata ventral de gerbilos da Mongólia machos na idade adulta. A resposta prostática frente a essas duas condições foi avaliada isoladamente e em conjunto, com base 1) nas alterações histológicas e incidência de lesões malignas e pré-malignas, 2) na atividade de proliferação celular e 3) na sinalização de andrógenos e estrógenos na glândula.

Os resultados obtidos a partir desse estudo serão apresentados na forma de um manuscrito, que se encontra em fase de elaboração.

Baixas doses de di-n-butil ftalato protegem a próstata do gerbilo da Mongólia contra desordens inflamatórias e lesões malignas induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica

Mariana Marcielo de Jesus¹, Ana Carolina Negrin¹, Maria Etelvina Pinto-Fochi², Rejane Maira Góes^{1,2*}

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Financiado por:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. nº 2011/16316-1) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

*Correspondência para:

Profa. Dra. Rejane Maira Góes (e-mail: remagoes@ibilce.unesp.br)

Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15054-000

Introdução

A obesidade e a exposição contínua a desreguladores endócrinos (EDC) são dois problemas da vida moderna com repercussões negativas sobre a saúde da população mundial. EDC são compostos que alteram o funcionamento normal dos hormônios por diferentes mecanismos (Santamarta, 2001; Loureiro, 2002; Queiroz & Waissmann, 2006; Bila & Dezotti, 2007). Eles abrangem um amplo espectro de substâncias, como fitoestrogênios, pesticidas organoclorados, bisfenol A e ftalatos (Loureiro, 2002; Bila & Dezotti, 2007). Entre os ftalatos, o di-n-butil ftalato (DBP) é amplamente encontrado em produtos médicos à base de PVC, de higiene pessoal, de construção e alimentos (Loureiro, 2002; Koniecki et al., 2011; Bradley et al., 2013) e, embora não seja o ftalato mais produzido (Loureiro, 2002), seu estudo torna-se interessante devido à sua ampla utilização em produtos cotidianos.

A crescente incidência de obesidade e sobrepeso é uma preocupação atual em vários países, tendo em vista sua associação com diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres e os prejuízos e gastos com saúde envolvidos (Forrester, 2013). A maior prevalência de pessoas obesas e com sobrepeso é atribuída ao aumento do consumo de calorias, particularmente de dietas ricas em lipídios, associado ao estilo de vida sedentário da população atual (Stubbs & Lee, 2004; Chen et al., 2009). Existem evidências na literatura de que a exposição a certos EDC, como os ftalatos, está associada ao aumento de peso corporal (Hatch et al., 2010). Assim, os ftalatos seriam responsáveis por provocar alterações metabólicas no organismo, atuando como agentes obesogênicos (Hatch et al., 2010; Schug et al., 2011; Hao et al., 2012). Entretanto, a relação entre exposição aos EDC e obesidade ainda é pouco explorada na literatura, em parte devido à dificuldade em discriminar os vários elementos adicionais aos quais as populações humanas estão expostas juntamente com esses dois fatores. Assim, estudos experimentais poderão trazer novas informações a respeito dessa associação.

Estudos clínicos e experimentais apontam para os efeitos negativos da obesidade e da exposição ao DBP para a reprodução masculina. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica prejudica a qualidade do sêmen (número, motilidade e morfologia dos espermatozoides; Fernandez et al., 2011). Além disso, pacientes obesos apresentam maior

taxa de infertilidade (Guzick et al., 2001; Kort et al., 2006), disfunção erétil e hipotestosteronemia (Chung et al., 1999; Esposito et al., 2004). A exposição gestacional e perinatal a altas doses de DBP (100 a 750mg DBP/kg/dia), bem como a outros ftalatos, prejudica o desenvolvimento dos órgãos genitais, provocando hipoplasia dos mesmos, hipospadia, redução na distância anogenital e criptorquismo (Mylchreest et al., 1998; 2000). Também leva à diminuição na produção de espermatozoides, degeneração dos túbulos seminíferos e hiperplasia das células de Leydig (Mylchreest et al., 1998; 2000).

Menor atenção tem sido dada às alterações prostáticas frente ao consumo de dieta hiperlipídica e exposição ao DBP, em comparação com os demais componentes do sistema genital masculino. Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação positiva entre câncer de próstata e maior consumo de lipídios saturados (Pelser et al., 2013). Além disso, estudos com ratos indicam que o consumo de dieta hiperlipídica e/ou a obesidade aumentam o peso prostático e alteram algumas vias de sinalização, aumentando a proliferação celular na próstata e resultando em maior incidência de lesões pré-malignas e malignas (Cai et al., 2001; Escobar et al., 2009; Ribeiro et al., 2012a; b). Contudo, ainda não é conhecida a resposta prostática frente à oferta de dieta hiperlipídica desde a gestação até a idade adulta. Por sua vez, as exposições gestacional e lactacional de ratos Wistar a altas doses de DBP também levam à maior susceptibilidade de inflamação e neoplasias intraepiteliais prostáticas na idade adulta (Scarano et al., 2009). Considerando-se que tanto o consumo de dieta hiperlipídica como a exposição aos EDC aumentam a susceptibilidade a lesões patológicas na próstata na vida adulta, é relevante avaliar quais seriam os efeitos e possíveis interferências da ação conjunta desses dois fatores. Além disso, existe uma lacuna na literatura a esse respeito, visto que os estudos experimentais geralmente utilizam elevadas doses de DBP, as quais são menos adequadas para estabelecer comparações com a exposição humana.

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*, Muridae, Gerbilinae) é um roedor de laboratório muito utilizado em pesquisas experimentais em várias áreas científicas, inclusive em estudos reprodutivos (Pinheiro et al., 2003; Segatelli et al., 2004; Satzman et al., 2008; Beu et al., 2009; Taboga et al., 2009; Juana et al., 2010; Pinto et al., 2010a; b; Gonçalves et al., 2013). O complexo prostático desse roedor é bem caracterizado (Pegorin

de Campos et al.; 2006; Rochel et al., 2007) e o lobo ventral tem se mostrado bastante aplicável em estudos acerca das patologias prostáticas devido à elevada incidência de lesões malignas espontâneas durante o envelhecimento (Campos et al., 2008) ou após a indução de carcinogênese por N-Metil N-Nitrosuréia (MNU; Gonçalves et al., 2010; 2013), em comparação com outros roedores. Portanto, o gerbilo da Mongólia é um bom modelo para os estudos de toxicidade prostática e ainda inexplorado quanto aos efeitos do consumo de DBP e dieta hiperlipídica. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos da exposição prolongada (gestacional e pós-natal) à dieta hiperlipídica e a baixas doses do desregulador endócrino di-n-butil ftalato (DBP) sobre a resposta tecidual e incidência de lesões patológicas na próstata ventral de gerbilos machos adultos.

Material e Métodos

Animais e delineamento experimental

Gerbilos da Mongólia foram mantidos em caixas de polietileno, sob condições controladas de luminosidade e temperatura, com ração e água *ad libitum*, sendo esta fornecida aos animais em garrafas de vidro. Os procedimentos de manutenção e experimentação foram apreciados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (060/2012 CEUA/UNESP).

48 fêmeas recém-desmamadas (4 semanas de idade) foram divididas aleatoriamente em 2 grupos, os quais foram alimentados com ração balanceada ou ração hiperlipídica (Tab. I) por um período de 8 semanas. Não houve diferença no ganho de peso corporal das fêmeas após esse período (respectivamente $33,8 \pm 5,5$ g e $30,8 \pm 5,2$ g; $p=0,1186$). Ao término do tratamento com as dietas, as fêmeas foram acasaladas com machos normais (12 a 14 semanas de idade). Após a confirmação do acasalamento, através de esfregaço vaginal (dia 0 de gestação), metade das fêmeas de cada grupo foi exposta ao di-n-butil ftalato (DBP; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA; 5mg/kg/dia na água de beber). As soluções aquosas de DBP foram preparadas três vezes por semana e disponibilizada aos animais em garrafas de vidro revestidas com fita adesiva Silver Tape. O consumo médio de água entre as fêmeas tratadas com ração normal e hiperlipídica foi de $14,1 \pm 4,2$ mL/dia e $12,1 \pm 2,3$ mL/dia, respectivamente.

Os filhotes machos (n=12 animais/grupo; 1 animal/família) com 4 semanas de idade foram pesados e selecionados aleatoriamente para compor os seguintes grupos: *Grupo controle (C)*: filhos de mães alimentadas com ração balanceada e assim alimentados até maturidade sexual; *Grupo tratado com dieta hiperlipídica (HF)*: filhos de mães alimentadas com ração hiperlipídica e alimentados com a mesma ração até a maturidade sexual; *Grupo tratado com di-n-butil ftalato (Ph)*: filhos de mães alimentadas com a ração balanceada, alimentados com a mesma ração até maturidade sexual e expostos a doses baixas de DBP na gestação, lactação até maturidade sexual; *Grupo tratado com dieta hiperlipídica e di-n-butil ftalato (HFPh)*: filhos de mães alimentadas com ração hiperlipídica, alimentados com a mesma ração do desmame até a maturidade sexual e expostos concomitantemente ao DBP desde a gestação até a maturidade sexual. As doses de exposição dos filhotes ao DBP foram as mesmas descritas para as mães.

Ao fim do experimento, os gerbilos machos com 14 semanas de idade foram eutanasiados por inalação de CO₂, decapitados e o sangue coletado para as dosagens hormonais. O índice de adiposidade, expresso em porcentagem, foi estimado a partir da soma do peso das gorduras epididimal, retroperitoneal e visceral dividido pelo peso corporal x 100 (Taylor & Phillips, 1996; Fernandez et al., 2011).

Tabela I. Composição das dietas utilizadas.

Composição	Ração balanceada	Ração hiperlipídica[#]
Proteínas (%)	22	20
Carboidratos (%)	48	37
Lipídeos (%)	4	20
Calorias (Kcal/g)	3,16	4,8
Outros* (%)	26	23

* Outros: vitaminas, minerais e água.

[#] Padronizada pelo Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP).

Análises séricas hormonais

Amostras de sangue foram coletadas no momento da decapitação, centrifugadas (3000rpm, 20min) e estocadas a -70°C até o momento da análise. As dosagens hormonais

foram realizadas em duplicata com o uso de ELISA e kits de alta sensibilidade (testosterona e 17 β -estradiol, Cayman Chemical Company, MI, EUA), seguindo as instruções dos fabricantes. O limite de detecção para a testosterona e para o 17 β -estradiol é de 6 pg/mL e 19 pg/mL, respectivamente. As leituras foram realizadas no leitor SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, CA, EUA), a 405 nm.

Análises histológicas

O complexo prostático (vesícula seminal, glândula coaguladora e lobos prostáticos dorsolateral, dorsal e ventral) foi removido, imerso em solução salina e pesado. Posteriormente, o lobo ventral foi removido, pesado e fixado por imersão, durante 24 horas, em formaldeído tamponado a 4% recém-preparado ou em Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético), durante 3 horas. Após a fixação, os fragmentos foram processados para inclusão em parafina (Paraplast - Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes histológicos (4 μ m de espessura) foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), para estudos morfológicos gerais da próstata, com reticulina de Gömöri, para estudos das fibras reticulares no estroma prostático, e com ácido periódico & reativo de Schiff (PAS), para análise da secreção glicoproteica. As lâminas foram analisadas e as imagens digitalizadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, acoplado com câmara digital CCD e Sistema de aquisição de imagens.

