



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Efeitos da exposição ao metilparabeno sobre a próstata de
gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*)**

JANAÍNA RIBEIRO COSTA

**GOIÂNIA-GO
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

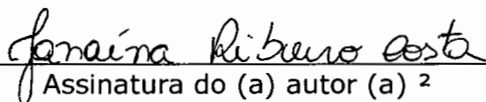
Nome completo do autor: JANAÍNA RIBEIRO COSTA

Título do trabalho: Efeitos da exposição ao metilparabeno sobre a próstata de gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 22 / 11 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

JANAÍNA RIBEIRO COSTA

**Efeitos da exposição ao metilparabeno sobre a próstata de
gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito

GOIÂNIA-GO

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

COSTA, JANAINA RIBEIRO

Efeitos da exposição ao metilparabeno sobre a próstata de gerbilos
adultos (*Meriones unguiculatus*) [manuscrito] / JANAINA RIBEIRO
COSTA. - 2016.
XI, 72 f.

Orientador: Prof. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos; co
orientador Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras.

1. paraben. 2. ventral prostate. 3. female prostate. 4. endocrine
deregulator. 5. alfa oestrogen receptor. I. Santos, Dra. Fernanda
Cristina Alcantara dos , orient. II. Título.

CDU 591.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 451

Aos vinte e cinco dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezesseis, às catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, Dra. Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito e Prof. Dr. Roger Luís Henschel Pobbe para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "Efeitos da exposição ao metil-parabeno sobre a próstata de gerbilos adultos (*Meriones unguiculatus*)", em nível de mestrado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Janaína Ribeiro Costa**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidenta, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que em cerca de 33 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 horas e 45 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após
lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três
vias de igual teor.

Assinatura manuscrita em azul de Fernanda Cristina Alcantara dos Santos.

Prof. Dr. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos

Presidenta da Banca

Universidade Federal de Goiás

Assinatura manuscrita em azul de Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito.

Dra. Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito

Universidade Federal de Goiás

Assinatura manuscrita em azul de Roger Luís Henschel Pobbe.

Prof. Dr. Roger Luís Henschel Pobbe

Universidade Federal de Goiás

Dedicatória

Este trabalho é feito na memória de Carlos Roberto Ribeiro Costa, meu pai, que sempre foi um exemplo de alegria de viver, de luta, de superação e me inspirou a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida. Dedico ainda a minha mãe Maria Levinda pelo seu apoio e confiança para meu o crescimento profissional.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia por me oferecer a oportunidade de ampliar meu conhecimento e de realizar esta dissertação de mestrado.

À minha orientadora, Prof. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, pela sua confiança ao ter acreditado em mim, tornando possível a minha realização profissional. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade.

Aos professores Manoel Francisco Biancardi, Mara Rúbia Marques e Pedro Vale de Azevedo Brito pela atenção, pela receptividade e por transmitir seu conhecimento e sabedoria.

A toda a minha família pelo carinho, paciência e incentivo. Em especial à minha mãe Maria Levinda, aos meus irmãos João Alberto e Leonardo, à minha cunhada Karina Nunes que sempre estiveram comigo em todas as situações.

Ao meu primo Prof. Dr. Ary Henrique Oliveira por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência, e por ser também um exemplo de profissional a ser seguido. Seu incentivo foi fundamental para a realização deste trabalho.

A minha discipuladora, pastora e amiga Raquel Medeiros pela amizade e conselhos que me fortaleceram durante esta caminhada.

Aos meus amigos do Laboratório de Histofisiologia Mônica, Rodrigo, Daniel Andrés, Clainy, Liana, Naiara Cristina e Eliana pela amizade, companheirismo e apoio durante toda a pesquisa.

À CAPES pelo incentivo através da bolsa e auxílios à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE FIGURA.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Próstata masculina.....	1
1.2 Próstata feminina	2
1.3 Função dos andrógenos e estrógenos na próstata	4
1.4 Desreguladores endócrinos	5
1.5 Características dos parabenos.....	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 Geral	10
2.2 Específicos.....	10
3. METODOLOGIA.....	11
3.1 Animais	11
3.2 Delineamento experimental e biometria.....	11
3.3 Microscopia de luz	12
3.4 Estereologia	12
3.5 Imunofluorescência	12
3.6 Análise imunohistoquímica	13
3.7 Quantificação de células AR, ER α e PCNA positivas	14
3.8 Estatística	14
4. ARTIGO.....	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A4	Androstenediona
AR	Receptor de andrógeno
DE	Ducto ejaculatório
EDCs	Desreguladores endócrinos
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
ER	Receptor de estrógeno
ERα	Receptor de estrógeno alfa
ERβ	Receptor de estrógeno beta
HE	Hematoxilina e eosina
IDA	Ingestão diária aceitável
MGMT	O6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno de proliferação nuclear
PFA	Paraformaldeído
PHBA	Ácido parahidroxibenzoico
PSA	Antígeno específico da próstata
PAP	Fosfatase ácida prostática
UR	Uretra

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Divisão anatômica da próstata masculina.....	2
Figura 2. Estrutura química dos parabenos.....	7

RESUMO

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor dos mamíferos e tem importante função na reprodução. O tecido prostático é regulado por hormônios esteroides, sendo que sua homeostase depende de uma interação hormonal equilibrada. A exposição a químicos ambientais que apresentam atividade hormonal pode ocasionar distúrbios na próstata, aumentando a probabilidade dessa glândula desenvolver lesões. Compostos químicos hormonalmente ativos estão presentes em grande quantidade e de diversas formas no meio ambiente. Dentre estas substâncias estão os parabenos, uma classe de conservantes com ação antimicrobiana e antifúngica amplamente utilizada na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Os parabenos são conhecidos por perturbar o sistema reprodutivo e agir como desreguladores endócrinos que mimetizam os efeitos fisiológicos dos estrógenos. Até o momento, não está claro se os parabenos podem alterar a morfofisiologia da próstata. Portanto, é relevante entender se o metilparabeno pode predispor a próstata a desenvolver lesões na idade adulta. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a próstata de gerbilos adultos expostos ao metilparabeno. Para isto, machos e fêmeas com 90 dias de idade receberam, por gavagem, 500 mg/kg de metilparabeno diluídos em hidroxietil-celulose a 1%. Estes animais foram divididos em três subgrupos que foram sacrificados após 3, 7 e 21 dias de tratamento. As próstatas foram coletadas para análises estruturais, citoquímicas e imunohistoquímicas. Os resultados mostraram que a exposição ao metilparabeno diminuiu o peso dos testículos dos grupos 7 e 21 dias. Nas fêmeas houve aumento do peso do complexo prostático do grupo de 21 dias. Em ambos os sexos, a Reticulina de Gömöri mostrou um remodelamento do compartimento estromal com desorganização das fibras reticulares e aumento das fibras colágenas. Além disso, machos e fêmeas apresentaram alterações morfológicas importantes como focos de crescimento hiperplásico do epitélio secretor. Nas fêmeas observou-se a presença de neoplasia intraepitelial prostática, focos inflamatórios estromais, e aumento de células ER α -positivas. Houve um aumento do número de células AR-positivas, e aumento das taxas de proliferação celular em ambos os sexos. Em conjunto, estes dados indicam que o metilparabeno foi capaz de interferir com receptores androgênicos e estrogênicos, sugerindo que este químico pode ter

atividade estrogênica e antiandrogênica na próstata. Nos machos houve uma intensa imunomarcção para MGMT (O6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase) em todos os grupos tratados e nas fêmeas apenas no grupo 3P. A imunomarcção para MGMT na próstata masculina e feminina sugere que a exposição ao metilparabeno tornou a glândula mais suscetível a modificações epigenéticas. Os resultados obtidos com este estudo são relevantes, pois demonstram que o consumo crescente de parabenos pelas populações humanas pode estar relacionado com o surgimento de alterações morfofisiológicas da próstata.

Palavras-Chave: parabenos, próstata ventral, próstata feminina, desregulador endócrino, receptor de estrógeno alfa, receptor de andrógeno.

ABSTRACT

The prostate is an accessory gland of the mammalian reproductive system with important role in reproduction. The prostatic tissue is regulated by hormones with its homeostasis dependent on a balanced hormonal interaction. The exposure to environmental chemicals with hormonal activities can cause disorders in the prostate increasing the probability of this gland to develop major lesions. Hormonally active chemicals are present in the environment in substantial amounts and forms. Amongst them are the parabens, a class of preservatives with antifungal and antimicrobial activities commonly used in the cosmetic, pharmaceutical and food industry. They are known for affecting the reproductive system and act as endocrine disruptors that mimics the physiological effects of estrogens. Up their, it is unclear whether the exposure to parabens alters the prostate morphophysiology. Therefore, it is relevant to comprehend whether the methylparaben can lead to the development of lesions in the prostate in adult gerbils. Thus, the aim of this work was to evaluate the prostate of adult gerbils exposed to methylparaben. For this, males and females aging 90 days received, through gavage, 500 mg/kg of methylparaben diluted in 1% hydroxyethyl cellulose. These animals were divided into three subgroups that were euthanized after 3 (3P), 7 (7P) and 21 days of treatment (21P). The prostates were collected for structural, cytochemical and immunohistochemical analysis. The results demonstrated that the exposure to methylparaben reduced the body weight of males of 3P and 7P groups, and testis weight of 7P and 21P groups. In the females we observed an increase in the prostatic complex weight of the 21P group. In both sexes, Gömöri's reticulin staining showed a remodeling of the stromal compartment with reticular fibers disorganization and collagen fibers increase. Besides, males and females presented important morphological alterations as hyperplasic growth foci. In females, it was observed the presence of prostatic intraepithelial neoplasia, stromal inflammatory foci and an increase of ER α -positive cells. Immunohistochemical data showed an increase of AR-positive cells and in the proliferation rates for both genders. Altogether, these data demonstrate that methylparaben was capable to interfere in androgenic and estrogenic receptors, suggesting that this chemical might have estrogenic and anti-androgenic activity in the prostate. In males there was an intense immunostaining for MGMT in all treated groups whereas in females only in the 3P group. The immunostaining for MGMT in the prostate of males and females

suggests that the exposure to methylparaben made the gland more susceptible to epigenetic modifications. The results obtained with this study are alarming, as they indicate that the increasing consumption of parabens by urban population can be related with the arising of morphophysiological alterations in prostate.

Keywords: paraben, ventral prostate, female prostate, endocrine deregulator, alfa oestrogen receptor, androgenic receptor

1. INTRODUÇÃO

1.1 Próstata masculina

A próstata é uma glândula sexual acessória do sistema reprodutor, responsável pela secreção de nutrientes que proporcionam condições ideais de sobrevivência e viabilidade aos espermatozoides durante e após a ejaculação (Aumüller e Seitz, 1990). Esta glândula localiza-se na base da bexiga e ao redor da uretra (Risbridger e Taylor, 2006).

A glândula prostática é normalmente encontrada na maioria dos mamíferos, mas a sua morfologia varia entre as diferentes espécies (Price e Williams-Ashman, 1961). Anatomicamente, a próstata humana em adultos é compacta e dividida em regiões: zona periférica, central e de transição (Figura 1A). Os tecidos destas regiões são diferentes entre si e são susceptíveis a desordens prostáticas (Selman, 2011).

Em roedores (Figura 1B), a próstata é formada por quatro lobos distintos, designados como o lobo ventral, lateral, dorsal e o lobo anterior ou glândula coaguladora (Timms, 2008; Lee et al., 2011). Esses diferentes lobos tem funções fisiológicas e características histológicas exclusivas (Lee et al., 2011).

As próstatas de humanos e roedores são semelhantes ao nível celular, embora anatomicamente sejam diferentes. Histologicamente, a próstata consiste em numerosos alvéolos que são revestidos por um epitélio que varia de simples a pseudoestratificado, e que são envolvidos por um estroma fibromuscular (Risbridger e Taylor, 2006; Cordeiro et al., 2008).

O tecido epitelial é composto por células secretoras, basais e neuroendócrinas (Long et al., 2005; Prajapati et al., 2013). As células secretoras do compartimento epitelial sintetizam e secretam proteínas, incluindo o antígeno específico da próstata (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP), e os lançam no lúmen (McNeal, 1988). O estroma é constituído de células musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos (Takao e Tsujimura, 2008) que participam da manutenção e sustentação do tecido (Santos e Taboga, 2006).

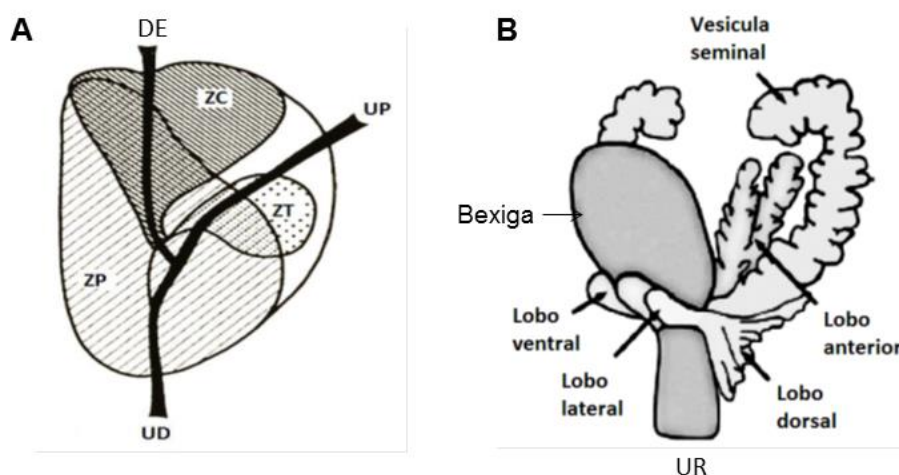


Figura 1. Divisão anatômica da próstata masculina. **(A)** Representação esquemática da próstata humana adulta. Uretra distal (UD), uretra proximal (UP), ducto ejaculatório (DE) e as três maiores zonas glandulares descritas por McNeal. Zona central (ZC), zona periférica (ZP) e zona de transição (ZT). Adaptado de Timms (2008). **(B)** Vista lateral da próstata de camundongo. Adaptado de Risbridger (2006).

