



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde**

Luiz Roberto Falleiros Junior

**Exposição neonatal ao etinilestradiol
aumenta o crescimento da próstata ventral e
promove a hiperplasia epitelial e inflamação
em gerbilos machos adultos.**

São José do Rio Preto

2015

Luiz Roberto Falleiros Junior

Exposição neonatal ao etinilestradiol aumenta o crescimento da próstata ventral e promove a hiperplasia epitelial e inflamação em gerbilos machos adultos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia S. Leite Vilamaior

São José do Rio Preto
2015

Falleiros-Junior, Luiz Roberto

Exposição neonatal ao etinilestradiol aumenta o crescimento da próstata ventral e promove a hiperplasia epitelial e inflamação em gerbilos machos adultos. / Luiz Roberto Falleiros Junior

São José do Rio Preto, 2015

74p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

1.Desregulação endócrina; 2.Próstata neonatal; 3.Etinilestradiol; 4.Receptor de andrógeno.

Luiz Roberto Falleiros Junior

Exposição neonatal ao etinilestradiol aumenta o crescimento da próstata ventral e promove a hiperplasia epitelial e inflamação em gerbilos machos adultos.

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Dra Patricia Leite Vilamaior

1º Examinador: Dr. Ricardo Alexandre Fochi

2º Examinador: Dra. Lilian Castiglione

Suplentes:

Dra. Silvana Gisele Pegorim Campos

Dra Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto, ___/___/___.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS.....	17
4. ILUSTRAÇÕES.....	20
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	31
7.. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
8. APÊNDICE.....	45
9. ANEXO 1.....	74

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À minha orientadora **Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior** por todos esses anos de amizade, convivência, parceria e incentivo, sobre tudo pelas orientações e sugestões que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Obrigado, por acreditar no meu trabalho e por compartilhar seus conhecimentos. E nos últimos dois anos pela dedicação para com a minha formação profissional, por sua disponibilidade e principalmente por sua paciência.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga** por esses 13 anos de convivência diária, pelas orientações e co-orientações em tudo, pelo auxílio, incentivo e por ter cedido seu laboratório e os materiais necessários para que meu projeto fosse desenvolvido, assim como as horas de trabalho. Obrigado por sempre esclarecer minhas dúvidas, por mais simples que fossem, e por olhar cada lâmina que fiz, sempre encontrando aquela região ou aquele cantinho do corte que estivesse bom.

À **Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara** pela paciência, amizade e parceria, por todos os ensinamentos sobre histologia, por ter me aceitado como estagiário e ensinado as primeiras técnicas, sempre disposta a responder minhas perguntas, por ceder parte do seu tempo para me ensinar e contribuir com minha formação profissional. Muito obrigado pelas orientações e co-orientações de todos estes anos e por todo o socorro prestado durante o desenvolvimento desse projeto.

À **Profa. Dra. Rejane Maira Góes** pela convivência, seriedade e parceria.

À **Profa. Dra. Silvana Gisele Pegorin de Campos** e à **Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas** pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação, as quais contribuíram para o aprimoramento do primeiro manuscrito.

Aos professores titulares e suplentes da **banca examinadora** desse trabalho pela disponibilidade e pelas contribuições que, certamente, enriquecerão ainda mais meu trabalho.

Ao amigo **Manoel Francisco Biancardi**, que mesmo não querendo participar, ajudou demais com as traduções.

Ao casal de amigos **Ricardo e Maria Etelvina**, pela amizade e convivência e por estarem sempre ao meu lado, no trabalho, nos churrascos, e nas viagens que arrumo de última hora. Em especial ao Ricardo por todas as horas gastas solucionando meus problemas de informática, word e image....estamos juntos Isminim.

Aos **jurássicos** do Laboratório de Microscopia e Microanálise, alguns mais próximos, outros, nem tanto, **Lara, Wellerson, Sabrina, Sérgio, Renato, Cristiane, Bianca e Ana Paula** por todas as experiências, inspirações e ensinamentos compartilhados, pelas alegrias e pela convivência.

Aos não tão velhos assim, amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálise **Camila, Carol Christante, Carol Frandsen, Carol Negrin, Cássia, Douglas, Ellen, Eloísa, Guilherme, Júlia, Luiz Henrique, Mari Marcielo, Marina, Mateus, Patrícia, Simone, Silvana, Vanessa e Viviane** pelos bons momentos de descontração, pelo auxílio em várias atividades, por compartilharem os conhecimentos teórico-práticos, pelas horas do fala que eu te escuto e sobretudo, pela amizade que levaremos para a vida toda. Em especial a **Cintia Puga, Mariana Zanatelli e Nayara** por toda ajuda na formatação e nas aulas.

Aos **docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** que contribuíram para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos e, conseqüentemente, para minha formação profissional.

À técnica **Rosana Silistino de Souza** por toda a ajuda relacionada ao meu material de eletrônica. Obrigado pela disposição em cortar meus blocos.

À **FAPESP** pelo projeto concedido (Processo: 2012/12607-4).

Em especial, agradeço...

À **Deus** por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais **Luiz Roberto e Vanilde** que não me deram apenas a vida, mas também a educação e as condições de estudo, e que me ensinaram a fazer tudo da melhor forma possível, com dignidade e honestidade, confiando em mim e me apoiando para que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Obrigado por sempre estarem presentes.

À minha irmã **Fabiane** que sempre me ajudou em tudo o que precisei. Obrigado pelo companheirismo, pela amizade, pelas alegrias e, sobretudo, por me entender.

Ao **Dr. José Tajara da Silva “ in memorian”** por ter me empregado nos primeiros anos da minha carreira, sempre acreditando no meu potencial. Obrigado por ter se mostrado um amigo e por ter financiado inteiramente os primeiros meses de faculdade, contribuindo, assim, com o meu crescimento profissional, me dando oportunidade de chegar onde estou.

À **Dra Ana Maria Rossi** pelos anos de convívio, parceria e proteção (acho que essa é a palavra), pelos valores e ensinamentos que carrego até hoje, por sua integridade e honestidade contagiante. Obrigado por me incentivar e me fazer acreditar que o mundo é enorme, e que algo melhor sempre está à nossa espera, basta buscarmos.

À **minha família, cunhados e cunhadas**, e aos **amigos** por todo apoio, amor desprendido e amizade que perdura há anos, por todas as mensagens de WhatsApp e e-mails trocados, os quais nos aproximaram e permitiram que compartilhássemos bons momentos, mesmo estando longe.

Aos meus filhos **Bruna, Luiz Roberto e Maria Eduarda** que são a razão do meu viver. Obrigado por compreenderem a minha ausência, em vários momentos. A vocês dedico meu amor eterno, meu respeito e minha gratidão por tudo o que vocês representam para mim. Vocês são a esperança de um mundo melhor.

A minha esposa **Alexandra**, peça importantíssima neste quebra cabeça que é a vida. Lá se vão vinte e tantos anos juntos. Quem diria que uma simples paquera daria origem a um amor tão intenso e tão verdadeiro. Você me fez buscar, me fez acreditar, me fez crescer e não me deixou desistir, jamais imaginaria minha vida sem você. Obrigado por compreender a minha ausência na hora do jantar, nas noites que cheguei tarde, nas festas que não pude ir e nos momentos que não estive perto para ajudar a cuidar dos nossos filhos. Que esta nova etapa seja nossa, pois tenho certeza que não cheguei até aqui sozinho, e espero que você esteja ao meu lado nas próximas conquistas e por toda minha vida. Eu te amo.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - **(a-b)** Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos adultos controle corados pela hematoxilina-eosina (HE). Epitélio (Ep), estroma (S), camada de células musculares lisas (SMC). **(c-f)** Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos adultos tratados com EE. Coloração: HE. Os alvéolos são revestidos por um epitélio desenvolvido e hiperplásico (setas). No lumen, pode-se observar o acúmulo de micro cálculos (*). Focos inflamatórios (In) são muito comuns nas glândulas expostas ao EE. **(g-h)** Cortes histológicos da próstata ventral de gerbilos controle **(g)** e tratados com EE **(h)**. Coloração: reticulina de Gömöri. Fibras reticulares (setas), fibras colágenas (CO)..... **21**
- FIGURA 2** - Imunohistoquímica para receptor de andrógenos (AR) e para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Controle: **a, e**; EE: **b-d, f-h**. Setas indicam marcações nucleares epiteliais e estromais para AR e PCNA. Células AR-positivas foram observadas em áreas de intensa proliferação celular **(b-d)** e em regiões com infiltrados inflamatórios (*, **b-c**). Células PCNA-positivas foram raras nas próstatas ventrais de gerbilos controle **(e)**, entretanto tornaram-se muito frequentes nos compartimentos epiteliais e estromais do grupo EE **(f-h)**..... **22**

- FIGURA 3** - Frequência de células epiteliais e estromais AR-positivas na próstata ventral masculina dos grupos controle e tratados com EE. Os valores foram representados pela média \pm SEM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$); $n = 30$ campos em 3 animais/grupo..... **23**
- FIGURA 4** - Frequência de células epiteliais e estromais PCNA-positivas na próstata ventral masculina dos grupos controle e tratados com EE. Os valores foram representados pela média \pm SEM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$); $n = 30$ campos em 3 animais / grupo..... **24**
- FIGURA 5** - Imunohistoquímica para receptor de estrógeno alfa (ER α ; **a-d**) e para α -actina de músculo liso (**e-h**). No grupo controle (**a**) foram observadas marcações para ER α no núcleo de células estromais (setas), enquanto que as próstatas ventrais do grupo **EE (b-d)** apresentaram marcações nucleares nas células epiteliais e estromais, além de marcações citoplasmáticas nas células estromais. A imunomarcacão para α -actina demonstrou que as células musculares lisas do grupo controle (**e**) formam uma camada fina e regular ao redor dos alvéolos prostáticos (setas). Já no grupo tratado com EE (**f-h**), as marcações foram difusas e irregulares (setas), estando ausentes em regiões de intensa proliferação epitelial (cabeça de seta)..... **25**

FIGURA 6 - Ultraestrutura da próstata ventral de gerbilos adultos controle (a) e submetidos ao tratamento com EE (b-d). (a) Epitélio secretor e estroma perialveolar da próstata ventral de gerbilos controle. Núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER), vesícula de secreção (V), lâmina basal (BL), células musculares lisas (SMC). Aumento: 10,000x. (b) Região proliferativa do epitélio prostático (Ep) exibindo padrão típico de estratificação celular. Acúmulo de ceramidas pode ser observado entre as células epiteliais (setas). Aumento: 6000x. (c) Detalhe do citoplasma basal de células epiteliais secretoras exibindo uma grande quantidade de cisternas alargadas do RER. Complexo de Golgi (G). Aumento: 10.000x. (d) Detalhe do estroma prostático exibindo SMC e fibras de colágeno (CO). Corpos densos (setas), vesículas pinocíticas (cabeça de seta), mitocôndrias (Mt). Aumento: 10.000x.....

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ¹ Peso corporal, do complexo prostático (PrC) e peso relativo do PrC em machos adultos controle e tratados com EE (n = 8/group). Peso relativo corresponde à relação entre o peso da próstata masculina e o peso de todo o corpo. Os valores são médias ± erro padrão. ² Dados estereológicos obtidos para a próstata ventral masculina durante o tratamento de EE (média ± erro padrão; n = 30 campos em 5 animais / grupo).....	27
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AR** - receptor de andrógeno
- BL** - lâmina basal
- BPA** - bisfenol A
- CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais
- CML** - células musculares lisas
- CO** - colágeno
- DAB** - 3,3'-Diaminobenzidine
- DES** - dietilestilbestrol
- DHT** - di-hidro testosterona
- EDC** - disruptores endócrinos
- EE** - 17 α -etinil estradiol
- Ep** - epitélio prostático
- Er α** - receptor de estrógeno alpha
- Er β** - receptor de estrógeno beta
- G** - Complexo de Golgi
- HE** - Hematoxilina-Eosina
- HPB** - hiperplasia prostática benigna
- Mt** - mitocôndrias
- N** - Núcleo
- PCNA** - antígeno nuclear de proliferação celular
- PrC** - complexo prostático
- RER** - retículo endoplasmático rugoso

SEM - erro padrão da média

SMC - células musculares lisas

T - testosterona

UGS - seio urogenital

V - vesícula de secreção

RESUMO

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital responsável pela produção de um líquido alcalino que garante a capacitação e sobrevivência dos espermatozoides. O seu desenvolvimento ocorre sob influência de um controle androgênico e estrogênico regulado e preciso, de forma que sensíveis interferências podem predispor esta glândula a desenvolver doenças como hiperplasia prostática benigna e câncer durante a vida adulta e senil. A exposição inapropriada a estrógenos exógenos no período de desenvolvimento embrionário e neonatal tem sido relacionada a distúrbios permanentes na morfofisiologia de vários órgãos do sistema reprodutor masculino. Estudos epidemiológicos indicam que homens que foram expostos a componentes estrogênicos durante o desenvolvimento intra-uterino e neonatal apresentaram maior probabilidade de ocorrência de infertilidade e de câncer de testículo e próstata. Até o momento, não é possível afirmar se existem fatores intrínsecos do desenvolvimento que podem predispor a glândula prostática ao desenvolvimento de câncer com a idade. Porém, como a exposição precoce a hormônios esteróides é capaz de alterar permanentemente vários órgãos reprodutivos, torna-se questionável se esses agentes também podem interferir na estrutura e fisiologia prostática. Com base nesses relatos, o objetivo deste estudo foi analisar morfologicamente a próstata ventral de gerbilos adultos expostos ao ethynylestradiol (EE) durante a primeira semana de desenvolvimento pós-natal. Para isso, foram empregados métodos morfológicos, morfométricos-estereológicos, imunohistoquímicos e ultraestruturais. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição pós-natal ao EE duplicou o peso do complexo prostático, aumentando a frequência relativa dos compartimentos epitelial e estromal e a atividade secretora no lobo ventral da próstata. Todas as glândulas expostas ao EE

apresentaram intensa remodelação estromal, focos de hiperplasia epitelial e de infiltrados inflamatórios intersticiais e intraluminais. Células AR e PCNA-positivas tornaram-se significativamente mais frequentes no epitélio e no estroma. Células ER α -positivas, que foram restritas ao compartimento estromal em próstatas controle, foram frequentemente observadas no epitélio prostático dos animais tratados. O presente estudo demonstrou que a exposição ao EE durante o desenvolvimento pós-natal da próstata ventral pode causar alterações organizacionais na histofisiologia deste órgão, predispondo os indivíduos precocemente a lesões prostáticas. Estes resultados são de grande importância para a saúde pública, visto que o EE tem sido cada vez mais utilizado por mulheres em todo o mundo, e que a bioacumulação deste químico ambiental tem atingido níveis cada vez mais altos nos diferentes ecossistemas.

ABSTRACT

The prostate is an accessory gland of genital system responsible for producing an alkaline liquid which ensures sperm survival and capacitation. Its development occurs under the influence of an androgen and estrogen regulated and precise control, so sensible interferences may predispose this gland to developing diseases such as benign prostatic hyperplasia and cancer during adult and senile life. Inappropriate exposure to exogenous estrogens in embryonic and neonatal development period has been related to permanent disturbances in morphophysiology of various organs of the male reproductive system. Epidemiological studies indicate that men who were exposed to estrogenic compounds during intrauterine and neonatal development had higher probability of infertility and testicular and prostate cancer. Until now, it is not possible to say whether there are intrinsic factors of development that may predispose prostatic gland to the development of cancer with age. However, as early exposure to steroid hormones can permanently alter various reproductive organs, it is questionable whether such agents may interfere in the prostate structure and physiology. Based on these reports, the aim of this study was to analyze morphologically the ventral prostate of adult gerbils exposed to ethynylestradiol (EE) during the first week of prenatal development. To this, we employed morphological, stereological-morphometrical, immunohistochemical and ultrastructural methods. The results showed that the postnatal exposure to EE duplicated the prostatic complex weight, increasing the relative frequency of epithelial and stromal compartments, besides the secretory activity of the ventral lobe of the prostate. All glands exposed to EE showed strong stromal reshuffling and some foci of epithelial hyperplasia and inflammatory infiltrated in both luminal and

epithelial or stromal compartments. Cells positive for AR and PCNA increased into the epithelial and stromal tissues. ER α -positive cells, which are normally found into stromal compartment of intact prostates, were frequently observed in the prostatic epithelial of treated animals. This study demonstrated that the exposure to EE during the postnatal development causes histophysiological alterations of this gland, predisposing to the development of prostatic lesions during life. These results are important taking account public health, considering the EE has been largely used by women worldwide. Moreover, the bioaccumulation of this chemical has been increased in different ecosystems.