Análises estereológicas e morfométricas

As análises estereológicas foram aplicadas aos cortes histológicos corados com HE para a determinação da frequência relativa do tecido epitelial, lúmen e estroma, segundo o método de contagem de pontos com o uso do retículo de Weibel (Weibel, 1963). Essas análises foram realizadas com o software Image Pro-Plus 6.0 (Copyright© 1993-2006, Media Cybernetics, Inc., MD, USA), a partir de 50 campos microscópicos digitalizados aleatoriamente no aumento de 200x (n=5 animais/grupo, 10 campos/animal), sob os quais foi aplicado um retículo de 130 pontos. A porcentagem relativa de cada componente foi estimada pela contagem da intersecção dessas porções teciduais nos pontos do retículo. A análise morfométrica foi realizada a partir de imagens obtidas com câmera BX61VS

(Olympus Corporation, Tóquio, Japão) acoplada ao scanner de lâminas V5110-SH5, do mesmo fabricante, a fim de determinar a altura das células epiteliais da próstata e a espessura da camada muscular do ácino prostático. Para esta análise, foram utilizadas 200 medidas de cada parâmetro por grupo experimental (n=5 animais/grupo, 40 medidas/animal). Apenas regiões prostáticas morfologicamente normais foram utilizadas nessas análises.

Análises da incidência e multiplicidade de lesões prostáticas

Cortes sequenciais foram corados com HE e reticulina de Gömöri e digitalizados em aumento de 400x no scanner de lâminas supracitado, para análise da incidência (número de indivíduos acometidos) e multiplicidade de lesões (número de focos de cada tipo de lesão). O corte todo foi examinado e as lesões identificadas foram classificadas de acordo com o sistema de classificação histopatológica para próstata de roedores proposto por Shappell et al. (2004) em atrofia epitelial (altura epitelial < 4µm), neoplasia intraepitelial prostática (PIN), carcinoma microinvasivo e desordens inflamatórias (inflamação intraluminal e periductal). Além das características histológicas, a caracterização do carcinoma microinvasivo foi confirmada pela ausência ou fragmentação das fibras reticulares na base do epitélio acinar, analisadas nos sequenciais corados com reticulina de Gömöri.

Imunocitoquímica

Os anticorpos primários usados no presente estudo foram: AR (rabbit polyclonal, N-20, diluição 1:75, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), PCNA (mouse monoclonal, PC10, diluição 1:100, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e p63 (mouse monoclonal, 4A4, diluição 1:100, sc-8431, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Para essa análise, cortes histológicos fixados em formaldeído tamponado a 4% ou em metacarn foram desparafinizados, reidratados através de gradiente de álcoois e a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6, a 93°C, por 20-45min. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3% em metanol por 20min, e o bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com leite desnatado 5% (30-60min) ou background sniper (10min; Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpos

primários diluídos em BSA 1%, overnight a 4°C ou por 1h a 37°C. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário apropriado e, posteriormente, com avidina/biotina (ABC Staining Systems, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), polímero Dako (EnVision™, Dual Link System-HRP, Dako, CA, USA) ou ADVANCE™ HRP Link e ADVANCE™ HRP Enzyme (Dako, CA, USA). A revelação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

Imunofluorescência

Após passarem pelos procedimentos descritos acima, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário em BSA 1% (α -actina; mouse monoclonal, 1A4, diluição 1:100, sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) overnight a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC (1:200; sc-2010, fluorescein conjugated, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) por 2h em temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI blue (UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941 for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).

Determinação do índice de proliferação celular e células AR e p63-positivas

O número de células AR, PCNA e p63-positivas na próstata ventral dos gerbilos foi estimado em cinco animais, para os quais foram selecionados aleatoriamente cinco campos microscópicos em aumento de 400x, totalizando 25 campos microscópicos por grupo. Para esses campos foi determinada a porcentagem de núcleos marcados em relação ao total de núcleos e calculado os valores médios por animal.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.0 (Copyright© 1992-2007, GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Os resultados quantitativos foram comprovados por meio dos testes estatísticos paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (Kruskal-Wallis). $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Análises biométricas

A exposição isolada à dieta hiperlipídica ou ao DBP, durante a gestação e a lactação, não alterou o peso corporal dos filhotes ao desmame, mas levou a um aumento de 31% quando em associação (Tab. I). A exposição gestacional e pós-natal isolada ou conjunta a esses fatores aumentou discretamente a média do peso corporal na idade adulta; sendo esse aumento estatisticamente significante apenas para o grupo sujeito ao DBP (Tab. I). Esse grupo apresentou índice de adiposidade aproximadamente 35% superior em relação ao grupo C (Fig. 1).

O peso úmido do complexo prostático aumentou em todos os grupos experimentais, enquanto o peso relativo aumentou (~ 44%) apenas no grupo HFPh (Tab. I). Tanto o peso úmido do lobo ventral como o relativo aumentou em todos os grupos, sendo esse aumento estatisticamente diferente do controle apenas nos grupos alimentados com a dieta hiperlipídica (Tab. I).

Aspectos histopatológicos

Não foram observadas alterações histológicas drásticas na próstata ventral dos gerbilos da Mongólia adultos após a exposição à dieta hiperlipídica, ao DBP ou a ambos; todos os grupos apresentaram características de glândula madura, com ácinos amplos e epitélio diferenciado (Fig. 2a-b, e-f, i-j, m-n). Entretanto, todos os grupos experimentais exibiram maior frequência de perfis acinares com atrofia epitelial (Fig. 4a-c), conforme confirmado pelas análises estereológicas e morfométricas (Tab. II) e pela análise da incidência e multiplicidade de lesões (Fig. 6). A atrofia epitelial foi acompanhada de aumento do lúmen acinar (Fig. 2e, i, m; Tab. II) e maior intensidade de coloração da secreção pelo PAS, em especial nos grupos Ph e HFPh (Fig. 2j, n). Independentemente da dieta, o tratamento dos animais com DBP levou a uma diminuição no volume do compartimento estromal (Tab. II). Também se notou, para todos os grupos experimentais, uma redução de aproximadamente 14 a 19% na espessura da camada subepitelial de células musculares lisas, em comparação com o grupo C (Fig. 2d, h, l, p; Tab. II). Conforme o

esperado, uma espessa camada de fibras reticulares foi observada logo abaixo da membrana basal em disposição contínua ao redor do ácino prostáticos de todos os animais, em regiões histologicamente normais (Fig. 2c, g, k, o).

A incidência geral de lesões patológicas foi de 33, 50, 58 e 67% para os grupos C, Ph, HF e HFPh, respectivamente (Fig. 6). Portanto, mesmo sem ter levado à obesidade, a exposição isolada à dieta hiperlipídica aumentou em 76% a ocorrência de lesões patológicas na próstata ventral, sendo esse aumento de 103% quando combinado com o DBP. Contudo, ao discriminar os tipos e a frequência das lesões, verificou-se que apenas a dieta hiperlipídica isolada levou ao surgimento de lesões malignas (Fig. 6), como carcinoma microinvasivo (Fig. 3). Essa dieta também aumentou a frequência de lesões pré-malignas e inflamatórias, em comparação com o grupo C (Fig. 5c, f). Os focos de lesões malignas identificados pelo aspecto histopatológico foram confirmados pelo rompimento da membrana basal (Fig. 3c-d, f). Essas regiões também exibiram desorganização da camada muscular subepitelial (Fig. 3a-b, e). A exposição a baixas doses de DBP diminuiu a incidência de desordens inflamatórias e aumentou a incidência de PIN, em comparação com o grupo C (Fig. 5b, e; 6). O grupo exposto concomitantemente à dieta hiperlipídica e ao DBP também exibiu menor incidência de desordens inflamatórias em comparação com o grupo HF (Fig. 5a, d; 6). Os dados de multiplicidade indicaram que, além da incidência, a dieta hiperlipídica isoladamente aumentou o número de focos de lesões teciduais, enquanto sua associação com o DBP reduziu os mesmos (Fig. 6).

Análises sorológicas

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na mediana dos níveis séricos de testosterona (Fig. 7a) e estradiol (Fig. 7b) entre os grupos. Contudo, os valores numéricos do primeiro foram mais altos para os animais do grupo HFPh, e os do segundo foram mais baixos para os do grupo Ph.

Imunocitoquímica (AR, PCNA e p63)

O aparente aumento das células AR-positivas verificado pela imunocitoquímica e análise quantitativa para os animais tratados apenas com a dieta hiperlipídica, em

comparação com o controle, não foi estatisticamente significativo (Fig. 7a, d, n). Verificou-se uma tendência na diminuição de células AR-positivas tanto no epitélio como no estroma prostático dos animais Ph e HFPh em relação ao controle e diminuição de aproximadamente 29% em relação ao grupo HF (Fig. 7a, h, k, n).

A média da frequência de células PCNA-positivas no epitélio e no estroma prostáticos foi maior no grupo tratado apenas com dieta hiperlipídica, em comparação com os demais grupos (Fig. 7b, e-f, i, l). Porém, esse aumento foi significativo apenas em comparação com o grupo tratado com DBP, o qual mostrou baixa frequência de células PCNA-positivas em relação aos demais grupos (Fig. 7o).

Houve diminuição de células p63-positivas, embora não significativa, em todos os grupos experimentais (Fig. 7c, g, j, m). Essa células diminuíram 23, 17 e 29% nos animais HF, Ph e HFPh, respectivamente (Fig. 7p).

Discussão

Esse estudo mostra que a exposição prolongada à dieta hiperlipídica ou a baixas doses do desregulador endócrino di-n-butil ftalato (DBP) não afeta drasticamente o desenvolvimento e a histologia da próstata de gerbilos da Mongólia machos, exceto pela maior incidência de atrofia epitelial. Porém, essa exposição torna a glândula prostática mais susceptível ao desenvolvimento de lesões patológicas no início da idade adulta. Assim, a exposição desse roedor ao DBP aumentou a incidência de PIN na próstata. Por sua vez, o consumo prolongado de alto teor lipídico aumentou as desordens inflamatórias e lesões pré-malignas e malignas, levando a uma incidência de 42% de carcinoma microinvasivo já no início da idade adulta.

O consumo cinco vezes maior de lipídios desde a vida intra-uterina até a idade adulta (14 semanas) não foi capaz de induzir obesidade no gerbilo, conforme demonstrado pela variação no peso corporal e no índice de adiposidade. Estudo recente confirma ser necessário um período de pelo menos 15 semanas de consumo da dieta para a indução da obesidade em ratos Wistar adultos (Ribeiro et al., 2012b), conforme estabelecido na padronização desse modelo de obesidade (Nascimento et al., 2008). Embora a condição de obesidade não tenha sido alcançada nesse estudo, os dados aqui obtidos são preocupantes,

pois sugerem que, para esse roedor, o consumo de dieta hiperlipídica em proporções semelhantes à que está submetida grande parte da população mundial pode acarretar sérios prejuízos para a saúde prostática, independentemente da condição de obesidade.

Diferentemente do consumo de dieta hiperlipídica, a administração isolada de baixas doses DBP aos gerbilos, desde a gestação até a idade adulta, aumentou tanto o peso corporal como o índice de adiposidade, corroborando a ideia de que os ftalatos possam atuar como agentes obesogênicos (Hatch et al., 2010; Schug et al., 2011; Hao et al., 2012). O aumento na adiposidade induzido pela exposição a baixas doses de DBP pode ser devido a alterações no número, tamanho e distribuição dos adipócitos ocorridas durante o desenvolvimento do tecido adiposo (Hatch et al., 2010), que refletiram no acúmulo de gordura nas regiões epididimal, retroperitoneal e visceral desses animais. Também é possível que esse ftalato, mesmo em baixas doses, tenha interferido em outros componentes das vias de sinalização hipotálamo-hipófise e glândulas endócrinas relacionados com o controle da adiposidade, como a leptina (Moschos et al., 2002).

