



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

**Avaliação morfofisiológica dos efeitos do bisfenol-A sobre o
desenvolvimento neonatal da próstata de gerbilos (*Meriones
unguiculatus*)**

Rodrigo Fernandes de Lima

GOIÂNIA-GO

2015

RODRIGO FERNANDES DE LIMA

Avaliação morfofisiológica dos efeitos do bisfenol-A sobre o desenvolvimento neonatal da próstata de gerbilos (*Meriones unguiculatus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como a defesa de produto final - Nível Mestrado.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Fernanda Cristina Alcântara dos Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Rúbia Marques

GOIÂNIA-GO

2015

RODRIGO FERNANDES DE LIMA

Avaliação morfofisiológica dos efeitos do bisfenol-A sobre o desenvolvimento neonatal da próstata de gerbilos (*Meriones unguiculatus*)



Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
Universidade Federal de Goiás



Profa. Dra. Lara Silvia Corradi Olhê Blanck
Universidade Federal do Tocantins



Profa. Dra. Walquíria Arruda
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro
Universidade Federal de Goiás
(Suplente)

Prof. Dr. Sérgio Marcelino de Oliveira
Universidade Federal do Mato Grosso
(Suplente)

Aprovada em: 06/03 /2015

Dedicatória

Dedico este aos meus pais, pois eles sempre acreditaram em mim e me ajudaram na minha construção profissional.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por me oferecer essa oportunidade de melhorar como profissional.

A minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos pela sua confiança ao ter acreditado em mim, sua paciência com minha rotina conturbada, amizade e sua contribuição para me tornar um melhor profissional.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Mara Rúbia Marques pela sua dedicação e paciência que me proporcionou nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi pelo seu conhecimento e boa vontade em ensinar durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A toda a minha família que sempre esteve comigo em todas as situações e momentos de ausência, me entendendo e me apoiando, em especial minha Mãe Vilma Fernandes, meu pai José Lima e minha irmã Luana Fernandes.

Aos meus amigos do Laboratório de Histologia Daniel Andrés, Thelma Saddi e Marcos Vinicius que me apoiaram durante toda a pesquisa, e sempre fizeram fácil o trabalho me fornecendo o melhor ambiente de amizade.

Em especial a Mônica Campos, por tudo que me ensinou, todas as horas que passamos juntos no laboratório e todos os conselhos e amizade que me fortaleceu e me conduziu para ser um profissional e pessoa melhor.

Aos meninos de iniciação científica, Fábio Yukio, Clainy e especialmente a Iana Figueiredo e Wendyson Duarte, por estarem sempre presentes no laboratório dispostos a aprender e ajudar e com isso auxiliarem na construção desse trabalho.

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Morfofisiologia da próstata.....	1
1.1.1 Morfofisiologia da próstata masculina.....	Erro! Indicador não definido.
1.1.2 A próstata feminina.....	3
1.4 Gerbilo (<i>Meriones unguiculatus</i>) como modelo experimental	8
1.5 Disruptores endócrinos.....	10
1.5.1 Bisfenol – A	12
2 OBJETIVO GERAL	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Delineamento experimental	16
3.3 Biometria.....	17
3.4 Processamento histológico e análise citoquímica.....	17
3.5 Reconstrução tridimensional.....	17
3.6 imunohistoquímica	18
3.7 Quantificação de células ar e pcna-positivas.....	19
3.8 Estereologia.....	19
3.9 Estatística	19
4. ARTIGO.....	21
5. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGD: distância anogenital	17
AR: receptor de andrógeno	6
BPA: Bisfenol-A	12
dpc: dia após o coito	5
ER: receptor de estrógeno	11
ER α : receptor de estrógeno alfa	13
ER β : receptores de estrógeno beta.....	13
GC: glândula coagulante	9
LA: lobos anteriores	2
LD: lobo dorsal	2
LDL: lobo dorsolateral	9
LL: lobo lateral.....	2
LP: lobo parauretral.....	10
LV: lobo ventral	2
PSA: antígeno prostático específico.....	1
QDE: Químicos disruptores endócrinos	10
UGE: Epitélio urogenital	4
UGM: Mesênquima urogenital.....	4
UGS: Seio urogenital.....	4
vmp: mesênquima condensado ventral.....	6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo das zonas da próstata humana.	2
Figura 2. Representação esquemática dos lobos da próstata de rato.....	3
Figura 3: Desenvolvimento do seio urogenital.....	5
Figura 4: Meriones unguiculatus	9
Figura 5: O esquema demonstra a lobulação da prostata de gerbilo e sua nomenclatura específica	10
Figura 6: Interação de disruptores endócrinos (QDE) nos receptores e sua competição com os ligantes naturais (LN).....	11
Figura 7: Representação de moléculas de policarbonato.	12

RESUMO

O desenvolvimento neonatal é estimulado por diversas interações hormonais. Os poluentes ambientais que mimetizam hormônios esteróides, como o bisfenol-A (BPA), podem causar alterações no padrão de desenvolvimento da próstata, levando a lesões ao longo da vida. O objetivo deste estudo foi verificar se a exposição neonatal ao BPA afeta o desenvolvimento da próstata de gerbilos machos e fêmeas. Para isso, os recém-nascidos foram expostos a níveis ambientais (LBPA – 40 µ/kg/dia) e doses elevadas (HBPA – 4 mg/kg/dia) de BPA, do 1º ao 7º dia de vida. No oitavo dia, os complexos prostáticos foram coletados e processados para as análises morfológica, estereológica e imunohistoquímica. Com a reconstrução tridimensional observamos que nos machos os brotos prostáticos se alongaram em forma de “V” em direção ao mesênquima condensado ventral (VMP). Os dados estereológicos dos machos demonstraram um aumento significativo na frequência relativa do compartimento mesenquimal do grupo LBPA em relação aos demais grupos ($p \leq 0,05$). As células AR-positivas tornaram-se significativamente mais frequentes no mesênquima periuretral (PeM), brotos epiteliais ventrais (VB) e camada muscular (SM) dos grupos tratados com BPA. Ocorreu uma redução na frequência de células PCNA-positivas nos brotos periuretrais (PeB) e na SM do grupo LBPA. Em fêmeas, a reconstrução tridimensional demonstrou que os PeBs podem emergir de um ou ambos os lados da uretra e também foi visível uma significativa redução do mesênquima parauretral (PaM) nos grupos tratados com BPA. Apenas as fêmeas do grupo HBPA apresentaram brotos parauretrais (PaB) aparentemente mais desenvolvidos. No grupo LBPA observou-se um aumento na frequência de células AR-positivas no PeM e uma diminuição destas células no PeB e mesênquima parauretral (PaM). No grupo HBPA as células AR-positivas tornaram-se mais frequentes no PeM e PaB, contudo sofreram redução no PeB e PaM. Células PCNA-positivas tornaram-se significativamente menos frequentes no PaB e PaM dos grupos LBPA e HBPA. Em relação às células ER-α positivas, nas fêmeas do grupo LBPA observou-se uma redução das imunomarcações no PeM e SM, enquanto que no grupo HBPA essa redução ocorreu apenas no PaM. Este estudo revelou que o desenvolvimento pós-natal da próstata de fêmeas de gerbilos é mais precoce e morfológicamente distinto do que ocorre nos machos da mesma espécie.

Além disso, pode-se observar que o BPA exerceu um efeito antiproliferativo sobre a glândula prostática de machos e fêmeas com oito dias de vida pós-natal, sendo as fêmeas mais susceptíveis a este químico ambiental.

Palavras-Chave: Próstata ventral; morfogênese prostática, BPA, receptores hormonais, proliferação celular.

ABSTRACT

The neonatal development is stimulated by various hormonal interactions. Environmental pollutants that mimic steroid hormones, such as bisphenol A (BPA) can cause changes in the pattern of development of the prostate, leading to lifelong lesions. The objective of this study was to determine whether neonatal exposure to BPA affects the development of prostate gerbils males and females. For this, the newborns were exposed to environmental levels (LBPA - 40 μ / kg / day) and high dose (HBPA - 4 mg / kg / day) of BPA, from 1st to the 7th day of life. On the eighth day, the prostatic complexes were collected and processed for morphological analysis, stereological and immunohistochemistry. It was observed through the three-dimensional reconstruction that in males the prostatic buds have elongated in a "V" form towards the ventral condensed mesenchyme (VMP). The stereological data of males showed a significant increase in the relative frequency of the mesenchymal compartment in the LBPA group compared to other groups ($p \leq 0.05$). The AR-positive cells became significantly more frequent in the periurethral mesenchyme (PEM), ventral epithelial buds (VB) and muscle layer (SM) in the BPA group. There was a reduction in the frequency of PCNA-positive cells in the periurethral buds (PeB) and in the SM of the LBPA group. In females, the three-dimensional reconstruction showed that PeBs can emerge from one or both sides of the urethra and it was also visible a significant paraurethral mesenchyme (MAP) reduction in the BPA group. Only females of the HBPA group apparently presented paraurethral buds (PAB) more developed. In the LBPA group it was observed an increase in the AR-positive cells frequency in the PeM and a decrease of these cells in the PeB and mesenchyme paraurethral (PaM). In the HBPA group the AR-positive cells were more frequent in the PeM and PaB and reduced in PeB and PaM. PCNA-positive cells became significantly less frequent in the PaB and PaM of LBPA and HBPA groups. Regarding the ER- α positive cells in the group LBPA females showed a reduction in the immunoblots of PeM and MS, whereas in the group HBPA this reduction occurred only in the PaM. This study revealed that the postnatal development of the prostate of female gerbils occurs earlier and are morphologically distinct from what occurs in males of the same species. Furthermore, it can be seen that the BPA exerted a proliferative effect on the prostate gland of males and females

with eight days of postnatal life, though females being more susceptible to this environmental chemicals.

Keywords: Ventral prostate; prostate morphogenesis; BPA; hormone receptors; cell proliferation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MORFOFISIOLOGIA DA PRÓSTATA MASCULINA

Anatomicamente, a próstata masculina localiza-se na base da bexiga e ao redor da uretra. Pesa aproximadamente um grama ao nascimento e seu tamanho e peso se modificam com o desenvolvimento, que é influenciado por andrógenos. Na puberdade e vida adulta pode atingir em média 30 gramas, e na fase senil pode aumentar de tamanho, sendo essa fase mais propensa ao desenvolvimento de anormalidades (6-8).

A principal função da próstata é produzir uma secreção glicoprotéica que, juntamente com a secreção da vesícula seminal, com os espermatozoides e com a secreção das glândulas bulbouretrais, forma o líquido ejaculado. Em geral, as funções primordiais da secreção prostática são a coagulação e liquefação do sêmen. Também pode-se relacionar a secreção da próstata com a proteção dos espermatozoides e sua capacidade de interagir com o muco cervical (9). Em roedores essa secreção prostática também está ligada ao controle de múltiplas fecundações. As principais proteínas encontradas na secreção prostática são o antígeno específico da próstata (PSA), a seminogelina, a fibronectina e a lactoferrina (9).

A próstata é encontrada em muitos mamíferos como roedores, quirópteros, canídeos, felinos e outros, porém existe uma variação morfofisiológica entre esses indivíduos. Em humanos esse órgão é compacto, porém, com regiões distintas. Essas regiões são chamadas de zonas e nomeadas conforme conforme ilustra a figura 1.

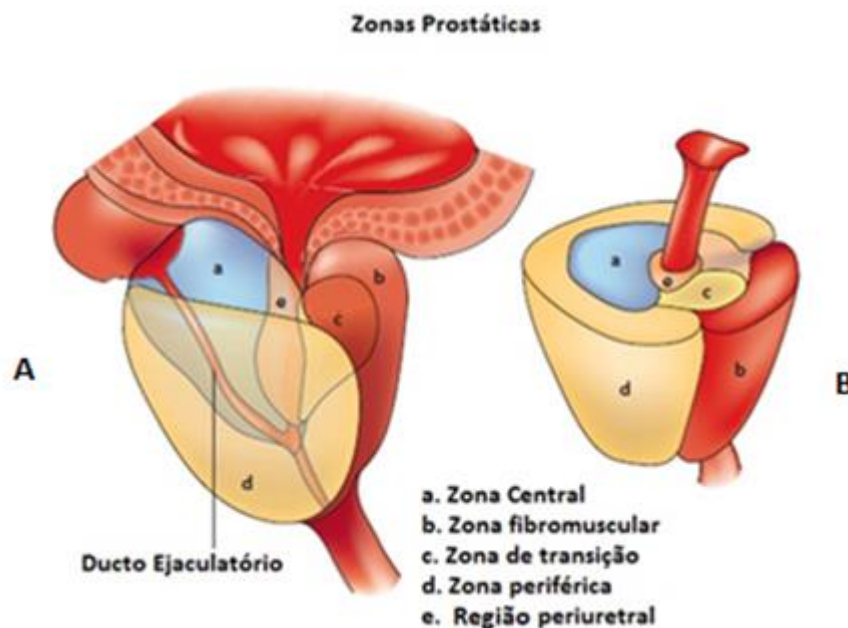


Figura 1. Esquema ilustrativo das zonas da próstata humana. **A:** próstata na sua posição anatômica, em transparência mostrando ducto ejaculatório. **B:** vista superior da próstata isolada. O corte transversal evidencia suas zonas em relação a uretra. Adaptada de De Marzo (2007) (7).