1. INTRODUÇÃO

Desenvolvimento e morfologia da próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital de mamíferos, responsável pela produção de uma importante fração do fluido seminal ^(1, 2). O grande interesse em se compreender a biologia desta glândula deve-se tanto ao seu fascinante processo de desenvolvimento, quanto à alta incidência de doenças prostáticas, como adenocarcinoma e a hiperplasia prostática benigna (HPB) ⁽¹⁻³⁾.

O câncer de próstata é a principal e mais frequente doença neoplásica que atinge os homens e, embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e de cura ⁽⁴⁾. Entre os homens americanos, o câncer de próstata é o tipo mais comum de neoplasma não cutâneo e a segunda maior causa de mortalidade por carcinoma. Essa malignidade tem os andrógenos e os estrógenos diretamente envolvidos. Porém, a patologia molecular desse problema é complexa, pois além de ser uma doença relacionada à idade, a fatores hereditários e dependente de andrógenos, é também influenciada por outros hormônios esteróides endógenos, fatores ambientais, dietas e repostas imunes e inflamatórias ⁽⁴⁻⁶⁾.

Assim como a glândula seminal, a próstata é dependente de andrógenos para o desenvolvimento e a diferenciação durante a embriogênese e para sua manutenção durante a vida adulta. A ação desses hormônios é mediada via receptores hormonais específicos ⁽⁷⁻⁸⁾. Pesquisas demonstram que na ausência de andrógenos, hormônios não androgênicos como o estradiol e a vitamina D, em combinação com os receptores de hormônios podem induzir a ação androgênica. Assim, a ação hormonal na próstata é determinada não somente pela concentração de andrógenos, mas também por vários

outros fatores, como os níveis de receptores hormonais e seus co-ativadores, presença de fatores de crescimento, e talvez outros fatores que ainda venham a ser identificados (8-10).

A próstata madura é uma tem organização estrutural complexa, sendo constituída por compartimentos teciduais distintos como o compartimento luminal ou lume, o compartimento epitelial e o compartimento estromal ^(1,11).

Em todas as espécies de mamíferos, o desenvolvimento e o crescimento da próstata começam ainda na vida fetal e completam-se até a maturidade sexual ⁽¹²⁾. A formação da próstata inicia-se a partir de uma subdivisão da cloaca, no seio urogenital (UGS), o qual é uma estrutura embrionária ambissexual, formada por uma camada epitelial derivada do endoderma, circundada por uma camada mesenquimal, de origem mesodérmica ⁽¹³⁾. A partir deste UGS, em ambos os sexos, a bexiga se desenvolve. Em humanos, o UGS surge aproximadamente por volta da sétima semana de gestação e permanece indiferenciado até a décima ou décima-segunda semana, quando, então, se inicia a morfogênese prostática, dependente dos andrógenos produzidos pelos testículos fetais ⁽¹³⁾. A formação da próstata em camundongos começa por volta do décimo-sétimo dia de gestação e, em ratos, no décimo-oitavo dia ⁽¹⁴⁾.

Embora a morfologia da próstata varie significativamente entre os mamíferos, os sinais indutivos provenientes do mesênquima do UGS estão conservados entre as diferentes linhagens de espécies ⁽¹³⁾.

A citodiferenciação epitelial e mesênquima-estromal ocorre simultaneamente, duas a três semanas depois do nascimento de mamíferos roedores, como ratos e camundongos ⁽¹³⁾. À medida que os cordões epiteliais sólidos se canalizam, o epitélio se reorganiza em duas populações distintas de células: as células epiteliais basais, que se

localizam subjacentes à membrana basal, formando uma camada descontínua de células, e as células luminais colunares altas, que se diferenciam e delimitam o lúmen ductal (15,16).

O estroma prostático também se diferencia em uma camada de músculo liso que circunda as porções glandulares e os ductos prostáticos (17,18). Em camundongos, a morfogênese da ramificação está quase completa duas semanas depois do nascimento (13,19,20). Os níveis séricos de testosterona (T) são baixos durante esse período e o aumento do peso da próstata é discreto. Na puberdade, os níveis desse hormônio começam a elevar-se significativamente e o peso da glândula e a quantidade de DNA aumentam mais rápido do que durante o período perinatal. Em camundongos, as proteínas secretórias prostáticas são primeiramente detectadas pouco antes da puberdade (por volta de vinte dias após o nascimento), e aumentam concomitantemente com os níveis séricos de testosterona. No período fetal humano há pouquíssima atividade secretora nas células prostáticas, presumivelmente devido à ação dos andrógenos testiculares fetais (13).

A interação parácrina entre o epitélio e o estroma ao seu redor é fundamental durante a morfogênese prostática e na homeostase do órgão adulto de humanos e de roedores (18,21). As interações envolvidas no desenvolvimento da próstata acontecem de maneira recíproca: o mesoderma, derivado do seio urogenital (UGS), induz a diferenciação epitelial e, este epitélio em desenvolvimento, induz a diferenciação do mesoderma em músculo liso (22). O resultado final dessa relação epitélio-mesênquima é a formação do tecido prostático maduro, no qual o epitélio mostra-se com células de fenótipos diferenciados e o estroma composto, predominantemente, por células musculares lisas (CML). Na fase adulta de um indivíduo, interações semelhantes às

acima citadas, mantêm a próstata funcionalmente ativa através da homeostase, entre morte e proliferação celular, dependente de ação androgênica ^(22,23). Um desequilíbrio na interação homeostática entre epitélio e estroma prostáticos pode iniciar e promover carcinogênese nesse órgão ⁽²⁴⁾ e durante esses processos, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e pela manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino estimulado por andrógenos ⁽²²⁾.

A expressão de receptores de andrógenos (AR) no mesênquima e no UGS é um dos fatores que possibilita o desenvolvimento das glândulas do trato genital masculino. O mesênquima do UGS expressa altos níveis desse receptor, enquanto que no epitélio, o mesmo é quase indetectável durante esse mesmo período. A expressão de fatores de crescimento parácrinos no mesênquima também é responsável pela morfogênese glandular e pelo crescimento das células epiteliais na próstata em desenvolvimento ^(15,17).

Na maturidade sexual, a próstata do camundongo é uma glândula multilobulada, situada ao redor da uretra, na base da bexiga ^(13, 25). Nos humanos, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar, composta de ductos e ácinos, com atividade secretora principalmente ligada à porção alveolar, porém os ductos também podem secretar algumas substâncias que compõem o conteúdo final da secreção prostática ⁽²⁶⁾.

A próstata do gerbilo

A utilização de gerbilos, roedores murídeos da subfamília Gerbillinae, é cada vez mais frequente na pesquisa científica das áreas de imunologia ^(27,28), de fisiologia ⁽²⁹⁾, de culturas de células ⁽³⁰⁾ e de morfologia ⁽³¹⁻³⁵⁾. O gerbilo da espécie *Meriones unguiculatus* tem se revelado um bom modelo para o estudo da próstata ⁽³⁴⁻³⁷⁾, pois

nesse animal, essa glândula apresenta-se anatomicamente semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e à fusão de seus lobos, características ausentes no rato e no camundongo, onde os lobos ventral, dorsal e dorso-lateral são distintos ⁽²⁵⁾.

Histologicamente, a próstata dos gerbilos jovens (45 dias) é formada por ácinos secretores pequenos e ainda em formação, apresentando epitélio simples, com pequenos dobramentos em sua extensão. Este compartimento é delimitado por estroma não muscular, de tecido conjuntivo frouxo, subjacente ao epitélio acinar e, subjacente a este, há uma espessa camada de CML. Nos gerbilos adultos (120 dias), a próstata apresenta ácinos com epitélio prismático simples e altamente secretor. Entre as porções glandulares, há estroma conjuntivo vascularizado, com poucas fibras conjuntivas e elásticas, além de CML bem compactadas, dispostas ao redor de cada ácino ⁽¹¹⁾. Estas características teciduais e a disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares são também muito semelhantes às encontradas na próstata humana ⁽³⁸⁾.

Fundamentando-se nas semelhanças morfofuncionais já estabelecidas até o momento, é possível criar situações experimentais e que correlacionem com a fisiologia humana devido à grande importância da próstata para a homeostase e a funcionalidade de todo o sistema genital masculino. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e o estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia dessa glândula.

Uma característica importante dessa espécie como modelo experimental para o estudo da próstata é o desenvolvimento espontâneo de lesões, que podem também ser influenciadas por hormônios esteróides ⁽³⁹⁾.

Regulação hormonal da próstata

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também exercem funções importantes para a homeostase da glândula.

Nos mamíferos, o principal andrógeno circulante do plasma é a testosterona (T), sendo que as células de Leydig são responsáveis pela produção de 95% desse esteróide e a supra-renal, de 5% ⁽⁸⁾. Na próstata, o hormônio DHT (Di-hidro testosterona) é o andrógeno predominante, formado a partir de T por ação da enzima 5 α -redutase. A T e a DHT se ligam ao mesmo tipo de receptor – o AR, porém desencadeiam distintas funções fisiológicas. A T regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, já a DHT tem papel fundamental durante a virilização embrionária puberal, além de ser responsável pela funcionalidade da próstata no indivíduo adulto ⁽⁴⁰⁾.

Embora a próstata seja um alvo importante dos andrógenos, ela também é considerada dependente de estrógenos, pois expressa receptores de estrógenos dos tipos alfa (ER α) e beta (ER β) ⁽⁴¹⁾.

Os estrógenos regulam o desenvolvimento e a função da próstata em vários estágios da vida do homem, através de mecanismos diretos e indiretos ^(42,43). O crescimento, a diferenciação e as funções da próstata são primariamente controladas por andrógenos, mas os estrógenos modulam esses efeitos de dois modos: a via mais importante é a da regulação estrogênica indireta, que interfere na produção de andrógenos por repressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Outra via de regulação indireta por estrógeno é via prolactina. Os estrógenos também têm efeitos diretos sobre a próstata, os quais podem ser alcançados pela produção local do hormônio, através da aromatização da T, por ação específica da enzima aromatase ⁽⁴³⁾.

Na próstata, há receptores de estrógenos nos fibroblastos, nas células epiteliais basais e secretoras. Tanto o estrógeno quanto a DHT são capazes de diminuir a taxa de morte celular. O aumento da concentração sérica de estrógenos pode promover indiretamente o crescimento prostático, pelo aumento da produção de fatores de crescimento. Os estrógenos induzem os fibroblastos prostáticos a expressarem os receptores dos fatores de crescimento epidermal e o do fibroblasto, aumentam os níveis de AR e estimulam as células epiteliais basais a produzirem fatores de crescimento que agem nas células epiteliais ⁽⁴⁴⁾.

Influência dos estrógenos sobre o desenvolvimento prostático

Embora o desenvolvimento prostático seja dirigido por andrógenos, os estrógenos também podem influenciar a morfogênese prostática. A exposição inapropriada a estrógenos durante o período embrionário e neonatal causa distúrbios permanentes no desenvolvimento prostático, sendo esse processo referido como “estrogenização do desenvolvimento” ou “*imprint*” ^(45,46).

Estudos com roedores têm demonstrado que a exposição a estrógenos durante as duas primeiras semanas de desenvolvimento embrionário modifica o brotamento, a ramificação e a diferenciação prostática masculina, de modo que a natureza dessas alterações é dependente da dose de hormônio empregada ⁽⁴⁵⁾.

Doses altas de estrógeno causam distúrbios permanentes na próstata, que incluem redução do crescimento, defeitos na diferenciação das células epiteliais, alteração da função secretora e reduzida resposta a andrógenos na vida adulta ⁽⁴⁷⁾. Inversamente, doses baixas de estrógenos têm sido associadas ao aumento do tamanho e

atividade secretória da glândula prostática no indivíduo adulto, e ao surgimento de doenças prostáticas em indivíduos senis ^(48,49).

Os efeitos causados por ambas as doses de estrógenos parecem ser mediados pelo ER α , uma vez que camundongos deficientes na produção desse receptor não apresentam alterações de desenvolvimento quando expostos aos estrógenos ⁽⁴⁸⁾.

Durante o desenvolvimento prostático normal, o AR é o receptor dominante tanto no epitélio quanto no estroma, enquanto o ER α é expresso a baixos níveis nas células estromais próximas aos ductos prostáticos em expansão. Com a exposição a altas doses de estrógenos, os níveis de ER α aumentam, fazendo com que a morfogênese prostática torne-se um processo dirigido por estrógenos. Esse evento causa interrupções na expressão coordenada de genes críticos para o desenvolvimento prostático, entre eles, Hox13, NKx3.1, Shh, FGF-10 e BMP-4, ocasionando uma supressão no brotamento e na ramificação prostática ⁽⁴⁶⁾. Por outro lado, estudos com camundongos demonstram que, em baixas doses, os estrógenos não só interagem com o ER α , mas também atuam como agonistas do AR, aumentando sua expressão e atividade, fato que ocasiona o maior desenvolvimento prostático ^(48,50).

Vários estudos envolvendo a estrogenização intra-embrionária e neonatal de roedores foram desenvolvidos com a finalidade de avaliar o impacto que o estrógeno e outros compostos de ação análoga podem causar sobre os órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de ratos e de camundongos ⁽⁴⁹⁻⁵²⁾. O foco de interesse desses experimentos advém do fato que nas últimas décadas milhões de mulheres têm exposto seus filhos a estrógenos sintéticos durante a gestação ^(53,54). Dentre esses compostos sintéticos que apresentam atividade estrogênica pode-se citar o bisfenol A (BPA), o dietilestilbestrol (DES) e o 17 α -etinil estradiol (EE), entre tantos outros xenoestrógenos.

O EE é um estrógeno sintético que faz parte da composição de muitos dos contraceptivos utilizados na atualidade e que apresenta uma ação muito semelhante ao DES. Nos EUA e na Europa, é estimado que 2% a 5% das 60 milhões de mulheres que usam contraceptivos orais engravidam acidentalmente e, desconhecendo a gravidez, continuam o uso dos mesmos até o terceiro ou quarto mês de gestação. Essa alta incidência de fertilização ocorre devido a erros na administração da pílula (principalmente por esquecimento) ou, em poucos casos, a variações individuais na sensibilidade aos hormônios contraceptivos. Como a exposição intrauterina a esse hormônio ocorre no período crítico para o desenvolvimento dos órgãos sexuais, várias anormalidades do desenvolvimento ocorrem nesse período, sobretudo nos órgãos que apresentam morfogênese dependente de hormônios esteróides ^(49,53,55,56).

Camundongos machos expostos a baixas doses EE no período de desenvolvimento intrauterino apresentaram, no período neonatal, um crescimento prostático anormal ⁽⁴⁹⁾, e quando suas próstatas foram analisadas na vida adulta, pode-se constatar um grande desenvolvimento glandular e uma alta expressão de AR ⁽⁵³⁾. Esses trabalhos demonstram que os efeitos que o EE causa sobre a próstata de camundongos machos recém-nascidos e adultos é equivalente às alterações glandulares causadas pelo BPA e pelo DES.

Justificativa do estudo

A biologia prostática é assunto de interesse de vários pesquisadores no mundo, principalmente devido à propensão que essa glândula apresenta para desenvolver lesões durante a senescência ⁽⁴²⁾.