A maior oferta de lipídios nos períodos gestacional e pós-natal aumentou o peso do complexo prostático e do lobo ventral na idade adulta. Portanto, nossos achados indicam que o excesso de lipídios é um importante fator indutor de hipertrofia prostática, independentemente dos demais fatores encontrados no quadro de obesidade (Cai et al., 2001; Xie et al., 2007; Escobar et al., 2009; Kim et al., 2011; Ribeiro et al., 2012a; b). O aumento da próstata ventral não foi acompanhado de alteração nos níveis de proliferação celular e na proporção dos compartimentos teciduais da glândula na idade adulta, exceto por aumento do componente luminal. Assim, é possível que a hipertrofia observada seja um reflexo de alterações ocorridas durante o desenvolvimento fetal ou puberal da próstata e a distúrbios na proliferação celular nessas fases.

Sabe-se que a obesidade pela ação da leptina pode ativar vias pró-inflamatórias locais por meio da expressão das citocinas como o fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) e interleucina 1 (Moschos et al., 2002; Shoelson et al., 2007; Lubrano et al., 2013; Masko et al., 2013). Dados recentes indicam que a obesidade induzida a ratos adultos pela dieta hiperlipídica aumenta as desordens inflamatórias na próstata (Ribeiro et al., 2012a). Nossos dados também revelam o aumento da incidência e do número de focos inflamatórios para a

próstata dos gerbilos expostos à dieta hiperlipídica, mesmo sem indução da obesidade. Assim, esses dados indicam que os lipídios por si favorecem a inflamação prostática.

As desordens inflamatórias são apontadas como importante indutor das doenças prostáticas, estando envolvidas nos passos iniciais da carcinogênese nessa glândula (De Marzo et al., 2007; Bernoulli et al., 2008). Assim, diversos autores sugerem que as desordens inflamatórias precederiam o aparecimento de lesões pré-malignas, assim como estas surgiriam anteriormente às lesões malignas (Borowsky et al., 2006; Bernoulli et al., 2008). Interessantemente, nossos resultados reiteram essa ideia, visto que o aumento de inflamação prostática observado após o consumo de dieta hiperlipídica foi acompanhado de alta incidência de carcinoma microinvasivo. A análise da expressão dos mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e interleucinas-1 na glândula serão realizadas para validar essa ideia.

Diversos estudos relatam o risco aumentado de desenvolvimento de lesões prostáticas em indivíduos e animais obesos e/ou que ingeriram grande quantidade de lipídeos (Calle & Kaaks, 2004; Facina et al., 2012; Ribeiro et al., 2012a). Ribeiro et al. (2012a) verificaram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica reduz os níveis de testosterona circulantes e a expressão de AR na próstata de ratos. Entretanto, esse modelo de obesidade envolve outras alterações metabólicas como a resistência à insulina e hiperglicemia, sendo também encontrados efeitos na expressão de ER β , PI3K e FGF-2 (Ribeiro et al., 2012a; b). As características de resistência à insulina não foram investigadas nesse estudo, mas não foram observadas alterações nos níveis de esteroides sexuais ou no número de células AR-positivas.

O gerbilo da Mongólia possui elevada pré-disposição a desenvolver lesões prostáticas espontâneas durante o processo de envelhecimento, como PIN, carcinoma microinvasivo e adenocarcinoma (Zanetoni, 2002; Pegorin de Campos et al., 2006; Campos et al., 2008), o que em parte é atribuído ao desbalanço hormonal que acomete os indivíduos com a senilidade (Zanetoni, 2002). O aumento marcante de PIN e de carcinoma microinvasivo detectado para os gerbilos expostos à dieta hiperlipídica, cujos esteroides sexuais não foram alterados, trazem novas evidências para o papel dos lipídios no favorecimento às lesões malignas na próstata. A alta incidência de lesões patológicas

também nos permite sugerir que o elevado teor lipídico na alimentação durante períodos críticos para o desenvolvimento e maturação prostática leva à reprogramação da glândula e provoca seu envelhecimento precoce.

A exposição a baixas doses de DBP aumentou a incidência de PIN. Entretanto, independentemente da dieta, esse tratamento resultou em menor incidência e frequência de focos inflamatórios, sugerindo um papel protetor do DBP contra as desordens inflamatórias na próstata para esse modelo experimental. Esse efeito anti-inflamatório foi acompanhado de redução nos níveis de proliferação celular. Efeito oposto foi observado por Scarano et al. (2009), que notaram aumento nas desordens inflamatórias após a administração de altas doses desse ftalato (100mg DBP/kg/dia) a ratos Wistar durante a gestação e a lactação. Esses autores sugerem que o DBP em doses altas exerça um papel citotóxico direto ou indireto, desencadeando respostas inflamatórias não-bacterianas que poderiam influenciar a patogênese das desordens adaptativas e pré-neoplásicas na próstata do rato. A exposição a compostos estrogênicos, assim como a castração, também aumenta a incidência de inflamação na próstata de ratos (Naslund et al., 1988; Stoker et al., 1999), indicando que o estrógeno ou o aumento na relação estrógeno/testosterona funciona como agentes inflamatórios na glândula prostática. Com base nessas evidências, e nas respostas teciduais aqui observadas, tais como a diminuição da proliferação celular, é possível sugerir que, em baixas doses, esse desregulador endócrino tenha interferido nas vias de sinalização do estrógeno. Embora os resultados obtidos até o momento não nos permitam esclarecer por quais mecanismos isso ocorreu, três possibilidades serão testadas futuramente: se o DBP i) desequilibra a expressão de ER α /ER β , ii) tem uma ação agonista sobre o ER β ou iii) inativa e bloqueia o ER α . Destacamos ainda que a baixa dose de DBP utilizada no presente estudo não foi suficiente para produzir um efeito antiandrogênico, como anteriormente descrito para exposições em altas doses (Mylchreest et al., 1998; Ema, 2002; Gray Jr. et al., 2006; Aoki et al., 2011).

Sendo assim, os dados aqui apresentados mostram que o consumo continuado de dieta hiperlipídica por gerbilos da Mongólia, desde a gestação até a idade adulta, leva à hipertrofia prostática e favorece a instalação de processos inflamatórios e lesões pré-malignas e malignas, resultando em um *status* de envelhecimento precoce. Baixas doses de

DBP nesses períodos, quando administradas isoladamente, induzem a obesidade. A exposição continuada a baixas doses desse ftalato também possui efeito anti-inflamatório e antiproliferativo sobre a próstata na idade adulta. Além disso, observou que a exposição a baixas doses de DBP reverte os danos causados pelo consumo de elevado teor lipídico, protegendo o tecido prostático contra os mesmos.

Referências bibliográficas

- AOKI, K.A.; HARRIS, C.A.; KATSIADAKI, I.; SUMPTER, J.P. Evidence suggesting that di-n-butyl phthalate has antiandrogenic effects in fish. **Environ Toxicol Chem**, v. 30, p. 1338-1345. 2011.
- BERNOULLI, J.; YATKIN, E.; LAAKSO, A.; ANTTINEN, M.; BOSLAND, M.; VEGA, K.; KALLAJOKI, M.; SANTTI, R.; PYLKKÄNEN, L. Histopathological evidence for an association of inflammation with ductal pin-like lesions but not with ductal adenocarcinoma in the prostate of the Noble rat. **Prostate**, v. 68, p. 728-739. 2008.
- BEU, C.C.; ORSI, A.M.; DOMENICONI, R.F. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. **Anat Histol Embryol**, v. 38, n. 1, p. 49-57. 2009.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666. 2007.
- BOROWSKY, A.D.; DINGLEY, K.H.; UBICK, E.; TURTELTAUB, K.W.; CARDIFF, R.D.; DEVERE-WHITE, R. Inflammation and atrophy precede prostatic neoplasia in a PhIP-induced rat model. **Neoplasia**, v. 8, p. 708-715. 2006.
- BRADLEY, E.L.; BURDEN, R.A.; LEON, I.; MORTIMER, D.N.; SPECK, D.R.; CASTLE, L. Determination of phthalate diesters in foods. **Food Addit Contam Part A**, v. 30, p. 722-734. 2013.
- CAI, X.; HALEEM, R.; ORAM, S.; CYRIAC, J.; JIANG, F.; GRAYHACK, J.T.; KOZLOWSKI, J.M.; WANG, Z. High fat diet increases the weight of rat ventral prostate. **Prostate**, v. 49, p. 1-8. 2001.
- CALLE, E.E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 579-591. 2004.

- CAMPOS, S.G.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; VILAMAIOR, P.S.; TABOGA, S.R. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. **Int J Exp Pathol**, v. 89, p. 13–24. 2008.
- CHEN, J.Q.; BROWN, T.R.; RUSSO, J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, p. 1128–1143. 2009.
- CHUNG, W.S.; SOHN, J.H.; PARK, Y.Y. Is obesity an underlying factor in erectile dysfunction? **Eur Urol**, v. 36, p. 68-70. 1999.
- DE MARZO, A. M.; PLATZ, E.A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C.G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, p. 256-269. 2007.
- EMA, M. Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats. **Congenit Anom**, v. 42, p. 297-308. 2002.
- ESCOBAR, E.L.O.; GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CARVALHO, H.F. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR γ levels and prostate growth. **Prostate**, v. 69, p. 548-558. 2009.
- ESPOSITO, K.; GIUGLIANO, F.; DI PALO, C.; GIUGLIANO, G.; MARFELLA, R.; D'ANDREA, F.; D'ARMIENTO, M.; GIUGLIANO, D. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, p. 2978-2984. 2004.
- FACINA, C.H.; GONÇALVES, B.F.; TABOGA, S.R. Efeito promocional da dieta hiperlipídica sobre a carcinogênese prostática em gerbilos. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2011, São José do Rio Preto. **Resumos...** Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxiii_cic/fase1.php>. Acesso em: 15 Nov. 2012.
- FERNANDEZ, C.D.B., BELLENTANI, F.F.; FERNANDES, G.S.A.; PEROBELLI, J. E.; FAVARETO, A.P.; NASCIMENTO, A.F.; CICOGNA, A.C.; KEMPINAS, W.D.G. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, p. 32-42. 2011.

- FORRESTER, T. Epidemiologic transitions: migration and development of obesity and cardiometabolic disease in the developing world. **Nestlé Nutr Inst Workshop Ser**, v. 71, p. 147-156. 2013.
- GONÇALVES, B.F.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.; TABOGA, S.R.; CAMPOS, S.G. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 1, p. 96-106. 2010.
- GONÇALVES, B.F.; CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; FALLEIROS JR., L.R.; AMORIM, R.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, p. 1202-1213. 2013.
- GRAY JR., L.E.; WILSON, V.S.; STOKER, T.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; NORIEGA, N.; HOWDESHELL, K.; ANKLEY, G.T.; GUILLETTE, L. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. **Int J Androl**, v. 29, p. 96-104. 2006.
- GUZICK, D.S.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C.K.; NAKAJIMA, S.T.; COUTIFARIS, C.; CARSON, S.A.; CISNEROS, P.; STEINKAMPF, M.P.; HILL, J.A.; XU, D.; VOGEL, D.L. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **N Engl J Med**, v. 345, n. 19, p. 1388-1393. 2001.
- HAO, C.; CHENG, X.; XIA, H. MA, X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Biosci Rep**, v. 32, p. 619-629. 2012.
- HATCH, E.E.; NELSON, J.W.; STAHLHUT, R.W.; WEBSTER, T.F. Association of Endocrine Disruptors and Obesity: Perspectives from Epidemiologic Studies. **Int J Androl**, v. 33, n. 2, p. 324–332. 2010.
- JUANA, L.; BÁRBARA, V.G.; MARTÍN, M.T.; AGUSTÍN, C.; GUILLERMO, R.B.; GUADALUPE, O. Neither testosterone levels nor aggression decrease when the male

- Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) displays paternal behavior. **Horm Behav**, v. 57, n. 3, p. 271-275. 2010.
- KIM, J.M.; SONG, P.H.; KIM, H.T.; MOON, K.H. Effect of obesity on prostate-specific antigen, prostate volume, and International Prostate Symptom Score in patients with benign prostatic hyperplasia. **Korean J Urol**, v. 52, p. 401-405. 2011.
- KONIECKI, D.; WANG, R. MOODY, R.P.; ZHU, J. Phthalates in cosmetic and personal care products: concentrations and possible dermal exposure. **Environ Res**, v. 111, p. 329–336. 2011.
- KORT, H.I.; MASSEY, J.B.; ELSNER, C.W.; MITCHELL-LEEF, D.; SHAPIRO, D.B.; WITT, M.A.; ROUDEBUSH, W.E. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **J Androl**, v. 27, p. 450-452. 2006.
- LOUREIRO, I.R. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- LUBRANO, C.; GENOVESI, G.; SPECCHIA, P.; COSTANTINI, D.; MARIANI, S.; PETRANGELI, E.; LENZI, A.; GNESSI, L. Obesity and metabolic comorbidities:
- MASKO, E.M.; ALLOTT, E.H.; FREEDLAND, S.J. The relationship between nutrition and prostate cancer: is more always better? **Eur Urol**, v. 63, p. 810-820. 2013.
- MOSCHOS, S.; CHAN, J.L.; MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril**, v. 77, p. 433-444. 2002.
- 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**, v. 43, p. 47-60. 1998.
- MYLCHREEST, E.; WALLACE, D.G.; CATTLEY, R.C.; 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**, v. 55, p. 143-151. 2000.
- NASCIMENTO, A.F.; SUGIZAKI, M.M.; LEOPOLDO, A.S.; LIMA-LEOPOLDO, A.P.; LUVIZOTTO, R.A.M.; NOGUEIRA, C.R.; CICOONA, A.C. A hypercaloric pellet-diet

- cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 968-974. 2008.
- NASLUND, M.J.; STRANDBERG, J.D.; COFFEY, D.S. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. **J Urol**, v. 140, p. 1049-1053. 1988.
- PEGORIN DE CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **Anat Rec A**, v. 288A, p. 723–733. 2006.
- PELSER, C.; MONDUL, A.M.; HOLLENBECK, A.R.; PARK, Y. Dietary fat, fatty acids, and risk of prostate cancer in the NIH-AARP diet and health study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 33, p. 697-707. 2013.
- PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Structure of the pelvic and penile urethra – relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Anat**, v. 202, p. 431-444. 2003.
- PINTO, M.E.; BOTTA, L.S.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 293, p. 310–319. 2010a.
- PINTO M.E.; EGYDIO, F.M.; TABOGA, S.R.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C.; GÓES, R.M. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. **Microsc Res Tech**, v. 73, p. 119–127. 2010b.
- QUEIROZ, E.K.R.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 485-493. 2006.
- RIBEIRO, D.L.; PINTO, M.E.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R.; MAEDA, S.Y.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. **J Androl**, v. 33, p 854-865. 2012a.

- RIBEIRO, D.L.; PINTO, M.E.; MAEDA, S.Y.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell Tissue Res**, v. 349, p. 577-588. 2012b.
- ROCHEL, S.S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 290, p. 1233–1247. 2007.
- SALTZMAN, W.; THINDA, S.; HIGGINS, A.L.; MATSUMOTO, W.R.; AHMED, S.; MCGEEHAN, L.; KOLB, E.M. Effects of siblings on reproductive maturation and infanticidal behavior in cooperatively breeding Mongolian gerbils. **Dev Psychobiol**, v. 51, p. 60–72. 2009.
- SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol e Desenv Rur Sustent**, Porto Alegre, v. 2, n. 3. p. 18-29. 2001.
- SCARANO, W.R.; TOLEDO, F.C.; GUERRA, M.T.; CAMPOS, S.G.P.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; FELISBINO, S.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; TABOGA, S.R.; KEMPINAS, W.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**, v. 262, p. 215–223. 2009.
- SCHUG, T.T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J.J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127, p. 204-215. 2011.
- SEGATELLI, T.M.; FRANÇA, L.R.; PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Androl**, v. 25, n. 6, p. 872-880. 2004.
- SHAPPELL, S.B.; THOMAS, G.V.; ROBERTS, R.L.; HERBERT, R.; ITTMANN, M.M.; RUBIN, M.A.; HUMPHREY, P.A.; SUNDBERG, J.P.; ROZENGURT, N.; BARRIOS, R.; WARD, J.M.; CARDIFF, R.D. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Res**, v. 64, p. 2270 –2305. 2004.

- SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2169-2180. 2007.
- STOKER, T.E.; ROBINETTE, C.L.; COOPER, R.L. Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. **Reprod Toxicol**, v. 13, p. 463-472. 1999.
- STUBBS, C.O.; LEE, A.L. The obesity epidemic: both energy intake and physical activity contribute. **Med J Aust**, v. 181, p. 489-491. 2004.
- TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 8, p. 946-955. 2009.
- TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, n. 3, p. 389-398. 1996.
- WEIBEL, E.R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**, v. 12, p. 131-155. 1963.
- XIE, L.P.; BAI, Y.; ZHANG, X.Z.; ZHENG, X.Y.; YAO, K.S.; XU, L.; ZEEGERS, M.P. Obesity and benign prostatic enlargement: a large observational study in China. **Urology**, v. 69, p. 680-684. 2007.
- ZANETONI, C. **Alterações na próstata relacionadas com o envelhecimento do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*): aspectos estruturais, histoquímicos e ultra-estruturais**. 2002. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

Tabela I. Parâmetros biométricos de gerbilos controle (C), tratados com dieta hiperlipídica (HF), tratados com DBP (Ph) e tratados com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh).

Parâmetros biométricos n=12	Grupos experimentais			
	C	HF	Ph	HFPh
Peso corporal 4s (g)	19,4±3,9 ^a	19,5±4,3 ^a	18,3±3,4 ^a	25,4±5,6 ^b
Peso corporal 14s (g)	59,9±5,7 ^a	61,5±4,9 ^{a,b}	64,8±6,9 ^b	64,3±4,8 ^{a,b}
Peso do complexo prostático (mg)	331,8±136,4 ^a	423,1±117,2 ^b	443,7±135,1 ^b	505,6±70 ^b
Peso relativo do complexo prostático (x10 ⁻³)	5,5±2 ^a	6,8±1,6 ^{a,b}	6,8±1,7 ^{a,b}	7,9±1 ^b
Peso da próstata ventral (mg)	9,4±5,2 ^a	13±4,5 ^b	12,3±3,6 ^{a,b}	14,7±3,5 ^b
Peso relativo da próstata ventral (x10 ⁻⁴)	1,5±0,8 ^a	2,1±0,7 ^b	1,9±0,5 ^{a,b}	2,3±0,5 ^b

Valores expressos em média±desvio padrão.

Os superíndices ^{a,b} indicam diferença significativa entre os grupos (p≤0,05).

Tabela II. Parâmetros estereológicos e morfométricos de gerbilos machos dos grupos Controle (C), Tratado com dieta hiperlipídica (HF), Tratado com DBP (Ph) e Tratado com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh).

Parâmetros estereológicos e morfométricos	Grupos experimentais			
	C	HF	Ph	HFPh
<i>Estereologia (%)</i> *				
Epitélio	19,6±7	14,5±7,3	16,1±6,3	16±9,2
Estroma	51,9±14,8 ^a	50,2±13,9 ^a	32,4±13,2 ^b	38,3±15 ^b
Lúmen	28,5±13,3 ^a	35,4±15,5 ^{a,c}	51,5±15,6 ^b	45,7±19 ^{b,c}
<i>Morfometria (μm)</i> [#]				
Altura do epitélio	12,5±2,9 ^a	11,1±3,6 ^{b,c}	10,7±3,6 ^b	11,6±4,1 ^{a,c}
Espessura de cml	7,4±3,2 ^a	6,4±3 ^b	6±2,7 ^b	6,1±2,6 ^b

* 50 campos por grupo experimental (n=5 animais/grupo, 10 campos /animal).

[#] 200 medidas por grupo experimental (n=5 animais/grupo, 40 medidas/animal).

Valores expressos em média±desvio padrão.

Os superíndices ^{a,b,c} indicam diferença significativa entre os grupos (p≤0,05).

Figura 1. Índice de adiposidade dos gerbilos controle (C), tratados com dieta hiperlipídica (HF), tratados com DBP (Ph) e tratados com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh). Estão representados os valores individuais de 12 animais de cada grupo experimental (círculos) e o valor mediano por grupo (linha). Dentro de cada grupo, alguns animais exibiram o mesmo índice de adiposidade (4 para C; 3 para HF; 2 para Ph e HFPh). * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos controle (C; **a-d**), tratados com dieta hiperlipídica (HF; **e-h**), tratados com DBP (Ph; **i-l**) e tratados com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh; **m-p**). A análise panorâmica permite observar o aumento no volume luminal prostático (lu) nos animais HF (*), Ph e HFPh (**) em relação aos animais C (Ph~HFPh>HF>C; **a, e, i, m**). A próstata dos animais Ph e HFPh apresentou maior intensidade de secreção PAS-positiva (**b, f, j, n**). Observou-se, em todos os grupos estudados, integridade da membrana basal (cabeça de seta), assim como fibras reticulares dispostas concêntricamente ao ácino (**c, g, k, o**). A imunofluorescência para alfa-actina revelou células musculares lisas (smc) organizadas concêntricamente ao redor dos ácinos prostáticos dos animais dos grupos C, HF, Ph e HFPh (**d, h, l, p**, respectivamente). Epitélio (ep), compartimento estromal (s). Barras: **a, e, i, m**: 100µm; **h, l, p**: 50µm; **c-d, g, k, o**: 20µm; **b, f, j, n**: 10µm.

Figura 3. Carcinomas microinvasivos encontrados na próstata ventral de gerbilos tratados com dieta hiperlipídica (HF). Note o rompimento da camada de fibras reticulares localizadas abaixo da membrana basal (setas grossas), assim como da camada de células musculares lisas (setas finas). Barras: **e**: 100µm; **a-c, f**: 50µm; **d**: 10µm.

Figura 4. Atrofia epitelial prostática (setas duplas) encontrada na próstata ventral dos animais tratados com dieta hiperlipídica (HF; **a**), tratados com DBP (Ph; **b**) e tratados com

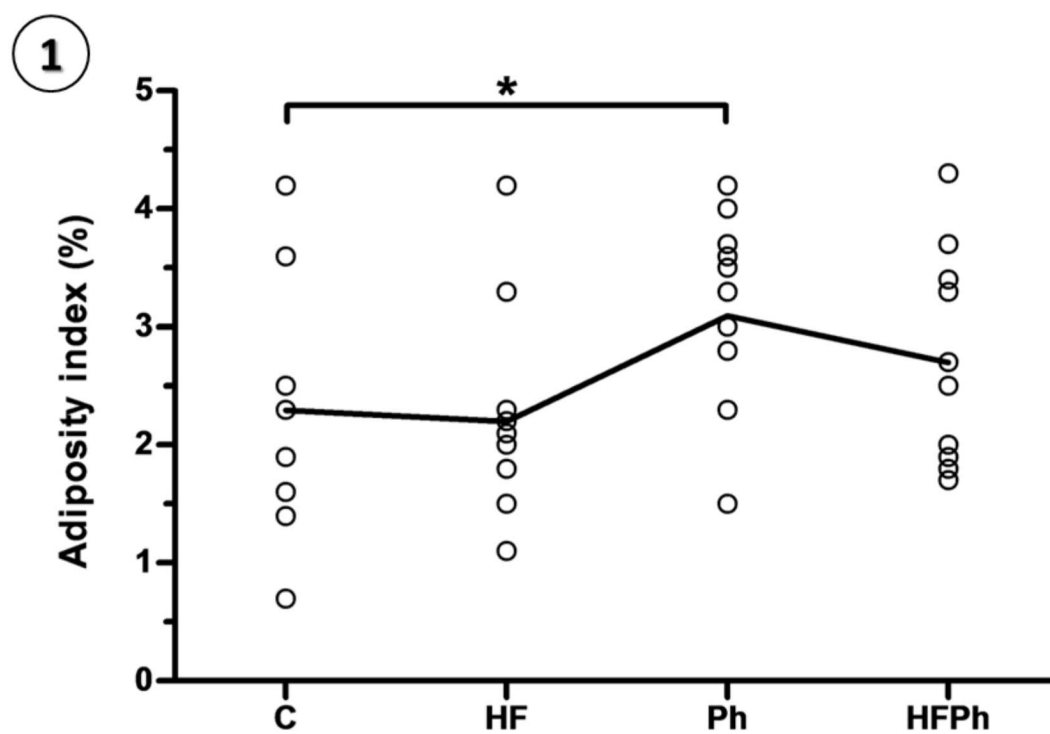
dieta hiperlipídica + DBP (HFPh; **c**). Epitélio (ep), células musculares lisas (smc). Barras: **a**: 50µm; **b-c**: 20µm.