Diferente dos humanos, a próstata de roedores apresenta-se lobulada. Assim, na base da bexiga formam-se quatro pares de lobos que também são nomeados conforme a sua localização anatômica, sendo então chamados de lobos ventrais, lobos anteriores, lobos laterais e lobos dorsais (Fig. 2) (10).

Como algumas patologias associadas à próstata humana são mais frequentes nas zonas de transição e periférica, estudos com animais modelo sugerem uma relação morfofisiológica entre essas zonas e o lobo ventral. Deste modo, este lobo vem sendo estudado para melhor compreender o mecanismo de crescimento normal da glândula, bem como o desenvolvimento de patologias (5, 7, 10-12).

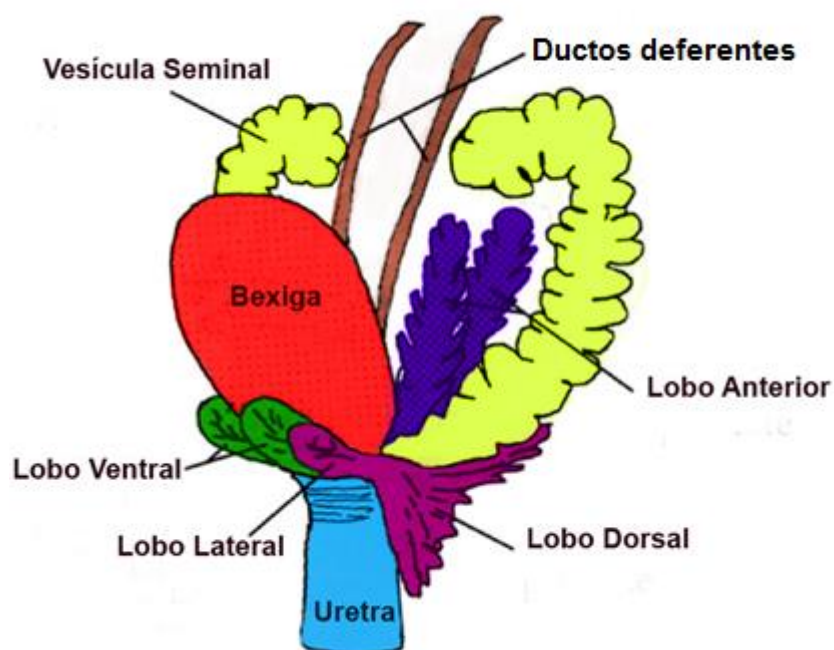


Figura 2. Representação esquemática dos lobos da próstata de rato. Adaptado de Valkenburg e Williams (2001) (10).

Histologicamente, a próstata humana é classificada como uma glândula túbulo-alveolar, sendo composta por túbulos lineares revestidos por epitélio pseudoestratificado colunar e por um estroma fibromuscular. O epitélio secretor de uma próstata normal é composto por células variadas que interagem entre si, sendo elas as células basais, células intermediárias, células neuroendócrinas e células lumbais secretoras (5, 9).

1.2 A PRÓSTATA FEMININA

A partir do século vinte, estudos têm demonstrado a existência da próstata feminina e seu importante papel nas fêmeas de várias espécies. O primeiro a descrever a existência desse órgão foi Reinier De Graaf em 1672 (13). Dois séculos depois, Alexander Skene também a descreveu, porém renomeando-a como glândula parauretral de Skene e relatando que a glândula apresentava uma secreção reduzida e sem importância fisiológica (4, 13).

A próstata feminina foi tratada como um órgão vestigial durante muitos anos, porém estudos confirmaram que a sua atividade está relacionada diretamente com o

comportamento sexual ligado ao ponto-G (G-spot) e à biologia reprodutiva da fêmea, uma vez que a presença de frutose na secreção da glândula contribui para o sucesso da fertilização dos oócitos (13, 14).

Outro ponto importante a ser salientado é a fisiologia desse órgão, pois na literatura é relatado que a disfunção do seu funcionamento pode afetar a saúde da mulher, causando doenças como prostatites, neoplasias e adenocarcinomas (14).

A presença da próstata em fêmeas já foi descrita em várias espécies de roedores como: *Rattus rattus*, *Meriones lybicus*, *Rattus norvegicus*, *Mastomys erythroleucus*, *Paraomys natalensis* e *Meriones unguiculatus* (2, 4, 15).

Uma análise estrutural da próstata feminina de roedores demonstrou a presença de numerosos ductos, alvéolos e um rico estroma com tecido muscular liso. Sua morfologia microscópica é semelhante à próstata ventral de machos e no interior dos alvéolos e ductos foi encontrada uma secreção glicoprotéica. As células epiteliais apresentaram intensa atividade exócrina, levando a crer que essa substância pode ser denominada como líquido prostático feminino (2, 4).

1.3 DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA

O desenvolvimento da próstata ocorre no seio urogenital (UGS) e requer uma refinada coordenação de sinalizações parácrinas, sendo regulado por expressão gênica precisa espacial e temporalmente (16-18). O UGS é um tubo originado do intestino primitivo que apresenta uma terminação caudal chamada cloaca. Uma membrana denominada septo urorretal biparte a cloaca, originando então um acentuado UGS ventral e o reto primitivo. Esse evento ocorre por volta do 13º ao 14º dia de desenvolvimento intrauterino em ratos, período no qual o UGS é diferenciado em bexiga urinária e UGS definitivo (Fig. 3) (13, 19-24).

O UGS é formado basicamente por uma camada central de tecido epitelial originado do endoderma, denominado epitélio urogenital (UGE) e por uma camada de tecido conjuntivo indiferenciado oriundo do mesoderma, denominado mesênquima urogenital (UGM) (13, 19-24).

Os UGSs de machos e fêmeas não são diferenciados, apresentando uma morfologia semelhante até por volta do 17º e 18º dia de gestação em roedores, até que começa a ocorrer modificações, pois, com a diferenciação das gônadas, as células de Leydig presentes no testículo fetal iniciam a produção da testosterona, sendo esse andrógeno o principal responsável pela iniciação da morfogênese prostática (13, 19-24).

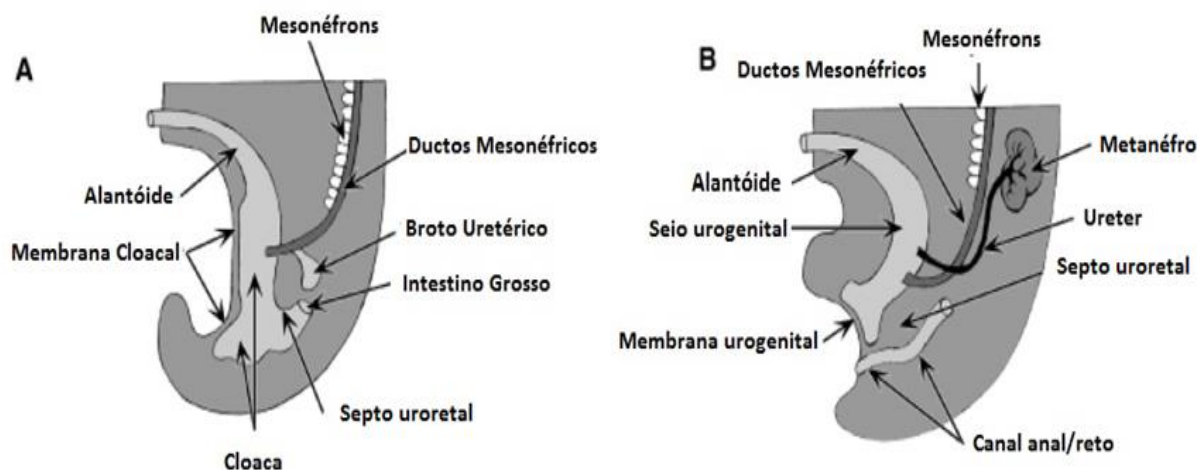


Figura 3: Desenvolvimento do seio urogenital. **A:** demonstra que o seio urogenital sem a divisão da cloaca. **B:** a cloaca se origina após o crescimento do septo uroretal, delimitando o seio urogenital definitivo e o canal anal primitivo. Adaptada de Staak et al. (1).

O desenvolvimento da próstata em roedores inicia por volta do 15,5º dias após a concepção (dpc) e finaliza por volta de 2 semanas após o nascimento. Este processo diverge de humanos, onde a morfogênese prostática inicia por volta da 10ª semana de gestação e termina antes do nascimento. Existe uma variedade de roedores sendo utilizados para estudos de desenvolvimento da próstata, e com isso ocorrem algumas divergências em relação ao período de início da morfogênese prostática, pois existe variação entre as espécies (18, 20, 25).

O desenvolvimento da próstata de roedores é caracterizado por cinco estágios bem definidos: (1) determinação, (2) iniciação ou brotamento, (3) morfogênese de ramificação, (4) diferenciação e (5) maturação puberal. A determinação (ocorre por volta do 15,5º dpc) corresponde a fase em que eventos moleculares oriundos do UGM estimulam uma área específica do UGS, onde ocorrerá o desenvolvimento da próstata. A fase de brotamento ou iniciação (ocorre do 16,5º/17,5º até o 19º dpc em camundongos, e do 18,5º até o 21º em ratos),

quando pequenas projeções oriundas do UGE tornam-se salientes, invadindo o UGM nas regiões ventral, dorsal e lateral em direção caudal, tomando-se como referência a bexiga urinária. O brotamento termina ao nascimento e caracteriza-se pela não diferenciação completa dos lobos prostáticos (19, 20, 25-27).

Após o nascimento inicia a morfogênese de ramificação. Nessa fase os brotos provindos do UGE conseguem ultrapassar a camada muscular periuretral localizada em torno do UGM e entram em contato com um tecido conjuntivo indiferenciado, localizado ventralmente denominado mesênquima condensado ventral (vmp). Na fase de diferenciação ocorre a ramificação dos brotos, sendo eles estimulados por sinalizações parácrinas, adquirindo características típicas de cada lobo da próstata do roedor, sendo essa fase finalizada 15 a 30 dias após o nascimento. A fase de maturação ocorre na puberdade quando o nível sérico de andrógenos começa a se elevar (19, 20, 25-27).

Estudos descrevem que todo o processo de morfogênese prostática é estimulado principalmente por hormônios esteróides. A ativação de receptores de andrógenos (AR) no UGM desencadeia uma produção de fatores parácrinos que ativam uma cascata de eventos responsáveis por sinalizações entre UGM e UGE. Essa interação entre o mesênquima e o epitélio do UGS corresponde ao principal evento para a formação da próstata, pois os fatores parácrinos ativam a proliferação epitelial e coordenam todo o desenvolvimento prostático, estimulando, orientando e/ou inibindo a proliferação celular (13, 19-21).

Os principais e mais bem estudados fatores parácrinos que estimulam a morfogênese da próstata são os fatores de transcrição homeobox NKx3.1, Hoxa-13, Hoxb-13 e Hoxd-13, o fator de crescimento de fibroblasto FGF-7 e FGF-10, a glicoproteína Sonic hedgehog (Shh), o receptor de Shh, patch (ptc) e os fatores de transcrição da família Gli, proteínas de morfogênese óssea BMP-4 e BMP-7, fatores de transcrição Forkhead Box (FoxA1 e FoxA2), geneg da família Sox (Sox9), via de sinalização Notch (receptores Notch1 e ligantes Jagged1, Jagged2 e Delta Like1) e o gene Wnt (13, 19-21).

Os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento da próstata feminina ainda não são conhecidos, porém sabe-se que a sua morfogênese é dependente de andrógenos. Segundo Thomson et al. (22), a formação da próstata em fêmeas de

roedores pode estar relacionada a diversos fatores, como níveis aberrantes de testosterona, aumento da sensibilidade androgênica ou mesmo em decorrência de um programa intrínseco da organogênese.

1.4 PAPEL DOS ANDRÓGENOS E ESTRÓGENOS NA PRÓSTATA

O desenvolvimento da próstata é dependente de hormônios esteróides. Assim, os andrógenos são fundamentais para essa glândula tanto no desenvolvimento embriológico e pós natal, bem como para garantir a sua maturação e funcionalidade durante a puberdade e vida adulta (28).

Além do receptor androgênico (AR), outros receptores nucleares, como o receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e o receptor de estrógeno beta ($ER\beta$), são necessários para o desenvolvimento da próstata. Esses receptores são expressos temporal e espacialmente em momentos específicos do desenvolvimento e manutenção funcional da próstata. O AR é um membro da família de receptores nucleares, e é ativado pela sua ligação com a testosterona ou dihidrotestosterona (DHT), regulando a expressão específica de genes alvos (29). Enquanto que o $ER\alpha$ é expresso predominantemente no mesênquima, durante estágios iniciais do desenvolvimento, o $ER\beta$ tem sua expressão localizada no epitélio durante as fases de diferenciação das células epiteliais prostáticas (19).

Nos machos os principais esteróides são os andrógenos, responsáveis pelas características sexuais na embriogênese e puberdade. No adulto, os andrógenos são importantes na manutenção das funções reprodutivas e no comportamento. Além dos efeitos na reprodução, os andrógenos têm ação em outros tecidos como a pele, ossos, músculos e cérebro (32).