Atualmente, têm-se buscado nos processos de desenvolvimento a resposta para o entendimento dos mecanismos de progressão de patologias prostáticas, visto que o destino de suas células é determinado durante a vida embrionária e neonatal ⁽¹³⁾.

Nas últimas décadas, os seres humanos estão cada vez mais expostos a níveis crescentes de poluentes ambientais. Esses químicos ambientais, também denominados de “desreguladores” ou “disruptores” endócrinos, estão presentes em quantidades significativas no solo, no ar, na água e em produtos industrializados em geral ⁽⁵⁷⁾. Em contato com o organismo, essas substâncias apresentam atividade hormonal, geralmente mimetizando andrógenos ou estrógenos. Por mimetizar esteróides, os químicos ambientais podem interferir diretamente com o balanço hormonal sistêmico, causando alterações irreversíveis nos órgãos regulados por esses hormônios.

O processo de desenvolvimento e de diferenciação prostática é regulado principalmente por andrógenos, e sensíveis alterações ou interferências nos níveis desses hormônios podem alterar o padrão normal de desenvolvimento dessa glândula ⁽⁵⁸⁾.

A exposição pré-natal e neonatal a compostos estrogênicos como o etinilestradiol causa diversos distúrbios no desenvolvimento, incluindo malformações graves e alterações na morfofisiologia dos órgãos do sistema genital masculino e feminino ^(47,54,56). Essas anormalidades do desenvolvimento estão bem descritas para vários órgãos do sistema reprodutor de ratos e camundongos e, em gerbilos, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram, recentemente, que a exposição neonatal resulta, em indivíduos na idade adulta, em desordens benignas e pré-malignas ⁽⁵⁶⁾ e, ainda, não se conhece os efeitos desse tipo de exposição na fase senil. Assim, uma questão ainda permanece em aberto: se as lesões que tem início na fase adulta teriam ou

não continuidade e se as mesmas poderiam desenvolver graus superiores de invasividade e progressão em longo prazo.

Atualmente, não é possível afirmar se existem fatores intrínsecos do desenvolvimento que possam predispor a glândula prostática ao desenvolvimento de câncer sob influência da idade. Porém, como a exposição neonatal a hormônios esteróides é capaz de alterar permanentemente vários órgãos reprodutivos, torna-se questionável se essas alterações podem desencadear lesões prostáticas durante a vida adulta e senil em gerbilos.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição neonatal ao desregulador endócrino etinilestradiol causa alterações morfofisiológicas na próstata de gerbilos durante as fases adulta e senil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Os gerbilos (*Meriones unguiculatus*) que foram empregados neste experimento foram provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto (SP) e mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*”. Os experimentos foram realizados segundo o protocolo da comissão de ética para uso de animais da UNESP (Protocolo

número 061/2012 - CEUA). Neste experimento, foram utilizados 10 fêmeas e 10 machos de gerbilos adultos (entre três e quatro meses de idade).

Durante a formação das famílias, cada macho e cada fêmea foram aleatoriamente mantidos na mesma caixa para que ocorresse o acasalamento. As fêmeas grávidas foram divididas em dois grupos experimentais. Ao nascimento, os filhotes provenientes das ninhadas formaram os seguintes grupos: Grupo Controle (C): 1 hora após o nascimento da ninhada, cinco fêmeas lactantes receberam doses orais diárias de 100 µl de óleo de mineral (Nujol/Mantecorp), do 1º ao 10º dia de vida dos filhotes; Grupo etinilestradiol (EE): 1 hora após o nascimento da ninhada, cinco fêmeas lactantes receberam doses diárias de 10 µg/kg/dia de EE (17 α -ethynyl estradiol, Sigma) diluído em 100 µl de óleo mineral, do 1º ao 10º dia de vida dos filhotes. Este protocolo de tratamento foi adaptado de Thayer et al. (2001) ⁽⁵³⁾. Todos os filhotes foram desmamados com 21 dias de idade. Os filhotes fêmeas foram destinados a outro experimento. Dois filhotes machos de cada ninhada foram obtidos aleatoriamente, de modo que cada grupo foi composto por 10 animais, que foram submetidos a diferentes metodologias de análise. Todos os gerbilos machos foram eutanasiados quando completaram 120 dias de vida.

Todos os animais foram eutanasiados por inalação de CO₂, seguida por decaptação. O peso corpóreo e o peso do complexo prostático (PrC – que corresponde a região da uretra associada aos lobos ventral, dorsolateral e dorsal da próstata) foram mensurados para posterior análise biométrica. O PrC foi dissecado em estereomicroscópio (Leica, Germany) para remover o tecido adiposo e isolar o segmento uretral associado ao tecido prostático.

Processamento histológico e análise histoquímica

Após a pesagem, os PrC coletados (oito animais por grupo) foram fixados em paraformaldeído 4% (em tampão fosfato Sörensen pH 7,2- 0,1M), ou em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%), lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e, então, incluídos em Paraplast (Histosec, Merk) ou historesina (Leica historesin embedding kit). Os órgãos foram seccionados a 3-5 μ m e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e pela reticulina de Gömöri. Os cortes histológicos foram analisados em fotomicroscópio Olympus BX60 I (Olympus, Japan), e as imagens foram digitalizadas nos softwares DP-BSW v3.1 (Olympus, Japan) e no sistema virtual de lâminas BX 61VS (Olympus, Tokyo, Japan).

Estereologia

As análises estereológicas foram realizadas no sistema de teste multipontos com 130 pontos e 10 linhas ⁽⁵⁹⁾ para comparar a frequência relativa de cada compartimento prostático (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) como descrito por Huttunen (1981) ⁽⁶⁰⁾. Para isso, foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal; n = 5). Os valores relativos foram determinados pela contagem dos pontos coincidentes sobre cada compartimento em estudo, seguido da divisão destes pelo número total de pontos do sistema teste. A análise estereológica foi realizada no sistema analisador de imagens, com o programa Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

Imunohistoquímica

Os cortes histológicos da próstata ventral foram desparafinizados, reidratados em série decrescente de etanol, e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. Para a visualização dos anticorpos primários utilizou-se o kit Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System (RE7150-K) que incluiu etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (PBS 3 x 5 minutos), como se descreve a seguir: A atividade endógena da peroxidase foi neutralizada através da aplicação de Novocastra Peroxidase Block por 10 minutos, seguiu-se a isto a aplicação do Novocastra Protein Block por 5 minutos, para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e do polímero. Subsequentemente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para o receptor de andrógeno (Anti-AR, rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology) ou receptor de estrógeno alfa (Anti-ER α , rabbit polyclonal IgG, MC-20, Santa Cruz Biotechnology), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, mouse monoclonal IgG2a, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e α -actina de músculo liso (mouse monoclonal IgG2a, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) em uma diluição de 1:100 e mantidos a 4°C overnight. No dia seguinte foi incubado com o Novocastra Post Primary Block por 1 hora, após este tempo foi aplicado o NovoLink Polymer por 1 hora. Depois os cortes foram incubados com uma solução (1:20) de Novocastra DAB Chromogen e NovoLink DAB Substrate Buffer, respectivamente; a reação produziu um precipitado de cor castanha. Os cortes foram contrastados com Novocastra Hematoxylin, desidratadas em séries crescentes de etanol, montadas em Entellan (MERK) e avaliadas em microscopia de luz convencional.

Quantificação de células AR- e PCNA-positivas

Para a quantificação de células AR- e PCNA-positivas foram capturadas 30 fotomicrografias (aumento de 400x) de cada grupo experimental. Para cada imagem, foi obtido o número total de células positivas e negativas por área de interesse (epitélio e estroma). A frequência (%) de células AR- e PCNA-positivas foi obtida em função do número total de células por área. Entre células positivas e negativas, foram contadas 5.800 células para AR, e 4.600 células para PCNA.

Análise estatística

Os testes de hipótese utilizados para determinar a significância estatística foram o teste de Man-Whitney para dados de distribuição não-paramétrica e o teste-*t* para dados paramétricos. Todas as análises foram realizadas no software Statistica 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa). Análise descrita dos dados com medidas de tendência central e dispersão e testes para verificação da normalidade dos dados com o teste Kolmogorov Smirnov. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Todos os valores foram representados pela média \pm erro padrão da média.

Análise Ultraestrutural

Os fragmentos de 0,5 mm da próstata ventral de gerbilos foram fixados em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão Millonig pH 7.3 contendo ácido tânico 0.25%, durante 24 horas. Após lavagem em tampão, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em resina Araldite⁽⁶¹⁾. As telas de cobre contendo

os cortes ultrafinos foram contrastadas com solução de acetato de uranila a 2% (20 minutos), lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% (6 minutos) e lavadas novamente. A análise ultraestrutural das glândulas prostáticas foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-Modelo EM 910.

3. RESULTADOS

Biometria

Não foi observada diferença significativa no peso corpóreo dos animais dos dois grupos experimentais. Contudo, o PrC e o PrC relativo tornaram-se cerca de duas vezes maiores ($p \leq 0.05$) nos machos adultos expostos ao EE (Tabela I).

Morfologia e estereologia

Todas as próstatas ventrais dos animais submetidos ao tratamento neonatal com EE apresentaram alterações morfológicas epiteliais e estromais (Fig. 1). O compartimento epitelial tornou-se muito proliferativo, exibindo diversos focos de crescimento hiperplásico (Fig. 1c-f). O estroma tornou-se muito celularizado e comprometido por infiltrados inflamatórios (Fig. 1e). As fibras reticulares, que no grupo controle eram delgadas e restritas à base do epitélio, passaram a formar redes complexas distribuídas desde a base do epitélio até regiões profundas do estroma interalveolar (Fig. 1g-h).

A análise estereológica (Tabela 1) corroborou os dados morfológicos, demonstrando que ocorreu um aumento significativo dos compartimentos epitelial e estromal, com conseqüente diminuição da frequência relativa luminal ($p \leq 0.05$).

Análise imunohistoquímica

AR

Células AR-positivas foram observadas no epitélio e no estroma da próstata ventral dos grupos controle e EE (Fig. 2a-d). Contudo, ocorreu um aumento significativo das imunomarcações epiteliais e estromais no grupo EE ($p \leq 0.05$; Fig. 3).

PCNA

Células PCNA-positivas foram pouco frequentes no compartimento epitelial ($5.5 \pm 0.5\%$) e estromal ($3.8 \pm 0.3\%$) da próstata ventral de gerbilos controle (Fig. 2e, 4). Contudo, estas células tornaram-se muito frequentes no grupo EE, principalmente em regiões hiperplásicas epiteliais e estromais (Fig. 2f-h). A quantificação de células PCNA-positivas demonstrou um aumento significativo das imunomarcações epiteliais ($43.0 \pm 1.8\%$) e estromais ($28.6 \pm 1.4\%$) (Fig. 4).

ER α

Na próstata ventral de gerbilos controle os fibroblastos e as células musculares lisas exibiram fracas marcações nucleares para ER α (Fig. 5a). No entanto, no grupo EE o padrão de marcação foi bastante distinto, com marcações nucleares nas células epiteliais e marcações citoplasmáticas e nucleares nas células estromais (Fig. 5b-d).

α -Actina

A imunomarcação para α -actina de músculo liso demonstrou que o tratamento com EE ocasionou um remodelação das células musculares lisas ao redor dos alvéolos prostáticos (Fig. 5e-h). Nos grupos tratados com EE pode-se observar um aparente

aumento na espessura da camada de musculatura lisa, bem como um desarranjo e interrupção da mesma em áreas de intensa proliferação epitelial (Fig. 5g).

Análise ultraestrutural

O tratamento com EE causou alterações no padrão ultraestrutural da próstata ventral de gerbilos (Fig. 6). O epitélio secretor, que era simples cilíndrico na próstata controle, apresentou muitas áreas de estratificação no grupo EE. As células epiteliais tornaram-se menores, porém com citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Fig. 6b, c). Corpos lamelares com acúmulo de ceramidas foram frequentemente observados nas células epiteliais prostáticas. Estes corpos representam dobras da membrana plasmática com arranjo em espiral (Fig. 6b). No estroma, as células musculares lisas do grupo EE exibiram um fenótipo contrátil, caracterizado pela presença de muitos corpos densos e vesículas pinocíticas (Fig. 6d).

4. ILUSTRAÇÕES

Figuras

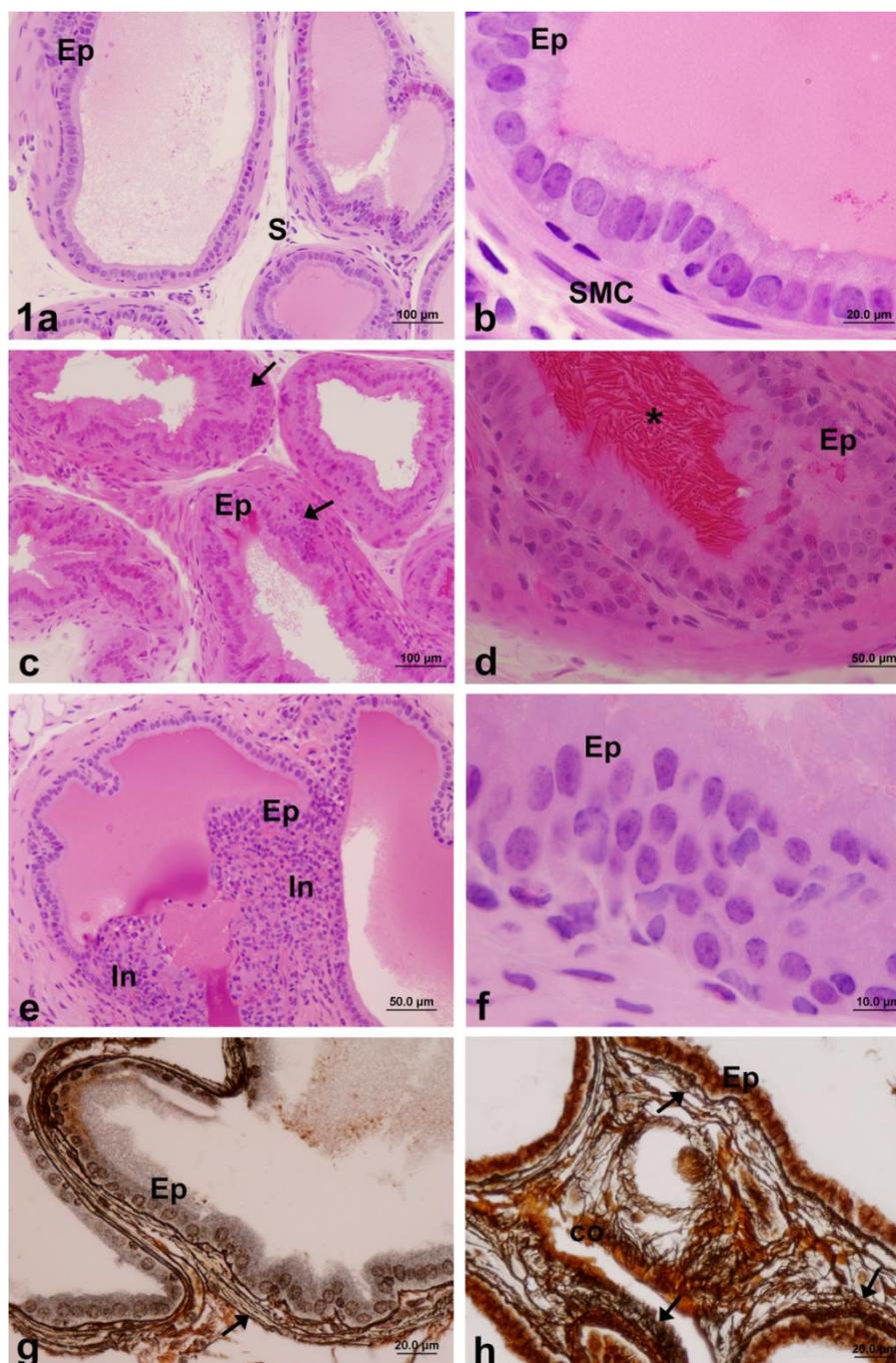


Figura 1. (a-b) Cortes histológicas da próstata ventral de gerbilos adultos controle corados pela hematoxilina-eosina (HE). Epitélio (Ep), estroma (S), camada de células musculares lisas (SMC). (c-f) Cortes histológicas da próstata ventral de gerbilos adultos tratados com EE. Coloração: HE. Os alvéolos são revestidos por um epitélio desenvolvido e hiperplásico (setas). No lumen, pode-se observar o acúmulo de microcálculos (*). Focos inflamatórios (In) são muito comuns nas glândulas expostas ao EE. (g-h) Cortes histológicas da próstata ventral de gerbilos controle (g) e tratados com EE (h). Coloração: reticulina de Gömöri. Fibras reticulares (setas), fibras colágenas (CO).