A maior parte dos estudos experimentais está direcionada para o lobo ventral da próstata de gerbilos machos, devido sua semelhança histológica com a próstata humana e por desenvolver distúrbios prostáticos com o avanço da idade assim como os seres humanos (Vilamaior et al., 2000; Shappell et al., 2004). Além disso, a zona periférica e de transição da próstata humana são mais susceptíveis às patologias (Selman, 2011) e segundo Rochel e colaboradores (2007), o lobo ventral e dorsolateral do gerbilo da Mongólia apresenta semelhança mais próxima à zona periférica da próstata humana em relação ao volume dos compartimentos epiteliais e estromais, sugerindo assim relação entre essas zonas e o lobo ventral do gerbilo. Portanto, a próstata de gerbilos tem sido muito utilizada como modelo experimental por apresentar semelhança histológica, histoquímica e estrutural quando comparado a próstata humana.

1.2 Próstata feminina

A ocorrência da próstata feminina tem sido relatada em vários mamíferos, incluindo seres humanos (Zaviacic, 1999) e diversos roedores (Shehata, 1980; Santos et al., 2003; Custódio et al., 2004).

A descrição da próstata feminina ocorreu pela primeira vez em 1672, por Reinier de Graaf, que identificou um conjunto de glândulas localizada ao redor da uretra e que tinha semelhança com a próstata masculina (de Graaf, 1672). Um ginecologista americano, Alexander Skene, em 1880, identificou dois ductos parauretrais que se abrem em orifícios de ambos os lados da uretra, que desde então a próstata feminina ficou conhecida como “glândulas parauretrais de Skene” (Skene, 1880).

Este órgão foi considerado vestigial por muito tempo (Zaviačič e Ablin, 2000), mas alguns estudos demonstraram que a próstata feminina está relacionada com o ponto G, que quando estimulado promove a ejaculação feminina (Schubach, 2002; Zaviacic, 1999). Além disso, já foi relatado que a próstata feminina pode desenvolver doenças benignas e malignas de forma semelhante à próstata masculina (Custódio et al., 2010). Marcadores enzimáticos da glândula masculina também foram identificados na próstata feminina, como a fosfatase ácida prostática (PAP) e o antígeno específico da próstata (PSA) (Tepper et al., 1984).

A próstata feminina de gerbilos e mulheres apresenta localização parauretral e histologicamente tem os mesmos componentes da próstata masculina: alvéolos constituídos de células secretoras e basais, circundados por um estroma fibromuscular (Santos et al., 2003).

Portanto, a próstata de fêmeas de gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) apresenta homologia com a próstata feminina humana e com a próstata ventral de gerbilos machos (Taboga et al., 2001). Além disso, este roedor é um bom modelo experimental para estudos morfofisiológicos da próstata feminina, porque assim como os machos, gerbilos fêmeas senis desenvolvem espontaneamente distúrbios prostáticos (Maia et al., 2013). Devido a esta característica, o gerbilo tornou-se um excelente modelo para investigar as ações de hormônios, como por exemplo, dos estrógenos, que podem alterar a fisiologia prostática. Desde então, esforços têm sido direcionados aos estudos dessa glândula em machos e fêmeas, com principal enfoque para os estudos sobre indução hormonal e exposição a desreguladores endócrinos.

1.3 Função dos andrógenos e estrógenos na próstata

Os andrógenos são os principais esteroides sexuais masculinos (Heemers et al., 2006) e regulam o crescimento, a diferenciação e a morte programada de células na glândula prostática e em outros órgãos reprodutivos através de interação com o receptor androgênico (AR) (Banerjee et al., 2001). Os andrógenos também são importantes para manutenção da estrutura e função da próstata adulta (Trapman e Brinkmann, 1996). Além disso, estes hormônios são capazes de estimular o desenvolvimento e progressão de doenças relacionadas com o avanço da idade em homens, incluindo hiperplasia benigna prostática e câncer de próstata (Dehm e Tindall, 2007).

A testosterona é o andrógeno mais abundante no sangue, sendo sintetizado pelas células de Leydig nos testículos (Davison e Bell, 2006). Nas fêmeas, a testosterona é produzida pelos ovários, glândula suprarrenal e por conversão periférica (no fígado, no tecido adiposo, e pele) por precursores de andrógenos (Androstenediona e Dehidroepiandrosterona) (Walters et al., 2016). A testosterona pode ser convertida irreversivelmente em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase (Wilson, 2011) e também pode sofrer uma conversão em estrógenos pela enzima aromatase (Untergasser et al., 2005). Para exercer sua função, a testosterona e a DHT se ligam ao AR, que é um membro da família de receptores nucleares. A DHT tem maior afinidade de ligação com AR do que a testosterona, e a sua atividade biológica é mais efetiva do que a da testosterona (Deslypere et al., 1992).

No tecido prostático normal e na maioria das células do câncer de próstata, o AR é predominantemente citoplasmático. Após a ligação dos andrógenos aos seus receptores, ocorre uma mudança conformacional no AR, permitindo sua translocação nuclear (Black e Paschal, 2004). No núcleo, o complexo andrógeno-AR promove a transcrição de genes que contém elementos responsivos aos andrógenos.

Os andrógenos também podem atuar sobre a próstata feminina, estimulando seu crescimento e atividade secretora, sendo essenciais para regular sua morfofisiologia (Santos e Taboga, 2006; Biancardi et al., 2010). Além da próstata, tem-se demonstrado que os andrógenos atuam através do AR desempenhando um

papel importante na regulação de órgãos como útero, ovários e glândulas mamárias (Walters et al., 2016).

O mecanismo de ação dos andrógenos na próstata e em doenças prostáticas já está bem elucidada, no entanto, esta glândula também é sensível à ação dos estrógenos. Este hormônio é essencial para a homeostase do tecido prostático, e um desequilíbrio em seus níveis séricos pode levar a perturbação do crescimento glandular e surgimento de lesões prostáticas (Ellem e Risbridger, 2009). Em fêmeas, os estrógenos são produzidos pelos ovários e estimulam principalmente o desenvolvimento e crescimento do sistema reprodutor. Nos machos, o estrógeno é produzido pelo tecido adiposo, glândula suprarrenal, testículos e também pela próstata (Rickie et al., 2007).

A ação dos estrógenos é mediada por dois receptores: receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) (Risbridger et al., 2007). O $ER\alpha$ é expresso durante o desenvolvimento da glândula prostática até a puberdade, e a expressão de $ER\beta$ geralmente ocorre na glândula adulta (Omoto et al., 2005; McPherson et al., 2008). Machos e fêmeas de gerbilos adultos expressam principalmente $ER\alpha$ no estroma do tecido prostático e $ER\beta$ principalmente em células epiteliais (Maia et al., 2013). Uma ativação inadequada de $ER\alpha$ leva a proliferação, inflamação, e ao desenvolvimento de lesões pré-malignas, enquanto que a ativação de $ER\beta$ desencadeia efeitos antiproliferativos. Assim, os estrógenos são capazes de exercer efeitos benéficos ou adversos na próstata, por meio da ativação de seus receptores (Ellem e Risbridger, 2009).

Portanto, andrógenos e estrógenos desempenham um papel significativo na próstata e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal desta glândula, bem como para a manutenção da sua homeostase ao longo da vida adulta (McPherson et al., 2008).

1.4 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos são substâncias exógenas naturais ou sintéticas que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ou eliminação de hormônios endógenos que são essenciais para o equilíbrio homeostático,

reprodução, desenvolvimento e comportamento (Kavlock et al., 1996; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Os desreguladores endócrinos podem interferir com diversos mecanismos fisiológicos, tais como afinidade de ligação dos receptores hormonais, interação com enzimas que sintetizam ou metabolizam hormônios, alteração do eixo hipotalâmico-hipofisário ou, ainda, bloqueio da ação hormonal (Kavlock et al., 1996; Santamarta, 2001).

Por milênios o organismo humano sofreu a ação e adaptou-se aos desreguladores endócrinos naturais, como fitoestrógenos encontrados em vegetais, cereais, plantas e frutas. Geralmente, estes desreguladores não se acumulam no organismo e são excretados de forma natural. No entanto, isso não ocorre em produtos químicos sintéticos que mimetizam os hormônios endógenos, pois essas substâncias podem se acumular em tecidos, e passam a agir como se fossem hormônios do próprio organismo (Colborn, 2002).

Os estudos sobre desreguladores endócrinos iniciaram-se com a descoberta de que substâncias químicas ambientais teriam ações estrogênicas. Desde então, uma variedade de substâncias foram descritas por desregular a sinalização de estrógenos, como o bisfenol-A, etinilestradiol, parabenos e metais pesados. Embora os desreguladores endócrinos mais comuns apresentem efeitos estrogênicos, substâncias com efeitos anti-estrogênico e anti-androgênico já foram descritas (Cooke et al., 2010).

O aumento da incidência e prevalência de doenças associadas com desreguladores endócrinos químicos, tais como o câncer, diabetes, obesidade, síndrome metabólica e infertilidade tem sido relatada nos últimos 50 anos (Coster e Larebeke, 2012).

Como a próstata expressa receptores hormonais durante o desenvolvimento e na vida adulta, e é dependente da sinalização de andrógenos para seu funcionamento normal, os desreguladores endócrinos (EDCs) podem perturbar essa interação hormonal e proporcionar a etiologia e progressão de doenças prostáticas (Cooke et al., 2010).

1.5 Características dos parabenos

Os parabenos pertencem a uma família de conservantes com ação antimicrobiana e antifúngica amplamente utilizada desde 1930 na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (Witorsch e Thomas, 2010; Castelain e Castelain, 2012). Quimicamente são ésteres, cujo principal metabólito é o ácido parahidroxibenzoico (PHBA). Atualmente, várias formas de parabeno são empregadas na indústria, das quais metil-, etil-, propil-, butil-, isopropil-, isobutil- e benzilparabeno podem ser utilizados isoladamente ou associados (Figura 2) (Darbre e Harvey, 2008; Guo e Kannan, 2013).

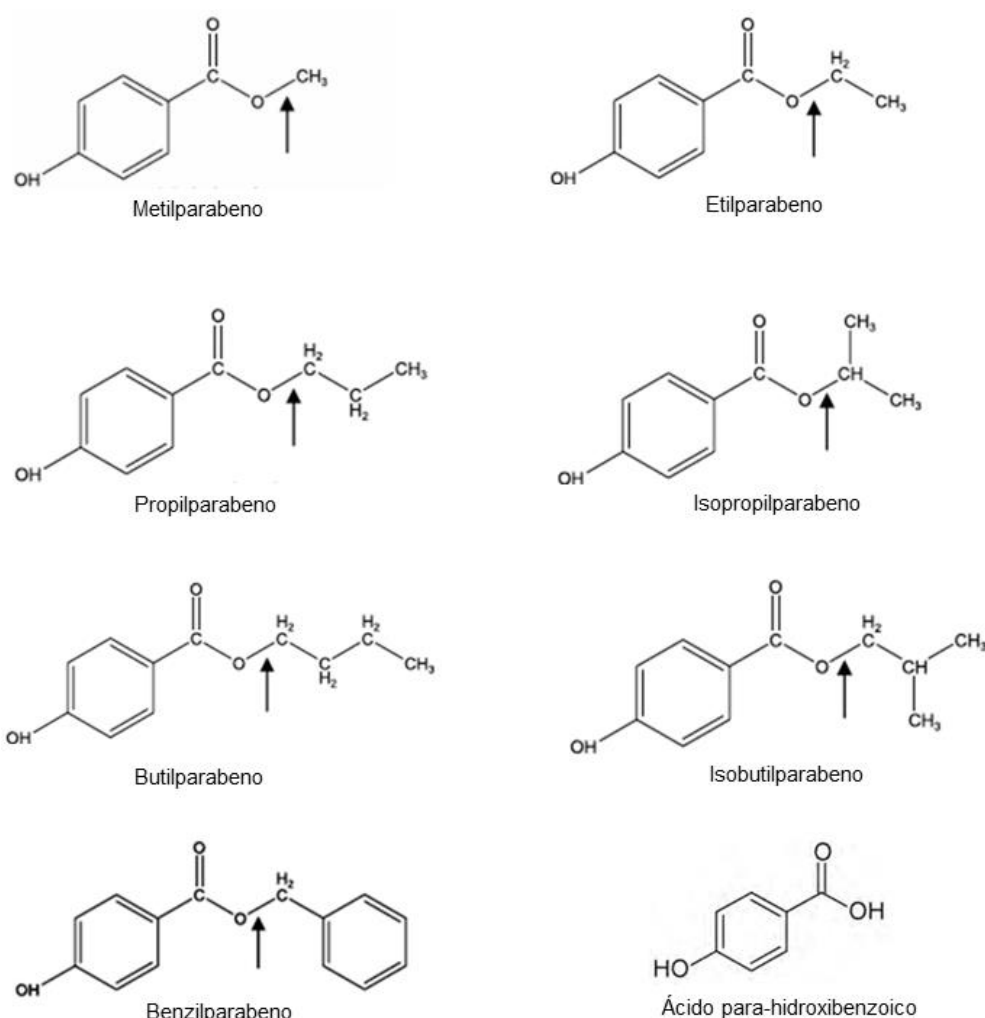


Figura 2. Estrutura química dos parabenos. A hidrólise do éster (seta) dá a ligação comum do metabólito ácido parahidroxibenzoico (PHBA) (adaptado de Darbre e Harvey, 2008).