A testosterona é o mais importante andrógeno secretado pelos testículos e o principal andrógeno presente no plasma do adulto (8). Esse andrógeno pode sofrer uma conversão irreversível a DHT, reação catalisada pela enzima 5α -redutase, ou pode ser convertido em estrógenos, pela enzima aromatase (8).

No ano de 1991 foi reconhecido a existência de dois tipos de 5 α -redutase. A isoenzima 1 é expressa na pele ao nascimento, e permanentemente na pele e outros tecidos após a puberdade. A isoenzima 2 é expressa no trato urogenital de machos e fêmeas durante os estágios iniciais da embriogênese e durante a vida adulta no trato urogenital e na pele genital. Essa enzima exerce um papel fundamental na diferenciação sexual, maturação e manutenção dos tecidos urogenitais masculinos (8). Uma terceira forma da isoenzima foi identificada no tecido prostático em nível de RNAm, posteriormente utilizando técnicas de imunomarcacão, verificou-se que a enzima 5 α -redutase-3 localizava-se nas células basais dos ácinos prostáticos (33).

Em relação ao estradiol, os níveis são altos durante a vida fetal e no início da vida neonatal, tanto em humanos quanto em roedores. Durante o desenvolvimento em humanos, há um aumento dos níveis endógenos de estradiol materno e este aumento tem sido relacionado com o surgimento de metaplasia escamosa durante o desenvolvimento prostático, contudo esta alteração é transitória, regredindo rapidamente após o nascimento (25). Além disso, o desenvolvimento prostático pode ser influenciado por estrógenos exógenos e, dependendo do período e do nível de exposição, estes estrógenos podem causar alterações epigenéticas permanentes (*"imprinting"*) que podem causar efeitos agudos e a longo prazo (34).

O equilíbrio entre andrógenos e estrógenos é de suma importância na manutenção da próstata durante a vida adulta. Geralmente, com o envelhecimento, os níveis de estradiol se mantem constantes, enquanto os níveis de testosterona decrescem, causando um desequilíbrio hormonal que pode predispor ao desenvolvimento de doenças prostáticas (35).

A ativação dos estrógenos mediante ER α pode ocasionar diferentes alterações como: proliferação desregulada, inflamação e câncer de próstata. No entanto, ER β está relacionado com efeitos benéficos dos estrógenos, como atividade anti-proliferativa, anti-inflamatoria, e anti-carcinogenica (35).

1.5 GERBILO (*Meriones unguiculatus*) COMO MODELO EXPERIMENTAL

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um roedor da família Muridae, subfamília Gerbillinae (Fig. 4). Ele é um animal originário da China e Mongólia e foi introduzido nas Américas como uma nova proposta de modelo experimental por Victor Schwentker. Esses animais apresentam um comportamento dócil, micção infrequente, são menores que os ratos e maiores do que os camundongos, apresentam fácil manuseio em laboratório e tem comportamento monogâmico, tornando-o um excelente modelo experimental (3, 5).



Figura 4: *Meriones unguiculatus*

O gerbilo vem sendo amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa desde 1960, pois apresenta uma próstata lobulada como a maioria dos roedores, porém mais compacta e com relativa similaridade morfológica, histoquímica e ultraestrutural com a próstata humana (10).

Apesar da próstata desse animal apresentar quatro pares de lobos, como outros roedores, diverge na nomenclatura e na constituição histológica dos lobos. O termo lobo ventral permanece sendo utilizado, porém o lobo dorsal passa a ser chamado de lobo dorsolateral, o lobo lateral denominado lobo dorsal e o lobo anterior chamado de glândula coaguladora (Fig. 5).

Histologicamente, esses lobos apresentam semelhanças, sendo formados por um epitélio secretor, um estroma subepitelial rico em músculo liso que circunda os alvéolos, e por um estroma intersticial que envolve e sustenta as unidades secretoras. Algumas diferenças são notadas entre os lobos, como o tamanho das

unidades secretoras, a altura das células epiteliais, a composição e aspecto das secreções e a organização do estroma. (3, 5).

A próstata da fêmea desse animal é composta de dois lobos laterais a uretra, denominados lobos parauretrais, que apresentam similaridade ao lobo ventral dos machos (16). Estudos demonstraram que a próstata dessas fêmeas é sensível à estímulos hormonais, tanto endógenos quanto exógenos. Esta glândula desenvolve espontaneamente desordens prostáticas, como hiperplasias, neoplasia intraepitelial prostática e adenocarcinomas microinvasivos (6, 16, 36).

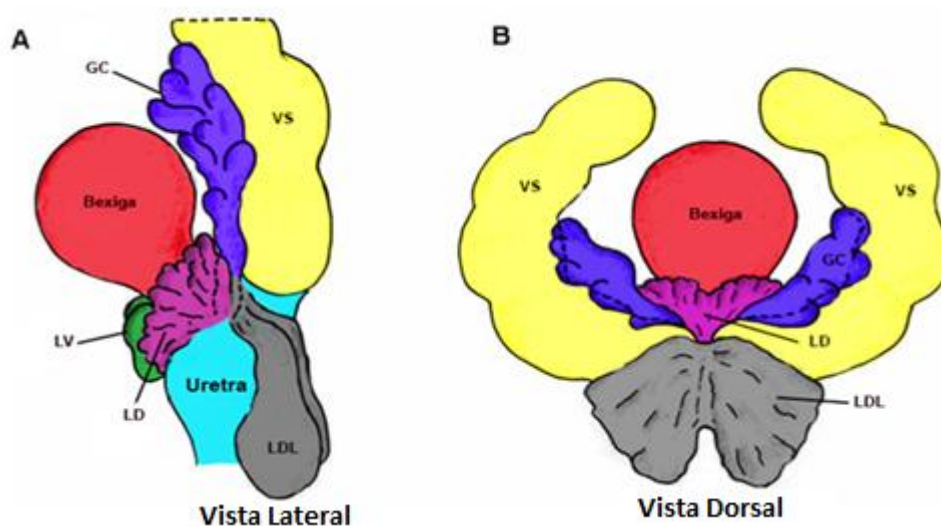


Figura 5: Representação esquemática da próstata de gerbilos machos. O esquema demonstra a lobulação da próstata de gerbilo e sua nomenclatura específica. Vesícula seminal (VS – amarelo), bexiga urinária (vermelho), Lobo dorsal (LD – rosa), lobo ventral (LV – verde), lobo dorsolateral (LDL – cinza) e glândula coaguladora (GC – azul). A: vista lateral. B: vista dorsal. Adaptado de Rochel et al. (3).

1.6 QUÍMICOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Desde a década de 90 sabe-se que muitos químicos ambientais e industriais podem causar desordens no sistema endócrino de humanos (37).

Suspeitava-se que o período e a duração da exposição a estes químicos durante o desenvolvimento agravariam essas desordens hormonais em crianças e, futuramente, nos adultos. Essas substâncias foram chamadas de químicos de disruptão endócrina (QDE). Atualmente já é sabido que esses poluentes ambientais podem comprometer o desenvolvimento de órgãos do aparelho reprodutor (37, 38).

Os QDE, também chamados de xenobióticos, podem apresentar ação estrogênica ou antiestrogênica, sendo designados xenoestrogênicos. Os QDE com ação estrogênica são capazes de mimetizar estrógenos (agonista) e ligar-se ao receptor de estrogênio (ER), ou bloquear a sua ação (antagonista), sendo então essas as características para configurar um QDE como um agente estrogênico (Fig. 6) (39).

Os QDE podem agir através de diferentes mecanismos alterando a síntese, secreção, transporte e eliminação hormonal e causando alterações epigenéticas em diversos órgãos e sistemas (39, 40).

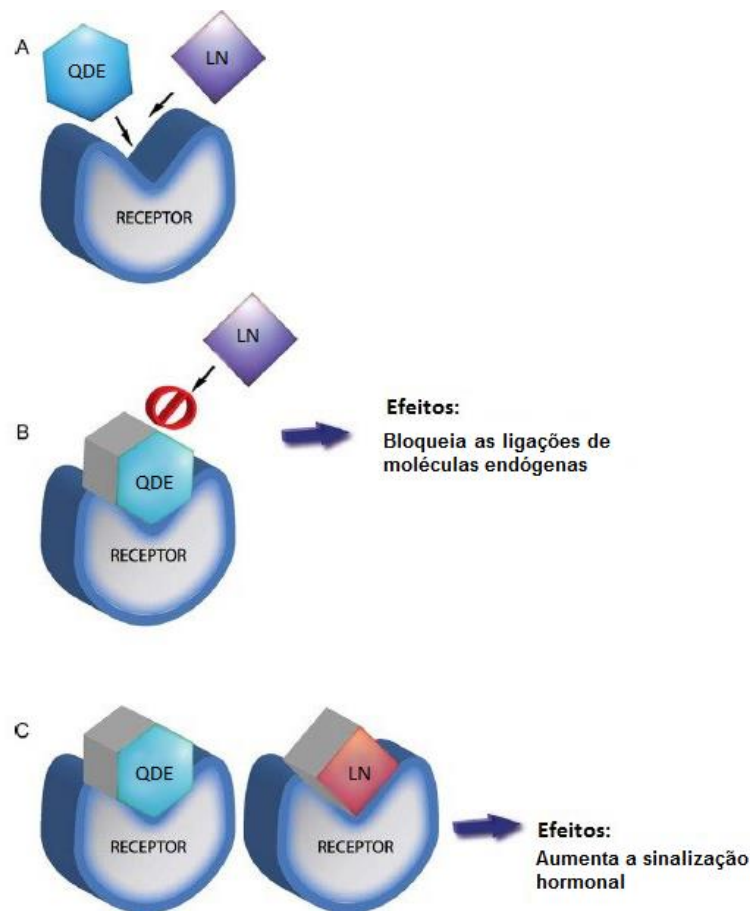


Figura 6: Interação de QDE nos receptores e sua competição com os ligantes naturais (LN). A: o QDE competindo com uma molécula endógena pelo sítio de ligação no receptor. B: Ligação do QDE com o receptor e consequente bloqueio da ligação da molécula endógena. C: ligação do QDE e da molécula endógena, tornando a sinalização acentuada. Adaptado de Rogers et al. (41).

Os QDE com função estrogênica e/ou androgênica podem ser encontrados nos alimentos, no meio ambiente, na água, nos vegetais e em diversos materiais

produzidos pelo homem como pesticidas, plásticos, derivados do fenol, ftalatos, dioxinas e outros (38, 41).

Disruptores de ação estrogênica, tais como dietilestilbestrol, etinilestradiol e bisfenol-A têm sido estudados por pesquisadores do mundo inteiro, visto que a exposição a estes compostos durante períodos críticos do desenvolvimento pode causar alterações permanentes em diversos órgãos reprodutivos de fêmeas e machos (19, 25, 37).

1.6.1 Bisfenol – A

O Bisfenol-A (BPA) é um componente químico branco, sólido e cristalino, solúvel em óleo e pouco solúvel em água. Pertence ao grupo dos fenóis com grupo hidroxila ligados diretamente nos anéis aromáticos (Fig. 7). A presença do grupo hidroxila o torna reativo e pode ser convertido em éteres, ésteres e sal.

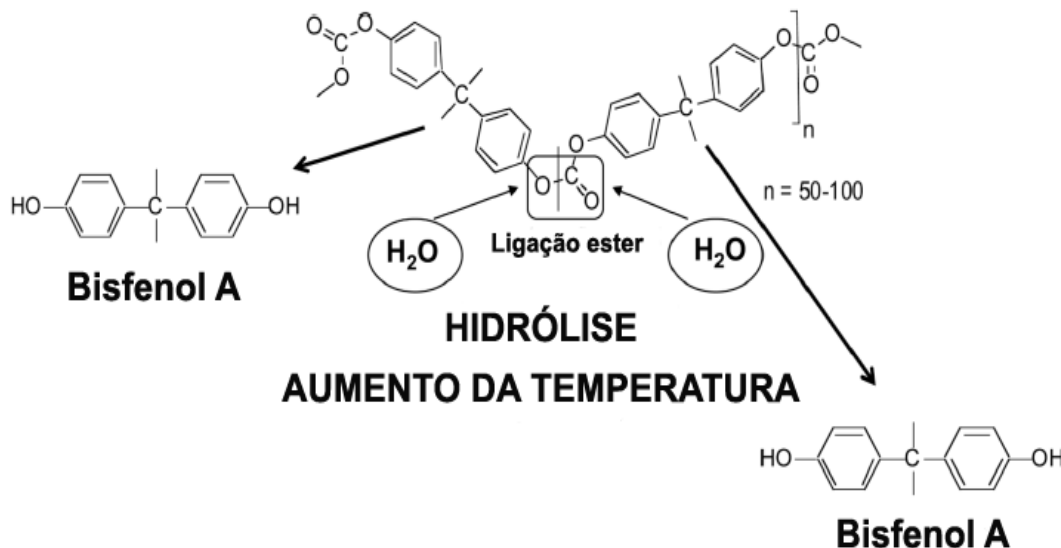


Figura 7: Representação de moléculas de polycarbonato. O polycarbonato é composto de moléculas de Bisfenol-A unidas pela ligação de ésteres. As ligações ésteres são suscetíveis à hidrólise quando expostas a altas temperaturas ou alterações de pH. Quando hidrolisado, o Bisfenol-A é liberado no meio circundante. Adaptado de Taylor et al. (44).