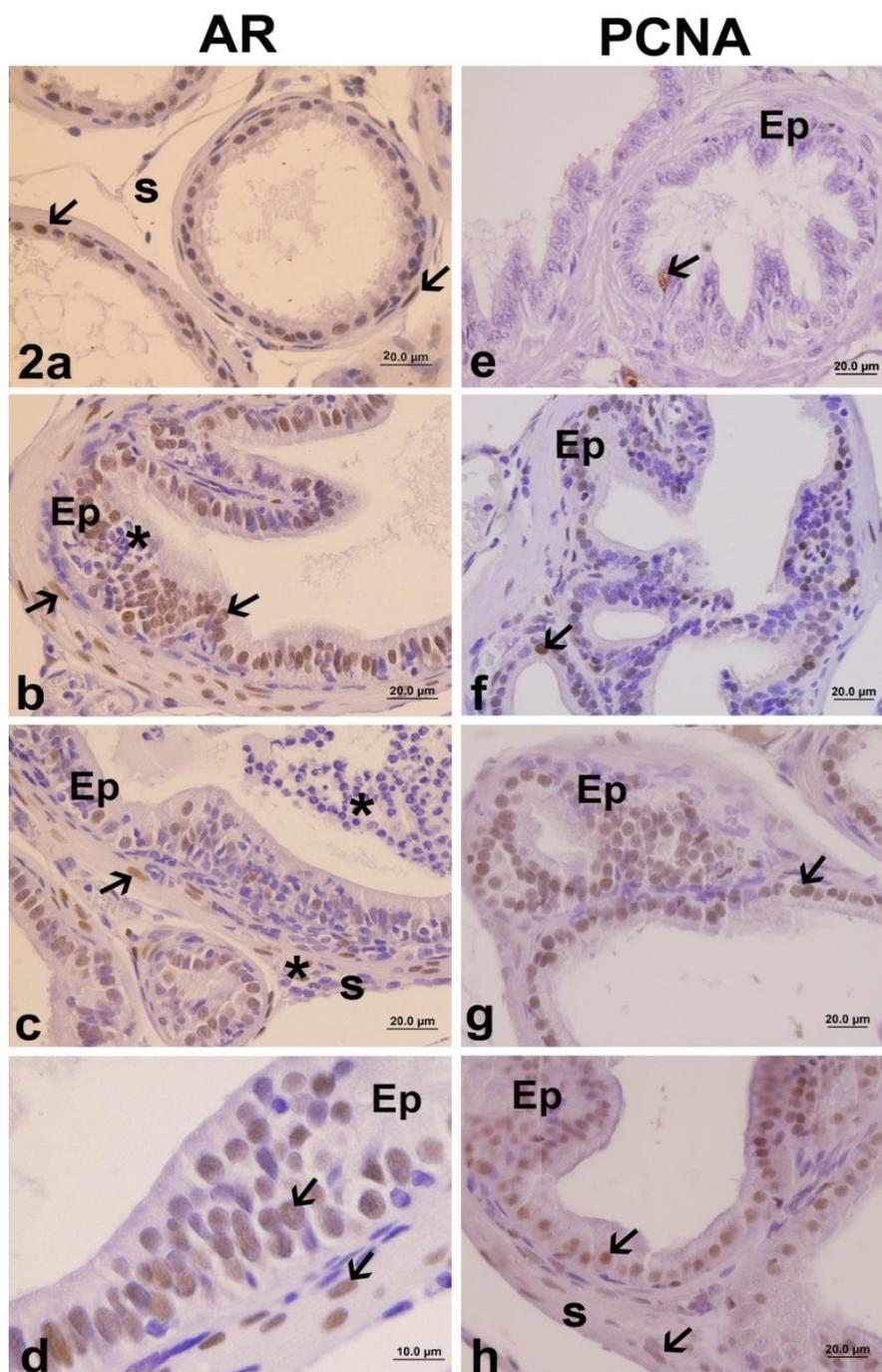


Figura 2. Imunohistoquímica para receptor de andrógenos (AR) e para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Controle: **a, e**; EE: **b-d, f-h**. Setas indicam marcações nucleares epiteliais e estromais para AR e PCNA. Células AR-positivas foram observadas em áreas de intensa proliferação celular (**b-d**) e em regiões com infiltrados inflamatórios (*, **b-c**). Células PCNA-positivas foram raras nas próstatas ventrais de gerbilos controle (**e**), entretanto tornaram-se muito frequentes nos compartimentos epiteliais e estromais do grupo EE (**f-h**).

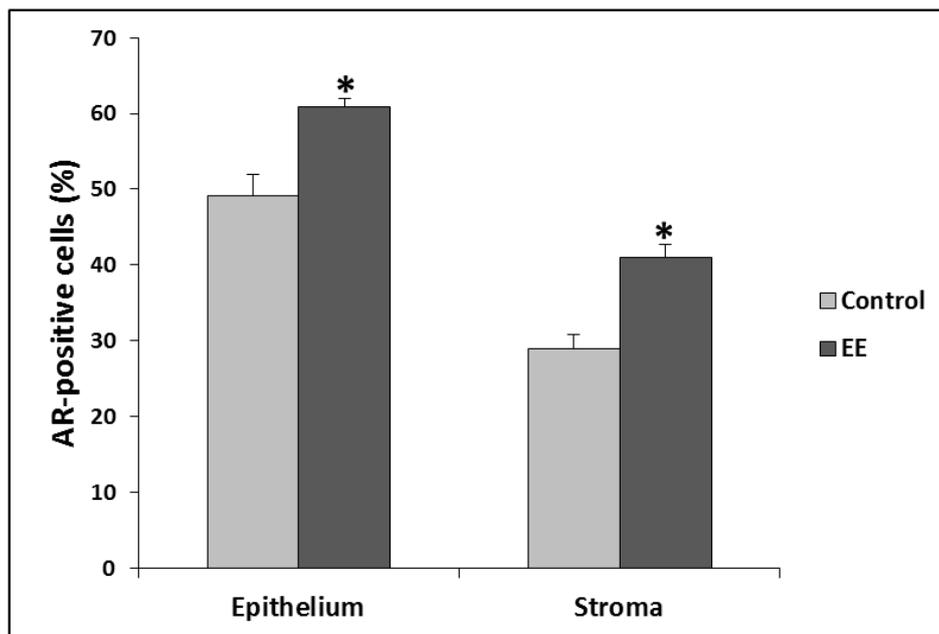


Figura 3. Frequência de células epiteliais e estromais AR-positivas na próstata ventral masculina dos grupos controle e tratados com EE. Os valores foram representados pela média \pm SEM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$); $n = 30$ campos em 3 animais / grupo.

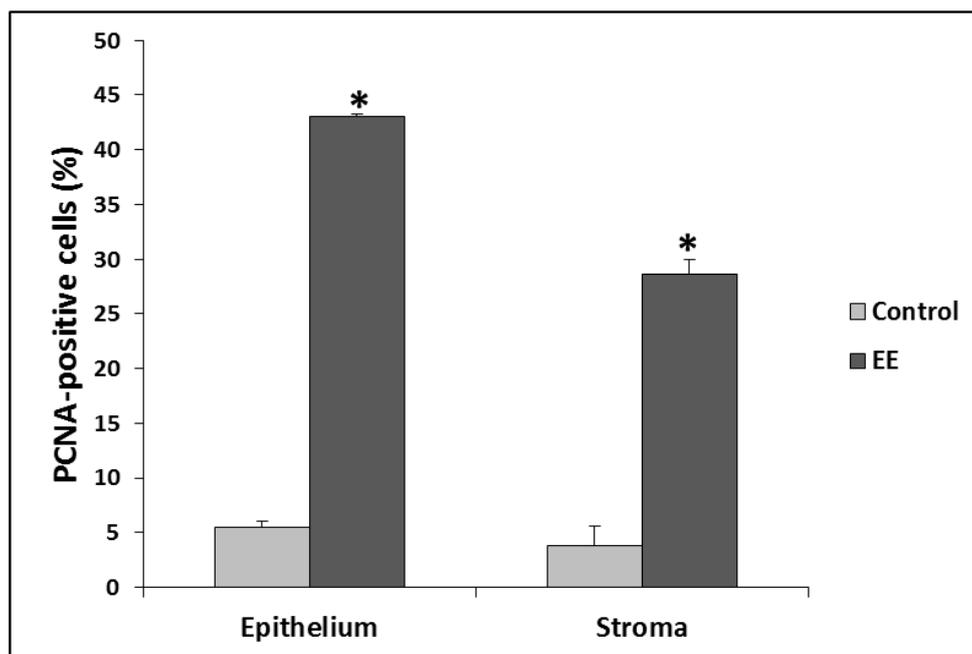


Figura 4. Frequência de células epiteliais e estromais PCNA-positivas na próstata ventral masculina dos grupos controle e tratados com EE. Os valores foram representados pela média \pm SEM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$); $n = 30$ campos em 3 animais / grupo.

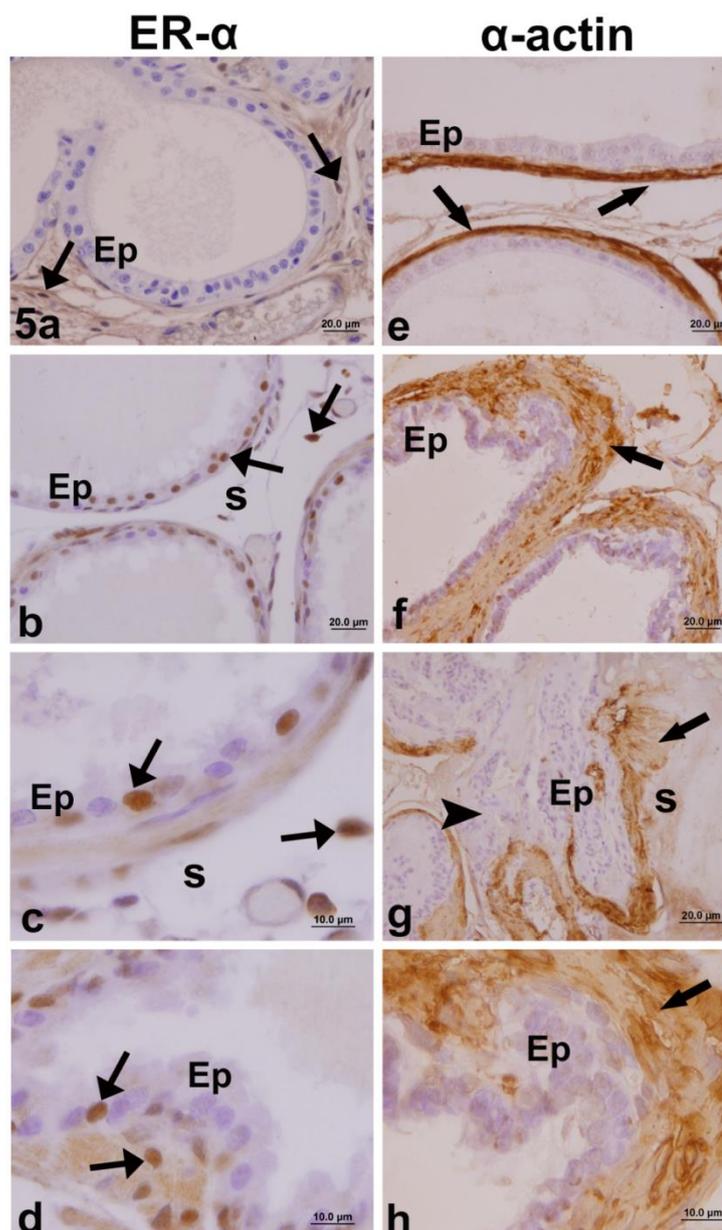


Figura 5. Imunohistoquímica para receptor de estrógeno alfa (ER α ; **a-d**) e para α -actina de músculo liso (**e-h**). No grupo controle (**a**) foram observadas marcações para ER α no núcleo de células estromais (setas), enquanto que as próstatas ventrais do grupo EE (**b-d**) apresentaram marcações nucleares nas células epiteliais e estromais, além de marcações citoplasmáticas nas células estromais. A imunomarcação para α -actina demonstrou que as células musculares lisas do grupo controle (**e**) formam uma camada fina e regular ao redor dos alvéolos prostáticos (setas). Já no grupo tratado com EE (**f-h**), as marcações foram difusas e irregulares (setas), estando ausentes em regiões de intensa proliferação epitelial (cabeça de seta).

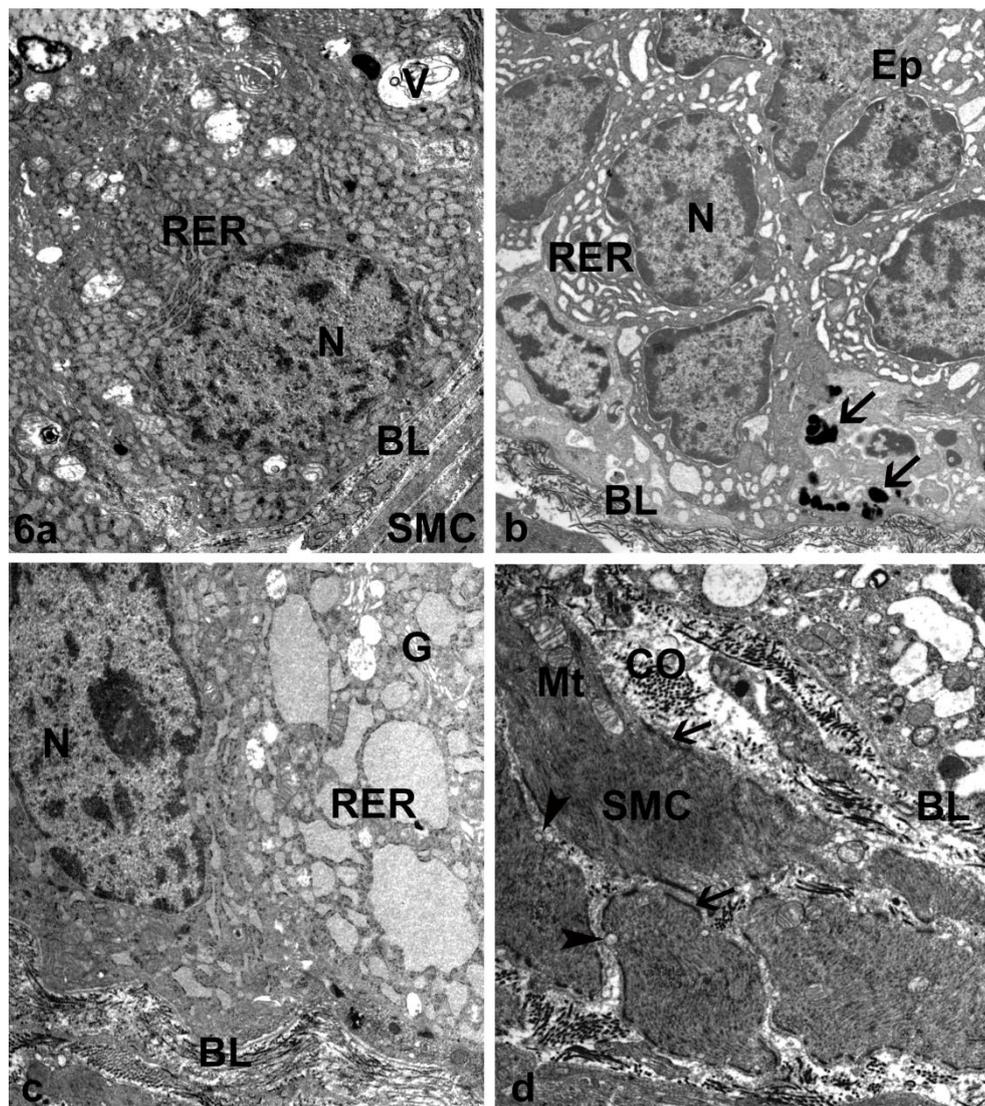


Figura 6. Ultraestrutura da próstata ventral de gerbilos adultos controle (a) e submetidos ao tratamento com EE (b-d). (a) Epitélio secretor e estroma perialveolar da próstata ventral de gerbilos controle. Núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER), vesícula de secreção (V), lâmina basal (BL), células musculares lisas (SMC). Aumento: 10,000x. (b) Região proliferativa do epitélio prostático (Ep) exibindo padrão típico de estratificação celular. Acúmulo de ceramidas pode ser observado entre as células epiteliais (setas). Aumento: 6000x. (c) Detalhe do citoplasma basal de células epiteliais secretoras exibindo uma grande quantidade de cisternas alargadas do RER. Complexo de Golgi (G). Aumento: 10.000x. (d) Detalhe do estroma prostático exibindo SMC e fibras de colágeno (CO). Corpos densos (setas), vesículas pinocíticas (cabeça de seta), mitocôndrias (Mt). Aumento: 10.000x.