Os parabenos são considerados bons conservantes devido ao fato de serem não irritantes, não sensibilizantes, de baixa toxicidade, baixo custo, solúveis em

meio aquoso, não apresentarem odor ou gosto perceptível e terem estabilidade em diferentes faixas de pH e de calor (Soni et al., 2001, 2002). As propriedades dos parabenos variam com o aumento do comprimento da cadeia do grupo éster, ou seja, quanto maior o número de carbono do grupo éster, maior será sua atividade antimicrobiana, embora sua solubilidade aquosa diminua. Assim, os ésteres de cadeia mais curta são mais utilizados devido à sua elevada solubilidade em meio aquoso (Soni et al., 2002). Contudo, os parabenos apresentam uma maior eficácia quando combinados (Mincea et al., 2009), sendo que a associação de metil e propil é a mais utilizada pelas indústrias (Ericksson et al., 2008).

O “*Scientific Committee on Consumer Safety*” (SCCS) da União Europeia recomenda o uso de parabenos nas concentrações máximas de 0,4% quando usados individualmente e 0,8% quando associados (SCCS, 2013). De acordo com a Comunidade Europeia a ingestão diária aceitável (IDA) de parabenos é de até 10mg/kg/dia (Oishi, 2004; SCCP, 2005), entretanto dados da literatura demonstram que o consumo diário de parabenos pode variar entre 1-466mg/kg/dia (Soni et al., 2002).

Os parabenos são absorvidos pelo organismo via ingestão, inalação ou contato dérmico (Ye et al., 2006; Janjua et al., 2008). Quando absorvidos por via oral, os parabenos são metabolizados a ácido parahidroxibenzoico (PHBA) por esterases presentes no intestino e fígado, e excretados pela urina (80-85%) dentro das primeiras 24 horas (Borbeg et al., 2010; Moos et al., 2014).

Apesar dos parabenos serem considerados bons conservantes e apresentarem uma rápida absorção e excreção pelo organismo, a preocupação com esses conservantes ocorreu a partir do estudo de Routledge e colaboradores (1998), que demonstrou a capacidade de ligação dos parabenos aos receptores de estrógenos. Nesse contexto, Routledge e colaboradores (1998) também mostraram que apesar dos parabenos terem afinidade de ligação pelos receptores de estrógenos, são menos potentes que o 17 β -estradiol. Desse modo, são denominados como “estrógenos fracos”, mas com potencial de agirem como desreguladores endócrinos (Sasseville et al., 2015).

Desde então, os parabenos e seus metabólitos têm sido considerados como desreguladores endócrinos químicos (EDCs), devido a sua capacidade em mimetizar os efeitos fisiológicos dos estrógenos em diversos modelos biológicos (Darbre e Harvey, 2008; Park et al., 2012). Em fêmeas, os parabenos tem

demonstrado atividade estrogênica em ensaios uterotróficos (Routledge et al., 1998) e têm sido apontados por aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama (Okubo et al., 2001; Darbre et al., 2004). Em roedores machos, a exposição oral ao butil e propilparabeno diminuiu a produção de esperma e a secreção de testosterona (Oishi, 2001; 2002). Por outro lado, estudos similares com ratos demonstraram a ausência de efeitos espermatotóxicos e hormonais do metil e etilparabeno (Oishi, 2004) butil e metilparabeno (Hoberman et al., 2008). Embora existam vários estudos sobre os efeitos dos parabenos sobre o sistema reprodutor, estes dados ainda são insuficientes e/ou contraditórios, especialmente com relação às glândulas acessórias ao sistema reprodutor.

Além da atividade estrogênica, pesquisas indicam que os parabenos tem afinidade pelo AR (Satoh et al., 2005), mas com ação antiandrogênica (Satoh et al., 2005; Chen et al., 2007; Ma et al., 2014). Então, os parabenos apresentam uma ação estrogênica e/ou antindrogênica, que pode levar a uma desregulação endócrina por mimetizar hormônios através da interação com seus receptores. Dessa forma, sabendo que a homeostase da próstata adulta depende de um controle hormonal preciso, é necessário conhecer os fatores que possam alterar a histofisiologia desta glândula. Portanto, a proposta deste trabalho é testar o potencial de interferência do metilparabeno na glândula prostática feminina e masculina de gerbilos adultos, uma vez que substâncias exógenas com atividade hormonal podem predispor a próstata a desenvolver lesões ao longo da vida.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da exposição oral ao metilparabeno sobre os compartimentos epiteliais e estromais da próstata de fêmeas e machos de gerbilos adultos.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos morfofisiológicos do metilparabeno em três diferentes tempos de exposição (3, 7 e 21 dias).
- Avaliar se a exposição ao metilparabeno interfere com os parâmetros biométricos de gerbilos adultos de ambos os sexos.
- Avaliar por meio de análises morfológicas, citoquímicas e estereológicas os efeitos da exposição ao metilparabeno sobre a histofisiologia prostática.
- Identificar os possíveis efeitos hormonais do metilparabeno sobre a próstata adulta de gerbilos, por meio da análise imunohistoquímica de receptores hormonais e de marcadores de proliferação celular.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Os animais foram fornecidos pela Universidade Estadual Paulista (UNESP; São José do Rio Preto - SP) e mantidos no Laboratório Histofisiologia da Universidade Federal de Goiás (UFG; Goiânia - GO) sob condições controladas de luz e temperatura. Todos os animais foram mantidos em caixas de polietileno e a água filtrada foi fornecida em garrafas de vidro. Os gerbilos foram alimentados com ração “*ad libitum*” (Labina-Purina®; composição: 23% de proteína, 4% de gordura, fibra de 5% e 12% de minerais). O manejo dos animais e os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes éticas da Universidade Federal de Goiás (UFG; protocolo CEUA nº 024/13), seguindo o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

3.2 Delineamento experimental e biometria

Sessenta e quatro gerbilos adultos (3 meses de idade) (*Meriones unguiculatus*, Gerbillinae: Muridae) foram utilizados neste estudo (32 machos e 32 fêmeas). Oito machos e oito fêmeas do grupo controle receberam doses orais diárias de hidroxietil-celulose a 1% (Sigma-Aldrich; 0,2 ml/animal) durante 21 dias. Vinte e quatro machos e vinte e quatro fêmeas foram distribuídos aleatoriamente em três grupos que receberam doses orais diárias de metilparabeno (methyl-4-hidroxibenzoato, Sigma-Aldrich; 500 mg/kg em 0,2 ml de hidroxietil-celulose a 1%) por 3 (3P), 7 (7P) e 21 dias (21P). A dose de metilparabeno utilizada neste trabalho representa um valor intermediário entre uma ampla gama de concentrações adotadas em estudos anteriores (Oishi, 2002; Zhang et al, 2014). Esta dose pode ser considerada adequada, uma vez que a dose padrão que não causa efeitos adversos (NOAEL) em estudos crônicos em ratos é de 1.000 mg/kg/dia (Oishi, 2004).

Todos os gerbilos foram eutanasiados com uma dose letal de anestesia (100 ul/100 g), que foi preparada com uma mistura (proporção de 1/1) de anestésico (Cetamin, Syntec) e relaxante muscular (xilazina, Vetbrands). Durante a dissecação,

foram obtidos os pesos corpóreo, testicular, ovariano e do complexo prostático (segmento uretral, lobo dorsal, dorsolateral e ventral da próstata de machos, e segmento uretral mais o tecido prostático das fêmeas).

3.3 Microscopia de luz

Os complexos prostáticos de todos os animais foram fixados por imersão em metacarn (proporções: metanol 60%, clorofórmio 30%, e ácido acético a 10%) durante três horas a 4° C, ou em paraformaldeído 4% (em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2) durante 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, embebidos em parafina (Histosec, Merck, Darmstadt, Alemanha), e seccionados a 5 µm no micrótomo Leica (Leica RM2155, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) ou reticulina de Gömöri. Os cortes histológicos foram analisados e digitalizados usando um microscópio óptico Zeiss Axioscope A1 (Zeiss, Alemanha).

3.4 Estereologia

As análises estereológicas foram realizadas no sistema de teste multipontos com 130 pontos e 10 linhas (Weibel, 1963). A frequência relativa de cada compartimento do tecido prostático (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) foi comparada, como descrito por Vilamaior et al. (2006). Foram obtidos 30 campos microscópicos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal; n = 5). Resumidamente, foram determinados os valores relativos pela contagem dos pontos coincidentes sobre cada compartimento em estudo e estes valores foram divididos pelo número total de pontos. A análise estereológica foi realizada utilizando o programa Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EUA).

3.5 Imunofluorescência

Cortes histológicos da próstata de machos e fêmeas foram submetidos ao teste de imunofluorescência para a detecção de α -actina de músculo liso

(monoclonal de rato IgG2a, SC-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), que foi incubada em uma diluição de 1:100 overnight. Na manhã seguinte, as secções foram incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados com fluorocromos (anti-mouse, SC-2010, IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) durante 2 horas à temperatura ambiente. O DAPI foi utilizado para identificar os núcleos celulares (Sanches et al., 2014). Os cortes histológicos foram analisados com um microscópio de fluorescência Zeiss Imager M2 (Zeiss, Alemanha) acoplado ao AxioVision (Zeiss, Alemanha) de software.

3.6 Análise imunohistoquímica

Cortes da próstata masculina e feminina foram submetidos à imunohistoquímica para detectar o receptor de andrógeno (AR), o receptor de estrógeno alfa (ER α), o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) (n = 3 animais/grupo). Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados através de uma série decrescente de etanol. A recuperação de antígenos foi realizada em tampão citrato (pH 6,0). Para a detecção de anticorpos primários, foi utilizada o Biosystems Novolink Sistema de Detecção de polímero Leica (RE7150-K, Reino Unido). A atividade da peroxidase endógena foi neutralizada com Novocastra Peroxidase Block, e depois, Novocastra Protein Block foi usada para reduzir a ligação não específica do anticorpo primário e do polímero. Os anticorpos primários reativos com o receptor de andrógeno (AR - rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), receptor de estrógeno alfa (ER α - rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - mouse monoclonal IgG2a, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT - mouse monoclonal, clone E-1, SC-166528, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) foram utilizados a uma diluição de 1: 100 overnight a 4° C. No dia seguinte, Novocastra Post Primary Polymer foi utilizado como anticorpo secundário. Os cortes foram corados com DAB Chromogen e DAB Substrate Buffer (numa proporção de 1:20), e, finalmente, contrastados com hematoxilina. Os cortes histológicos foram analisados utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioscope A1 (Zeiss, Alemanha).

3.7 Quantificação de células AR, ER α e PCNA positivas

Para a quantificação de células AR, ER α e PCNA positivas foram capturadas 30 imagens (n = 3 animais/grupo; aumento de 400x) para cada grupo experimental. Em cada campo, o número total de células positivas epiteliais e estromais foram obtidos como frequência relativa (%) em relação ao número total de células. Nesta análise foram quantificadas entre células positivas e negativas 35.000 células para AR, 4.200 células para ER α e 37.000 células para PCNA. Todas essas análises foram realizadas utilizando o sistema de análise de imagem previamente descrito.

3.8 Estatística

Os testes de hipóteses utilizados para determinar a significância estatística foram o teste de Kruskal-Wallis para distribuições não paramétricas e a ANOVA para distribuições paramétricas. Além disso, a determinação das diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais foi realizada por meio do teste de Dunn para distribuições não-paramétricas e o teste de Tukey para as distribuições paramétricas. Os dados foram analisados utilizando Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). O nível de significância foi fixado em 5% ($p \leq 0,05$). Os valores foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

4. ARTIGO

Endocrine-disrupting effects of methylparaben on the adult gerbil prostate

O referido manu escrito foi submetido ao periódico "Environmental Toxicology"

Endocrine-disrupting effects of methylparaben on the adult gerbil prostate

Running head: Endocrine-disrupting effects of methylparaben on the prostate

Janaína R. Costa¹, Mônica S. Campos², Rodrigo F. Lima¹, Liana S. Gomes¹, Mara R. Marques¹, Sebastião R. Taboga², Manoel F. Biancardi¹, Pedro V. A. Brito¹, Fernanda C. A. Santos¹

¹Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Laboratory of Histophysiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.