O BPA foi sintetizado em 1891 por Alexander P. Dianin e, em 1930, foi extremamente analisado para investigar sua ação estrogênica (42). Hoje sabe-se

que o BPA é um QDE com ação estrogênica, pois esse químico compete com o estradiol pelos receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) (43).

Em 2010, o Canadá foi o primeiro país a declarar o BPA como um produto nocivo à saúde e ordenou a retirada desse QDE da fabricação de mamadeiras. Em 2011, na Europa, o BPA foi banido da produção de produtos infantis (41).

Estudos mostraram que o BPA pode ser encontrado em diferentes concentrações nos alimentos cultivados com água contaminada, em água aquecida em vasilhas de plástico, soro humano, líquido amniótico, sangue de neonatos, placenta, cordão umbilical e leite materno. Em algumas espécies de vertebrados aquáticos há uma alta concentração de BPA em regiões específicas do corpo, como no tecido muscular e hepático (41).

Atualmente o BPA é utilizado amplamente no mundo para a produção de policarbonato, tubulações de água, recipientes para alimentos, garrafas, brinquedos, mamadeiras, equipamentos médicos, produtos odontológicos, aparelhos eletrônicos e disco CD/DVD, estabilizador antioxidante, na produção de cloreto de vinilo e produção de papel térmico (42).

O papel térmico é produzido em grandes quantidades, pois é usado no registro de recibos, livros, fax e rótulos. Após a reciclagem esse papel é utilizado para a produção de folhetos, bilhetes, envelopes de correspondência, jornais, rolos para cozinha, papel higiênico e caixas de alimentos, comprovando que o ser humano estará em contato com esse QDE constantemente (41, 42).

Segundo a Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos a exposição ambiental ao BPA, considerada segura para o ser humano, é de cerca de 0,05 mg/kg/dia, e seu limite de migração proveniente de embalagens é de 3 mg/kg de alimentos. Já a União Europeia normatiza que o contato do ser humano com o BPA não deve ultrapassar 0,1 ng/ml em águas e alimentos por dia (43).

Apesar de haver determinações de países para limitar o contato com esse QDE, estudos vem demonstrando que não somente a temperatura (Fig. 9) pode estimular a liberação desse poluente das embalagens de alimentos e recipientes de

água, mais também a variação de pH que pode então aumentar sua concentração em certos produtos expostos a essas variantes (44, 45).

A utilização do BPA pela população vem causando um grande impacto no meio ambiente, pois, após exaustivas pesquisas realizadas e que estão em andamento, há evidências de que o BPA pode ser encontrado na atmosfera, rios e afluentes e poeira. A exposição por várias vias ao BPA pode então contribuir para desordens não somente no aparelho reprodutor, mas em todo o organismo (42).

Castro (2013) reforça a ideia de que o BPA apresenta efeito de disruptor endócrino sobre o sistema reprodutor, pois em roedores expostos a diferentes concentrações de BPA ocorre uma perturbação na expressão das enzimas 5 α -redutase e aromatase, sendo essas enzimas primordiais no desenvolvimento de patologias prostáticas (46).

Baseado no acima exposto, o BPA apresenta uma ação estrogênica e/ou antiandrogênica, pois mimetiza hormônios e se liga ao seu receptor desencadeando reações adversas. Deste modo, é de fundamental importância entender os efeitos desse QDE no período pós-natal, pois nessa fase a próstata está passando por um momento crítico do seu desenvolvimento (morfogênese de brotamento) e alterações hormonais podem desencadear distúrbios nesse período e ser a chave para o desenvolvimento de patologias associadas a esse órgão em fases tardias da vida.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição de bisfenol-A sobre o desenvolvimento pós-natal da próstata de gerbilos machos e fêmeas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever, comparativamente, a morfogênese prostática em machos e fêmeas de gerbilos com oito dias de desenvolvimento pós-natal, tanto sob condições normais de desenvolvimento, quanto expostos ao BPA.
- Avaliar se a exposição a diferentes concentrações de BPA pode causar alterações morfológicas e morfométrico-estereológicas na próstata de ambos os sexos.
- Analisar e quantificar, por métodos imunohistoquímicos, o padrão de imunomarcção dos receptores para andrógenos (AR) e estrógenos (ER α).
- Avaliar se os níveis de BPA empregados neste estudo podem alterar a morfofisiologia prostática, observando se existe um efeito de dose-dependência a este químico ambiental.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

As fêmeas e machos de gerbilos (*Meriones unguiculatus*) que foram empregados neste experimento eram provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto (SP), e foram mantidos no biotério da Universidade Federal de Goiás, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, sendo fornecidas água filtrada e ração “*ad libitum*”. Os experimentos foram realizados segundo o protocolo da comissão de ética no uso da Universidade Federal de Goiás (CEU Nº 024/13).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste experimento foram utilizadas 30 fêmeas de gerbilo virgens adultas e 30 machos adultos (90 a 120 dias de idade). Cada uma destas fêmeas foi mantida com um macho da mesma idade para que ocorresse o acasalamento e o nascimento da primeira geração. Ao confirmar o nascimento pela manhã, foi realizado o esfregaço vaginal para a detecção de espermatozoides. O dia da observação dos espermatozoides foi considerado como dia zero, sendo o marco do início da contagem. Confirmado o nascimento as famílias foram destinadas, aleatoriamente, a formarem três grandes grupos experimentais, como descritos a seguir:

Grupo controle (C): 10 fêmeas grávidas permaneceram intactas até o parto. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero. Do dia 1 ao dia 7 de vida pós-natal os filhotes machos e fêmeas receberam, via gavagem, doses diárias do veículo de diluição (10 µl óleo mineral – Nujol/Mantecorp). As fêmeas e machos da ninhada foram eutanasiados com 8 dias de idade.

Grupo bisfenol-A (LBPA): 10 fêmeas grávidas permaneceram intactas até o parto. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero. Do dia 1 ao dia 7 de vida pós-natal os filhotes machos e fêmeas receberam, via gavagem, doses diárias de BPA (Sigma) a concentrações ambientais (40µg/kg/dia, diluído em óleo

mineral). As fêmeas e machos da ninhada foram eutanasiados com 8 dias de idade (47).

Grupo bisfenol super (HBPA): 10 fêmeas grávidas permaneceram intactas até o parto. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero. Do dia 1 ao dia 7 de vida pós-natal os filhotes machos e fêmeas receberam, via gavagem, doses elevadas e diárias de BPA (Sigma - 4mg/kg/dia, diluído em óleo mineral). Esta dose elevada foi utilizada para avaliar possíveis efeitos de dose-dependência. As fêmeas e machos da ninhada foram eutanasiados com 8 dias de idade.

Deste modo, foram formados seis subgrupos experimentais. Cada subgrupo contendo 10 animais e durante a separação randômica, foram formados subgrupos com animais provenientes de ninhadas diferentes.

3.3 BIOMETRIA

Inicialmente foram realizadas medidas de distância anogenital (AGD) de todos os filhotes. Os animais dos subgrupos experimentais foram então anestesiados via administração intraperitoneal de anestésicos (cloridratos de ketamina e xilazina - 100µl/100g de massa corpórea), pesados e, em seguida, dissecados para a coleta da próstata. Após a dissecação, o complexo prostático feminino e a próstata ventral masculina foram pesados.

3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE CITOQUÍMICA

Após a pesagem, os órgãos coletados foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2- 0,1M, ou em metacarn (solução de metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%), lavadas em água, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em Paraplast (Histosec, Merk). Os órgãos foram seccionados a 5 µm e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) (48).

3.5 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL

Esta metodologia foi empregada para descrever o padrão de ramificação ductal prostática tanto em condições normais de desenvolvimento, quanto sob

exposição ao BPA. Após o processamento histológico, um complexo prostático de cada grupo experimental foi seccionado (5 μ m) em série e corado pela HE. A obtenção das imagens em microscopia de luz foi realizada com o microscópio Olympus BX 43 (Olympus, Japan) e o processamento das micrografias digitais sequenciais foram digitalizadas no programa CellSens Standar 1.6 (Olympus, Japan copyright © 2011). Posteriormente as imagens sequenciais foram submetidas no software Reconstruct (copyright © 1996-2007). Após o alinhamento das imagens, a uretra, os ductos e os alvéolos prostáticos foram selecionados separadamente para determinar a forma e a localização destas estruturas em cada corte. Subsequentemente, o software criou uma interface de ligação entre cada corte, e, em seguida, gerou o modelo 3D de cada grupo experimental.

3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados em série decrescente de etanol, e submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. Para a visualização dos anticorpos primários utilizou-se o kit Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System (RE7150-K) que incluiu etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (PBS 3 x 5 minutos), como se descreve a seguir: A atividade endógena da peroxidase foi neutralizada através da aplicação de Novocastra Peroxidase Block por 10 minutos, seguiu-se a isto a aplicação do Novocastra Protein Block por 5 minutos, para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e do polímero. Subsequentemente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para o receptor de andrógeno (Anti-AR, rabbit polyclonal IgG, N-20, Santa Cruz Biotechnology) ou receptor de estrógeno alfa (Anti-ER α , rabbit polyclonal IgG, MC-20, Santa Cruz Biotechnology) ou antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, mouse monoclonal IgG_{2a}, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) em uma diluição de 1:100 e mantidos a 4°C overnight. No dia seguinte foi incubado com o Novocastra Post Primary Block por 1 hora, após este tempo foi aplicado o NovoLink Polymer por 1 hora. Depois os cortes foram incubados com uma solução (1:20) de Novocastra DAB Chromogen e NovoLink DAB Substrate Buffer, respectivamente; a reação produziu um precipitado de cor castanha. Os cortes foram contrastados com Novocastra Hematoxylin, desidratadas

em series crescentes de etanol, montadas em Entellan (MERK) e avaliadas em microscopia de luz convencional.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS AR E PCNA-POSITIVAS

Para a quantificação de células AR- e PCNA-positivas foram capturadas 30 imagens (aumento de 400x) de cada grupo experimental. Para cada imagem, foi obtido o número total de células positivas e negativas por área de interesse (periuretral, muscular e parauretral). A frequência (%) de células AR- e PCNA-positivas foi obtida em função do número total de células por área. Entre células positivas e negativas, foram contadas 49.257 células para AR, e 54.317 células para PCNA.

3.8 ESTEREOLOGIA

As análises estereológicas foram realizadas no sistema de teste multipontos com 130 pontos e 10 linhas (49) para comparar a frequência relativa de cada compartimento prostático (epitélio, lúmen, estroma muscular e estroma não muscular) como descrito por Huttunen (50). Para isso foram capturados 30 campos aleatórios de cada grupo experimental (6 campos por animal; $n = 5$). Os valores relativos foram determinados pela contagem dos pontos coincidentes sobre cada compartimento em estudo, seguido da divisão destes pelo número total de pontos do sistema teste. A análise estereológica foi realizada no sistema analisador de imagens, com o programa Image Pro-Plus v6.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

3.9 ESTATÍSTICA

Os testes de hipótese utilizados para determinar a significância estatística foram o teste Kruskal-Wallis para dados de distribuição não-paramétrica e ANOVA para dados paramétricos. A determinação das diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi realizada usando o teste de Dunn's para dados não-paramétricos e o teste de Tukey's para dados paramétricos. Todas as análises foram realizadas no software Statistica 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK). O nível de

significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Todos os valores foram representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Secções de tecido prostático foram submetidos a imunofluorescência para detecção da α -actina presente na musculatura lisa (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), para isso, foi incubado em uma diluição de 1:100 *overnight*. Depois, os cortes foram incubados com o fluoróforo-conjugado com o anticorpo secundário (anti-mouse, sc-2010, IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 2 horas em temperatura ambiente. DAPI foi utilizado para identificar os núcleos das células. Os cortes histológicos foram analisados com o microscópio Zeiss Imager M2 fluorescence (Zeiss, Alemanha) e o software AxioVision (Zeiss, Alemanha).

4. ARTIGO

Bisphenol-A promotes antiproliferative effects in the postnatal prostate development of male and female gerbils.

O referido manuscrito foi submetido ao periódico "Reproductive toxicology"

Bisphenol-A promotes antiproliferative effects in the postnatal prostate development of male and female gerbils

Rodrigo Fernandes de Lima¹; Daniel Andrés Osório Rodriguez¹, Mônica Souza Campos², Manoel Francisco Biancardi¹, Iana Figueiredo Ferreira Roriz dos Santos¹, Wendyson Duarte de Oliveira¹, Gláucia Maria Cavasin¹, Mara Rubia Marques¹, Sebastião Roberto Taboga², Fernanda Cristina Alcantara dos Santos¹

¹*Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Federal University of Goiás, Samambaia II, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.*

²*University Estadual Paulista – UNESP, Department of Biology, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, 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, Federal University of Goiás, Campus II Samambaia, Goiânia, Goiás, 74001970, Brazil.*

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

Abstract

The aim of this study was to evaluate the development of male and female neonatal gerbils prostate under normal conditions and exposed to bisphenol-A (BPA). In males, three-dimensional reconstructions showed a “V”-shaped budding directed to VMP. The AR-positive immunolabelling were frequent in periurethral mesenchyme (PeM), ventral buds (VB) and muscle layer (SM), and there was a reduction in the number of PCNA-positive cells in the periurethral buds (PeB) and SM. In female, PeBs emerged from one or both sides of the urethra with a visible reduction in the paraurethral mesenchyme (PaM). AR-positive cells were reduced in PeB and PaM, becoming frequent in PeM and PaB. There was a reduction in cell proliferation of the PaB and PaM. The ER- α positive cells were less evident in PeM, SM and PaM. Thus, it can be seen that BPA exerted antiproliferative action in these glands with females being the most sensitive to BPA.