Tabelas

Tabela 1. ¹Peso corporal, do complexo prostático (PrC) e peso relativo do PrC em machos adultos controle e tratados com EE (n = 8/group). Peso relativo corresponde à relação entre o peso da próstata masculina e o peso de todo o corpo. Os valores são médias ± erro padrão. ²Dados estereológicos obtidos para a próstata ventral masculina durante o tratamento de EE (média ± erro padrão; n = 30 campos em 5 animais / grupo).

	Machos Adultos	
	Controle	EE
<i>¹Biometria</i>		
Peso Corporal (g)	62,3 ± 0,7	60,2 ± 1,0
Peso PrC (g)	0,62 ± 0,03	1,26 ± 0,17*
Peso Relativo do PrC (x10 ⁻²)	1,0 ± 0,03	2,08 ± 0,2*
<i>²Estereologia (%)</i>		
Epitélio	12,8 ± 0,9	25,3 ± 0,9*
Lúmen	66,7 ± 1,8	47,7 ± 1,4*
Estroma	20,5 ± 1,4	27,0 ± 1,1*

* Diferenças estatisticamente significativas entre o controle e tratamento EE (p ≤ 0,05)

5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a exposição ao EE durante a primeira semana de desenvolvimento pós-natal casou alterações morfofisiológicas na próstata ventral de gerbilos, que resultaram em lesões benignas nestes animais durante a vida adulta. No geral, as próstatas ventrais de gerbilos adultos apresentaram um aumento no peso do PrC e PrC relativo, aumento da atividade secretória, elevada frequência de células AR e PCNA-positivas, alteração do padrão de imunomarcção para ER α e α -actina e diversos focos de infiltrados inflamatórios associados a regiões de hiperplasia epitelial.

Já está bem estabelecido que o EE é um potente EDC, e que tem causado alterações permanentes no desenvolvimento de vários órgãos e sistemas ^(49,62-65). A natureza das desordens promovidas pelo EE está associada ao período de exposição e, principalmente, à dose empregada ^(66,67). Estudos que administraram altas doses de EE (entre 1-10mg/kg/day) a ratos Sprague-Dawley demonstraram uma diminuição do brotamento e ramificação ductal prostática, além de uma menor expressão dos AR ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Esses efeitos geralmente ocorrem por que altas doses de estrógenos exógenos promovem uma castração química no indivíduo, devido à supressão da secreção de gonadotrofinas pela pituitária. Estes eventos resultam em um decréscimo na secreção de andrógenos testiculares, ocasionando a diminuição dos níveis plasmáticos de andrógenos e conseqüente atrofia prostática ⁽⁷¹⁾.

Inversamente, a exposição a doses baixas de EE durante a morfogênese prostática tem sido associada ao aumento da glândula e a ocorrência de lesões na vida adulta, sendo que estas alterações parecem ser mediadas pelos ERs ^(49,67). Deste modo,

os dados obtidos com este estudo corroboram os resultados obtidos com outras espécies de roedores que também foram expostas à baixas concentrações de EE.

A alteração morfológica mais frequentemente encontrada neste estudo foi a ocorrência de focos de hiperplasia epitelial associados a infiltrados inflamatórios intraluminais e estromais. Resultados semelhantes foram observados em ratos *Wistar* expostos a baixas doses de EE no período gestacional e pós-natal ⁽⁷²⁾ e em ratos *Wistar* expostos perinatalmente à outros compostos com atividade estrogênica como metoxycholor e tamoxifen ⁽⁷³⁾. Embora estas lesões observadas na próstata ventral de gerbilos adultos sejam benignas, a alta frequência com que elas são encontradas é preocupante, pois ao longo da vida podem predispor os indivíduos a lesões mais graves.

As análises imunohistoquímicas demonstraram um aumento significativo na frequência de células epiteliais e estromais AR-positivas, e uma alteração no padrão de imunomarcção para ER α . Células ER α -positivas, que em gerbilos controle são observadas apenas no compartimento estromal, tornaram-se frequentes também no compartimento epitelial. Estes resultados sugerem que as alterações no padrão de imunomarcção para ER α podem ter aumentado a sensibilidade da próstata ventral aos andrógenos, culminando em um alto status proliferativo desta glândula em gerbilos adultos. Efeitos similares foram observados em outros roedores expostos nos períodos prenatais e posnatais a baixas doses de estradiol e diethylstilbestrol, metoxycholor e bisphenol-A ^(66,74).

Em gerbilos, estudo prévio com machos expostos durante o desenvolvimento intrauterino ao EE demonstrou que a próstata ventral não apresentou alterações em seu peso e imunomarcção para ER α , embora tenha ocorrido maior frequência de células epiteliais AR-positivas e focos de metaplasia e neoplasia intraepitelial prostática ⁽⁵⁵⁾.

Deste modo, a partir dos resultados obtidos com este estudo, nós acreditamos que a próstata ventral de gerbilos é mais susceptível a desregulação endócrina por xenobióticos como o EE durante o período de desenvolvimento pós-natal. Adicionalmente, a ocorrência de lesões proliferativas em animais jovens-adultos pode ser um fator de risco para a saúde destes indivíduos durante o envelhecimento.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo indica que a exposição ao EE durante o desenvolvimento pós-natal da próstata ventral pode causar alterações organizacionais na histofisiologia deste órgão, predispondo os indivíduos precocemente a lesões prostáticas. Estes resultados são de grande importância para a saúde pública, visto que o EE tem sido cada vez mais utilizado por mulheres em todo o mundo ^(49,75) e que a bioacumulação deste EDC tem atingido níveis cada vez mais altos nos diferentes ecossistemas ⁽⁶⁵⁾.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Risbridger GP, Taylor RA. 2006. Physiology of male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In *Physiology of reproduction*. (J.D. Neil, Ed.) pp 1149-1172.
- 2) Untergasser G, Madersbacherb S, Bergera P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*. 40(3):121-8.
- 3) Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253:165-174.
- 4) Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TWM. 2001. Co-administration of Finasterida and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171: 109-118.
- 5) Carruba G. 2006. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-217.
- 6) De Marzo AM, Platz EA, Stueliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaac W, Nelson W. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev* 7(4):256-269.

- 7) Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155: 5-17.
- 8) Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. 2002. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52:213-235.
- 9) Heinlein CA, Chang, C. 2002. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocr Rev*, 23(2): 175-200.
- 10) Taplin, ME, Balk, SP, 2004. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem*, 91: 483-490.
- 11) Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PSL, Góes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian Gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec. Part A*, 290, 1233-1247.
- 12) Vilamaior, PSL, Taboga. SR, Carvalho, HF 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec*, 288A: 885-892.
- 13) Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253:165-174.

- 14) Thomson AA. 2001. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121:187-195.
- 15) Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat*, 155:81-93.
- 16) Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. 2001. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68:270-279.
- 17) Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. 1996. Stromal development in ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155: 94-103.
- 18) Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. 1997. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 (Suppl.): 18-26.
- 19) Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. 2004. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*, 67(5): 417-434.
- 20) Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. 2004. Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Ster Bioch Molec Biol* 92(4): 221-236.

- 21) Cunha GR, Bigsby RM, Cooke PS, Sugimura Y. 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell differ* 17: 137-148.
- 22) Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70: 473-485.
- 23) Kirby RS, Christmas TS, Brawer M. 1996. Prostate cancer. Mosby ed. London, 170p.
- 24) Sung SY & Chung W. 2002. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation* 70: 506-521.
- 25) Price D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Berthesesa*, 12:1-27.
- 26) Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Samloff IM, Stamey TA. 1986. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesical. *J. Urol* 136:1148-1152.
- 27) Jeffers GW, Klei TR, Enright FM. 1984. Activation of the jird (*Meriones unguiculatus*) macrophages by the filarial parasite *Brugia pahangi*. *Infect. Immun.*, 43(1): 43-48.

- 28) Nawa Y, Horii Y, Okada M, Arizono N. 1994. Histochemical and cytochemical characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int Arch Allergy Immunol*, 104(3): 249-254.
- 29) Nolan, C.C., Brown, A.W. & Cavanagh, J.B. 1990. Regional variations in nerve cell response to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbil. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 81(2): 204-212.
- 30) Moritomo T, Saito H, Watanabe T, Mochizuki K. 1991. Tissue culture on Mongolian gerbil's (*Meriones unguiculatus*) malignant melanoma. *Jikken Dobutsu*, 40(3): 385-388.
- 31) Redecker, P. 1991. Ultrastructural demonstration of neuhaemal contacts in the internal zone of the median eminence of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): correlation with synaptophysin immunohistochemistry. *Histochem* 95(5): 503-511.
- 32) Aoki-Komori S, Sayto TR, Takahashi KW, Tanigushi K. 1994. Lectin histochemical studies on the scent gland in the Syrian hamster and Mongolian gerbil. *Jikken Dobutsu* 43(2): 181-190.
- 33) Jones D, Gonzales LF, Crews D, Galef BGJr & Clark MM. 1997. Effects of the intrauterine position on the metabolic capacity of the hypothalamus of female gerbils. *Physiol Behav* 61(4): 513-519.

- 34) Santos FCA, Taboga SR. 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod*, 3:3-18.
- 35) Campos SG, Gonçalves BF, Scarano WR, Corradi LS, Santos FC, Custodio AM, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol* 91(5): 394-407.
- 36) Santos FCA, Falleiros-Jr LR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2007. Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res*, 328:617-624.
- 37) Fochi RA, Perez APS, Bianchi CV, Rochel SS, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Santos FCA. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (Skene Paraurethral Glands). *Biol Reprod* 79:1084-1091.
- 38) Pegorin de Campos, SG, Zanetoni, Góes RM, Taboga, SR 2006. Biological behavior of the gerbil. *Int J Exp Pathol*. 89(1), 25-37.
- 39) Campos SG, Zanetoni, C, Scarano WR, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2008. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good

model for studies of spontaneous hormone-related disorders *Int J Exp Pathol* 89: 13-24.

- 40) Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko i. 2004. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol*, 92: 281-286.
- 41) McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzscheier KH, Risbridger GP. 2007. Essential role for estrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinol*, 148(2):566-574.
- 42) Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. 2001. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* 13:285-296
- 43) Härkönen PL & Mäkelä SI. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92: 297-305.
- 44) Droller MJ. 1997. Medical approaches in the management of prostatic disease. *British J Urol* 79 (Suppl2):42-52.
- 45) Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. 2001. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*, 13:241-252.

- 46) Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. 2004. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*, 25: 330-337.
- 47) Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res*, 322:173-181.
- 48) Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. 2005. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl acad Sci, USA*, 102(5):1484-1489.
- 49) Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS*, 102(19):7014-7019.
- 50) Gupta C. 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *P.S.E.B.M.*, 224:61-68.
- 51) Pu Y, Huang L, Prins GS. 2004. Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol* 273:257-275.

- 52) Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. 2005. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod*, 72(6):1344-1351.
- 53) Thayer KA, Ruhlen RL, Howdeshell KL, Buchanan DL, Cooke PS, Preziosi D, Welshons WV, Haseman J, vom Saal FS. 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. *Human Reproduction*, 16(5):988-996.
- 54) Schrager S and Potter BE. 2004. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physicians*, 69,2395-2400.
- 55) Perez AP; Biancardi MF; Dos Santos FCA; Góes RM; Taboga SR. 2011. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. *Int J Exp Pathol*, 92(2):121-30.
- 56) Perez AP; Biancardi MF; Vilamaior, PSL; Góes RM; Taboga SR. 2012. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. *Microsc Res Tech*, 75 (8): 1084-1092.
- 57) Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*, 23(3): 374-382.

- 58) Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. 2008. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102: 134-138.
- 59) Weibel ER. 1978. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation*, 12:131-155.
- 60) Huttunen, E., Romppanen, T., Helminen, H.J., 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat.*3, 357-370.
- 61) Cotta-Pereira, G., Rodrigo, F.G., David-Ferreira, J.F., 1976. The use of tannic acid glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol.* 51, 7–11.
- 62) Shimomura, K., Shimada, M., Hagiwara, M., Harada, S., Kato, M., Furuhashi, K., 2005. Insights into testicular damage induced by ethinylestradiol in rats. *Reprod Toxicol.* 20(1), 157-163.
- 63) Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessì-Fulgheri, F., Farabollini, F., 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav.* 50(2), 301-307.
- 64) Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C., Gray, L.E. Jr., 2008. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol

A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci.* 102(2), 371-382.

65) Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int.* 69, 104-119.

66) vomSaal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5), 2056-2061.

67) Taylor, J.A., Richter, C.A., Ruhlen, R.L., vomSaal, F.S., 2011. Estrogenic environmental chemicals and drugs: Mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid BiochemMol Biol.* 127, 83-95.

68) Iwase, T., Sano, F., Murakami, T., Inazawa, K., 1995. Male reproductive toxicity of ethinylestradiol associated with 4 weeks daily dosing prior to mating in rats. *J Toxicol Sci.* 20(3), 265-279.

69) Kinomoto, T., Sawada, M., Ogawa, S., Iguchi, A., Matsui, A., Iino, Y., Shiraishi, Y., Nishi, N., Mera, Y., 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 3). Effects of repeated doses of

ethinylestradiol for 2 and 4 weeks on the male reproductive organs. *J Toxicol Sci. Spec No*, 43-49.

- 70) Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Imatanaka, N., Takatsuki, M., 2002. Subacute oral toxicity study of ethinylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch Toxicol.* 76(2), 65-74.
- 71) Nicholson, T.M. and Ricke, W.A., 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation.* 82(4-5), 184-199.
- 72) Mandrup, K.R., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Axelstad, M., Dreisig, K., Hadrup, N., Vinggaard, A.M., Hass, U., Boberg, J., 2013. Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 42, 180-91.
- 73) Stoker, T.E., Robinette, C.L., Cooper, R.L., 1999. 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.* 13(6), 463-472.
- 74) Welshons, W.V., Nagel, S.C., Thayer, K.A., Judy, B.M., vom Saal, F.S., 1999. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health.* 15(1-2), 12-25.

- 75) Chabbert-Buffet, N., Gerris, J., Jamin, C., Lello, S., Lete, I., Lobo, P., Nappi, R.E., Pintiaux, A., 2013. Toward a new concept of "natural balance" in oral estroprogestin contraception. *GynecolEndocrinol.* 29(10): 891-896.

8. APÊNDICE

Esta dissertação resultou no seguinte artigo científico, o qual será submetido à revista “*Life Sciences*”.