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

Corresponding author:

Dr. Fernanda C. A. Santos: Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Laboratory of Histophysiology, Federal University of Goiás, Campus II Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.

E-mail address: fernanda_alcantara@ufg.br, phone: +55 62 3521-1765

Abstract

Parabens are xenoestrogens widely employed in cosmetics, foodstuffs, and pharmaceutical products. These chemicals are known to disrupt hormone-dependent organs, due to their binding affinity for hormonal receptors. Although recent studies have evaluated the endocrine-disrupting potential of parabens in several reproductive organs, few have investigated the effects of these chemicals in the prostate. The aim of this work was to evaluate the effects of oral exposure to methylparaben (500 mg/kg/day) for 3, 7, and 21 days on male and female adult gerbil prostate. For this purpose, we employed biometrical, morphological, and immunohistochemical analyses. The results showed that methylparaben caused morphological changes in gerbil prostates in all experimental groups. Male and female prostates displayed similar alterations such as epithelial hyperplasia, increased cell proliferation, and a higher frequency of AR-positive cells. However, the female prostate showed additional changes such as stromal inflammatory infiltration, intraepithelial neoplasia foci, and an increase in AR-positive frequency. Altogether, these data show that methylparaben was responsible for disrupting estrogenic and androgenic receptors, suggesting that parabens may have estrogenic and antiandrogenic effects in the prostate.

Key words: parabens, estrogen agonist, antiandrogens, female prostate, androgen receptor

Introduction

Parabens are p-hydroxybenzoic alkyl esters included in a family of preservatives with anti-microbial activity. They are widely employed since 1920 in cosmetic, pharmaceutical, and food industry (Błędzka et al., 2014). The anti-microbial strength of different parabens (benzyl-, butyl-, isobutyl-, ethyl-, methyl-, propyl-, isopropylparaben) vary according the alkyl chain length, so that higher the chain length, higher the liposolubility and antimicrobial activity (Darbre and Harvey, 2008; Guo and Kannan, 2013).

Parabens are absorbed by ingestion, inhalation, or dermal contact (Yet al., 2006; Janjua et al., 2008). When taken up orally, parabens are metabolized to parahydroxybenzoic acid (PHBA) for esterases presented in intestine and liver, and excreted in urine (80-85%) in the first 24 hours (Borbeg et al., 2011 Moos et al., 2015).

Parabens and its metabolites are considered endocrine-disrupting chemicals (EDCs), due to their capacity to mimic estrogenic physiological effects in several biological models (Darbre and Harvey, 2008; Park et al., 2012). In females, parabens display an estrogenic activity in uterotrophic assays (Routledge et al., 1998), and also increased the susceptibility to breast cancer development (Okubo et al., 2001; Darbre et al., 2004). In male rodents, oral butyl- and propylparaben exposure decreases testosterone and sperm production (Oishi, 2001; 2002). However, similar studies demonstrate a lack of spermatotoxic and hormonal effects of butyl-, ethyl- and methylparaben in the rats (Oishi, 2004; Hoberman et al., 2008). Although the effects of parabens on reproductive system are widely studied, these data are still

insufficient and/or contradictory, especially regarding the reproductive accessory glands.

The prostate is a sexual accessory gland, responsible for the production of essential nutrients for viability and survival of the sperm cells (Aumüller and Seitz, 1990). This gland, which was classically described as a male-exclusive organ, was also found in female rodents and humans (Zaviacic and Ablin, 2000; Santos and Taboga, 2006; Rodríguez–Castelán et al., 2016). The prostate may be disrupted by EDCs (Prins, 2008), and studies with gerbils have demonstrated the injurious effects that environmental chemicals have upon development, and maintenance of this gland throughout life (Lima et al., 2015; Rodriguez et al., 2015; Perez et al., 2016). However, the effects of parabens in the prostate gland are unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of oral methylparaben exposure on the male and female adult gerbil prostate.

Material and methods

Animals

The animals were provided by the São Paulo State University (UNESP; São José do Rio Preto – SP) and maintained in the Histophysiology Laboratory of the Federal University of Goiás (UFG; Goiânia – GO) under controlled conditions of light and temperature. All animals were housed in new polyethylene cages and filtered water was provided from glass bottles. Gerbils were fed with rodent food *ad libitum* (Labina-Purina®; composition: 23% protein, 4% fat, 5% fiber and 12% minerals). Animal handling and experiments were performed according to the ethical guidelines

of the Federal University of Goiás (UFG; Ethical committee number 024/13 CEUA), following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Experimental design

Sixty-four adult gerbils aging three-months-old (*Meriones unguiculatus*, Gerbillinae: Muridae) were employed in this study (32 males and 32 females). Eight control males and eight control females received daily oral doses of 1% hydroxyethyl-cellulose (Sigma-Aldrich; 0,2 ml/animal) for 21 days. Twenty-four males and 24 females were randomly distributed in three groups that received daily oral doses of methylparaben (methyl-4-hydroxybenzoate, Sigma-Aldrich; 500 mg/kg in 0,2 ml of 1% hydroxyethyl-cellulose) for 3 (3P), 7 (7P) and 21 days (21P). Methylparaben dose employed in this work represents an intermediary value between a wide range of concentrations adopted in previous studies (Oishi, 2002; Zhang et al., 2014). This dose may be regarded as suitable, since the no-observed-effect level (NOAEL) from chronic studies in rats is 1,000 mg/kg/day (Oishi, 2004).

After methylparaben exposure, all gerbils were euthanized with a lethal dosage of anesthesia (100µl/100g), which was prepared with a mixture (proportion of 1/1) of anesthetic (Cetamin, Syntec) and muscle relaxant (Xylazine, Vetbrands). The body, ovary, testis and prostatic complex (urethral segment, ventral, dorsolateral, and dorsal prostate lobes in males, and urethral segment plus prostatic tissue in females) were weighed.

Light Microscopy

The prostate complex of all animals were fixed by immersion in methacarn (proportions: methanol 60%, chloroform 30%, and acetic acid 10%) for three hours at

4°C, or 4% paraformaldehyde (buffered in 0.1 M phosphate, pH 7.2) for 24 hours. After fixation, the tissues were dehydrated through an ethanol series, embedded in paraffin (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany), and sectioned at 5 µm on a Leica microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). The sections were stained by hematoxylin-eosin (HE) or Gömöri's reticulin. The specimens were analyzed and digitized using a Zeiss Axioscope A1 light microscope (Zeiss, Germany).

Stereology

The stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 130 points and 10 test lines (Weibel, 1978). The relative frequency of each component of the prostatic tissue (epithelium, lumen, non-muscle stroma and muscle stroma) was compared, as described by Vilamaior et al. (2006). 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).

Immunofluorescence

Male and female prostate sections were subjected to immunofluorescence for the detection of smooth muscle α -actin (mouse monoclonal IgG2a, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), which was incubated at a dilution of 1:100 overnight. In the next morning, the sections were incubated with fluorochrome-conjugated specific secondary antibodies (anti-mouse, sc-2010, IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 2 hours at room temperature. DAPI was employed to identify the cell nuclei (Sanches et al., 2014). The histological sections were

analyzed with a Zeiss Imager M2 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) coupled to the AxioVision (Zeiss, Germany) software.

Immunohistochemistry

Male and female prostate sections were subjected to immunohistochemistry to detect androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER α), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) (n = 3 animals/group). The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a decreasing alcohol series. Antigen retrieval was performed in a citrate buffer (pH 6.0). For detection of primary antibodies, the Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System (RE7150-K, United Kingdom) kit was used. Endogenous peroxidase activity was neutralized with Novocastra Peroxidase Block, and afterwards Novocastra Protein Block was used to reduce non-specific binding of the primary antibody and polymer. Primary antibodies reactive to androgen receptor (AR - rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), estrogen receptor alpha (ER α - rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology), proliferating cell nuclear antigen (PCNA - mouse monoclonal IgG2a, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and O(6)-Methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT - mouse monoclonal, clone E-1, SC-166528, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were employed at a dilution of 1:100 overnight at 4°C. On the next day, Novocastra Post Primary and Polymer were used as secondary antibodies. The sections were stained with DAB Chromogen and DAB Substrate Buffer (in a proportion of 1:20), and finally counterstained with hematoxylin. The histological sections were analyzed using a Zeiss Axioscope A1 light microscope (Zeiss, Germany).

AR, ER α and PCNA quantification

For AR, ER α , and PCNA quantification, 30 microscopic fields (n = 3 animals/group; magnification of 400x) were used for each experimental group. In each field, the total number of positive epithelial and stromal cells was obtained as a relative frequency (%) in relation to the total number of cells. In the AR quantification, including positive and negative cells, we counted 35,000 cells; for ER α quantification we counted 4,200 cells; and, in PCNA quantification, we counted 37,000 cells. All these analyses were performed using the image analysis system previously described.

Statistical analyses

The hypothesis tests employed to determine statistical significance were the Kruskal-Wallis test for non-parametric distributions and the ANOVA for parametric distributions. Further determination of the significant statistical differences between experimental groups was done using Dunn's test for non-parametric distributions and the Tukey's test for parametric distributions. The data were analyzed using Statistica 7.0 (StatSoft, 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 the mean (SEM).

Results

Biometry

The biometrical analysis of male gerbils showed that methylparaben exposure did not change body and prostate weight. However, we observed a significant decrease of testis weight in the 7P and 21P groups (Table 1).

We did not find alterations of the body and ovary weight in female gerbils. However, we could observe a significant increase of the prostatic weight and relative prostatic weight in 21P females (Table 1).

Morphology and stereology

All male and female groups exposed to methylparaben showed prostatic morphological alterations.

In males, the morphological alterations of the ventral prostate were similar for all times of exposure to methylparaben (3P, 7P and 21P; Fig. 1a-d). These changes included a significant increase of the epithelium and muscle stroma, and a decrease of the non-muscle stroma (Table 1). Hyperplastic epithelial areas were found for all treatment times (Fig. 1b-d). In prostatic stroma, we observed a remodeling of type I and III collagen fibers (Fig. 2a-d), as well as an increase and a rearrangement of the smooth muscle cells, especially in areas surrounding hyperplastic epithelial growth (Fig. 3a-d).

Morphological changes of the gerbil prostatic gland were more severe in females (Fig. 1e-h). In females, all experimental groups exposed to methylparaben showed a significant increase of the epithelial and muscle compartments, and a reduction of the luminal and stromal areas (Table 1). 3P, 7P, and 21P groups showed stromal inflammatory foci, epithelial hyperplasia, and pseudocribiform intraepithelial neoplasia (Fig. 1f-h). However, hyperplastic and neoplastic foci were apparently more frequent in 7P and 21P groups (Fig. 1g-h).

Although we observed a decrease in the non-muscle stroma of the females, this compartment showed a higher increase of the type I and type III collagen fibers (Fig. 2e-h). Moreover, we observed an intense rearrangement of the smooth muscle

cells layer surrounding the hyperplastic alveoli (Fig. 3e-h). These alveoli had regions with lack of smooth muscle layer.

Hormonal receptors and cellular proliferation status

AR-positive and PCNA-positive cells were observed in the epithelium and stroma of the ventral prostate in males of all experimental groups (Fig. 4a-d and 4e-h). AR analysis and quantification demonstrated that the prostates of 3P, 7P, and 21P had an increase of the immunostaining either for the epithelial or stromal cells (Fig. 4a-d; Table 2). Immunostaining for PCNA in males showed no change for the stromal compartment, whereas the epithelial compartment was more proliferative only for 3P and 7P groups (Fig. 4e-h; Table 2).

Regarding the females, we obtained epithelial and stromal positive staining for AR and PCNA, and stromal positive staining for ER α (Fig. 5).

Females exposed to methylparaben showed an increase of the AR-positive epithelial and stromal cells (Fig. 5a-d; Table 3). ER α -positive stromal cells were significantly more frequent in all experimental groups exposed to methylparaben. However, a peak of immunostaining was observed in 3P group, followed by a progressive immunostaining decreasing in 7P and 21P (Fig. 5e-h; Table 3). Moreover, the quantitative analysis of PCNA showed an increase of the epithelial cell proliferation index for 3P, 7P, and 21P groups, besides an increase of the stromal proliferation in 3P and 7P groups (Fig. 5i-l; Table 3).

Additionally, when comparing male and female groups, we observed that although AR immunostaining were more frequent in males, the epithelial proliferation index was more elevated in females of the corresponding groups (Table 2 and 3).

O(6)-Methylguanine-DNA-methyltransferase

Males and females showed MGMT immunostaining in cytoplasm of the smooth muscle cells of the prostate (Fig. 6). However, in control animals (C), the female showed a more intense immunostaining for MGMT than males (Fig. 6a, e).

Males of methylparaben-exposed groups (3P, 7P, and 21P) showed a more intense immunostaining for MGMT when compared with control males (Fig. 6a-d). However, 3P females showed similar MGMT immunostaining when compared with control group, and a decreased status of this immunomarking for 7P and 21P groups (Fig. 6e-h).

Discussion

This study demonstrated that methylparaben oral exposure for 3, 7, and 21 days disrupts the morphophysiology of male and female adult gerbil prostate. Male and female prostates showed tissue disorders, changes of the estrogenic and androgenic receptors immunostaining, and an increase of the cell proliferation. We did not observe any time-dependent relation for the action of this chemical, hence the morphophysiological alterations occurred yearly in 3P groups and keep constant for 7P and 21P groups.