Keywords: prostatic morphogenesis, gerbil, endocrine-disrupting chemicals, AR antagonists

1. INTRODUCTION

The prostate is a reproductive system's accessory gland, and its main function includes the production of a glycoproteic secretion that is responsible for the maintenance of nutrition and the survival of the spermatozoon and the promotion of coagulation and liquefaction of the semen [1]. This non-male exclusive gland can be also found in females of mammals other than humans: the *primates*, *rodentia*, *carnivora*, and *lagomorfa* [2-6].

The prostatic morphogenesis takes place in the urogenital sinus (UGS), an endodermic tubule-like structure derived from the primitive intestine that ends in the cloaca [7]. The UGS, which is formed by an epithelial (UGE) and mesenchymal (UGM) region, is present in all mammals of both genders, being originated in the 13th day of embryonic development in rodents and in the 7th gestation week in humans [8].

The prostatic organogenesis is induced by androgens, necessary to initiate the gland development to continue its neonatal and embryonic growth; it is also used to

1 set off the prostatic secretory activity in puberty [9], having its androgenic action not
2 directly performed on epithelial cells. Under the androgen's influence, the growth and
3 differentiation of the prostatic gland is ruled by specific paracrine factors produced
4 and secreted by the mesenchymal cells. Thereafter, the differentiation of epithelial
5 cells leads to an increase of androgenic receptor (AR) levels followed by an induction
6 of epithelial estrogenic (ER β) and stromal (ER α) receptor expression. In normal
7 development, the ER α acts in a paracrine manner, stimulating epithelial proliferation,
8 whereas ER β are related with quiescence [10].

9 The prostatic embryogenesis includes a gap of development where
10 morphoregulatory genes are expressed in specific locations and times. Sensitive
11 exogenous interferences, such as an exposure to environmental endocrine
12 deregulator chemicals, can alter such equilibrium, predisposing this gland to the
13 development of irreversible alterations throughout an individual's life [8, 11].

14 A vast number of endocrine deregulators mimic endogenous hormones [12].
15 An example is Bisphenol-A (BPA), a synthetic monomer-like chemical applied in the
16 production of polycarbonate plastics, which is widely scattered in the environment
17 [13]. BPA is a crystalline, solid white component very soluble in oils but not very
18 soluble in water [14]. It was first synthesized in 1891 by Alexander P. Dianin and, in
19 1930, began to be studied with the view of investigating its estrogenic action [15].
20 Nowadays, it is known that BPA acts as an endocrine deregulator, vying with
21 estradiol for the alpha (ER α) and beta estrogenic receptors (ER β) [16].

22 Recent studies have shown that BPA is found in different concentrations in
23 food cultivated with contaminated water or in heated plastic dishes made by
24 polycarbonate [15]. This compound is vastly used in the production of plastic
25 receptacles for food, water tabulations, toys, baby bottles, medical and electronic
26 devices, dental products, CD/DVDs, antioxidant stabilizers, vinyl chloride and thermal
27 papers [15, 17].

28 According to the American Environmental Protection Agency (EPA), the safe
29 exposure to BPA for humans is about of 0.05 mg/kg/day, and its migration limit for
30 food packaging is 3 mg/kg. The European Union regulates that the amount of BPA
31 must not exceed 0.1 ng/ml in food and water [16].

32 Many studies appear to suggest that exposure to BPA presents effects on the
33 prostate gland. There is substantial evidence indicating that this endocrine
34 deregulator leads to permanent epigenetic alterations in the prostatic genome,

enhancing thereby the risk of cancer development with aging [18]. However, there is a discrepancy in the obtained results when the concentrations of BPA and the time of exposure assessed are very variable [19]. Hence, many questions need to be answered as how BPA can influence prostatic development, increasing the risk of cancer in the prostate, and regarding which stages of life are most susceptible to the hormonal disequilibrium caused by BPA [20].

Therefore, it is very important to evaluate the effects of exposure to BPA during the critical periods of prostatic development. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is considered an ideal model for such study since it presents a significant human prostate homology and has shown crucial outcomes to a variety of hormonal therapies and/or to exposure to environmental chemicals [21-24]. The objective of this study was to morphologically evaluate the neonatal development of the prostate gland of male and female gerbils in normal conditions and under exposure to different concentrations of BPA.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental design

The animals were provided by the São Paulo State University (UNESP; São José do Rio Preto), maintained in polyethylene cages under controlled conditions of light and temperature, and provided with filtered water and rodent food *ad libitum*. 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 the Care and Use of Laboratory Animals.

We used 30 adult female and 30 adult male (between 3 and 4 months old) gerbils (*Meriones unguiculatus*, *Muridae: Gerbillinae*) for mating. We matched, randomly, one male and one female to form independent families. The mating day was determined by the presence of spermatozooids in the vaginal smears; this day was considered day 0, being the initial day of the pregnancy period [25]. After birth, the males and females of the litter were destined to form three experimental groups as follows: the control group (C), male and female pups received from the 1st until the 7th postnatal day (PND) by gavage and daily doses of vehicle dilution (10 µl mineral oil Nujol/Mantecorp); the low BPA group (LBPA), male and female pups received

from the 1st until the 7th PND by gavage and environmental doses of BPA (Sigma, 40 µg/kg/day diluted in mineral oil); and the high BPA group (HBPA), male and female pups received from the 1st until the 7th PND by gavage and high doses of BPA (Sigma, 4mg/kg/day diluted in mineral oil). The protocol of BPA treatment was adapted from Prins et al. [26]. Thus, six experimental subgroups (three male groups, $n = 10$ animals/group, and three female groups, $n = 10$ animals/group) were formed. Only one pup of each litter was randomly employed to compose each subgroup.

All pups were euthanized in the 8th PND (PND8) by a lethal dosage of anesthesia (0.1 mL/pup), which was prepared with a mixture (proportion of 1/1) of an anesthetic (Ketamine, Syntec) and a muscle relaxant (Xylazine, VETBRANDS). The body weight, prostatic complex weight (PrC - correspondent urethral segment, ventral, dorsolateral and dorsal prostate lobes in males, and correspondent urethral segment plus paraurethral glands in female) and anogenital distance (AGD) were measured, and, then, the developing prostate tissues were dissected out using a Leica stereoscopic microscope (Leica, Germany).

2.2 Light microscopy

The prostate of the PND8 animals were fixed by immersion in methacarn (proportions: methanol 60%, chloroform 30% and acetic acid 10%) for 3 hours or 4% paraformaldehyde (buffered in 0.1 M phosphate, pH 7.2) for 24 hours. After fixation, the tissues were washed in water, dehydrated in 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). The specimens were analyzed using an Olympus BX43 light microscope (Olympus, Japan), and the images were digitalized using CellSens Standard software v1.6 (Olympus, Japan).

2.3 Three-Dimensional Reconstruction

Three-dimensional reconstruction was performed to determine the pattern of prostatic budding and branching in male and females gerbils in all the groups ($n = 1$ animal/group). Serial histological sections (5 µm thickness) were obtained from the developing prostate and further stained with HE. The serial sections were analyzed

using the Olympus BX43 light microscope (Olympus, Japan) and digitalized with CellSens Standard software v1.6 (Olympus, Japan). The alignment and the reconstruction of the structures were performed with the Reconstruct software [27]. Digital images were submitted to morphometric analysis of the developing prostate buds. We determined the number, the area and the perimeter of epithelial outgrowths buds (ventral in males and paraurethral in females). These parameters of male and female prostate epithelial buds were determined as the sum of all structures in a central section of each gland ($n = 5$ prostates/group).

2.4 Stereology

The stereological analyses were carried out using Weibel's multipurpose graticulate with 130 points and 10 test lines [28], to compare the relative frequency of each component of developing prostate (epithelial buds, mesenchyme, smooth muscle, blood vessels and lumen) as described by Huttunen [29]. 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).

2.5 Immunohistochemistry

Tissue sections were subjected to immunohistochemistry to detect the androgen receptor (AR), the estrogen receptor-alpha (ER α), and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The sections were deparaffinized, rehydrated through alcohol of decreasing series, and 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. This comprises sequential stages interspersed with washing steps, which were made with Phosphate Buffer Saline (PBS). Endogenous peroxidase activity was neutralized with Novocastra Peroxidase Block after Novocastra Protein Block was used to reduce the non-specific binding of the primary antibody and polymer. Primary antibodies reactive to AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

CA, USA), ER α (rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology), and PCNA (mouse monoclonal IgG2a, SC 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) were employed at a dilution of 1:100 overnight at 4°C. On the next day, the polymers Novocastra Post Primary Block and NovoLink Polymer were used as secondary antibodies. The sections were stained with Novocastra DAB Chromogen and NovoLink DAB Substrate Buffer (proportion 1:20), and finally counterstained with Novocastra Hematoxylin. The histological sections were analyzed using an Olympus BX43 light microscope (Olympus, Japan).

2.6 AR and PCNA quantification

For AR, 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 cells was obtained as a relative frequency (%) in relation to the total number cells.

2.7 Immunofluorescence – α -actin

Tissue sections were subjected to immunofluorescence for the detection of smooth muscle α -actin (mouse monoclonal IgG_{2a}, sc-32251, IA4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), which was incubated at a dilution of 1:100 overnight. 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. The histological sections were analyzed with a Zeiss Imager M2 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) coupled to the AxioVision (Zeiss, Germany) software.

2.8 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 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The level of significance was set at 5% ($p \leq 0.05$). Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3. RESULTS

3.1. Biometry

According to Table 1, the exposure to BPA did not show significant alterations in the body and PrC weight and in the AGD of both sexes in the different experimental groups.

3.2 Three-Dimensional Reconstruction

In the male control group PND8 (Fig. 1a, b), it was observed that the buds of the ventral prostate are outgrowths of the lateral region of the urethral epithelium. These epithelial buds (PeB) grow long ventrally towards the condensed ventral mesenchyme (VMP), presenting a 'V' form branching pattern (Fig. 1a). At this stage, many PeBs stretching the urethra towards the VMP were still observed. The smooth muscle (SM) showed a large reduction in the region adjacent to the VMP. Based on the model analysis, it is possible to notice an interruption in the SM, which allows the interaction of PeB with the VMP, resulting in the formation of the ventral region of the male gerbil prostate.

In the female control group, paraurethral prostatic lobes (PaL) could be seen in the cranial region of the urethra (Fig. 1g, h). The 3D-reconstruction models demonstrated that the PeBs of females can emerge from one or both lateral regions of the urothelium in the caudal portion of the urethra. These PeBs grow long cranially inside the periurethral mesenchyme (PeM) until reaching an SM interval, which is adjacent to the paraurethral mesenchyme (PaM). Thus, these PeBs intersect the SM interval and invade the PaM, thereby initiating a ductal channeling and branching process (Fig. 1h). At this stage of development, PeBs in elongation were not observed, and all formed epithelial buds (EB) were already inside the PaM (Fig. 1h).

Significant alterations in the development pattern of the ventral prostate in males exposed to the BPA (Fig. 1c-f) were not observed. However, in the female group an apparent reduction of the PaM in both LBPA and HBPA was observed. Notwithstanding this, alterations in the budding pattern of the epithelial buds in the females of these groups were not found (Fig. 1i-l).

Comparatively, in this stage of development, the ventral prostate of males presented up to three times more EB occupying an area four times greater than the paraurethral EB of females. Still, the morphometric data showed that there are no substantial differences in the number, area or perimeter of EB between the control and treated groups of both sexes (Table 2).

3.3 Morphology and stereology

The ventral prostate of the male control gerbils presented two distinct components: a periurethral region, made up of periurethral buds (PeB), which open up in the urothelium, and a periurethral mesenchyme in differentiation (PeM), and a ventral region that is constituted of ventral buds (VB) and VMP (Fig. 2a-c). Between these two regions, exists a discontinuous and thick SM layer (Fig. 2a, b). In this stage of prostatic development, the PeB and VB showed an absent or reduced lumen and were surrounded by a thin smooth muscle layer.

Evident morphological alterations in the ventral prostates of males exposed to different concentrations of BPA during the postnatal development stage (Figs. 2d-i) were not observed. Meanwhile, stereological data (Table 1) showed a significant increase in the relative frequency of the mesenchymal compartment in the LBPA group when compared to the other groups ($p \leq 0.05$).

The female prostate gland of the PGD8 control groups (Fig. 3) showed several morphological differences when compared with the ventral prostate of males at the same age. Although this gland presented similar PeB and PeM to those observed in males, the epithelial cords that crossed through the SM did not elongate ventrally. These paraurethral epithelial cords, here referred as paraurethral buds (PaB), invaded the PaM, becoming less branched than the VB of the male prostate (Fig. 3c). The PeB and PaB formed solid buds of epithelial cells surrounded by a thin SM layer (Fig. 3b, c). In females exposed to the BPA (Fig. 3d-i), only the prostates from the HBPA group presented a PaB that was apparently more developed (Fig. 3i). Such

morphological evidence was proven by the stereological analysis of the HBPA group (Table 1) that shows a significant increase in the frequency of prostatic epithelial buds with consequent reduction in the luminal and mesenchymal frequency ($p \leq 0.05$).