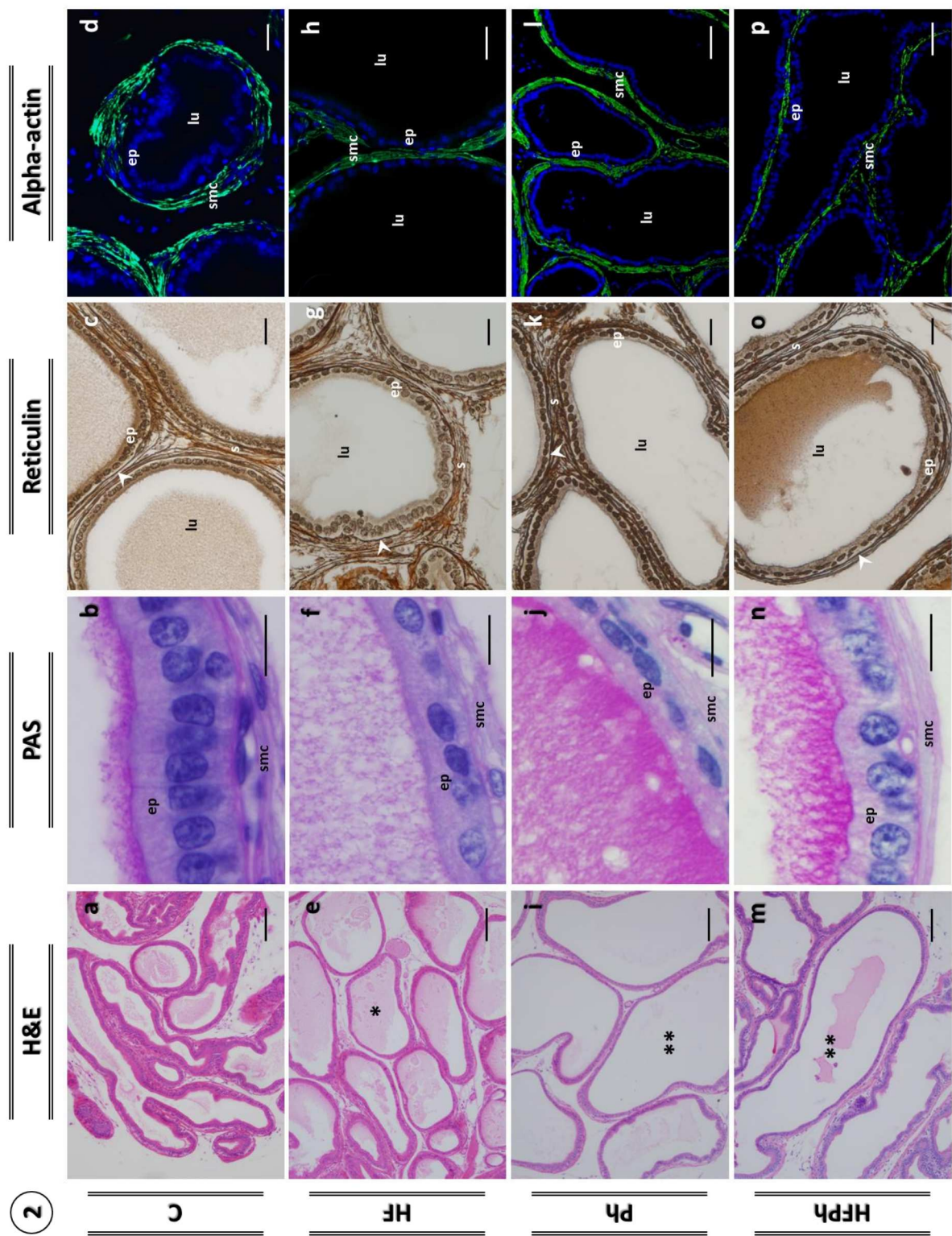
Figura 5. Alterações pré-malignas encontradas na próstata ventral dos animais tratados com dieta hiperlipídica (HF; **c, f**), tratados com DBP (Ph; **b, e**) e tratados com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh; **a, d**). Observa-se a presença de células epiteliais morfológicamente alteradas, possuindo núcleo com tamanho alterado e nucléolo evidente (setas finas), além de figuras mitóticas (cabeça de seta) e células no início do processo de divisão celular (seta grossa). Em algumas regiões, há formação de microácinos (★). Nota-se a presença de grande quantidade de células inflamatórias (*) no lúmen de alguns ácinos prostáticos (**b-c**). Epitélio (ep), células musculares lisas (smc), neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Barras: **a, c**: 50µm; **b, d, f**: 20µm; **e, insets**: 10µm.

Figura 6. Incidência e multiplicidade de lesões encontradas nos animais dos diferentes grupos experimentais. Grupos Controle (C), Tratado com dieta hiperlipídica (HF), Tratado com DBP (Ph) e Tratado com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh). Os dados de multiplicidade correspondem à variação do número de focos de lesões encontrados em cada grupo. n=12 animais/grupo.

Figura 7. Níveis séricos de testosterona (**a**) e estradiol (**b**) dos gerbilos controle (C), tratados com dieta hiperlipídica (HF), tratados com DBP (Ph) e tratados com dieta hiperlipídica + DBP (HFPh). Estão representados os valores individuais dos animais de cada grupo experimental (círculos) e o valor mediano por grupo (linha). n=9 animais/grupo.

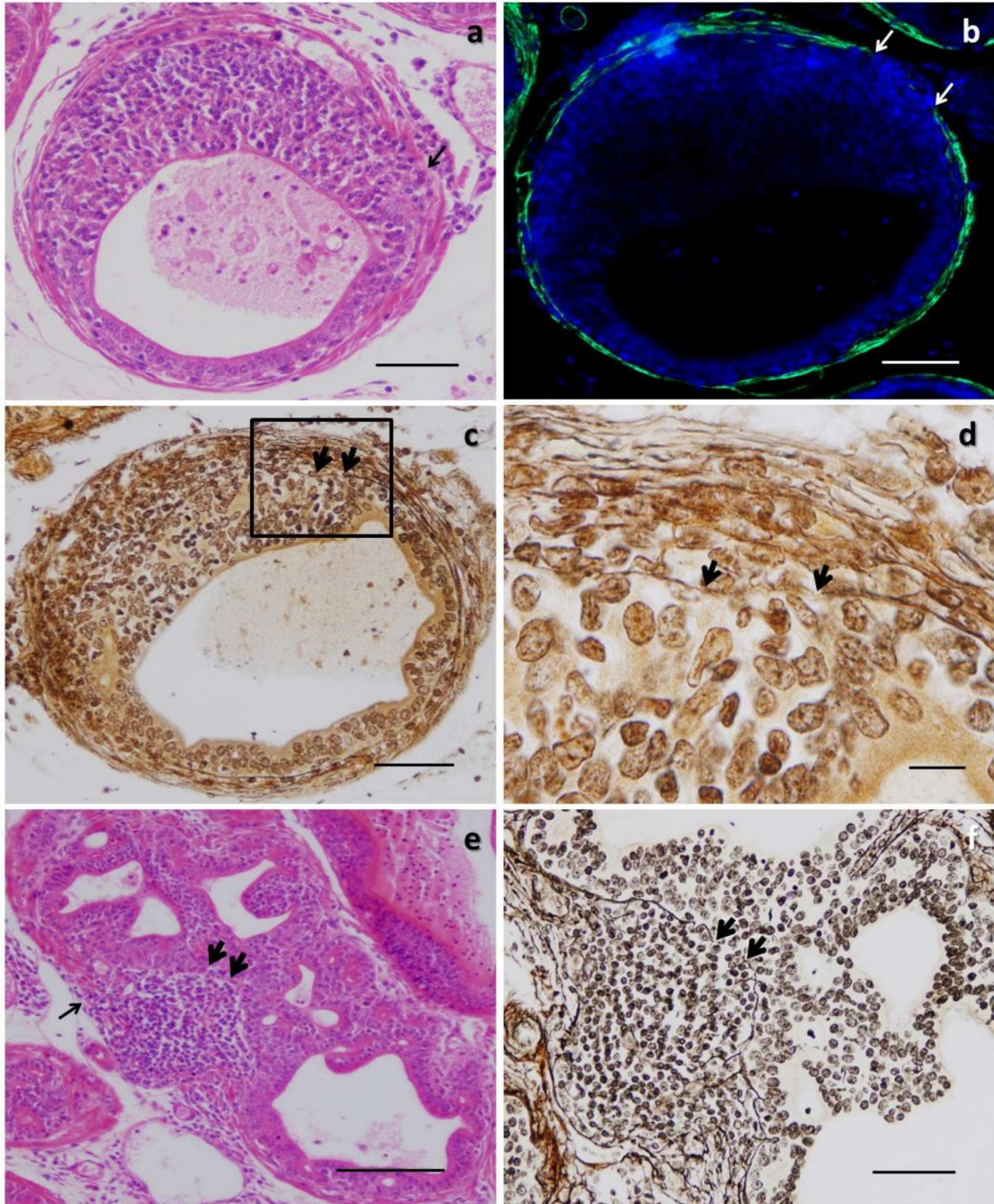
Figura 8. Imunocitoquímica para AR (**a, d, h, k, n**), PCNA (**b, e-f, i, l, o**) e p63 (**c, g, j, m, p**) na próstata ventral de gerbilos. As setas duplas e as cabeças de setas indicam células epiteliais e estromais imunorreativas, respectivamente. As setas simples indicam células epiteliais não marcadas. Barras: **a-e, g-m**: 20µm; **f**: 10µm. Os valores representam média±erro padrão. ^{a,b} representam diferenças significantes entre os grupos. p≤0,05 e n=5 animais/grupo.