Although the methylparaben effects were similar in both male and female, some important differences were found for morphological and biometrical parameters employed in this study. Males did not show body and prostatic weight changes, but they had a significant decrease of the testes weight. On the other hand, females did not show body and ovarian weight variations, but they had a significant increase of the prostatic weight.

Male rats that received oral dosages of butylparaben (61.0 - 1669.0 mg/kg/day) or propylparaben (125.0 – 1290.0 mg/kg/day) for eight weeks did not show prostate and testes weight changes, but they had daily reduction of sperm and testosterone production (Oishi, 2001; 2002). In opposition, no systemic or reproductive effect was observed in rats exposed to methyl and ethylparaben under the same experimental conditions (Oishi, 2004). These differences found in Oishi studies seem to be related to differences in estrogenic potential reported for each paraben type, because the level of estrogenic activity is increased in proportion to alkyl chain length (Routledge et al., 1998). Although our study did not evaluated spermatotoxic parameters, the results demonstrated that methylparaben (smallest alkyl chain length among all parabens) has disrupting activities upon the gonads, hence it caused a significant reduction of testicular weight.

Similarly, Vo and co-workers (2010) demonstrated that young female rats exposed to different types and doses of parabens (62.5, 250 and 1,000 mg/kg/day of methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl- and isobutylparaben) did not present body and ovarian weight changes, except by the groups exposed to 1,000 mg/kg/day of methyl- and isopropylparaben, which showed a decrease in ovarian weight. In our study, the methylparaben dosage gave to gerbil females was not sufficient to change ovarian weight, but it increased the prostatic complex weight.

Prostatic morphological changes such as epithelial hyperplasia and stromal remodeling were frequent either in male or female of gerbils. However, females showed additional types of tissue disorders such as intraepithelial neoplasia, and stromal inflammatory foci. This type of tissue injuries was also found in the prostate of gerbils exposed to EDCs and to other forms of hormonal manipulation (Santos et al., 2008; Campos et al., 2015; Colleta et al., 2015; Biancardi et al., 2016; Perez et

al., 2016). Epithelial hyperplastic growth, neoplasia, and inflammation are typical events stimulated by chemicals with estrogenic action (Prins et al., 2001; Risbridger et al., 2007). Thus, the morphological data obtained here indicate that methylparaben acts as an estrogen agonist in gerbil prostate.

Parabens are known by its weak estrogenic activity in animal tissue, through the activation of alpha and beta estrogenic receptor (Routledge et al., 1998; Delfosse et al., 2015). In this context, parabens act as EDCs due to their ability in regulating genic expression and proliferation in estrogen-sensitive cells (Darbre and Harvey, 2008). In addition, studies showed that parabens interfere in the estrogen biosynthesis, by inhibiting the sulfotransferases (SULTs) enzymes, leading to higher levels of free oestradiol (Prusakiewicz et al., 2006; Boberg et al., 2011). In this study, we did not succeed in obtaining the immunostaining for ER α in male prostate, but the female results demonstrated that methylparaben exposure caused an increase up to 124% in the ER α immunostaining in female prostate. Thus, we believe that methylparaben increased estrogenic activity in prostate due to: (1) its potential for binding with ER α , and/or (2) for exerting indirect effects through the increase of free estrogen biosynthesis.

Besides an expressive increase of ER α in females, we also observed a significant increase of AR-positive cells in both epithelial and stroma of male and female prostate for all experimental groups. In males, the higher AR-positive cells frequency could not be correlated with an increased cell proliferation, hence stromal cells did not change the proliferative status, and the epithelial cells showed higher rates only for 3P and 7P groups. In females, although the AR immunostaining was kept equally higher for all treatment times, there was a proliferation peak in 3P and 7P groups, followed by a decrease in 21P. AR binding to androgens stimulates the

growth and physiology of androgen-dependent organs (Debes and Tindall, 2002). In this study, the higher AR activation was not directly related with cell proliferation increase and enhancement of the prostate secretory activity of the prostate. Recent studies have demonstrated that parabens can bind to AR, resulting in antiandrogenic effects (Chen et al., 2007; Boberg et al., 2011; Ma et al., 2014). Thus, we suggest that morphophysiological changes found in gerbil prostate result from the estrogenic and antiandrogenic effects of methylparaben.

Finally, this study showed that the male prostate exposed to methylparaben had a more intense immunostaining for MGMT than in females. MGMT enzyme has an important role in DNA repair, catalyzing the transfer of O(6)-methylguanine from DNA for an own cysteine residue (von Deimling et al., 2011). Thus, high MGMT immunostaining suggests tissue areas with higher DNA methylation. On the other hand, methyltransferases depletion results in the maintenance of methylation sites, which are potentially mutagenic (Gonçalves et al., 2013). Prostatic epigenetic changes induced by parabens were not reported for the scientific literature. However, adult male rats exposed to butylparaben showed hypermethylation in spermatozoa DNA (Park et al., 2012). In this study, female with hyperplastic and neoplastic alveoli showed weak MGMT immunostaining, suggesting that a decreased DNA repair activity in the methylparaben exposed female may be related with a higher frequency of prostatic disorders in this gender.

In conclusion, this work demonstrated that the exposure to a moderate methylparaben dosage for 3, 7, and 21 days caused morphophysiological changes in gerbil prostate. The methylparaben caused estrogenic effects upon gerbil prostate such as hyperplastic growth, neoplasia, inflammatory infiltrated, and an increase of the ER α immunostaining, especially in females. Moreover, this chemical lead to a

higher AR immunostaining, although we did not observe typical androgenic effects. These data suggest that parabens are potential EDCs for the prostate gland, acting either as estrogenic agonist or androgenic antagonist.

These results are relevant, because they raise an important issue related to growing paraben consumption by urban human population. Methylparaben is considered to be an “inoffensive” compound because it displays the lowest alkyl chain length, low permeability through skin, and the lowest degree of estrogenic activity among all other parabens. However, most part of cosmetics, food, and pharmaceutical products contain mixtures of parabens and others EDC (bisphenol-A, phthalates, etc.), which may amplify the hazards of these products with regard to human health.

Acknowledgements

We are very grateful to Luiz Roberto Falleiros Júnior as well as other researchers of the Laboratory of Microscopy and Microanalysis for their technical assistance. This paper was supported by a grant from the Brazilian agency CNPq (Brazilian National Research and Development Council, Procs. Nr. 475148/2012-6) and FAPEG (Goiás Research Foundation, Procs. Nr. 05/2012).

References

- Aumüller, G., Seitz, J., 1990. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int. Rev. Cytol.* 121, 127-231.
- Biancardi, M.F., Perez, A.P., Caires, C.R., Falleiros, L.R., Góes, R.M., Vilamaior, P.S., Freitas, D.R., Santos, F.C., Taboga, S.R., 2016. Prenatal and pubertal

testosterone exposure imprint permanent modifications in the prostate that predispose to the development of lesions in old Mongolian gerbils. *Asian J. Androl.* Epub ahead of print.

Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W., 2014. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* 67, 27-42.

Boberg, J., Christiansen, S., Axelstad, M., Kledal, T.S., Vinggaard, A.M., Dalgaard, M., Nellemann, C., Hass, U., 2011. Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reprod. Toxicol.* 31(2), 200-209.

Campos, M. S., Galvão, A. L., Rodríguez, D. A., Biancardi, M. F., Marques, M. R., Vilamaior, P. S., Santos, F. C., Taboga, S.R., 2015. Prepubertal exposure to bisphenol-A induces ER α upregulation and hyperplasia in adult gerbil female prostate. *Int. J. Exp. Pathol.* 96(3), 188-195.

Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221 (3), 278-284.

Colleta, S.J., Antoniassi, J.Q., Zanatelli, M., Santos, F.C., Góes, R.M., Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., 2015. Acute exposure to bisphenol A and cadmium causes changes in the morphology of gerbil ventral prostates and promotes alterations in androgen-dependent proliferation and cell death. *Environ. Toxicol.* Epub ahead of print.

Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24 (1), 5-13.

Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28 (5), 561-578.

Debes, J.D., Tindall, D.J., 2002. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett.* 187 (1-2), 1-7.

Delfosse, V., Maire, A.L., Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 88-101.

Gonçalves, B. F. G., Campos, S. G. P., Zanetoni, C., Scarano, W. R., Falleiros Jr, L. R., Amorim, R. L., Ges, 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. *The prostate.* 73, 1202-1213.

Guo, Y., Kannan, K., 2013. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 17;47 (24), 14442-14449.

Hoberman, A.M., Schreur, D.K., Leazer, T., Daston, G.P., Carthew, P., Re, T., Loretz, L., Mann, P., 2008. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth. Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 83 (2), 123-133.

Janjua, N.R., Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C., Andersson, A.M., 2008. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int. J. Androl.* 31 (2), 118–130.

Lima, R.F., Rodriguez, D.A., Campos, M.S., Biancardi, M.F., dos Santos, I.F., de Oliveira W.D., Cavasin, G.M., Marques, M.R., Taboga, S.R., Santos, F.C., 2015.

Bisphenol-A promotes antiproliferative effects during neonatal prostate development in male and female gerbils. *Reprod. Toxicol.* 58, 238-245.

Ma, D., Chen, L., Zhu, X., Li, F., Liu, C., Liu, R., 2014. Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (10), 6482-6494.

Moos, R.K., Angerer, J., Dierkes, G., Brüning, T., Koch, H.M., 2015. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Arch. Toxicol.* Epub ahead of print.

Oishi, S., 2001. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol. Ind. Health.* 17 (1), 31-39.

Oishi, S., 2002. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food. Chem. Toxicol.* 40 (12), 1807-1813.

Oishi, S., 2004. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem. Toxicol.* 42(11), 1845-1849.

Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I., 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem. Toxicol.* 39 (12), 1225-1232.

Park, C.J., Nah, W.H., Lee, J.E., Oh, Y.S., Gye, M.C., 2012. Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa. *Andrologia.* 44 (1), 187-193.

Perez, A.P., Biancardi, M.F., Caires, C.R.3, Falleiros, L.R., Góes, R.M., Santos, F.C., Taboga, S.R., 2016. Pubertal exposure to ethinylestradiol promotes different effects on the morphology of the prostate of the male and female gerbil during aging. *Environ. Toxicol.* Epub ahead of print.

Prins, G.S., 2008. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr. Relat. Cancer*. 15 (3), 649-656.

Prins, G.S., Birch, L., Couse, J.F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., Korach, K.S., 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: Studies with alpha ERKO and beta ERKO mice. *Cancer Res*. 61, 6089–6097.

Prusakiewicz, J.J., Ackermann, C., Voorman, R., 2006. Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm. Res*. 23 (7), 1517-24.

Risbridger, G.P., Ellem, S.J., McPherson, S.J., 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J. Mol. Endocrinol*. 39 (3), 183-188.

Rodríguez, D.A., de Lima, R.F., Campos, M.S., Costa, J.R., Biancardi, M.F., Marques, M.R., Taboga, S.R., Santos, F.C. 2015. Intrauterine exposure to bisphenol A promotes different effects in both neonatal and adult prostate of male and female gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Environ. Toxicol.* Epub ahead of print.

Rodríguez-Castelán, J., Anaya-Hernández, A., Méndez-Tepepa, M., Martínez-Gómez, M., Castelán, F., Cuevas-Romero, E., 2016. Distribution of thyroid hormone and thyrotropin receptors in reproductive tissues of adult female rabbits. *Endocr. Res*. 7, 1-12.

Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153 (1), 12-19.

Sanches, B.D., Biancardi, M.F., Dos Santos, F.C., Goes, R.M., Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., 2014. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in Mongolian gerbil. *Microsc. Res. Tech*. 77 (6), 458-466.

- Santos, F.C.A., Taboga, S.R., 2006. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim. Reprod.*, 3 (1), 3-18.
- Santos, F.C., Custodio, A.M., Campos, S.G., Vilamaior, P.S., Góes, R.M., Taboga, S.R., 2008. Antiestrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and ovaries. *Biol. Reprod.* 79 (4), 674-685.
- Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., Carvalho, H.F., 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288 (8), 885-892.
- Vo, T.T., Yoo, Y.M., Choi, K.C., Jeung, E.B., 2010. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reprod. Toxicol.* 29 (3), 306-316.
- von Deimling, A., Korshunov, A., Hartmann, C., 2011. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* 21(1), 74-87.
- Weibel, E. R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 12, 131-155.
- Ye, X., Bishop, A.M., Reidy, J.A., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2006. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ. Health Perspect.* 114, 1843–1846.
- Zaviacic, M., Ablin, R.J., 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in the human female. *Histol. Histopathol.* 15 (1), 131-142.
- Zhang, L., Dong, L., Ding, S., Qiao, P., Wang, C, Zhang, M., Zhang, L., Du, Q., Li, Y., Tang, N., Chang, B., 2014. Effects of n-butylparaben on steroidogenesis and

spermatogenesis through changed E₂ levels in male rat offspring. Environ. Toxicol. Pharmacol. 37 (2), 705-717.