“Neonatal exposure to ethynylestradiol increases ventral prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils.”

Luiz Roberto Falleiros-Júnior^{1,2}, Ana Paula da Silva Perez³, Sebastião Roberto Taboga²,
Fernanda Cristina Alcantara dos Santos⁴, Patrícia Simone Leite Vilamaior^{1,2}

¹*Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de Rio Preto, Avenida Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto, São Paulo, 15090000, Brazil*

²*Department of Biology, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, University Estadual Paulista – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054000, Brazil.*

³*Campinas State University – UNICAMP, Department of Structural and Functional Biology, Campinas, SP, Brazil.*

⁴*Department of Histology, Embriology and Cell Biology, Federal University of Goiás, Campus II Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.*

Corresponding author: Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior, *Department of Biology, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, University Estadual Paulista – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054000, Brazil. E-mail address: patvila@ibilce.unesp.br, phone: +55 17 32212511; Fax: +55 17 32212390.*

Abstract

The aim of this study was to analyze morphologically the ventral prostate of adult gerbils exposed to ethynylestradiol (EE) during the first week of prenatal development. For this purpose, we employed morphological, stereological-morphometrical, immunohistochemical, and ultrastructural methods. The results showed that the postnatal exposure to EE duplicated the prostatic complex weight, increasing the relative frequency of epithelial and stromal compartments, in addition to the secretory activity of the ventral lobe of the prostate. All glands exposed to EE showed strong stromal reshuffling, and some foci of epithelial hyperplasia and inflammatory infiltrate in both luminal and epithelial or stromal compartments. Cells positive for anti-AR and anti-PCNA reactions increased into the epithelial and stromal tissues. ER α -positive cells, which are normally found in the stromal compartment of intact prostates, were frequently observed in the prostatic epithelial of treated animals. This study demonstrated that the exposure to EE during postnatal development causes histophysiological alterations of this gland, predisposing to the development of prostatic lesions during life. These results are important for public health, considering that EE has been commonly used by women worldwide. Moreover, the bioaccumulation of this chemical has increased in different ecosystems.

Keywords: endocrine-disrupting chemicals, neonatal prostate development, ethynylestradiol, androgen receptor.

Introduction

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) belong to a category of environmental toxicants with the potential for disturbing endocrine pathways in several organisms (DenHond and Schoeters 2006; McLachlan et al. 2006; Caserta et al. 2008). Organs that are hormone-dependent are particularly sensible to EDCs (Taylor et al. 2011). This way, the exposure to EDCs during critical periods of ontogenetic development may promote specific disorders of reproductive system organs, predisposing to diseases during adult or elderly life (Huang et al. 2004; Nelles et al. 2011; Hu et al. 2012).

EDCs include natural products such as estrogens, androgens, and phytoestrogens, as well as a wide variety of industrial chemicals, including synthetic hormones, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychloro-biphenols, dioxins, furans, nonylphenols, besides drugs and pesticides that are released into environment (Jacobsen et al. 2010; Luccio-Camelo and Prins 2011; Aris et al. 2014).

There are several EDCs with estrogenic potential, mimicking or blocking the synthesis and activity of endogenous hormones (MacLachlan 2006; Vaiserman 2014). Among them, 17α -ethynylestradiol (EE) is a synthetic estrogen that is widespread in our environment, mainly due to its property of being resistant to degrading processes (Aris et al. 2014). Nowadays, EE has been prescribed for contraception, treatment of postmenopausal syndrome, therapies of hormonal replacement, prostate and breast cancer treatment, and osteoporosis (Thayer et al. 2001; Shimomura et al. 2005; Aris et al. 2014). Moreover, this drug has been widely employed in livestock in order to increase productivity and for the treatment of some diseases (Bartelt-Hunt et al. 2011).

Studies related to intrauterine and neonatal development in rodents have shown that exposure to EE during this period can cause irreversible changes of the

prostate morphophysiology (Timms et al. 2005; Perez et al. 2011; Mandrup et al. 2013). The nature of these changes may vary greatly and, generally, depends on the specie and doses employed, as well as the pathway and time of exposure to the drugs (Toppari 2008). Most of the researches show that high levels of EE are related to inhibition of prostatic growth, whereas low doses stimulate the growth and glandular function (vom Saal et al. 1997; Taylor et al. 2011).

Gerbils (*Meriones unguiculatus*) have been frequently employed in studies regarding hormonal regulation (Scarano et al. 2008; Campos et al. 2010; Fochi et al. 2013), carcinogenesis (Gonçalves et al. 2013, 2014), and endocrine disruption of the prostate (Perez et al. 2012; Biancardi et al. 2014). The results above have been interesting, since the ventral lobe of this gland responds to these manipulations similarly to the prostate of other rodents and of humans. However, at the present time there is no information regarding the effects of EE during the neonatal period and its consequences on the ventral prostate of adult gerbils. Thus, the aim of this study was to analyze the morphology of the ventral prostate in adult gerbils exposed to EE during the first week of postnatal development.

Material and Methods

Animals and experimental design

The animals were provided by the São Paulo State University (UNESP) (São José do Rio Preto) and maintained in polyethylene cages under controlled conditions of light and temperature. They were given filtered water and rodent food ad libitum. Animal handling and experiments were performed according to the ethical guidelines of

the UNESP (Ethical committee number 061/2012 - CEUA), following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

We used 10 adult female and 10 adult male (between 3 and 4 months old) gerbils (*Meriones unguiculatus*, Muridae: Gerbillinae) for mating. We randomly matched one male and one female to form independent families. Five pregnant females were put into each group, and their offspring formed two experimental groups, as follows: Control group (C): one hour after the birth of the pups, five lactating females received daily doses of 100 μ l of mineral oil (Nujol/Mantecorp) from the 1st to 10th postnatal day of the pups. EE group: one hour after the birth of the pups, five lactating females received daily doses of 10 μ g/Kg of EE (Sigma Aldrich) diluted in 100 μ l of mineral oil from the 1st to 10th postnatal day of the pups. The protocol of EE treatment was adapted from Thayer et al. (2001). All pups were weaned at 21 days. The female pups were destined for other experiments. Two pups from each litter were randomly obtained, and each group was composed of 10 animals, which were submitted to different methodologies. All male gerbils were euthanized when they completed 120 days of life.

All animals were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation. Body and prostatic complex (PrC - correspondent urethral segment, ventral, dorsolateral, and dorsal prostate lobes) were weighed. These fragments were dissected using a Leica stereoscopic microscope (Leica, Germany) to remove adipose tissues and isolate the urethral segment plus the associated prostatic tissue.

Light microscopy

PrC from adult male gerbils (eight animals per group) were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (buffered in 0.1 M phosphate, pH 7.2) or in Karnovsky fixative (5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for 24 h. After fixation, the tissues were washed in water, dehydrated in ethanol series, embedded in paraffin (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany) or in glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany), and sectioned at 3-5 μm on a Leica automatic rotatory microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). The sections were stained by hematoxylin-eosin (HE) and by Gömöri's reticulin. The specimens were analyzed with an Olympus BX60 light microscope (Olympus, Japan), and the images were digitalized using DP-BSW software v3.1 (Olympus, Japan) and a virtual slide system BX 61VS (Olympus, Tokyo, Japan).

Stereology

The stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 130 points and 10 test lines (Weibel 1978) to compare the relative frequency of each component of ventral prostatic tissue (epithelium, lumen, stroma), as described by Huttunen (1981). We chose 30 microscopic fields at random from each experimental group (six fields per animal; $n = 5$). Briefly, we determined the relative values by counting the coincident points in the test grid and dividing them by the total number of points. Stereological analysis was performed using Image-Pro Plus software v6.1 for Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

Immunohistochemistry

Prostate sections were subjected to immunohistochemistry ($n = 3$ animals per group) for detection of the androgen receptor (AR), as described in protocols applied to the prostate (Cordeiro et al. 2008), estrogen receptor-alpha ($ER\alpha$), and PCNA. Primary antibodies reactive to AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), $ER\alpha$ (rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology), and PCNA (mouse monoclonal IgG_{2a}, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were employed at a dilution of 1:100. Polymers (Post Primary Block and Polymer, NovocastraTM, RE7260-K, Newcastle Upon Tyne, UK; DAKO Envisiontm + Dual link system-HRP, K4061; DAKO, North America, Inc., Carpinteria, California, USA) were used as secondary antibodies according to the procedures described by the manufacturers. The sections were stained with diaminobenzidine and counterstained with Harris's hematoxylin. The histological sections were analyzed using an Olympus BX60 light microscope (Olympus, Japan).

AR and PCNA quantification

For AR and PCNA quantification, 30 microscopic fields (magnification of 400x) were used for each experimental group (10 fields per animal; $n = 3$). In each field, the total number of positive epithelial cells was obtained as a relative frequency (%) in relation to the total number of epithelial cells of the alveoli. The same procedure was followed for the positive stromal cells. In AR quantification, between positive and negative cells, we counted a mean of 6,800 epithelial cells and 4,900 stromal cells for each experimental group. Regarding PCNA quantification, we counted a mean of 5,800

epithelial cells and 4,600 stromal cells for each experimental group. All these analyses were performed using the image analysis system previously described.

Statistical analyses

The hypothesis tests employed to determine statistical significance were the Man-Whitney U test for non-parametric distributions and *t*-test for parametric distributions. The data were analyzed using Statistica 6.0 software (StarSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The level of significance was set at 5% ($P \leq 0.05$). Values are presented as mean \pm standard error of mean (SEM).

Ultrastructural analyses

The ventral prostate from adult male gerbils (two glands per group) were fixed by immersion with 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer, pH 7.3, containing 0.54% glucose, for 24 h (Cotta-Pereira et al. 1976). After being washed with the same buffer, the material was post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h, washed again, dehydrated in a graded acetone series, and embedded in Araldite resin. Ultrathin silver sections were cut by using a diamond knife and contrasted with 2% alcoholic uranyl acetate and then with 2% lead citrate in sodium hydroxide solution for 10 min. Grids were examined under a Leo-Zeiss 906 transmission electron microscope (Zeiss, Cambridge, UK) operating at 80 kV.

Results

Biometry

We did not observe statistically significant differences regarding the body weight in both experimental groups. However, the PrC and relative PrC increased approximately twofold ($p \leq 0.05$) in adult males exposed to EE (Table I).

Morphology and stereology

All treated prostates showed morphological changes in epithelial and stromal compartments (Fig. 1). The epithelial compartment became proliferative, showing several hyperplastic foci (Fig. 1c-f). The stromal compartments underwent an intense increase of cells, mainly related with inflammatory cells (Fig. 1e). Reticular fibers are thin in the control group and form a complex net which were distributed from the base of the epithelium to deep regions of the stroma (Fig. 1c-f). Stereological analysis (Table 1) reinforced the morphological data, showing a significant increase of epithelial and stromal compartment, in addition to a decrease of the acinar lumen ($p \leq 0.05$).

Immunohistochemical analyses

AR

AR-positive cells were observed in both epithelium and stroma of prostates in control and EE groups (Fig. 2a-d). However, we observed a significant increase of immunostaining in either the epithelial or stromal compartments of the EE group ($p \leq 0.05$; Fig. 3).

PCNA

PCNA-positive cells were not numerous in either the epithelial ($5.5 \pm 0.5\%$) or the stromal ($3.8 \pm 0.3\%$) compartments of the ventral prostate in control the group (Fig. 2e, 4). However, these cells became more frequent in the EE group, mainly in hyperplastic regions (Fig. 2f-h). The quantification of PCNA-positive cells showed an increase of epithelial ($43.0 \pm 1.8\%$) and stromal ($28.6 \pm 1.4\%$) immunostaining (Fig. 4).

ER α

Fibroblasts and smooth muscle cells from the prostates of the control group showed weak immunostaining for ER α (Fig. 5a). However, these same cells showed distinct markings for epithelial and stromal cells (Fig. 5b-d).

α -Actin

Immunostaining for smooth muscle α -actin showed that the treatment with EE caused a reshuffling of smooth muscle cells surrounding the prostatic acini (Fig. 5e-h). Moreover, we observed an increase of the smooth muscle layer in the EE group, as well as a reshuffling and a lack of this layer in areas surrounding epithelial proliferative focus (Fig. 5g).

Ultrastructural analyses

The treatment with EE caused changes in the ultrastructural array of the prostate (Fig. 6). The epithelium has shown some stratified areas in the prostate of the EE group, showing small cells with cytoplasm rich in rough endoplasmic reticulum and Golgi complex (Fig. 6b, c). Lamellar bodies with increase of ceramide were frequently

observed in epithelial cells. These bodies represent infoldings of the plasma membrane with spiral array (Fig. 6b). At stroma, smooth muscle cells of the EE group showed a contractile phenotype, characterized by the presence of several dense bodies besides pinocytotic vesicles (Fig. 6d).

Discussion

This study demonstrated that the exposure to EE during the first week of postnatal development leads to morphological and physiological changes in the ventral prostate of gerbils, resulting in benign lesions during adult life. In general, the prostates showed an increase of both PrC and relative PrC, an increase of secretory activity, high frequency of AR and PCNA-positive cells, a changed pattern of ER α and α -actin immunostaining, and several inflammatory foci associated with hyperplastic areas.

It is well established that EE is a potent EDC, causing permanent changes during the development of several organs (Shimomura et al. 2005; Timms et al. 2005; Dela Seta et al. 2006; Howdeshell et al. 2008; Aris et al. 2014). The nature of these disorders is generally associated with the period of exposure and the dose employed (vom Saal et al 1997; Taylor et al. 2011). Studies with high doses of EE (between 1–10 mg/kg/day) given to Sprague-Dowley rats showed a decrease in budding and ductal branching of the prostate, as well as a lower expression of AR (Iwase et al. 1995; Kinomoto et al. 2000; Yamasaki et al. 2002). These effects generally occur because higher levels of exogenous estrogens promote a chemical castration, due to the suppression of gonadotropins secreted by the pituitary. These events result in a decrease in the secretion of testis androgens, leading to a decrease of serum levels of androgens and causing prostate atrophy (Nicholson and Ricke 2011).

However, the exposure to low doses of EE during prostatic morphogenesis has been associated either with an increase of the gland or the occurrence of lesions during adult life, with these alterations mediated by ERs (Timms et al. 2005; Taylor et al., 2011). Thus, the data of this study corroborates the results obtained with other species of rodents exposed to low levels of EE.

The most frequent morphological alteration found in the present study was the occurrence of epithelial hyperplasia foci associated with inflammatory infiltrate in both lumen and stromal compartments of the prostate. Similar results were observed in *Wistar* rats exposed to low doses of EE during the gestational and postnatal periods (Mandrup et al. 2013), and in *Wistar* rats exposed perinatally to others compounds with estrogenic activity such as metoxychlor and tamoxifen (Stoker et al. 1999). Although these lesions observed in the prostate of adult gerbils are benign, the high frequency in which they are found deserves attention, considering they can become malignant lesions throughout the time.

The immunohistochemical analysis demonstrated a significant increase of the frequency regarding AR-positive cells in both epithelial and stromal tissues, in addition to a change in the reaction pattern for ER α . ER α -positive cells, which are found mainly in the stromal compartment, in our results became frequent into epithelial compartment.

These results suggest that the changes regarding the pattern of immunostaining for ER α increased the sensibility of the prostate regarding the androgens, leading to a proliferative status of this gland in adult animals. Similar effects were observed in other rodents exposed to low doses of oestradiol, diethylstilbestrol, metoxychlor, and bisphenol-A during prenatal and postnatal periods (vom Saal et al. 1997; Welshons et al. 1999).

Previous studies on male gerbils have shown that exposure to EE during intrauterine development did not change either the prostate weight or the ER α immunostaining, although an increase of AR-positive cells was observed, besides metaplasia and prostatic intraepithelial neoplasia foci (Perez et al., 2011). Thus, we believe that the ventral prostate of gerbils is more susceptible to endocrine disruption caused by xenobiotics such as EE, mainly during the postnatal development period. Indeed, the occurrence of proliferative lesions in young and adult animals may be a risk factor for the future health of these individuals during aging.