3.4 Immunohistochemical analyses

3.4.1 AR

AR-positive cells in the PeB, PeM, VB and SM of male prostate gerbils PND8 of all experimental groups (Fig. 4a-i) were observed. The immunolabelling turned out significantly more intense and frequent in the PeM, VB and SM of LBPA (Fig. 4d-f) and HBPA (Fig. 4g-i) groups (Table 3, $p \leq 0.05$).

The female gerbils PND8 of both control and treated groups were AR-positive in all regions (Fig. 5a-f). In the LBPA group, an increase in the frequency of AR-positive cells in the PeM and a decrease in PeB and PaM (Fig. 5c, d; Table 4; $p \leq 0.05$) were observed. In the HBPA group, the AR-positive cells appeared to be more frequent in the PeM and PaB, nevertheless with a reduction in the PeB and PaM (Fig. 5e, f; Table 4; $p \leq 0.05$).

3.4.2 PCNA

Proliferative cells were observed in all prostatic components of the PND8 males in the C, LBPA and HBPA groups (Fig. 4j-r). However, there was a reduction in the number of PCNA-positive cells in the PeB and SM of the LBPA group (Fig. 4m-o; Table 3; $p \leq 0.05$). In the HBPA group, all prostatic tissue components in development became significantly less proliferative (Fig. 4p-r; Table 3; $p \leq 0.05$).

In the female of the control group, all prostatic compartments and mainly the cells of PaB and PaM presented a pattern that was highly proliferative (Fig. 5g, h; Table 4). The postnatal exposure to BPA promoted a significant decrease in the cellular proliferation of PaB and PaM of the LBPA and HBPA groups (Fig. 5i-l; Table 4).

3.4.3 ER α

For this study, the immunolabelling to ER α in the PND8 male gerbils was unsuccessful. However, it was seen to be ER- α positive in PeM, PaM and SM in the female prostates in all experimental groups (Fig. 5m-r). No ER α -positive cells in the epithelial buds in the groups studied were evidenced. The LBPA group presented an immunolabelling reduction in PeM and SM, whereas, in the HBPA groups, such a finding occurred only in the PaM (Fig. 5o-r; Table 4; $p \leq 0.05$).

3.4.4 α -actin

The immunofluorescence analysis for α -actin in the ventral prostate of the PND8 male control group demonstrated that this protein is abundant in the SM and scarce around the VB (Fig. 4s). The LBPA and HBPA groups, when compared to the control group, presented VBs surrounded by a thick SM layer with intense labeling for α -actin (Fig. 4t, u). In the prostate of females, no alterations in the immunolabelling patterns for α -actin in any experimental group were observed (Fig. 5s-u).

4. DISCUSSION

This study is the first to compare the postnatal development of male and female gerbil prostates under normal conditions to those exposed to different bisphenol-A concentrations.

In the PND8 male group, it can be observed that the epithelial buds in growth pass through the same 'V' elongation pattern that was previously demonstrated by Sanches et al. [25] in male gerbils with one day of age. Nevertheless, in the PND8 males, several prostatic buds elongating from the urethra towards the VMP were still observed, which indicates that the branching and elongation of the gerbil ventral prostate takes place throughout the whole first week of postnatal development, lingering until the onset of second week. This branching and elongating pattern of the prostate observed in the male gerbils is similar to that in mice in which the prostatic morphogenesis is finalized between the 15th and 30th day of postnatal life [8].

The incidence of prostate in adult females has been described for various species of mammals [30-32]. However, little has been reported about the intrauterine and neonatal development in females, with only a few reports related to different

Wistar rat strains [33, 34]. In this study, we observed that, although the female gerbil PND8 presents prostate structures homologous to those in the development of males of the same age, there are some spatial and temporal structural differences with respect to the elongation processes and ductal branching between both sexes. In gerbil females, the urethra PeB emerging from the flow rate does not show an elongation of the standard 'V' type. These lateral buds form solid strands that extend linearly across the urethra to reach the PaM, which is located in the cranial region of the urethra near the base of the bladder. Moreover, in the female gerbil PND8, all PeBs in elongation already reached PaM and began the process of ductal branching and plumbing. These results demonstrate that the post-natal development of the female gerbil prostate is earlier and more morphologically distinct than that occurring in males of the same species. In addition, for comparison, the prostate shoots of PND8 females occupy only 25% of the area of the ventral shoots of male gerbils.

In general, the data collected from the BPA exposure suggested that this compound did not changed the AGD, body weight and PrC weight of male and female gerbils in both LBPA and HBPA groups. Previous studies that evaluated the effects of different dosages of BPA in other rodent species found no alterations in these same endpoints either [35-37]. However, in our study, we evaluated different parameters, including morphometric and stereological analysis as well as immunohistochemistry. In spite of not finding alterations in the glandular morphogenesis pattern and in the prostatic morphology in both sexes of PND8 gerbils, we observed changes in the immunolabelling patterns for AR and PCNA of all animals of LBPA and HBPA groups.

In the males of LBPA and HBPA groups, an increase in the frequency of AR-positive cells in the PeM, VB and SM was observed. On the other hand, PCNA-positive cells became less frequent in the PeB and SM in the LBPA animals as well as in all compartments of the ventral prostate in the HBPA. In the VBs of HBPA, which are structures that will differentiate into the prostatic alveoli of adult males, a reduction of about 35% in the rate of epithelial cell proliferation occurred. It has already been showed that BPA can bind to AR, antagonizing its functions [14, 26, 38]. Therefore, these results indicate that BPA has triggered an antiproliferative effect in the ventral prostate of PND8 male gerbils, especially in the group exposed to high dosages (HBPA).

1 In the PND8 females, the immunohistochemical results turned out to be more
2 adverse. In the LBPA, the AR frequency increased in the PeM, and, for PeB and
3 PaM, a decrease was observed. In the HBPA group, this receptor became more
4 frequent in the PeM and PaB and less frequent in the PeB and PaM. Furthermore, a
5 reduction in the ER α - positive cells in the PeM and SM of the LBPA group and in the
6 PaM of the HBPA group was also observed. Thus, it has been found that the different
7 regions of the female prostate of PND8 gerbils presented androgenic and estrogenic
8 alpha receptors that responded in distinct manners to the BPA exposure. It is also
9 noted that this complex interaction network can be related to alterations in the cellular
10 proliferation pattern observed in this study. The immunohistochemistry for PCNA in
11 females demonstrated that a significant reduction of cells in proliferation in the PaB
12 and PaM of LBPA and HBPA groups occurred. This antiproliferative pattern was
13 especially found in the PaBs that presented a reduction of more than 50% of the
14 proliferative rate in both treatments. This postnatal proliferation reduction of PaBs,
15 structures that will differentiate into the paraurethral alveoli in adult females, can
16 compromise the physiology of the organ during the aging process. Thus, it is
17 suggested that, in PND8 female gerbils, BPA, even in low dosages, can also bind on
18 the ARs, inhibiting their androgenic function as can be observed in other studies [38,
19 39].

20 Studies that have evaluated the toxicity of reproduction organs in terms of the
21 environmental dosages of BPA during critical periods of ontogenetic development
22 (intrauterine, neonatal and pubertal) have been controversial, and, generally, the
23 different outcomes are associated with the experimental design applied [14, 40].
24 Many studies demonstrated that dosages considered 'safe' by the US Environmental
25 Protection Agency (EPA, < 50ug/kg/day) [38, 41] can still cause epigenetics
26 alterations in many organs and systems, leading to a predisposition to serious
27 lesions throughout adult life [26, 42-46]. In this study, an alteration in the ductal
28 branching pattern or in the prostatic morphology in both genders of PND8 gerbils was
29 not observed. However, the immunohistochemical methods used demonstrated that
30 the exposure to BPA alters the activity of AR, ER α and PCNA. In males, the
31 exposure to high dosages of BPA resulted in a decrease of the proliferative status of
32 all compartments of the developing ventral prostate. In females, both high and low
33 dosages were sufficient to decrease the proliferation of paraurethral buds in the
34 branching process by more than 50%. Therefore, the collected data indicate that

BPA has antiproliferative effects during the postnatal development of the animals, with more sensitivity to this endocrine disruptor in females.

5. CONCLUSION

This study revealed that the postnatal development of the female gerbil prostate is earlier and more morphologically distinct than what occurs in males of the same species. Furthermore, it can be seen that the BPA exerted a proliferative effect on the prostate gland of male and female PND8, with females being more susceptible to this environmental chemical. Based on the methodologies used in this study, it is not possible to say whether the changes observed in the prostates of newborn gerbils are activational (transient) or organizational (permanent). However, these results have great importance for public health since all individuals, from the stage of being in the uterus to senescence, are exposed to increasing levels of endocrine disrupting chemicals such as BPA.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Luiz Roberto Falleiros Júnior as well as to the other researchers from 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).

7. REFERENCES

- [1] Vezina CM, Hardin HA, Moore RW, Allgeier SH, Peterson RE. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits fibroblast growth factor 10-induced prostatic bud formation in mouse urogenital sinus. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;113:198-206.
- [2] Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*. 2003;71:402-13.
- [3] Custodio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291:463-74.
- [4] Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007;290:1233-47.

- [5] Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat.* 2002;184:341-5.
- [6] Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53:946-55.
- [7] Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development.* 2002;129:1905-12.
- [8] Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation.* 2008;76:641-59.
- [9] Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Seminars in cancer biology.* 1994;5:391-400.
- [10] Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102:1484-9.
- [11] Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 2003;253:165-74.
- [12] Toppari J. Environmental endocrine disrupters. Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation. 2008;2:260-7.
- [13] Hu WY, Shi GB, Hu DP, Nelles JL, Prins GS. Actions of estrogens and endocrine disrupting chemicals on human prostate stem/progenitor cells and prostate cancer risk. *Molecular and cellular endocrinology.* 2012;354:63-73.
- [14] Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive toxicology.* 2007;24:199-224.
- [15] Michalowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37:738-58.
- [16] Goloubkova T, Spritzer PM. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2000;44:323-30.
- [17] Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol.* 2013;53:421-30.
- [18] Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ. The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction. *Biology of reproduction.* 2009;81:807-13.
- [19] Silins I, Hogberg J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International journal of environmental research and public health.* 2011;8:629-47.
- [20] Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocrine-related cancer.* 2008;15:649-56.
- [21] Santos FC, Custodio AM, Campos SG, Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. Antiestrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and ovaries. *Biology of reproduction.* 2008;79:674-85.
- [22] Perez AP, Biancardi MF, Vilamaior PS, Goes RM, Santos FC, Taboga SR. Microscopic comparative study of the exposure effects of testosterone cypionate and ethinylestradiol during prenatal life on the prostatic tissue of adult gerbils. *Microscopy research and technique.* 2012;75:1084-92.
- [23] Biancardi MF, Perez AP, Caires CR, Goes RM, Vilamaior PS, Santos FC, et al. Prenatal exposure to testosterone masculinises the female gerbil and promotes the development of lesions in the prostate (Skene's gland). *Reproduction, fertility, and development.* 2014.
- [24] Mônica S. Campos ALVG, Daniel A. O. Rodríguez, Manoel F. Biancardi, Mara R. Marques, Patrícia S. L. Vilamaior, Fernanda C. A. Santos, Sebastião R. Taboga. Prepubertal exposure to bisphenol-A induces ER α upregulation and hyperplasia in adult gerbil female prostate. *Int J Exp Pathol.* 2015.

- [25] Sanches BD, Biancardi MF, Dos Santos FC, Goes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in mongolian gerbil. *Microscopy research and technique*. 2014.
- [26] Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reproductive toxicology*. 2011;31:1-9.
- [27] Fiala JC. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *Journal of microscopy*. 2005;218:52-61.
- [28] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.
- [29] Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat*. 1981;132:357-70.
- [30] Zaviacic M, Jakubovska V, Belosovic M, Breza J. Ultrastructure of the normal adult human female prostate gland (Skene's gland). *Anat Embryol (Berl)*. 2000;201:51-61.
- [31] Satoh H, Mori K, Furuhashi K. Morphological and immunohistochemical characteristics of the heterogeneous prostate-like glands (paraurethral gland) seen in female Brown-Norway rats. *Toxicologic pathology*. 2001;29:237-41.
- [32] dos Santos FC, Carvalho HF, Goes RM, Taboga SR. Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell*. 2003;35:447-57.
- [33] Mahoney JJ. The embryology and postnatal development of the prostate gland in the female rat. *The Anatomical Record*. 1940;77:375-95.
- [34] Mahoney JJ, Witschi E. Genetics of the Female Prostate in Rats. *Genetics*. 1947;32:369-78.
- [35] Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsch F. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;55:399-406.
- [36] Tinwell H, Haseman J, Lefevre PA, Wallis N, Ashby J. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;68:339-48.
- [37] Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Ryan BC, Gray LE, Jr. Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;102:371-82.
- [38] Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127:83-95.
- [39] Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2003;75:40-6.
- [40] Vandenberg LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2014;12:259-76.
- [41] Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitamins and hormones*. 2014;94:129-65.
- [42] Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:7014-9.
- [43] Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2008;102:134-8.