Legends

Table 1. ¹Biometrical data of the male and female gerbils (n = 8 animals/group). Relative weight corresponds to the ratio between prostate complex weight and body weight. Values are means $\pm$ standard error of the means (SEM). ²Stereological data obtained for the male and female prostate during methylparaben exposure (mean $\pm$ SEM; n = 30 fields in 5 animals/group). *Statistically significant differences between control and methylparaben group ($p \leq 0.05$).

Table 2. Frequency (%) of AR and PCNA-positive cells in the male gerbil prostate of all experimental groups. Values are means $\pm$ standard error of the means. Asterisks represent statistically significant differences between the experimental groups ($p \leq 0.05$; n = 30 fields in 3 animals/group).

Table 3. Frequency (%) of AR, ER α , and PCNA-positive cells in the female gerbil prostate of all experimental groups. Values are means $\pm$ standard error of the means. Asterisks represent statistically significant differences between the experimental groups ($p \leq 0.05$; n = 30 fields in 3 animals/group).

Figure 1. Morphological aspects of the male and female gerbil prostate. Control (C) and methylparaben-exposed gerbils (3P, 7P and 21P). Hematoxylin-eosin method. Epithelium (Ep), lumen (L), smooth muscle cells (arrows) stroma (S), epithelial hyperplasia (hyp), intraepithelial neoplasia (pin), inflammatory infiltrate (*).

Figure 2. Fibrillar elements of prostate stroma in male and female gerbils. Control (C) and methylparaben-exposed gerbils (3P, 7P and 21P). Gömöri's reticulin method. Epithelium (Ep), lumen (L), stroma (S), reticular fibers (arrows) and collagen (Co or arrowhead).

Figure 3. Immunofluorescence for α -actin of smooth muscle cells in control (C) and methylparaben-exposed prostate gerbils (3P, 7P and 21P). Green: alpha-actin; Blue: DAPI. Epithelium (Ep), lumen (L), stroma (S), smooth muscle cells (arrows), muscle cell discontinuance (arrowhead).

Figure 4. Immunohistochemistry for male prostate in control (C) and methylparaben-exposed gerbils (3P, 7P and 21P). **(a-d)** Androgen receptor (AR). Arrows indicate AR-positive cells in epithelium and stroma. **(e-h)** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Arrows indicate the PCNA-positive cells in epithelium and stroma.

Figure 5. Immunohistochemistry for female prostate in control (C) and methylparaben-exposed gerbils (3P, 7P and 21P). **(a-d)** Androgen receptor (AR). Arrows indicate AR-positive cells in epithelium and stroma. **(e-h)** Estrogen receptor alpha (ER α). Arrows indicate ER α -positive cells in stroma. **(i-l)** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Arrows indicate the PCNA-positive cells in epithelium and stroma.

Figure 6. Immunohistochemistry for O(6)-Methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in prostate of the control (C) and methylparaben-exposed gerbils (3P, 7P

and ^{21}P). Cytoplasm reaction for MGMT in smooth muscle cells are indicated by arrows.

Table 1. Biometrical and stereological data obtained for the male and female groups during methylparaben exposure.

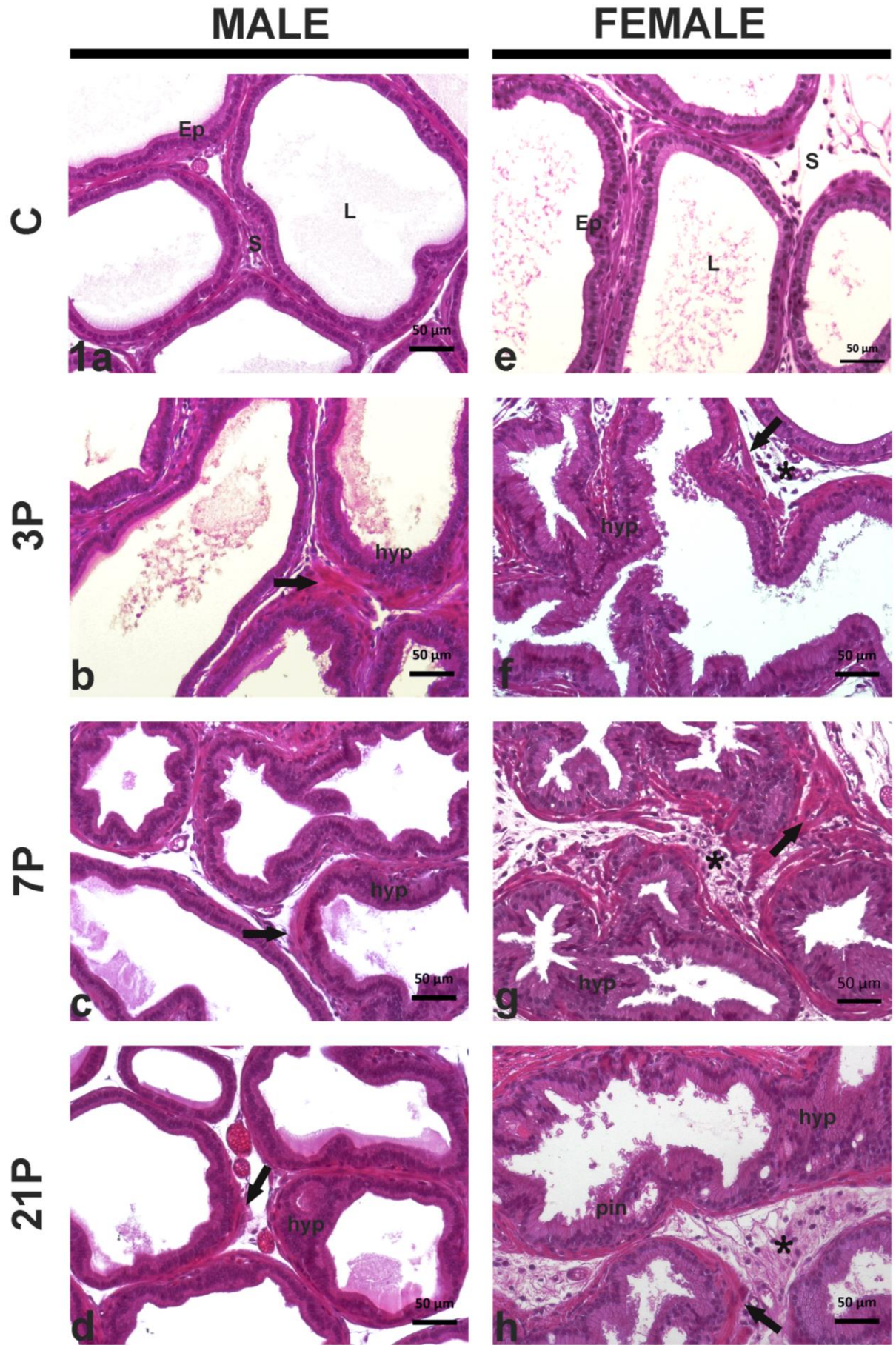
		Groups			
		Control	3P	7P	21P
¹ Biometry					
Body weight (g)	Male	73.2 ± 2.1	68.7 ± 1.1	69.6 ± 1.2	70.4 ± 1.8
	Female	54.8 ± 3.0	56.8 ± 2.7	60.0 ± 2.8	62.8 ± 4.8
Prostate complex weight (g)	Male	0.70 ± 0.04	0.80 ± 0.03	0.60 ± 0.06	0.68 ± 0.07
	Female*	0.13 ± 0.005 ^a	0.14 ± 0.007 ^a	0.20 ± 0.007 ^a	0.31 ± 0.05 ^b
Relative prostate weight	Male*	9.6 ± 0.6 ^a	12.7 ± 0.5 ^b	10.1 ± 1.1 ^a	9.6 ± 0.8 ^a
	Female*	2.4 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.8 ^a	4.9 ± 1.0 ^b
Testis weight (g)	Male*	1.10 ± 0.02 ^a	1.04 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.03 ^b	0.98 ± 0.03 ^b
Ovary weight (g)	Female	0.04 ± 0.003	0.03 ± 0.007	0.06 ± 0.006	0.05 ± 0.007
² Stereology (%)					
Epithelium	Male*	17.4 ± 1.2 ^a	26.9 ± 1.9 ^b	27.4 ± 1.7 ^b	29.7 ± 1.3 ^b
	Female*	16.1 ± 1.0 ^a	32.4 ± 1.3 ^b	33.1 ± 1.6 ^b	33.2 ± 1.0 ^b
Lumen	Male*	52.9 ± 1.9 ^a	45.5 ± 2.5 ^a	43.9 ± 2.7 ^a	37.7 ± 2.0 ^b
	Female*	34.6 ± 2.2 ^a	21.1 ± 1.6 ^b	24.0 ± 2.3 ^b	17.2 ± 1.4 ^b
Muscle stroma	Male*	9.8 ± 0.6 ^a	15.2 ± 0.8 ^b	16.8 ± 0.6 ^b	16.3 ± 0.9 ^b
	Female*	13.9 ± 0.9 ^a	20.0 ± 1.1 ^b	21.3 ± 1.3 ^b	22.5 ± 0.8 ^b
Non-muscle stroma	Male*	19.9 ± 1.7 ^a	12.5 ± 1.2 ^b	11.9 ± 1.6 ^b	16.3 ± 1.4 ^a
	Female*	35.7 ± 1.9 ^a	26.5 ± 1.9 ^b	21.6 ± 1.1 ^b	27.1 ± 1.7 ^b

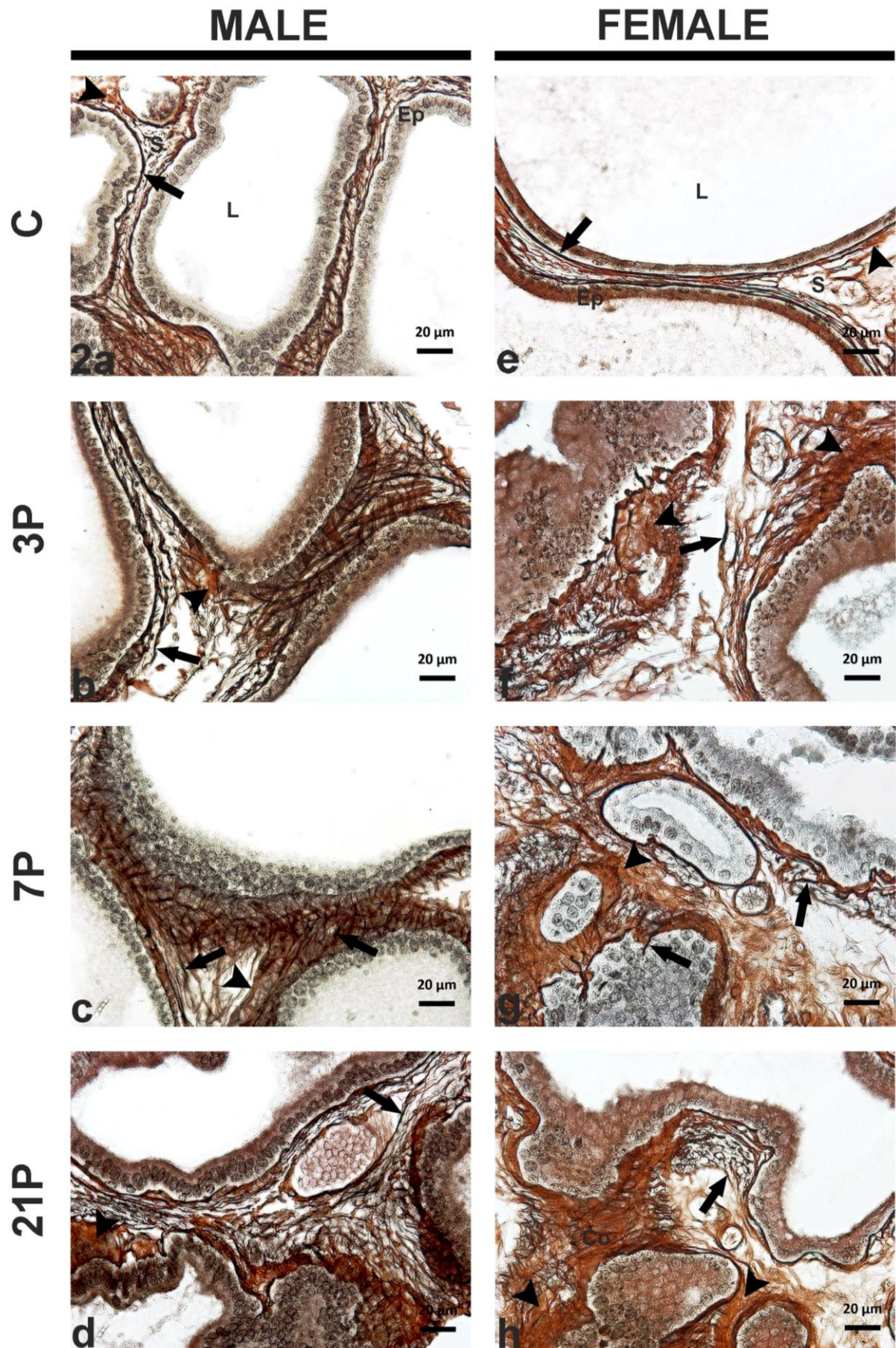
Table 2. Frequency (%) of AR and PCNA-positive cells in the gerbil male prostate of all experimental groups.