Conclusion

This study indicates that EE exposure during the postnatal development of the ventral prostate promotes organizational changes in the histophysiology of this organ, predisposing the animals, too early, to the development of prostatic lesions. These results are important for public health, since the EE has been widely employed for women worldwide (Timms et al. 2005; Chabbert-Buffet et al. 2013), and the bioaccumulation has reached high levels in different ecosystems (Aris et al. 2014).

Conflict of Interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Acknowledgements

This paper was supported by a grant from State of Sao Paulo Research Foundation – FAPESP (Process Nr.2012/12607-4 for PSLV) and from the Brazilian

agency CNPq (Brazilian National Research and Development Council, Procs. Nr. 475148/2012-6 for FCAS and Nr. 301596/2011-5 for SRT).

References

Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M., 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int.* 69, 104-119.

Bartelt-Hunt, S., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Miesbach, D., 2011. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J Contam Hydrol.* 123(3-4), 94-103.

Biancardi, M.F., Perez, A.P., Caires, C.R., Goes, R.M., Vilamaior, P.S., Santos, S.C., Taboga, S.R., 2014. Prenatal exposure to testosterone masculinises the female gerbil and promotes the development of lesions in the prostate (Skene's gland). *Reprod Fertil Dev.*

Campos, S.G., Goncalves, B.F., Scarano, W.R., Corradi, L.S., Santos, F.C., Custodio, A.M., Vilamaior, P.S., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2010. Tissue changes in senescent gerbil prostate after hormone deprivation leads to acquisition of androgen insensitivity. *Int J Exp Pathol.* 91, 394-407.

Caserta, D., Maranghi, L., Mantovani, A., Marci, R., Maranghi, F., Moscarini, M., 2007. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update.* 14(1), 59-72.

Chabbert-Buffet, N., Gerris, J., Jamin, C., Lello, S., Lete, I., Lobo, P., Nappi, R.E., Pintiaux, A., 2013. Toward a new concept of "natural balance" in oral estroprogestin contraception. *GynecolEndocrinol.* 29(10): 891-896.

Cordeiro, R.S., Scarano, W.R., Campos, S.G., Santos, F.C., Vilamaior, P.S., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*. 39(8), 1312-1324.

Cotta-Periera, G., Rodrigo, F.G., David-Ferreira, J.F., 1976. The use of tannic acid glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol*. 51, 7-11.

Della Seta, D., Minder, I., Belloni, V., Aloisi, A.M., Dessì-Fulgheri, F., Farabollini, F., 2006. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav*. 50(2), 301-307.

Den Hond, E. and Schoeters, G., 2006. Endocrine disrupters and human puberty. *Int J Androl*. 29(1), 264-271.

Fochi, R.A., Santos, F.C., Goes, R.M., Taboga, S.R., 2013. Progesterone as a morphological regulatory factor of the male and female gerbil prostate. *Int J Exp Pathol*. 94(6), 373-386.

Gonçalves, B.F., de Campos, S.G., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Falleiros, L.R. Jr., Amorim, R.L., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2013. A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. *Prostate*. 73(11), 1202-1213.

Gonçalves, B.F., Campos, S.G., Costa, C.F., Scarano, W.R., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2014. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: An approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. *Acta Histochem*. pii: S0065-1281(14)00259-1.

Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Ryan, B.C., Gray, L.E. Jr., 2008. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A,

decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicol Sci.* 102(2), 371-382.

Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., Prins, G.S., 2004. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl.* 25, 330-337.

Hu, W.Y., Shi, G.B., Hu, D.P., Nelles, J.L., Prins, G.S., 2012. Actions of estrogens and endocrine disrupting chemicals on human prostate stem/progenitor cells and prostate cancer risk. *Mol Cell Endocrinol.* 354(1-2), 63-73.

Huttunen, E., Romppanen, T., Helminen, H.J., 1981. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat.* 3, 357-370.

Iwase, T., Sano, F., Murakami, T., Inazawa, K., 1995. Male reproductive toxicity of ethinylestradiol associated with 4 weeks daily dosing prior to mating in rats. *J Toxicol Sci.* 20(3), 265-279.

Jacobsen, P.R., Christiansen, S., Boberg, J., Nellemann, C., Hass, U., 2010. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl.* 33(2), 434-442.

Kinomoto, T., Sawada, M., Ogawa, S., Iguchi, A., Matsui, A., Iino, Y., Shiraishi, Y., Nishi, N., Mera, Y., 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 3). Effects of repeated doses of ethinylestradiol for 2 and 4 weeks on the male reproductive organs. *J ToxicolSci. Spec No.* 43-49.

Luccio-Camelo, D.C., Prins, G.S., 2011. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid BiochemMol Biol.* 127(1-2), 74-82.

- Mandrup, K.R., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Axelstad, M., Dreisig, K., Hadrup, N., Vinggaard, A.M., Hass, U., Boberg, J., 2013. Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats. *ReprodToxicol.* 42, 180-91.
- McLachlan, J.A., Simpson, E., Martin, M., 2006. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* 20(1), 63-75.
- Nelles, J.L., Hu, W.Y., Prins, G.S., 2011. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev EndocrinolMetab.* 6(3), 437-451.
- Nicholson, T.M. and Ricke, W.A., 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation.* 82(4-5), 184-199.
- Perez, A.P., Biancardi, M.F., Goes, R.M., dos Santos, F.A., Taboga, S.R., 2011. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. *Int J ExpPathol.* 92, 121-130.
- Perez, A.P.S., Biancardi, M.F., Vilamaior, P.S.L., Góes, R.M., Santos, F.C.A., Taboga, S.R., 2012. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. *Microsc Res Tech.* 75(8), 1084-1092.
- Scarano, W.R., de Sousa, D.E., Campos, S.G., Corradi, L.S., Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., 2008. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J ExpPathol.* 89(1), 25-37.
- Shimomura, K., Shimada, M., Hagiwara, M., Harada, S., Kato, M., Furuhashi, K., 2005. Insights into testicular damage induced by ethinylestradiol in rats. *ReprodToxicol.* 20(1), 157-163.

Stoker, T.E., Robinette, C.L., Cooper, R.L., 1999. 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. *ReprodToxicol.* 13(6), 463-472.

Taylor, J.A., Richter, C.A., Ruhlen, R.L., vomSaal, F.S., 2011. Estrogenic environmental chemicals and drugs: Mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid BiochemMol Biol.* 127, 83-95.

Thayer, K.A., Ruhlen, R.L., Howdeshell, K.L., Buchanan, D.L., Cooke, P.S., Preziosi, D., Welshons, W.V., Haseman, J., vomSaal, F.S., 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyloestradiol. *Hum Reprod.* 16(5), 988-996.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., vomSaal, F.S., 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *PNAS.* 102(19), 7014-7019.

Toppari, J., 2008. Environmental endocrine disrupters. *Sex Dev.* 2(4-5), 260-267.

Vaiserman, A., 2014. Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? *Aging Dis.* 25(6), 419-429.

vomSaal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5), 2056-2061.

Weibel, E.R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 12, 131-155.

Welshons, W.V., Nagel, S.C., Thayer, K.A., Judy, B.M., vom Saal, F.S., 1999. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of

methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health*. 15(1-2), 12-25.

Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Imatanaka, N., Takatsuki, M., 2002. Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch Toxicol*. 76(2), 65-74.

Legends

Table I. ¹Body, prostate complex (PrC), and PrC relative weight in adult control males and in the EE-treated males (n = 8/group). Relative weight corresponds to the ratio between the weight of the male prostate and that of the whole body. Values are means \pm standard error. ²Stereological data obtained for the male ventral prostate during EE treatment (mean \pm SEM; n = 30 fields in 5 animals/group). *Statistically significant differences between control and EE treatment ($p \leq 0.05$).

Figure 1. (a-b) Histological sections of ventral prostate in control adult gerbils stained by HE. Epithelium (Ep), stroma (S), layer of smooth muscle cells (SMC). **(c-f)** Histological sections of ventral prostate in adult gerbils treated with EE. Stain: HE. The alveoli are surrounded by a developed and hyperplastic epithelium (arrows). Inside the lumen, note the presence of micro calculi (*). Inflammatory foci (In) are common in glands exposed to EE. **(g-h)** Histological sections of ventral prostate in control **(g)** and treated groups **(h)**. Stain: Gömöri's reticulin. Reticular fibers (arrows), collagen fibers (CO).

Figure 2. Immunohistochemistry for AR and PCNA. Control: **a,e**; EE: **b-d, f-h**. Arrows indicate nuclear markings into epithelial and stromal compartments for AR and PCNA-positive cells. AR-positive cells were observed in areas with intense proliferation **(b-d)** and in regions with inflammatory infiltrated (*, **b-c**). PCNA-positive cells were rare in ventral prostates of control gerbils **(e)**, becoming more frequent in epithelial and stromal compartments of the prostates in the EE group **(f-h)**.

Figure 3. Frequency of AR-positive epithelial and stromal cells in the ventral prostate of control and EE-treated males. Values are means \pm SEM. Asterisk represents statistically significant differences between the experimental groups ($p \leq 0.05$); $n = 30$ fields in three animals/group.

Figure 4. Frequency of PCNA-positive epithelial and stromal cells in the ventral prostate of control and EE-treated males. Values are means \pm SEM. Asterisk represents statistically significant differences between the experimental groups ($p \leq 0.05$); $n = 30$ fields in three animals/group.

Figure 5. Immunohistochemistry for ER α (**a-d**) and for smooth muscle α -actin (**e-h**).

In the control group (**a**) we observed ER α markings in the nuclei of stromal cells (arrows), whereas the ventral prostate of the EE group (**b-d**) showed nuclear markings for epithelial and stromal cells, as well as cytoplasm markings into stromal cells. Immunostaining for smooth muscle α -actin showed a thin layer surrounding the alveoli (arrows). On the other hand, in the EE group the markings were diffuse and irregular (arrows), and were absent in regions of intense epithelial proliferation (arrowhead).

Figure 6. Ultrastructural aspects of ventral prostate in the control (**a**) and EE groups (**b-d**). (**a**) Epithelium and perialveolar stroma of ventral prostate in control gerbils. Nucleus (N), rough endoplasmic reticulum (RER), secretion vesicle (V), basal lamina (BL), smooth muscle cells (SMC). Magnification: 10.000x. (**b**) Proliferative region of prostatic epithelium (Ep) showing a characteristic pattern of cellular stratification.

Aggregates of ceramide can be observed between the epithelial cells (arrows). Magnification: 6000x. (c) Detail of basal cytoplasm of epithelial cells showing a high amount of RER. Golgi complex (g). Magnification: 10.000x. (d) Detail of prostatic stroma showing SMC and collagen fibers (CO). Dense bodies (arrows), pinocytic vesicles (arrowhead), mitochondria (Mt). Magnification: 10.000x.

TABLE I

	Adult Males	
	Control	EE
<i>¹Biometry</i>		
Body weight (g)	62.3 ± 0.7	60.2 ± 1.0
PrC weight (g)	0.62 ± 0.03	1.26 ± 0.17*
PrC relative weight (x10 ⁻²)	1.0 ± 0.03	2.08 ± 0.2*
<i>²Stereology (%)</i>		
Epithelium	12.8 ± 0.9	25.3 ± 0.9*
Lumen	66.7 ± 1.8	47.7 ± 1.4*
Stroma	20.5 ± 1.4	27.0 ± 1.1*

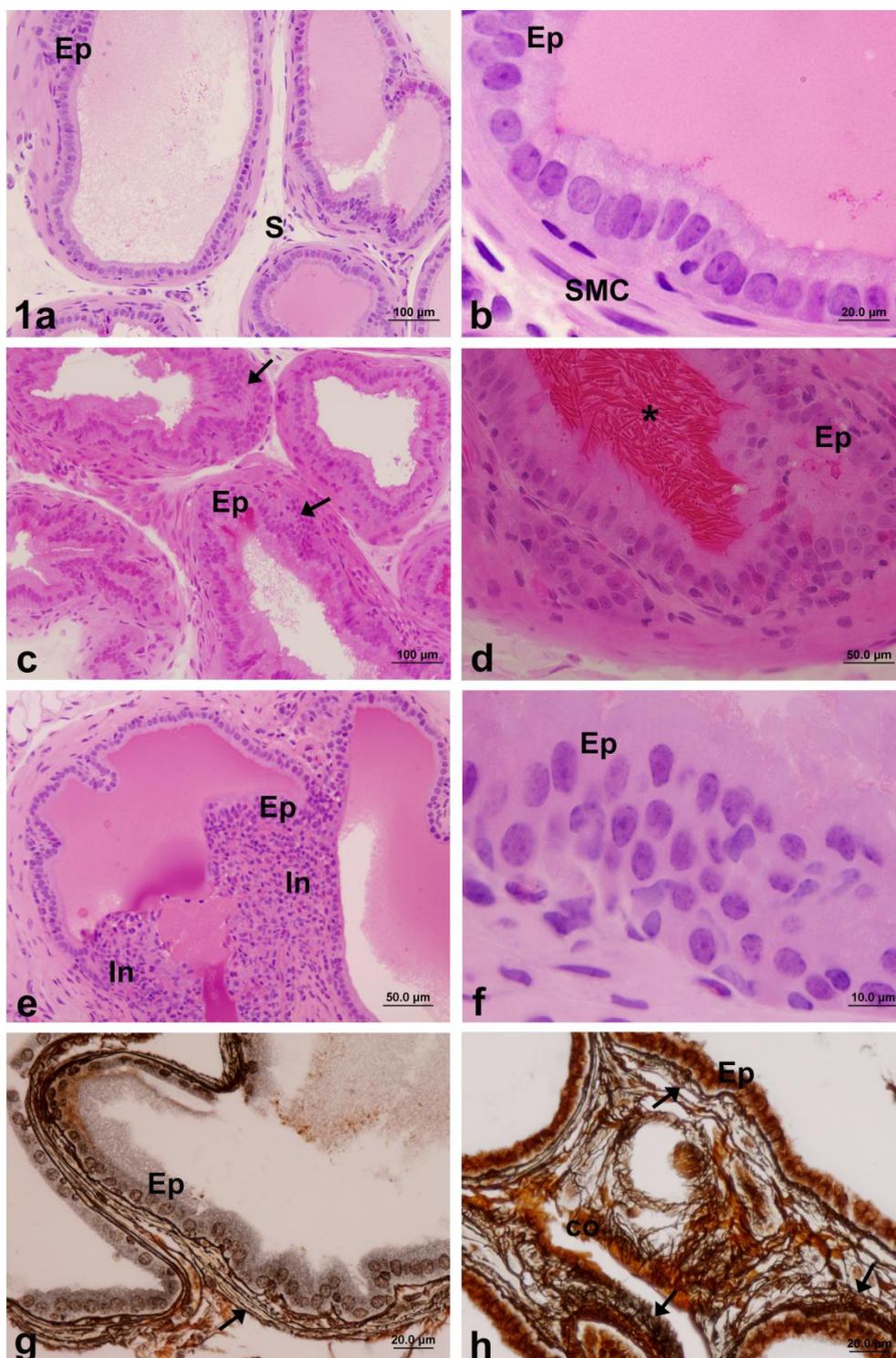
FIGURE 1.