- [44] Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, et al. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biology of reproduction*. 2011;84:734-42.
- [45] Mahoney MM, Padmanabhan V. Developmental programming: Impact of fetal exposure to endocrine-disrupting chemicals on gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor mRNA in sheep hypothalamus. *Toxicol Appl Pharm*. 2010;247:98-104.
- [46] Luccio-Camelo DC, Prins GS. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127:74-82.

8. Legends

Table 1. 1. Body and prostate complex (PrC) weight and anogenital distance (AGD) measurement in control and BPA-treated gerbils ($n = 6$ animals/group). Values are means $\pm$ SEM. 2. Stereological data obtained for the male and female prostate in all experimental groups (mean $\pm$ SEM; $n = 30$ fields in 5 animals/group) *Statistically significant differences between control and treatment groups ($p \leq 0.05$). (a, b, c) superscript letters represent statistically significant differences between the experimental groups.

Table 2. Number, area and perimeter of epithelial buds (EB) in PND8 male and female gerbils ($n = 5$ prostate/group). Values are means $\pm$ SEM.

Table 3. Frequency (%) of AR and PCNA-positive cells in the male gerbil prostate of all experimental groups. Periurethral buds (PeB), periurethral mesenchyme (PeM), ventral buds (VB), ventral mesenchymal pad (VMP), smooth muscle layer (SM). Values are means $\pm$ SEM. *Statistically significant differences between control and treatment groups ($p \leq 0.05$). (a, b, c) superscript letters represent statistically significant differences between the experimental groups ($n = 30$ fields in 3 animals/group).

Table 4. Frequency (%) of AR, PCNA and ER α -positive cells in the female gerbil prostate of all experimental groups. Periurethral buds (PeB), periurethral mesenchyme (PeM), paraurethral buds (PaB), paraurethral mesenchyme (PaM), smooth muscle layer (SM). Values are means $\pm$ SEM. *Statistically significant differences between control and treatment groups ($p \leq 0.05$). (a, b, c) superscript letters represent statistically significant differences between the experimental groups ($n = 30$ fields in 3 animals/group).

Figure 1. Three-dimensional reconstruction of the PND8 male and female gerbil prostates. Blue: urethra (U); Yellow: periurethral buds (PeB) and ventral buds (VB) in

males, and PeB and paraurethral buds (PaB) in females; Red: smooth muscle layer (SM); Light blue: ventral mesenchymal pad (VMP) in males and paraurethral mesenchyme (PaM) in females. Scale bars: 100 μ m.

Figure 2. PrC sections of PND8 male gerbils. Hematoxylin-eosin method. Urethra (U), periurethral mesenchyme (PeM), ventral mesenchymal pad (VMP), smooth muscle layer (SM), periurethral buds (PeB, arrowheads), ventral buds (VB, arrows).

Figure 3. PrC and adjacent vagina sections of PND8 female gerbils. Hematoxylin-eosin method. Urethra (U), vagina (V), periurethral mesenchyme (PeM), paraurethral mesenchyme (PaM), smooth muscle layer (SM), periurethral buds (PeB), paraurethral buds (PaB), blood vessels (arrows).

Figure 4. Immunohistochemical reactions in the ventral prostate PND8 gerbils for all experimental groups. **(a-i)** Immunohistochemistry for the androgen receptor (AR). Arrowheads indicate the AR-positive cells. **(j-r)** Immunohistochemistry for the proliferation cell nuclear antigen (PCNA). Arrowheads indicate the PCNA-positive cells. **(s-u)** Immunofluorescence for α -actin. Green: alpha-actin (arrows); Blue: DAPI. Periurethral buds (PeB), periurethral mesenchyme (PeM), ventral buds (VB), ventral mesenchymal pad (VMP), smooth muscle layer (SM).

Figure 5. Immunohistochemical reactions in female gerbil PND8 prostate of all experimental groups. **(a-f)** Immunohistochemistry for the androgen receptor (AR). **(g-l)** Immunohistochemistry for the proliferation cell nuclear antigen (PCNA). **(m-r)** Immunohistochemistry for the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$). **(s-u)** Immunofluorescence for α -actin. Green: alpha-actin (arrows); Blue: DAPI. Periurethral buds (PeB), periurethral mesenchyme (PEM), paraurethral buds (PaB), paraurethral mesenchyme (PaM), smooth muscle layer (SM).

Table 1

	Male			Female		
	C	LBPA	HBPA	C	LBPA	HBPA
¹ <i>Biometry</i>						
Body weight (g)	6.4 ± 0.4	7.4 ± 0.4	6.5 ± 0.6	5.9 ± 0.5	6.4 ± 0.6	6.5 ± 0.6
PrC weight (g)	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.002	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.005
AGD (mm)	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.08
² <i>Stereology (%)</i>						
Epithelial buds*	19.1 ± 1.9	19.2 ± 1.3	19.9 ± 1.3	12.4 ± 0.7 ^a	13.8 ± 0.7 ^a	19.9 ± 1.3 ^b
Mesenchyme*	48.2 ± 1.6 ^a	55.4 ± 1.6 ^b	46.8 ± 2.3 ^a	62.5 ± 1.8 ^a	56.1 ± 1.4 ^b	52.4 ± 2.1 ^c
Smooth muscle	29.5 ± 2.4	23 ± 2	29.6 ± 3	20.2 ± 1.6	24.5 ± 1.6	23.6 ± 2.5
Blood vessels*	2.3 ± 0.4	1.8 ± 2	3 ± 0.4	2.4 ± 0.4 ^a	4.3 ± 0.6 ^b	3.1 ± 0.4 ^a
Lumen*	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.3	2.5 ± 0.5 ^a	1.3 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.3 ^b

Table 2

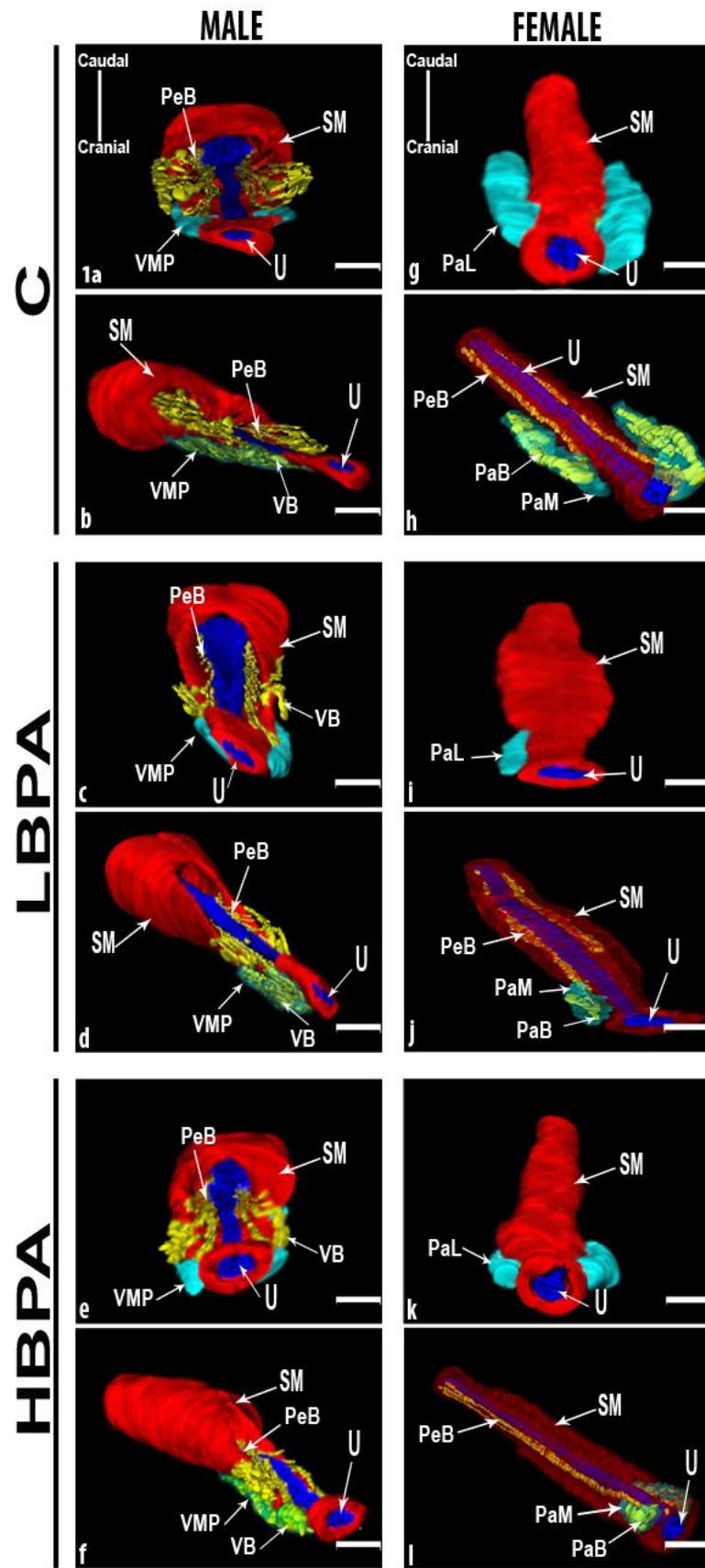
	Male			Female		
	C	LBPA	HBPA	C	LBPA	HBPA
EB number	10.4 ± 2.1	7.6 ± 1.6	10.0 ± 1.7	2.4 ± 0.2	3.2 ± 0.6	3.4 ± 0.2
EB area	10,970.9 ± 1368.9	13,991.2 ± 4254.4	15,909.3 ± 3300.1	3,021.6 ± 414.0	3,148.4 ± 686.9	3,389.6 ± 489.7
EB perimeter	1,394.5 ± 224.8	1,327.1 ± 342.5	1,650.0 ± 294.5	354.3 ± 32.5	408.8 ± 73.9	438.9 ± 35.4