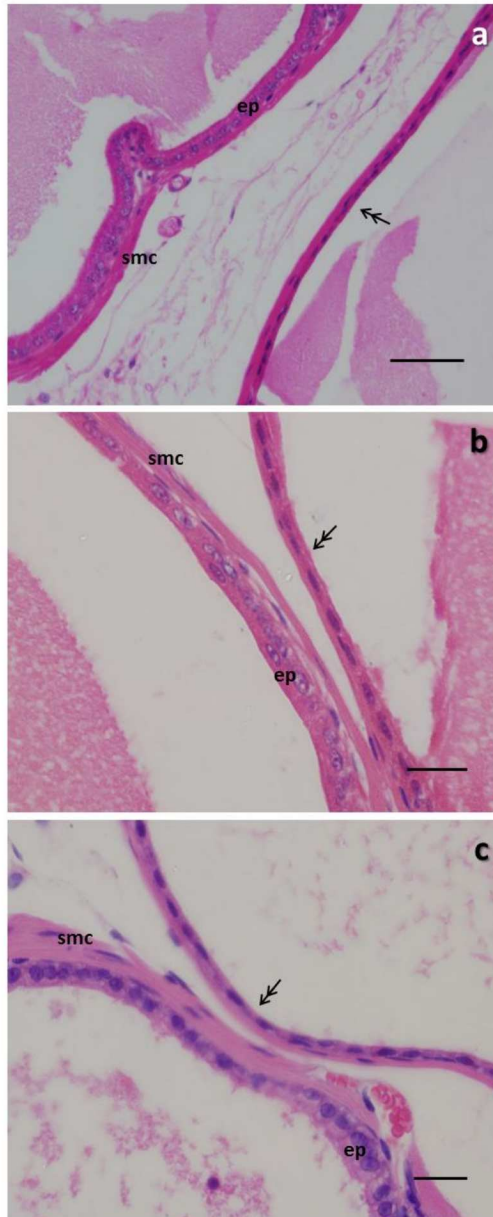
3

Microinvasive carcinoma



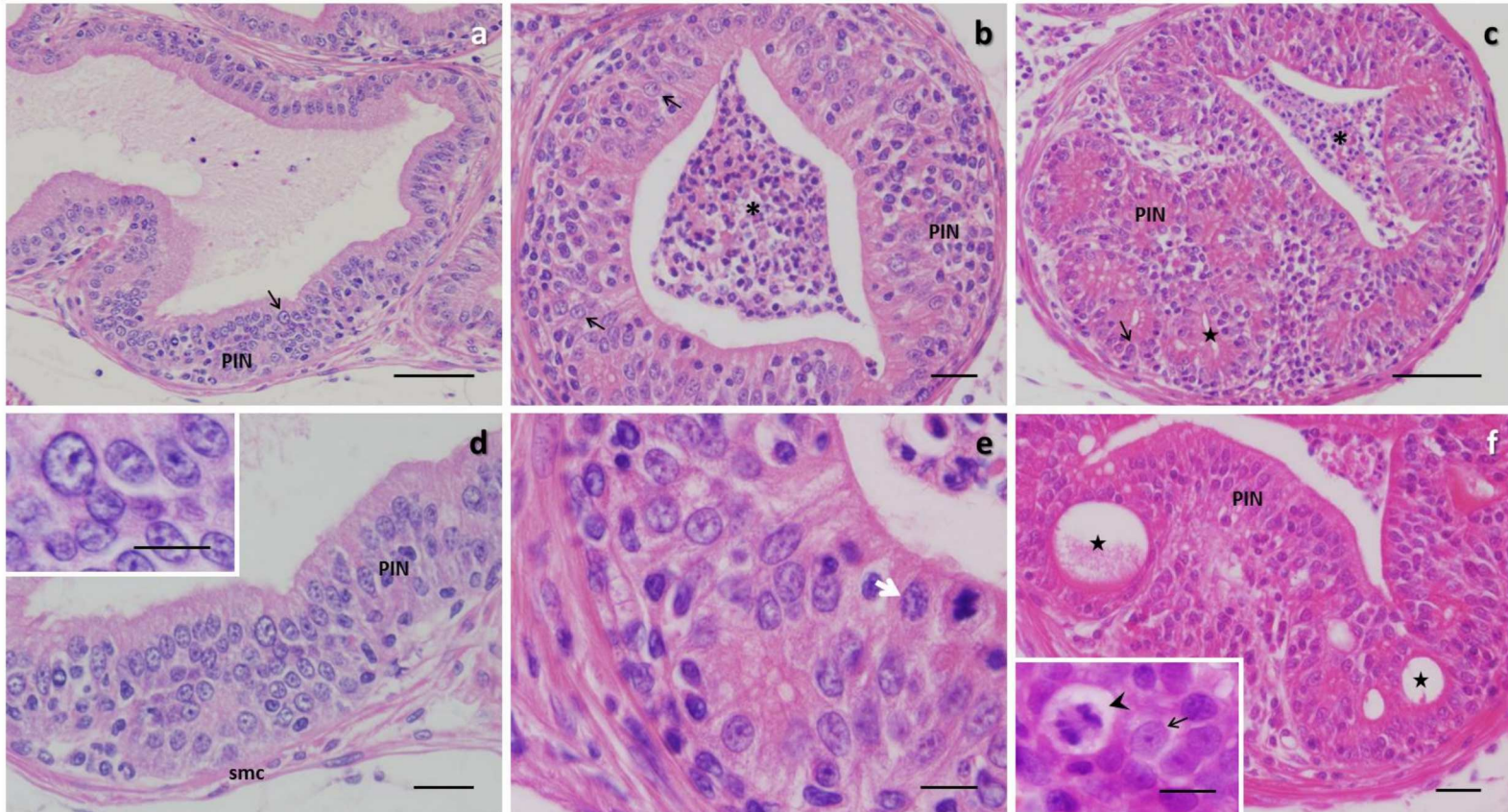
4

Epithelial atrophy

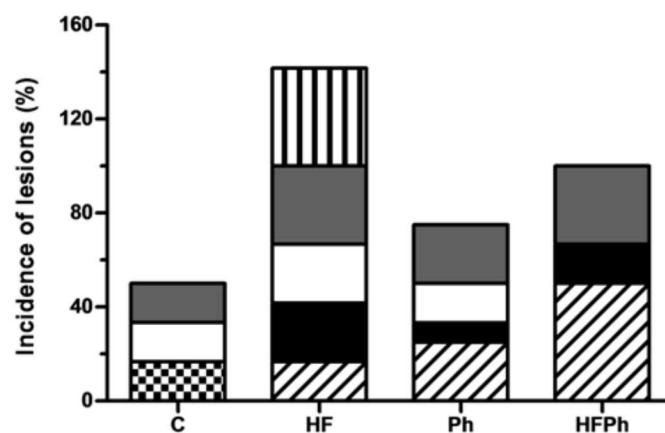


5

Premalignant lesions



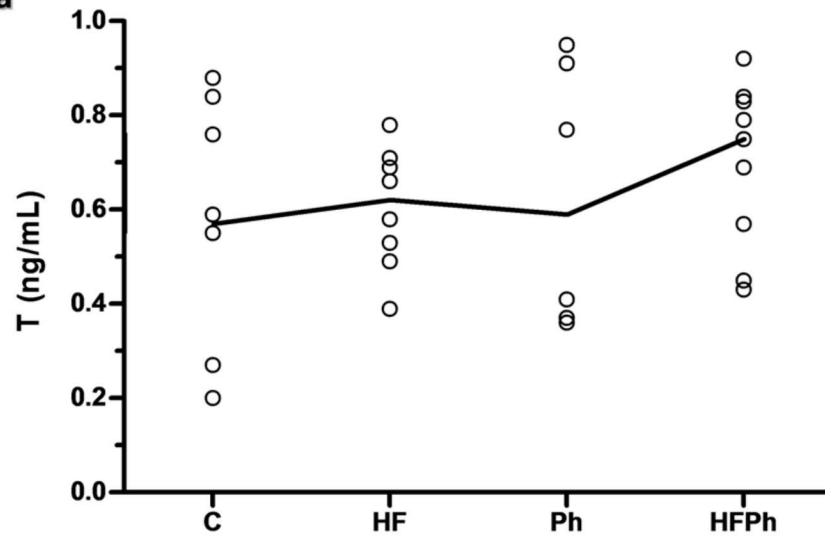
6



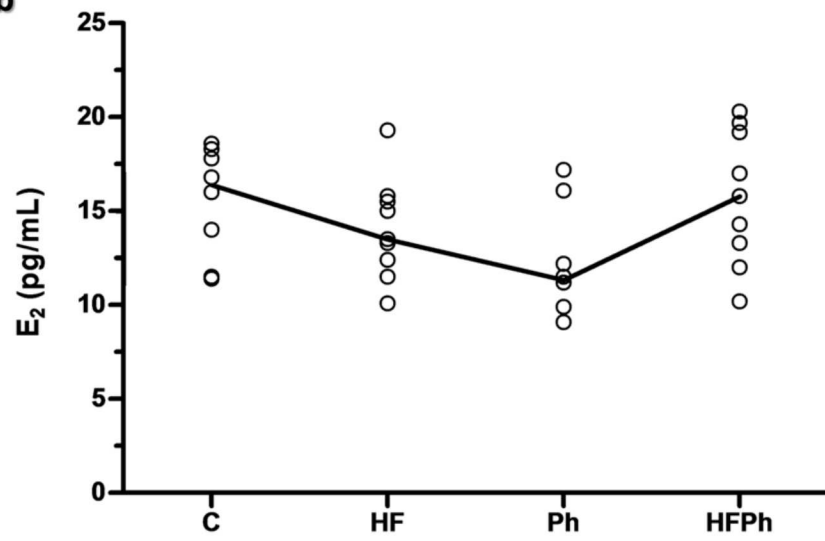
	Incidence (%)				Multiplicity			
	C	HF	Ph	HFPh	C	HF	Ph	HFPh
Epithelial atrophy	0	16.7	25	50	0	0-3	0-3	0-3
Intraluminal inflammation	16.7	0	0	0	0-1	0	0	0
Periductal inflammation	0	25	8.3	16.7	0	0-3	0-1	0-1
PIN+intraluminal inflammation	16.7	25	16.7	0	0-3	0-7	0-3	0
PIN	16.7	33.3	33.3	33.3	0-1	0-9	0-2	0-3
Microinvasive carcinoma	0	41.7	0	0	0	0-2	0	0