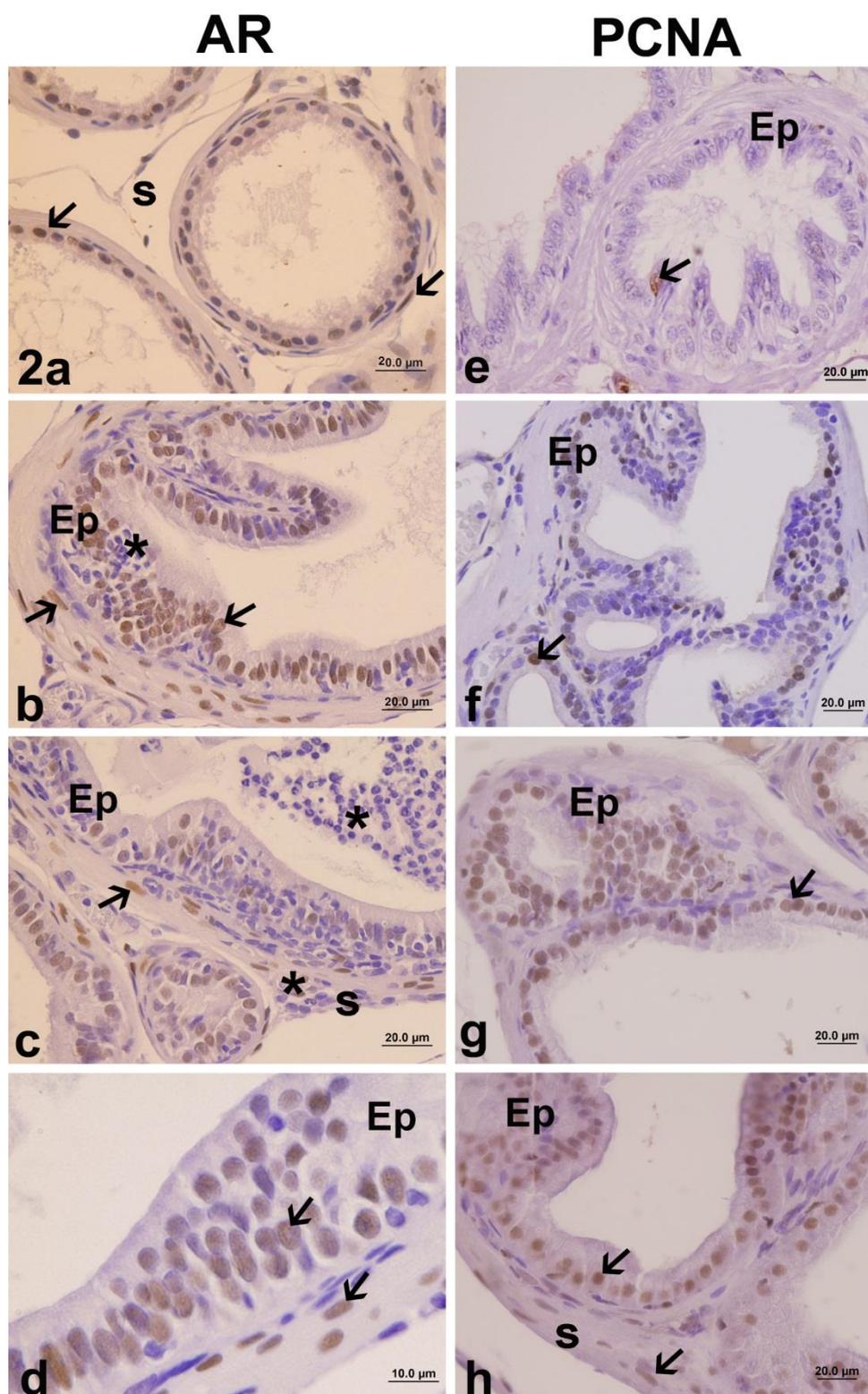
FIGURE 2.

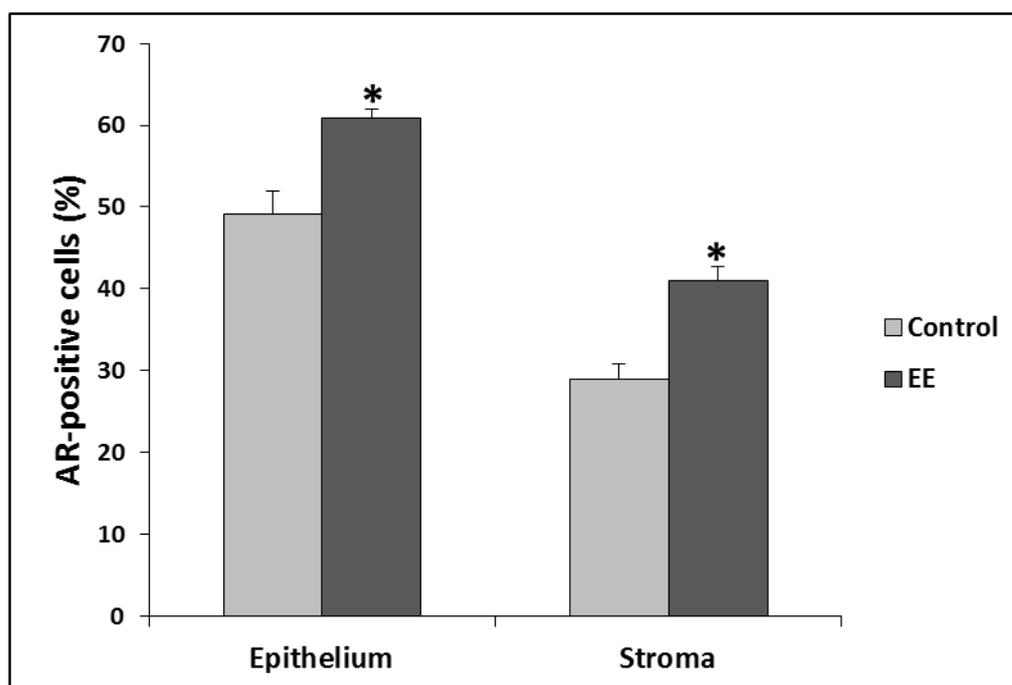
FIGURE 3.

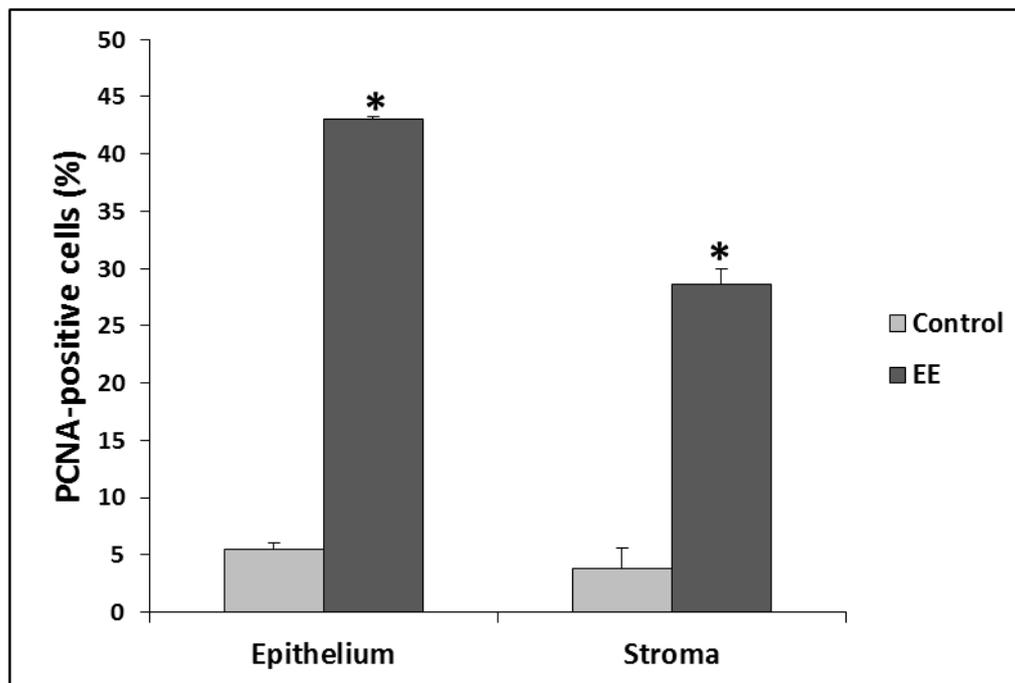
FIGURE 4.

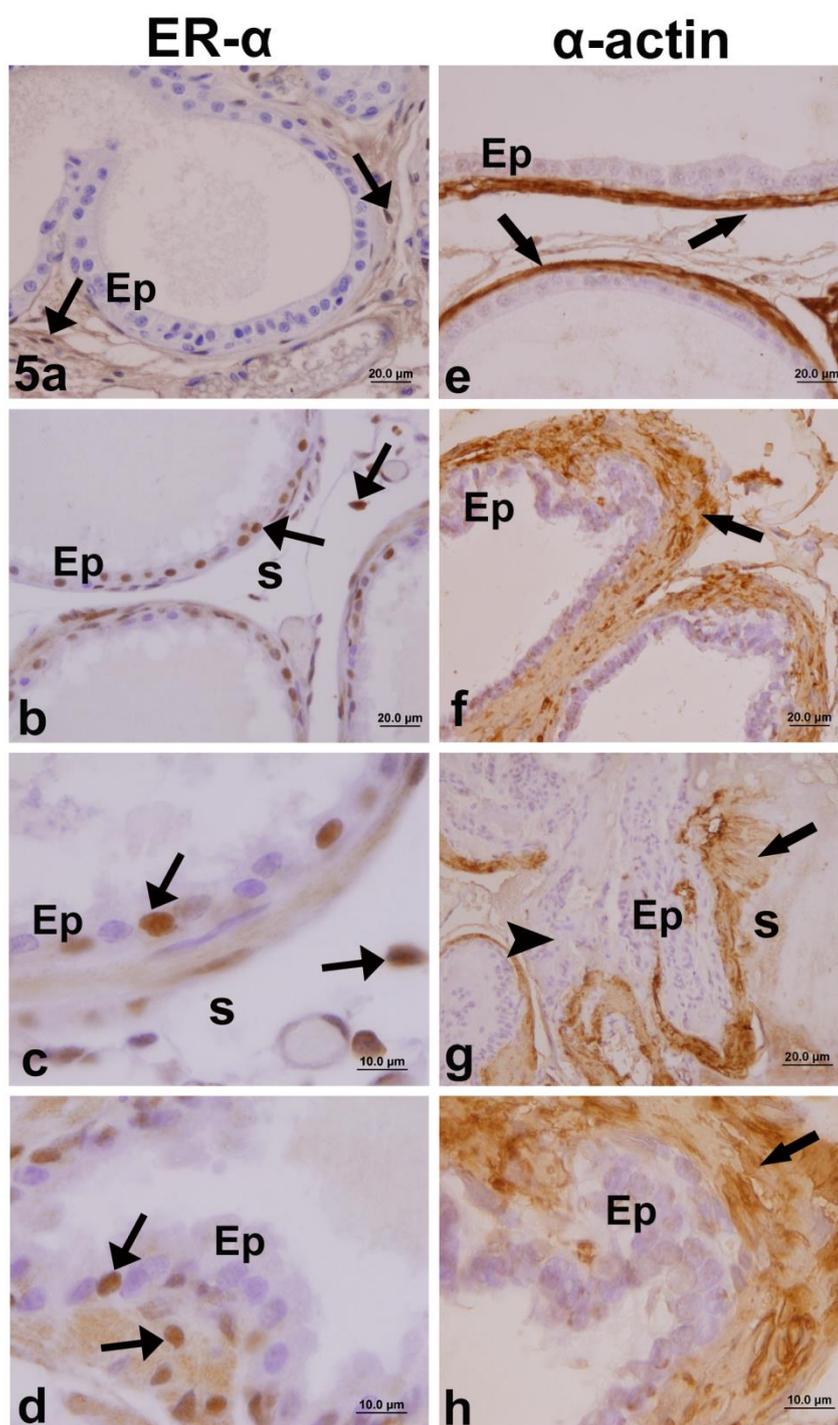
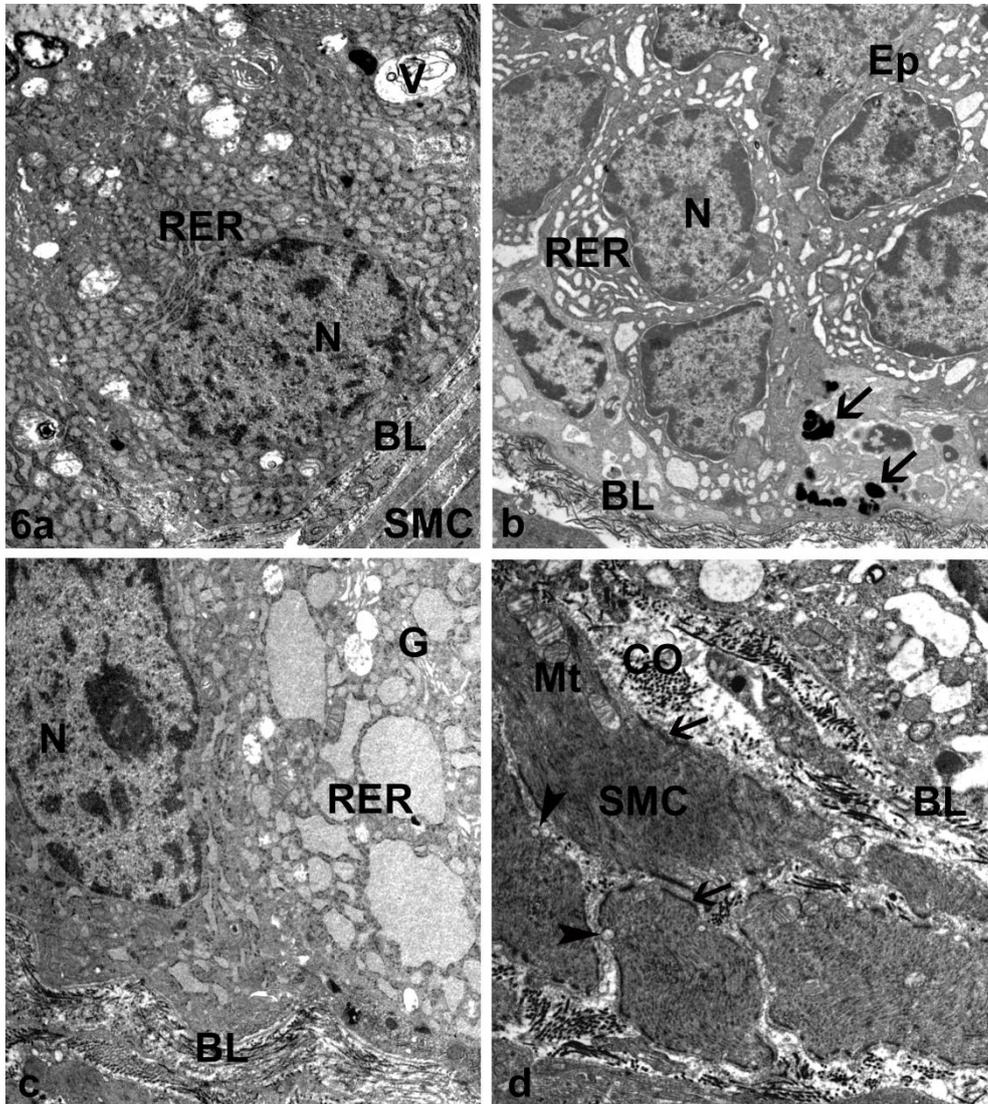
FIGURE 5.

FIGURE 6.

9. ANEXO 1: COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

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

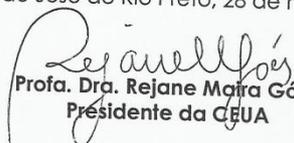
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização morfofisiológica da próstata de gerbilos adultos e senis expostos ao etinilestradiol no período neonatal**" (protocolo nº. 061/2012 - CEUA), sob responsabilidade do Professora Doutora Patricia Simone Leite Vilamajor, 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

UNESP/IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEUA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Morphophysiological characterization of the adults and senile gerbils prostate exposed to ethinylestradiol at neonatal period**" (protocol nº. 061/2012 - CEUA), on Patricia Simone Leite Vilamajor responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on march, 28th, 2012.

São José do Rio Preto, 28 de março de 2012.


Prof. Dra. Rejane Maria Góes
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – STAEPE
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth
CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP - Brasil
Tel 17 221 2425 fax 17 221 2390 / 3221 2500
E-mail: bitonti@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br