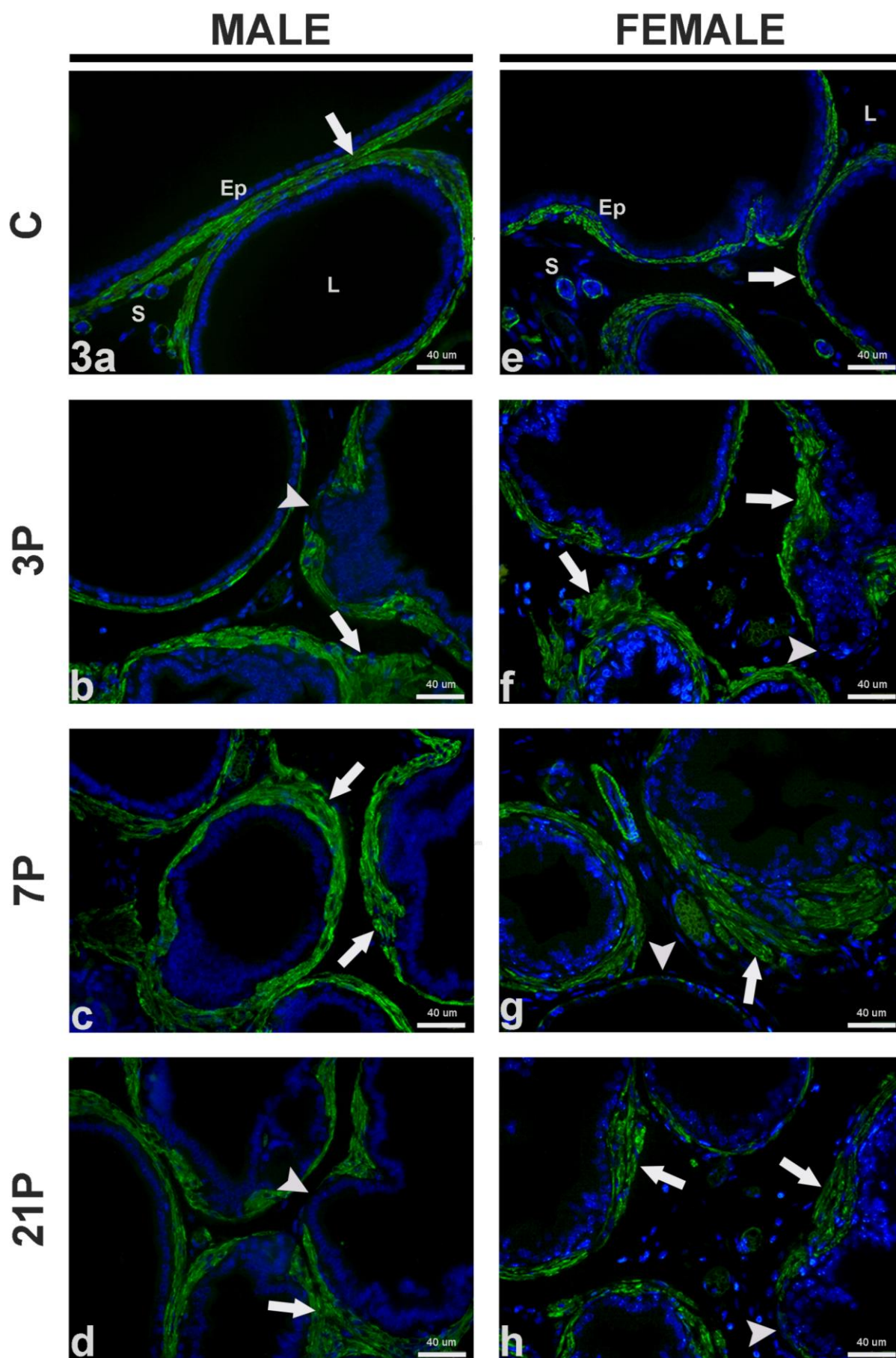
		Male groups			
		Control	3P	7P	21P
AR	Epithelium*	62.2 ± 2.4 ^a	78.4 ± 1.9 ^b	83.9 ± 2.1 ^b	81.1 ± 2.0 ^b
	Stroma*	30.0 ± 1.3 ^a	44.4 ± 2.2 ^b	47.0 ± 2.6 ^b	41.2 ± 2.0 ^b
PCNA	Epithelium*	4.4 ± 0.4 ^a	6.5 ± 0.6 ^b	6.4 ± 0.6 ^b	5.8 ± 0.3 ^a
	Stroma	8.9 ± 0.7	9.6 ± 0.6	7.0 ± 0.6	8.4 ± 0.6

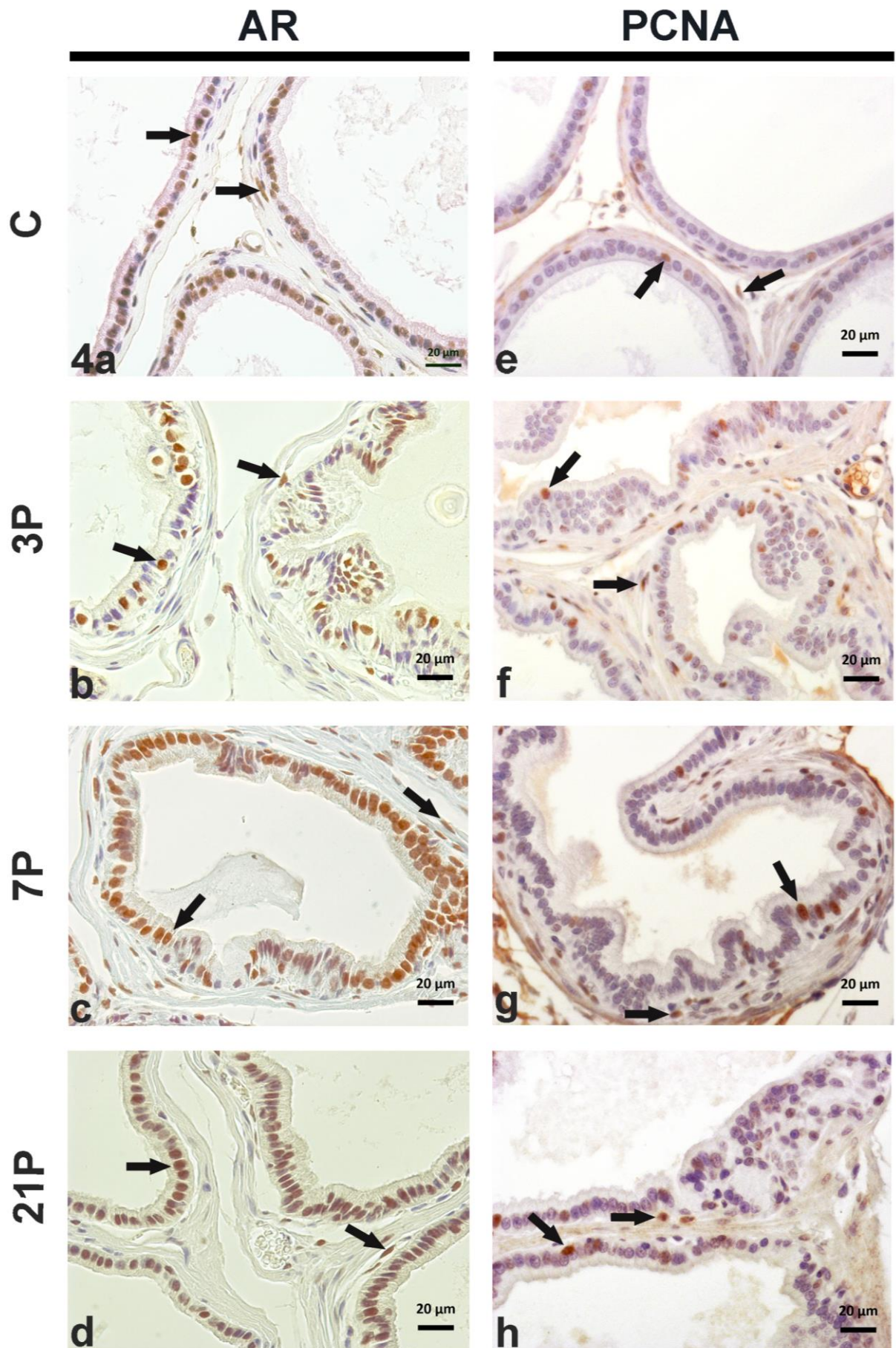
Table 3. Frequency (%) of AR, ER α , and PCNA-positive cells in the gerbil female prostate of all experimental groups.

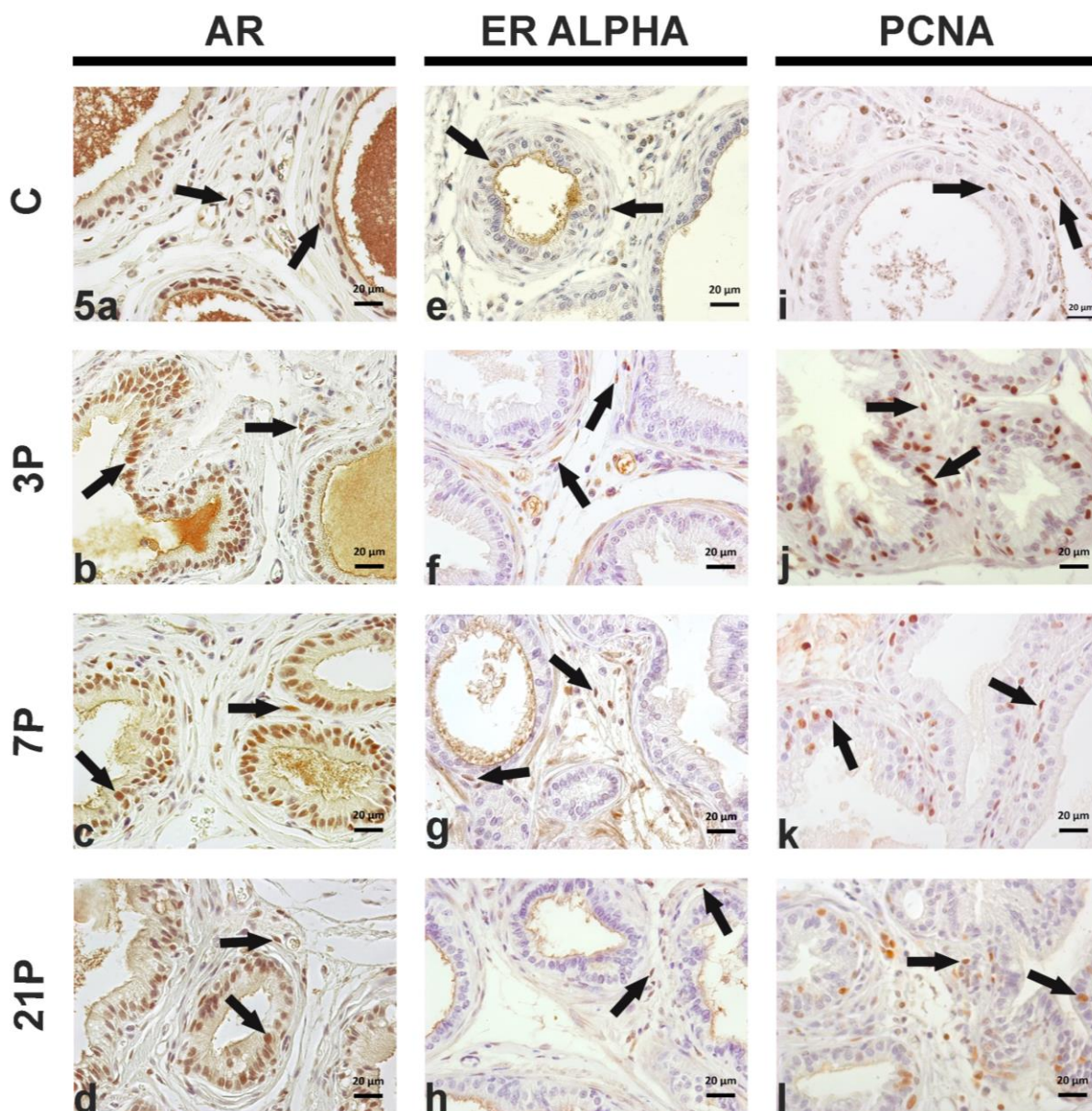
		Female groups			
		Control	3P	7P	21P
AR	Epithelium*	46.2 $\pm$ 2.4 ^a	63.9 $\pm$ 2.8 ^b	60.3 $\pm$ 3.3 ^b	58.3 $\pm$ 3.2 ^b
	Stroma*	19.1 $\pm$ 0.6 ^a	34.0 $\pm$ 1.6 ^b	37.2 $\pm$ 2.3 ^b	36.4 $\pm$ 1.7 ^b
ERα	Stroma*	24.7 $\pm$ 1.04 ^a	55.3 $\pm$ 1.5 ^b	43.9 $\pm$ 1.6 ^c	36.6 $\pm$ 1.7 ^d
PCNA	Epithelium*	9.9 $\pm$ 0.8 ^a	25.4 $\pm$ 1.7 ^b	25.2 $\pm$ 1.9 ^b	15.7 $\pm$ 1.1 ^c
	Stroma*	8.7 $\pm$ 0.7 ^a	13.1 $\pm$ 1.2 ^b	13.0 $\pm$ 1.1 ^b	8.6 $\pm$ 0.6 ^a