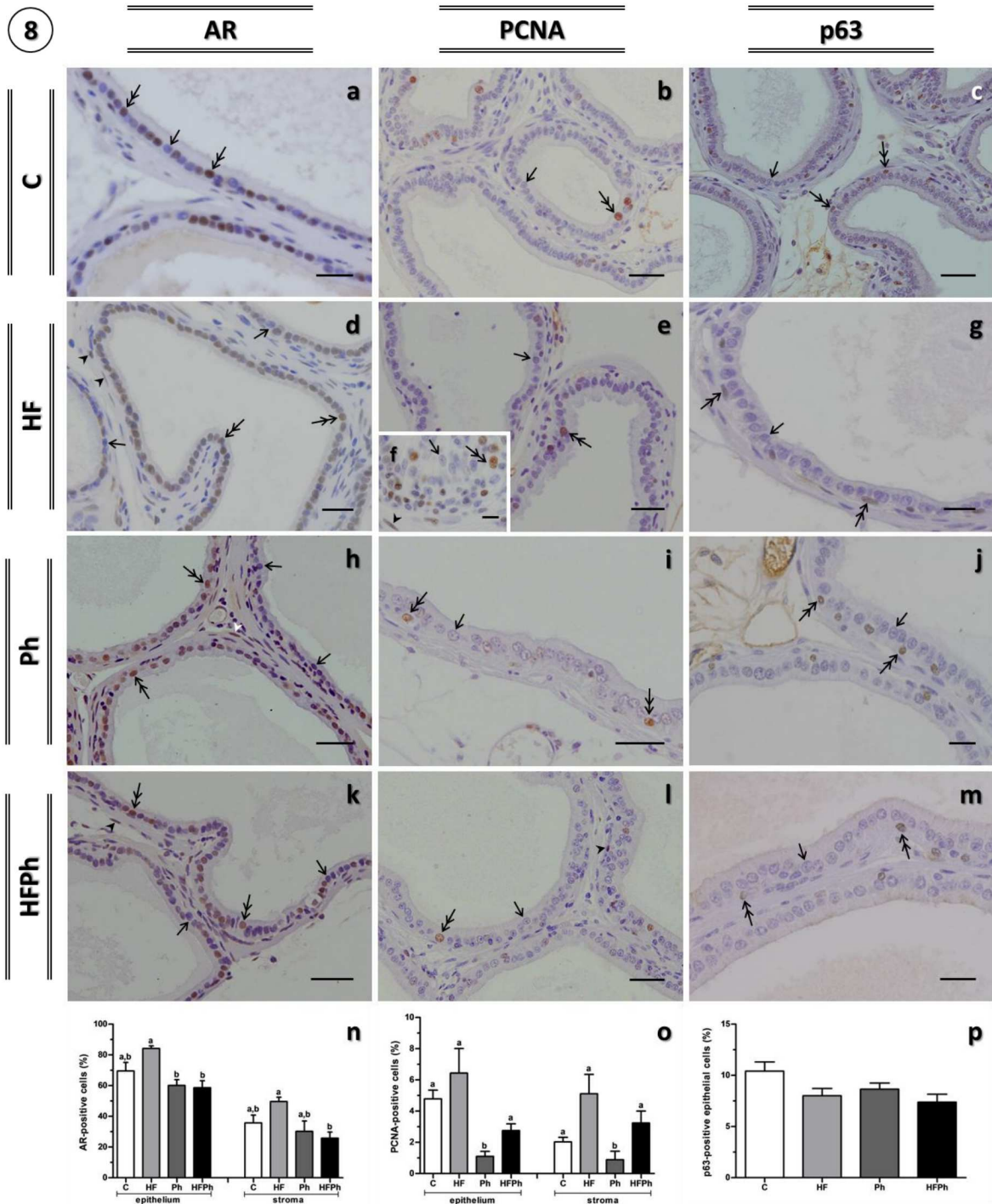
7

a



b





O estudo experimental de exposição contínua dos gerbilos da Mongólia desde a gestação até a idade adulta a baixas doses do desregulador endócrino di-n-butil ftalato (DBP), à dieta hiperlipídica ou a ambos resultou nas seguintes conclusões:

1. A exposição prolongada a elevado teor lipídico, ao DBP ou a ambos não afeta drasticamente a histologia prostática na idade adulta, exceto pela maior incidência de atrofia epitelial. Aparentemente a exposição aos lipídios e ao DBP atua sinergicamente na indução dessa atrofia.
2. A exposição prolongada a elevado teor lipídico ou ao DBP aumenta a susceptibilidade ao surgimento de lesões prostáticas na idade adulta.
3. A exposição gestacional e pós-natal a elevado teor lipídico altera a programação do desenvolvimento prostático e funciona como fator promotor para o surgimento de inflamação e lesões malignas na próstata.
4. A exposição gestacional e pós-natal isolada a baixas doses de DBP diminui os focos inflamatórios na próstata adulta.
5. A exposição gestacional e pós-natal a baixas doses de DBP protege a próstata ventral contra as lesões malignas e as desordens inflamatórias induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica.

- ABRAHAMSOHN, P.A. Aparelho reprodutor masculino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 414-430.
- ANDERSON, W.A.; CASTLE, L.; SCOTTER, M.J.; MASSEY, R.C.; SPRINGALL, C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. **Food Addit Contam**, v. 18, p. 1068-1074. 2001.
- ANWAY, M.D.; SKINNER, M.K. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. **Reprod Biomed Online**, v. 16, p. 23-25. 2008.
- BEU, C.C.; ORSI, A.M.; DOMENICONI, R.F. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. **Anat Histol Embryol**, v. 38, n. 1, p. 49-57. 2009.
- BIANCARDI, M.F.; SANTOS, F.C.A.; MADI-RAVAZZI, L.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R. Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype. **Anat Rec**, v. 293, p. 2163–2175. 2010.
- BIANCARDI, M.F.; PEREZ, A.P.S.; GÓES, R.M.; SANTOS, F.C.A.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R. Prenatal testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil prostate. **Exp Biol Med**, v. 237, p. 1298-1309. 2012.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quim Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666. 2007.
- BLOUNT, B.C.; SILVA, M.J.; CAUDILL, S.P.; NEEDHAM, L.L.; PIRKLE, J.L.; SAMPSON, E.J.; LUCIER, G.W.; JACKSON, R.J.; BROCK, J.W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. **Environ Health Perspect**, v. 108, p. 979-982. 2000.

- BRADLEY, E.L.; BURDEN, R.A.; LEON, I.; MORTIMER, D.N.; SPECK, D.R.; CASTLE, L. Determination of phthalate diesters in foods. **Food Addit Contam Part A**, v. 30, p. 722-734. 2013.
- CALAFAT, A.M.; BROCK, J.W.; SILVA, M.J.; GRAY JR., L.E.; REIDY, J.A.; BARR, D.B.; NEEDHAM, L.L. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. **Toxicology**, v. 217, p. 22-30, 2006.
- CARRUBA, G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1089, p. 201-217. 2006.
- CARRUBA, G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. **J Cell Biochem**, v. 102, p. 899-911. 2007.
- 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 Dev Reprod Toxicol**, v. 74, p. 277-285. 2005.
- CHAN, J.M.; HOLICK, C.N.; LEITZMANN, M.F.; RIMM, E.B.; WILLET, W.C.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.L. Diet after diagnosis and the risk of prostate cancer progression, recurrence and death (United States). **Cancer Causes Control**, v. 1, p. 199-208. 2006.
- CHRISTIANSEN, S.; BOBERG, J.; AXELSTAD, M.; DALGAARD, M.; VINGGAARD, A.M.; METZDORFF, S.B.; HASS, U. Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 313-21. 2010.
- CORRADI, L.S.; GÓES, R.M.; CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. **Differentiation**, v. 72, p. 198-208. 2004.
- CUNHA, G.R.; WANG, Y.Z.; HAYWARD, S.W.; RISBRIDGER, G.P. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. **Reprod Fertil Dev**, v. 13, p. 285-296. 2001.

- CUSTÓDIO, A.M.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. **Cell Biol Int**, v. 28, n. 5, p. 335-344. 2004.
- CUSTÓDIO, A.M.G.; SANTOS, F.C.A.; CAMPOS, S.G.P.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Aging effects on the Mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. **Anat Rec**, v. 291, p. 463–474. 2008.
- CUSTÓDIO, A.M.G.; SANTOS, F.C.A.; CAMPOS, S.G.P.; VILAMAIOR, P.S.L.; OLIVEIRA, S.M.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands). **Int J Exp Path**, v. 91, p. 132–143. 2010.
- DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.P.; GIUDICE, L.C.; HAUSER, R.; PRINS, G.S.; SOTO, A.A.; ZOELLER, R.T.; GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. **Endocr Rev**, v. 30, p. 293–342. 2009.
- EKMAN, P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. **Prostate Suppl**, v. 10, p. 14-18. 2000.
- ENVIRONMENTAL WORKING GROUP. **Beauty secrets: phthalates**. 2000. Disponível em: <<http://www.ewg.org/node/8168>>. Acesso em: 11 jul. 2011.
- ESCOBAR, E.L.O.; GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CARVALHO, H.F. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR γ levels and prostate growth. **Prostate**, v. 69, p. 548-558. 2009.
- FELDMAN, B.J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, p. 34-45. 2001.
- FLESHNER, N.; BAGNELL, P.S.; KLOTZ, L.; VENKATESWARAN, V. Dietary fat and prostate cancer. **J Urol**, v. 171, p. S19-24. 2004.
- FOCHI, R.A.; PEREZ, A.P.S.; BIANCHI, C.V.; ROCHEL, S.S.; GOES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; TABOGA, S.R.; SANTOS, F.C.A. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene paraurethral glands). **Biol Reprod**, v. 79, p. 1084–1091. 2008.

- FOSTER, P.M.D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **Int J Androl**, v. 29, p. 140–147. 2006.
- FREDERIKSEN, H.; AKSGLAEDE, L.; SORENSEN, K.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A.; ANDERSSON, A.M. Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. **Environ Res**, v. 111, p. 656-663. 2011.
- GÓES, R.M.; ZANETONI, C.; TOMIOSSO, T.C.; RIBEIRO, D.L.; TABOGA, S.R. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. **Micron**, v. 38, p. 231–236. 2007.
- GONÇALVES, B.F.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.; TABOGA, S.R.; CAMPOS, S.G. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 1, p. 96-106. 2010.
- GONÇALVES, B.F.; CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; SCARANO, W.R.; FALLEIROS JR., L.R.; AMORIM, R.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. **Prostate**, v. 73, p. 1202-1213. 2013.
- HAMILTON, W., BOYD, J., MOSSMAN, H. Human Embryology: Prenatal Development of Form and Function. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1959.
- HAO, C.; CHENG, X.; XIA, H. MA, X. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. **Biosci Rep**, v. 32, p. 619-629. 2012.
- HÄRKONEN, P.L.; MÄKELÄ, S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. **J Steroids Biochem Mol Biol**, v. 92, p. 297-305. 2004.
- HATCH, E.E.; NELSON, J.W.; STAHLHUT, R.W.; WEBSTER, T.F. Association of Endocrine Disruptors and Obesity: Perspectives from Epidemiologic Studies. **Int J Androl**, v. 33, n. 2, p. 324–332. 2010.

- HAUSER, R.; CALAFAT, A.M. Phthalates and human health. **Occup Environ Med**, v. 62, p. 806–818. 2005.
- HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. **Prostate**, v. 52, p. 213-235. 2002.
- HUYNH, H.; ALPERT, L.; ALAOUI-JAMALI, M.A.; NG, C.Y.; CHAN, T.W.M. Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. **J Endocrinol**, v. 171, p. 109–118. 2001.
- JUANA, L.; BÁRBARA, V.G.; MARTÍN, M.T.; AGUSTÍN, C.; GUILLERMO, R.B.; GUADALUPE, O. Neither testosterone levels nor aggression decrease when the male Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) displays paternal behavior. **Horm Behav**, v. 57, n. 3, p. 271-275. 2010.
- KAVLOCK, R.J.; DASTON, G.P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L.E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M.J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environ Health Perspect**, v. 104, p. 715-740. 1996.
- KIM, S.W. Prostatic disease and sexual dysfunction. **Korean J Urol**, v. 52, p. 373-378. 2011.
- KLUWE, W.M. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. **Environ Health Perspect**, v. 45, p. 3-10. 1982.
- KOCH, H.M.; DREXLER, H.; ANGERER, J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. **Int J Hyg Environ Health**, v. 206, p. 77-83. 2003.
- KOCH, H.M.; BECKER, K.; WITTASSEK, M.; SEIWERT, M.; ANGERER, J.; KOLOSSA-GEHRING, M. Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate - urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v. 17, p. 378-387. 2007.
- KONDO, F.; IKAI, Y.; HAYASHI, R.; OKUMURA, M.; TAKATORI, S.; NAKAZAWA, H.; IZUMI, S.; MAKINO, T. Determination of five phthalate monoesters in human urine

- using gas chromatography-mass spectrometry. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 85, p. 92-96. 2010.
- KONIECKI, D.; WANG, R. MOODY, R.P.; ZHU, J. Phthalates in cosmetic and personal care products: concentrations and possible dermal exposure. **Environ Res**, v. 111, p. 329–336. 2011.
- LICHTENSTEIN, A.H.; KENNEDY, E.; BARRIER, P.; DANFORD, D.; ERNST, N.D.; GRUNDY, S.M.; LEVEILLE, G.A.; VAN HORN, L.; WILLIAMS, C.L.; BOOTH, S.L. Dietary fat consumption and health. **Nutr Rev**, v. 56, p. S3-S19. 1998.
- LOUREIRO, I.R. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- LUU-THE, V.; LABRIE, F. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. **Prog Brain Res**, v. 181, p. 177-192. 2010.
- MAIN, K.M.; MORTENSEN, G.K.; KALEVA, M.M.; BOISEN, K.A.; DAMGAARD, I.N.; CHELLAKOOTY, M.; SCHMIDT, I.M.; SUOMI, A.M.; VIRTANEN, H.E.; PETERSEN, D.V.; ANDERSSON, A.M.; TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N.E. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 270-276. 2006.
- MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol**, v. 253, p. 165–174. 2003.
- MASKO, E.M.; ALLOTT, E.H.; FREEDLAND, S.J. The relationship between nutrition and prostate cancer: is more always better? **Eur Urol**, v. 63, p. 810-820. 2013.
- MATSUMOTO, A.M.; BREMNER, W.J. Testicular disorders. In: MELMED, S.; POLONSKY, K.S.; LARSEN, P.R.; KRONENBERG, H.M. **Williams Textbook of Endocrinology**. 12 ed. Elsevier Saunders, 2011. p. 689-778.
- MCMILLEN, I.C.; ROBINSON, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome prediction, plasticity, and programming. **Physiol Rev**, v. 85, p. 571–633. 2005.