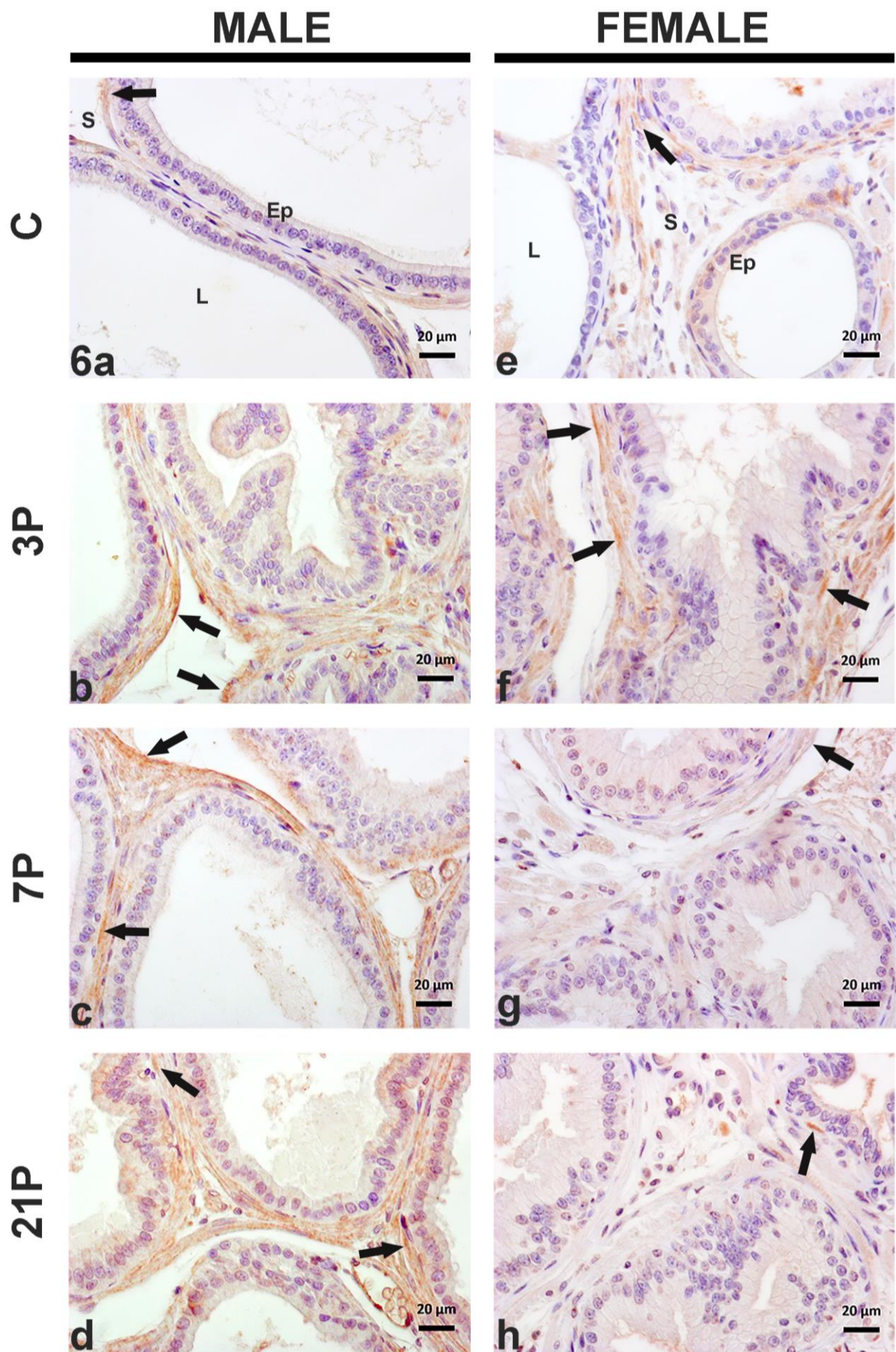












5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o metilparabeno atuou como desregulador endócrino em gerbilos adultos, visto que este químico alterou o padrão de imunomarcção de receptores androgênicos e estrogênicos na próstata de ambos os sexos.
2. Gerbilos machos e fêmeas apresentaram alterações morfológicas na próstata, mas as alterações foram mais proeminentes em fêmeas.
3. Não pode-se observar uma relação de tempo-dependência no que se diz respeito a ação deste químico, uma vez que os grupos expostos ao metilparabeno por 3 dias apresentaram os mesmos padrões de alterações que os grupos tratados por 7 e 21 dias.
4. O metilparabeno apresentou um efeito estrogênico na próstata masculina e feminina de gerbilos, aumentando as taxas de proliferação celular e induzindo a desordens prostáticas.
5. Estes resultados são importantes, pois servem para alertar a população mundial sobre os riscos do metilparabeno, visto que toda a humanidade está exposta a essa substância devido a sua grande utilização pelas indústrias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int Rev Cytol* 1990, 121: 127-231.

Banerjee P, Banerjee S, Brown, T.R. Increased androgen receptor expression. correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 2001, 142(9): 4066–4075.

Biancardi MF, Santos FC, Madi-Ravazzi L, Góes RM, Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR. Testosterone promotes an anabolic increase in the rat female prostate (Skene's paraurethral gland) which acquires a male ventral prostate phenotype. *Anat Rec* 2010, 293(12): 2163-75.

Black BE, Paschal BM. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2004, 15(9): 411-7.

Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 2010, 30(2): 301-12.

Castelain F, Castelain M. Parabens: a real hazard or a scare story?. *Eur J Dermatol* 2012, 22(6): 723-7.

Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 221(3): 278-84.

Colborn T. O futuro roubado. Porto Alegre: L&PM: 2002. p.354.

Cooke OS, Simon L, Cimafranca MA. Environmental Endocrine Disruptors and Male Reproductive Toxicology. *Male Reproductive Toxicology: Mechanisms and Manifestations* 2010, 11: 231- 244.

Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SGP, Santos FCA, Vilamaior PSL, Góes RM, Taboga SR. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation

during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 2008, 39(8): 1312-24.

Coster SD, van Larebek N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *J Environ Public Health* 2012, 2012: 713696. Epub 2012 Sep 6.

Custódio AMG, Góes RM, Taboga SR. Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol Int* 2004, 28(5): 335-44.

Custódio AMG, Santos FCA, Campos SGP, Vilamaior PSL, Oliveira SM, Góes RM, Taboga SR. Disorders related with ageing in the gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands). *Int. J. Exp. Path* 2010; 91: 132–143.

Darbre PD, Aljarrah A, Miller R, Coldham, NG, Sauer, M.J., Pope, G.S. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol* 2004, 24(1): 5-13.

Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl Toxicol* 2008, 28(5): 561-78.

Davison SL, Bell R. Androgen physiology. *Semin. Reprod. Med* 2006, 24: 71-77.

de Graaf, R. *De mulierum organis generationi inservientibus. Tractatus novus demonstrans tani homines et animalia caetera omnia, quac vivipara dicuntur, haud minus quam vivipara ab ovo originem ducere.* Leyden 1672.

Dehm SM, Tindall DJ. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol* 2007, 21(12): 2855-63.

Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul M.J. Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cel Endocrinol* 1992, 88: 15-22.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009; 30(4): 293-342.

Ellem SJ, Risbridger GP. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. *Steroid Enzymes and Cancer. Ann NY Acad. Sci* 2009, 1155: 174-86.

Eriksson E, Andersen HR, Ledin A. Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J Hazard Mater* 2008, 156(1-3): 240-59.

Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 2013, 47(24): 14442-9.

Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: current insights. *Mol Endocrinol* 2006, 20(10): 2265-77.

Hoberman AM, Schreur DK, Leazer T, Daston GP, Carthew P, Re T, Loretz L, Mann P. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod. Toxicol* 2008, 83(2): 123-33.

Janjua NR, Frederiksen H, Skakkebaek NE, Wulf HC, Andersson AM. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int J Androl* 2008, 31(2): 118-30.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996, 4: 715-40.

Lee CH, Olugbade AO, Kischenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2011, 40(3): 565-75.

Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci* 2005, 108(1): 1-11.

Ma D, Chen L, Zhu X, Li F, Liu C, Liu R. Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014, 21(10): 6482-94.

Maia SSR, Santos FCA, Magdalena PA, Góes RM, Vilamaior PSL, Margaret Warner M, Gustafsson JA, Taboga SR. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Male and Female Gerbil Prostates. *Biology of Reproduction* 2013, 88(1): 7.

McNeal, JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988, 12: 619–633.

McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation* 2008, 76(6): 660-70.

Mincea MM, Lupsa IR, Cinghita DF, Radovan CV, Talpos I, Ostafe V. Determination of methylparaben from cosmetic products by ultra performance liquid chromatography. *J Serb Chem. Soc* 2009, 74(6): 669–676.

Moos RK, Angerer J, Wittsiepe J, Wilhelm M, Brüning T, Kocha HM. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. *Int J Hyg Environ Health* 2014, 217(8): 845-53.

Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. *Food Chem Toxicol* 2001, 39(12): 1225-32.

Oshi S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 2001, 17(1): 31-9.

Oshi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002, 40(12): 1807-13.

Oshi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* 2004, 42(11): 1845-9.

Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(5): 1484-9.

Park CJ, Nah WH, Lee JE, Oh YS, Gye MC. Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa. *Andrologia* 2012, 1:187-93.

Prajapati A, Gupta S, Mistry B, Gupta S. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. *Biomed Res Int* 2013, 2013: 107954.

Price D, Williams-Ashman HG. The accessory reproductive glands of mammals. In: Young WC, editor. *Sex and internal secretions*. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1961, p. 366–448.

Ricke WA, Wang Y, Cunha GR. Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. *Differentiation* 2007, 75(9): 871-82.

Risbridger GP, Taylor RA. Chapter 23 - Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: Neill JD, Plant TM, Pfaff DW, Challis JRG, Kretser DMd, Richards JS, et al., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press 2006, p. 1149-72.

Rochel SS, Bruni CA, Taboga SR, Vilamaior PSL, Góes R.M. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat. Rec* 2007; 290: 1233–1247.

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, 153(1): 12-9.

Santamarta, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecol e Desenv Rur Sustent* 2001, v.2 (n.3); 18-29.

Santos FCA, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 2003, 35(6): 447-57.

Santos FCA, Taboga SR. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Anim Reprod* 2006, 3(1): 3-18.

Sasseville D, Alfalah M, Lacroix JP. "Parabenoia" Debunked, or "Who's Afraid of Parabens?". *Dermatitis* 2015, 26(6): 254-9.

Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai K. Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-Eco- Screen System). *J Health Sci* 2005, 51: 557–568.

SCCS. Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on Parabens. COLIPA nº P82. SCCS/1514/13, 2013.

SCCP. Scientific Committee on Consumer Products Extended opinion on the safety evaluation of parabens. SCCP/0873/05, 2005.

Schubach G. The G-spot is the female prostate. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186(4): 850.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. *Urology* 2011, 78(6): 1224-8.

Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbormeeeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 2004, 64(6): 2270-305.

Shehata R. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat* 1980, 107(3): 286-8.

Skene, AJC. The anatomy and pathology of two important glands of the female urethra. *Am J Obstet Dis. Women Child* 1880, 13: 265–270.

Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenberg NA. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol* 2001, 39(6): 513-32.

Soni MG, Taylorb SL, Greenbergc NA, Burdocka G.A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol* 2002, 40(10): 1335-73.

Taboga SR, Góes RM, Zanetoni C, Santos FCA. Ultrastructural characterization of the prostate secretory cells: a comparative study between the male and female organs. In *Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis*, 2001, Águas de Lindóia, Brazil, pp. 205.

Takao T, Tsujimura A. Prostate stem cells: the niche and cell markers. *Int J Urol*. 2008; 15(4): 289-94.

Tepper SL, Jagirdar J., Heath D., Geller SA. Homology between the female paraurethral (Skenes's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1984, 108(5): 423-5.

Timms BG. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 2008, 76(6): 565-77.

Trapman J e Brinkmann AO. The Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Path Res Pract* 1996, 192(7): 752-60.

Untergasser G, Plas E, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: agerelated tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005, 40(3): 121-8.

Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 2000, 45(3): 253-8.

Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell. Evol Biol* 2006, 288(8): 885-92.

Walters KA, Simanainen U, Gibson DA. Androgen action in female reproductive physiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016, 23(3): 291-6.

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

Wilson JD. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2011, 40(3): 577-90.

Witorsch RJ, Thomas JA. Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Crit Rev Toxicol* 2010, 3: 1-30.

Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ Health Perspect* 2006, 114(12): 1843-6.

Zaviacic M. The female prostate: from vestigial skene's parauretral glands and ducts to woman's functional prostate. 1st ed. Bratislava, Slovakia 1999; Slovack Academic Press. p 171.

Zaviacic M, Ablin RJ. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in human female. *Histol Histopathol* 2000, 15(1): 131-42.

Zhang L, Dong L, Ding S, Qiao P, Wang C, Zhang M, Zhang L, Du Q, Li Y, Tang N, Chang B. Effects of n-butylparaben on steroidogenesis and spermatogenesis through changed E² levels in male rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37(2): 705-17.