- MCPHERSON, S.J.; ELLEM, S.J.; SIMPSON, E.R.; PATCHEV, V.; FRITZEMEIER, K.H.; RISBRIDGER, G.P. Essential role for estrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. **Endocrinol**, v. 148, n. 2, p. 566-574. 2007.
- MCPHERSON, S.J.; ELLEM, S.J.; RISBRIDGER, G.P. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**, v. 76, p. 660-670. 2008.
- MORAL, R.; WANG, R.; RUSSO, I.H.; LAMARTINIERE, C.A.; PEREIRA, J.; RUSSO, J. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. **J Endocrinol**, v. 196, p. 101-112. 2008.
- MORTENSEN, G.K.; MAIN, K.M.; ANDERSSON, A.M.; LEFFERS, H.; SKAKKEBAEK, N.E. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Anal Bioanal Chem**, v. 382, p. 1084-1092. 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**, v. 43, p. 47-60. 1998.
- MYLCHREEST, E.; WALLACE, D.G.; CATTLEY, R.C.; 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**, v. 55, p. 143-151. 2000.
- NEWBOLD, R.R. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. **Hormones**, v. 9, p. 206-217. 2010.
- OLIVEIRA, S.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; CORRADI, L.S.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 3, p. 235-45. 2007.
- OLUJIMI, O.O.; FATOKI, O.S.; ODENDAAL, J.P.; OKONKWO, J.O. Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment: a need for more monitoring. **Water SA**, v. 36, p. 671-682. 2010.
- PEEHL, D.M. Cellular biology of prostatic growth factors. **Prostate suppl**, v. 6, p. 74-78. 1996.

- PEGORIN DE CAMPOS, S.G.P.; ZANETONI, C.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. **Anat Rec A**, v. 288A, p. 723–733. 2006.
- PELSER, C.; MONDUL, A.M.; HOLLENBECK, A.R.; PARK, Y. Dietary fat, fatty acids, and risk of prostate cancer in the NIH-AARP diet and health study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 33, p. 697-707. 2013.
- PEREZ, A.P.S.; BIANCARDI, M.F.; GÓES, R.M.; SANTOS, F.A.; TABOGA, S.R. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. **Int J Exp Path**, v. 92, p. 121–130. 2011.
- PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; SEGATELLI, T.M.; MARTINEZ, M.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Structure of the pelvic and penile urethra – relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Anat**, v. 202, p. 431-444. 2003.
- PINTO, M.E.; BOTTA, L.S.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 293, p. 310–319. 2010a.
- PINTO M.E.; EGYDIO, F.M.; TABOGA, S.R.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C.; GÓES, R.M. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. **Microsc Res Tech**, v. 73, p. 119–127. 2010b.
- PLAGEMANN, A. Perinatal programming, and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiol Behav**, v. 86, p. 661–668. 2005.
- PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **Nat Can Inst Monogr**, v. 12, p. 1-27. 1963.
- PRINS, G.S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocr Relat Cancer**, v. 15, p. 649–656. 2008.
- PRINS, G.S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, p. 641–659. 2008.

- QUEIROZ, E.K.R.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 485-493. 2006.
- RIBEIRO, D.L.; PINTO, M.E.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R.; MAEDA, S.Y.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. **J Androl**, v. 33, p. 854-865. 2012a.
- RIBEIRO, D.L.; PINTO, M.E.; MAEDA, S.Y.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell Tissue Res**, v. 349, p. 577-588. 2012b.
- RINALDI, J.C.; JUSTULIN JR., L.A.; LACORTE, L.M.; SAROBO, C.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R.; FELISBINO, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sci**, v. 92, p. 763-774. 2013.
- RISBRIDGER, G.P.; TAYLOR, R.A. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: NEILL, J.D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3 ed. St. Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 1149-1172.
- RISBRIDGER, G.P.; ELLEM, S.J.; MCPHERSON, S.J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. **J Mol Endocrinol**, v. 39, p. 183-188. 2007.
- ROCHEL, S.S.; BRUNI-CARDOSO, A.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 290, p. 1233-1247. 2007.
- ROCHEL-MAIA, S.S.; SANTOS, F.C.A.; ALONSO-MAGDALENA, P.; GÓES, R.M.; VILAMAIOR, P.S.L.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.Å.; TABOGA, S.R. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Male and Female Gerbil Prostates, **Biol Reprod**, v. 88, p. 1-7. 2013.
- SALTZMAN, W.; THINDA, S.; HIGGINS, A.L.; MATSUMOTO, W.R.; AHMED, S.; MCGEEHAN, L.; KOLB, E.M. Effects of siblings on reproductive maturation and infanticidal behavior in cooperatively breeding Mongolian gerbils. **Dev Psychobiol**, v. 51, p. 60-72. 2009.

- SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol e Desenv Rur Sustent**, Porto Alegre, v. 2, n. 3. p. 18-29. 2001.
- SANTOS, F.C.A.; TABOGA, S.R. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. **Anim Reprod**, v.3, n.1, p. 3-18. 2006.
- SANTOS, F.C.A.; CUSTÓDIO, A.M.G.; CAMPOS, S.G.P.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Antiestrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and ovaries. **Biol Reprod**, v. 79, p. 674–685. 2008.
- SCARANO, W.R.; TOLEDO, F.C.; GUERRA, M.T.; CAMPOS, S.G.P.; JUSTULIN JÚNIOR, L.A.; FELISBINO, S.L.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; TABOGA, S.R.; KEMPINAS, W.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**, v. 262, p. 215–223. 2009.
- SCARANO, W.R.; TOLEDO, F.C.; GUERRA, M.T.; PINHEIRO, P.F.F.; DOMENICONI, R.F.; FELISBINO, S.L.; CAMPOS, S.G.P.; 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**, v. 73, p. 972-984. 2010.
- SCHUG, T.T.; JANESICK, A.; BLUMBERG, B.; HEINDEL, J.J. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127, p. 204-215. 2011.
- SEGATELLI, T.M.; FRANÇA, L.R.; PINHEIRO, P.F.F.; ALMEIDA, C.C.D.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.E. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Androl**, v. 25, n. 6, p. 872-880. 2004.
- SETCHELL, B.P.; BREED, W.G. Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL, J.D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3 ed. St. Louis: Elsevier Academic Press, 2006. p. 771-825.
- SHARPE, R.M.; FISHER, J.S.; MILLAR, M.M.; JOBLING, S.; SUMPTER, J.P. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular

- size and sperm production. **Environ Health Perspect**, v. 103, n. 12, p. 1136-1143. 1995.
- SILVA, M.J.; REIDY, J.A.; HERBERT, A.R.; PREAU JR., J.L.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 72, p. 1226-1231. 2004.
- STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; BORTHAKUR, G.; BURNS, J.L.; BOWEN, P.E. Correlations of dietary patterns with prostate health. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, p. 114-130. 2008.
- STEERS, W.D. 5 α -reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 58 (Suppl. 6A), p. 17-24. 2001.
- STROM, S.S.; WANG, X.; PETTAWAY, C.A.; LOGOTHETIS, C.J.; YAMAMURA, Y.; DO, K.A.; BABAIAN, R.J.; TRONCOSO, P. Obesity, weight gain, and risk of biochemical failure among prostate cancer patients following prostatectomy. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 6889–6894. 2005.
- SYMONDS, M.E.; BUDGE, H. Nutritional models of the developmental programming of adult health and disease. **Proc Nutr Soc**, v. 68, p. 173-178. 2009.
- TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; GÓES, R.M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 8, p. 946-955. 2009.
- TANAKA, A.; MATSUMOTO, A.; YAMAHA, T. Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. **Toxicology**, v. 9, p. 109-123. 1978.
- TANG-PÉRONARD, J.L.; ANDERSEN, H.R.; JENSEN, T.K.; HEITMANN, B.L. Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. **Obes Rev**, v. 12, p. 622–636. 2011.
- THOMSON, A.A. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. **Reproduction**, v.121, p. 187–195. 2001.
- TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **J Urol**, v. 166, p. 2472-2483. 2001.

- TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; SMITH, M.J.; SMITH, V.C.; DANG, T.D.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res**, v. 8, p. 2912-2923. 2002.
- WEIHUA, Z.; MÄKELÄ, S.; ANDERSSON, L.C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J.I.; JENSEN, E.V.; NILSSON, S.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. **PNAS**, v. 98, p. 6330-6335. 2001.
- WILBORN, C.; BECKHAM, J.; CAMPBELL, B.; HARVEY, T.; GALBREATH, M.; LA BOUNTY, P.; NASSAR, E.; WISMANN, J.; KREIDER, R. Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 9, p. 4-31. 2005.
- WITTASSEK, M.; KOCH, H.M.; ANGERER, J. BRÜNING, T. Assessing exposure to phthalates – the human biomonitoring approach. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, p. 7–31. 2011.
- ZAVIAČIČ, M.; ZAJÍČKOVÁ, M.; BLAŽEKOVÁ, J.; DONÁROVÁ, L.; STVRTINA, S.; MIKULECKÝ, M.; ZAVIAČIČ, T.; HOLOMÁN, K.; BREZA, J. Weight, size, macroanatomy, and histology of the normal prostate in the adult human female: a minireview. **The J Histotechnol**, v. 23, n. 1, p. 61-69. 2000.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **“Efeitos combinados da exposição ao di-n-butil ftalato e do ambiente obesogênico sobre a resposta tecidual da próstata de gerbilos adultos”**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição:

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 060/2012, Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP).

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Mariana Marcello de Jesus
Aluno(a): Mariana Marcello de Jesus

Rejane Maira Góes
Orientador(a): Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

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

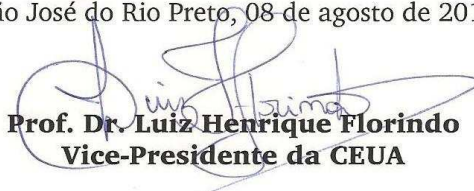
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos combinados da exposição ao di-n-butil ftalado e ambiente obesogênico sobre histofisiologia prostática e testicular de gerbilos adultos"**, (protocolo nº. 060/2012 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Rejane Maira Góes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 28 de março de 2012.

CERTIFICATE

Certify that the research project entitled **"Combined effects of exposure to di-n-butyl and ftalado obesogenic environment histophysiology on prostatic and testicular gerbils adult"** (protocol no. 060/2012 - CEUA), under the responsibility of Professor Dr. Rejane Maira Góes, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, at the meeting of march 28th, 2012.

São José do Rio Preto, 08 de agosto de 2013.


Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Vice-Presidente da CEUA

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-STA-IBILCE/UNESP**

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP. 15054-000, São José do Rio Preto/SP
Tel. (0xx17) 3221-2428 / e-mail: sta@ibilce.unesp.br / www.ibilce.unesp.br