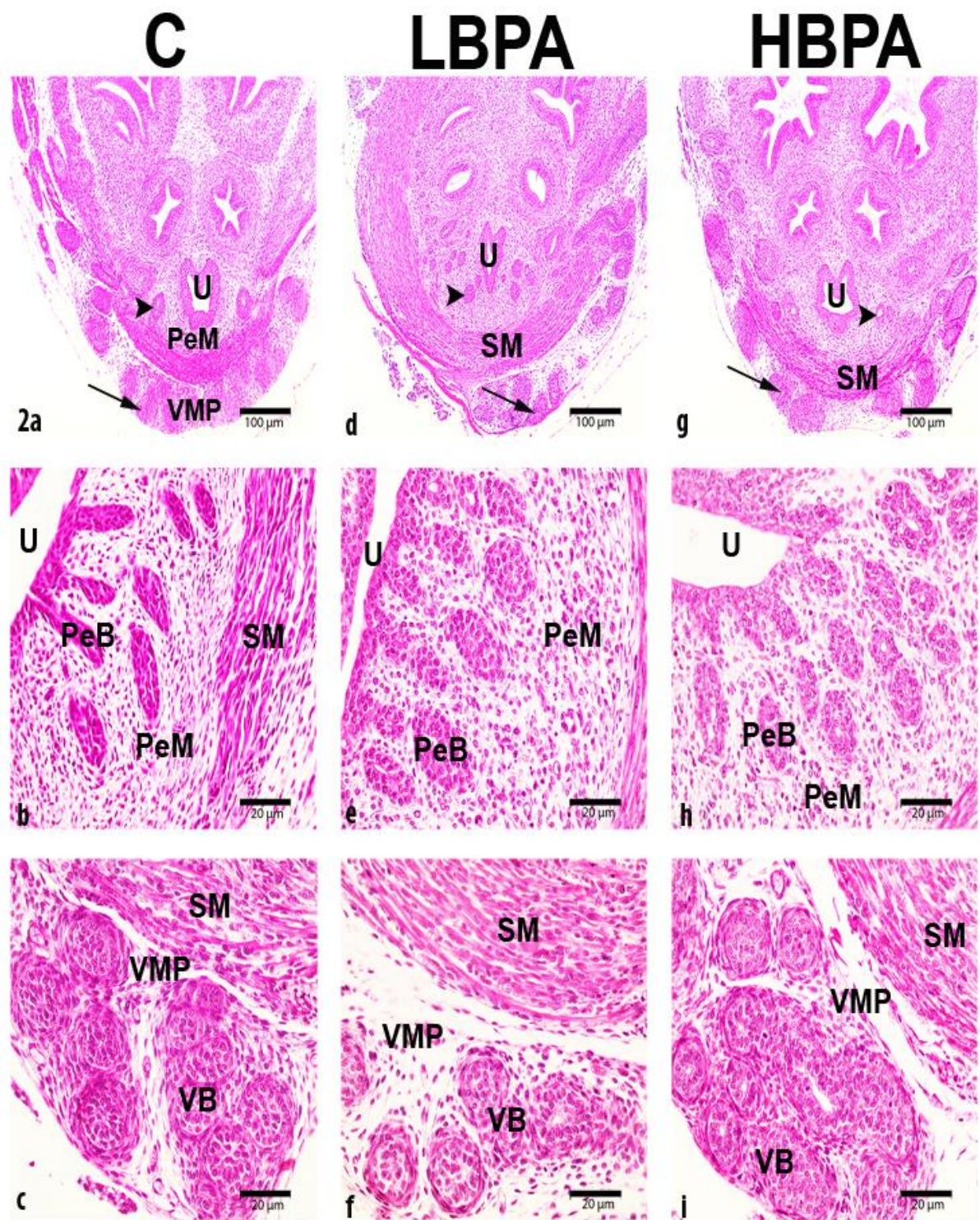
Table 3

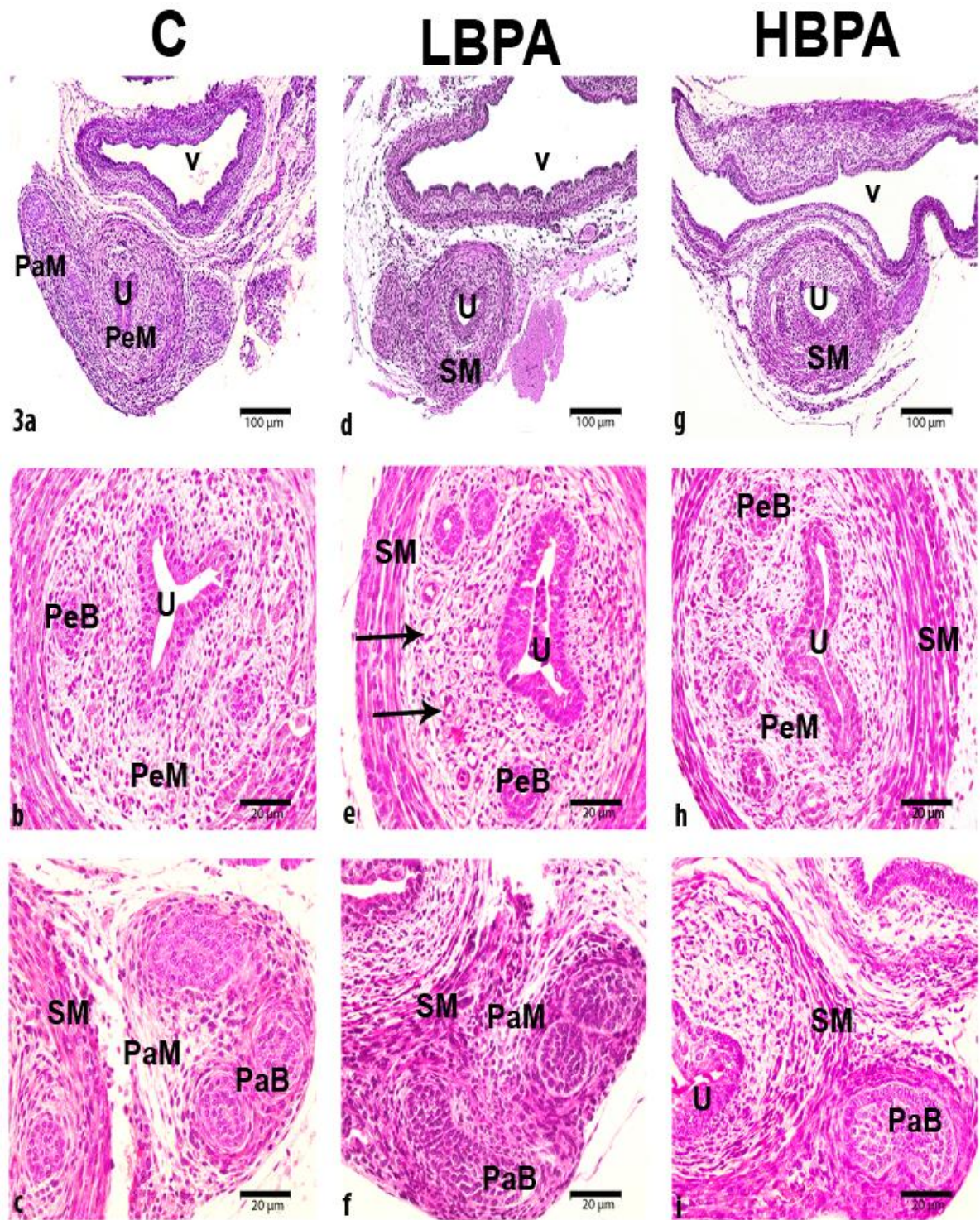
	AR			PCNA		
	C	LBPA	HBPA	C	LBPA	HBPA
PeB*	68.7 ± 2.7	70.1 ± 3.2	70.6 ± 2.1	77.8 ± 2.1 ^a	72.6 ± 2 ^b	68.1 ± 2.4 ^b
PeM*	60.6 ± 3.6 ^a	72.2 ± 1.6 ^b	73.9 ± 1.8 ^b	63.2 ± 3.1 ^a	58 ± 2.2 ^a	48.1 ± 2.1 ^b
VB*	29.4 ± 3.3 ^a	41.5 ± 4 ^b	39.3 ± 3.5 ^b	88.3 ± 2.4 ^a	89.4 ± 2.5 ^a	55.8 ± 3.7 ^b
VMP*	68 ± 2.7	70.5 ± 3.5	75.3 ± 2.8	65.7 ± 2.8 ^a	68 ± 1.9 ^a	51.1 ± 2.3 ^b
SM*	31.6 ± 1.3 ^a	39.4 ± 2.1 ^b	39.1 ± 1.8 ^b	74.1 ± 1.8 ^a	66.5 ± 1.5 ^b	47.2 ± 1.9 ^b

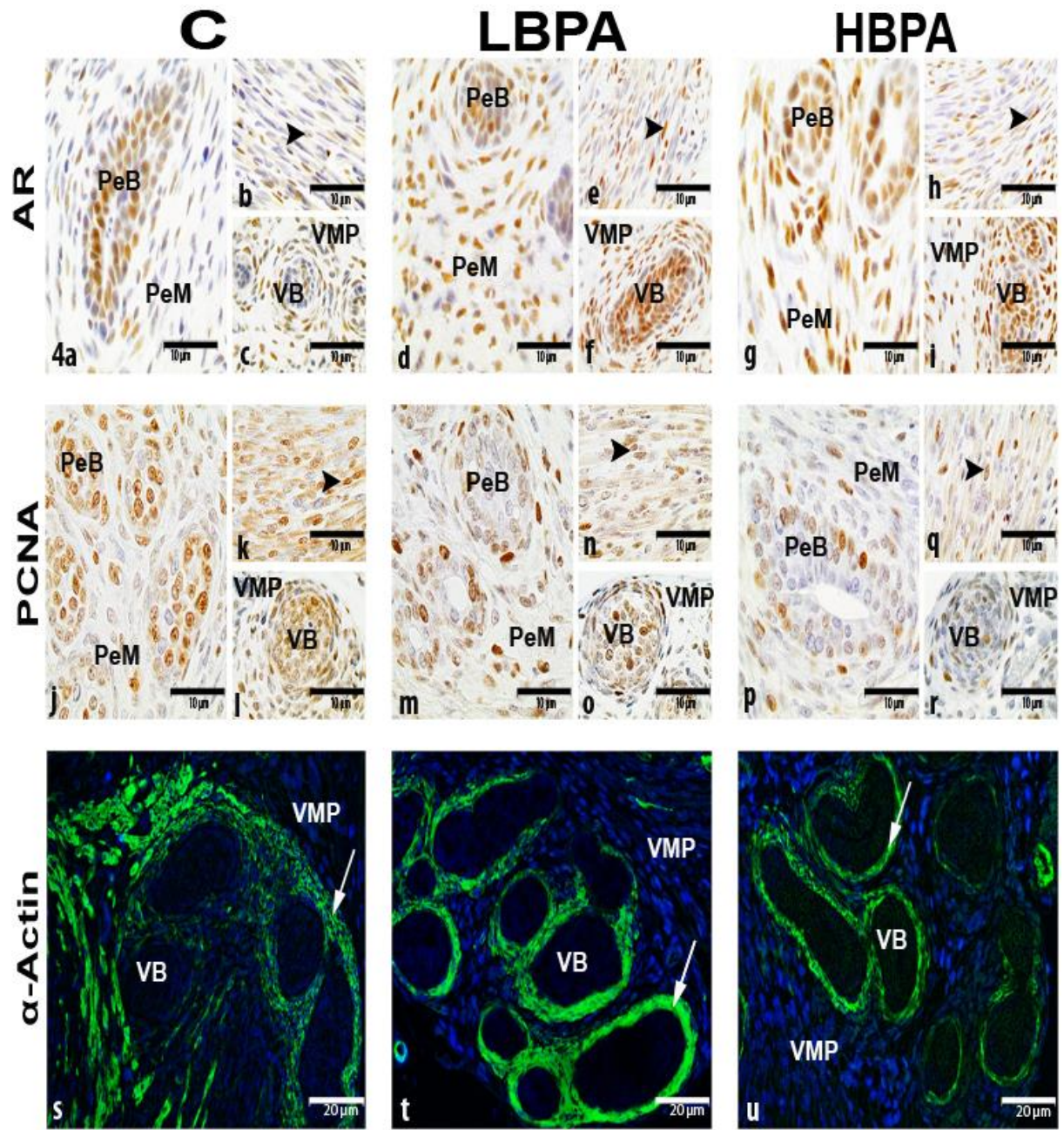
Table 4

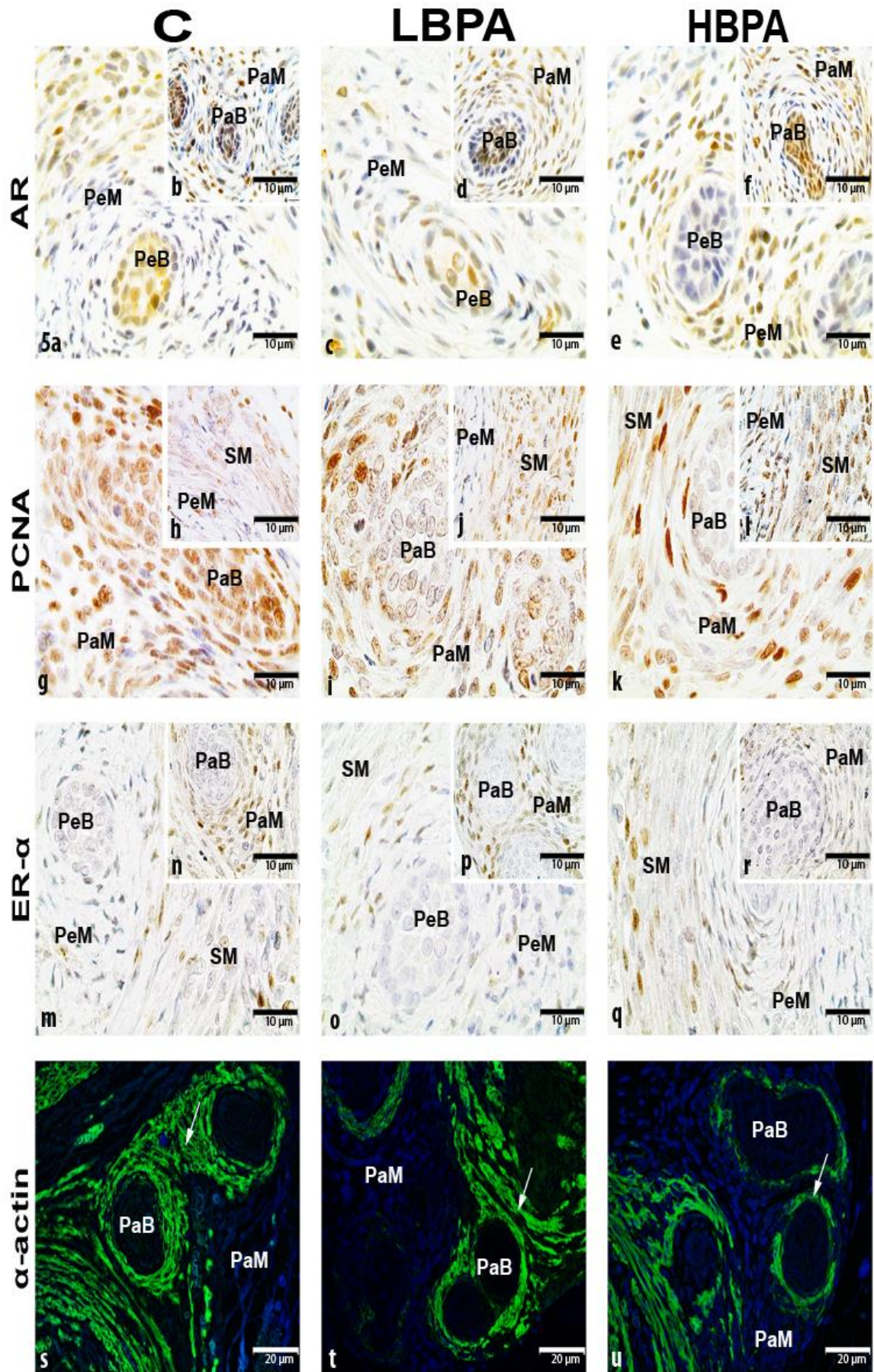
	AR			PCNA			ER- α		
	C	LBPA	HBPA	C	LBPA	HBPA	C	LBPA	HBPA
PeB*	86.5 $\pm$ 3.3 ^a	63.4 $\pm$ 7.7 ^b	56.9 $\pm$ 3.6 ^b	80.4 $\pm$ 4.1	73.5 $\pm$ 5.7	75.3 $\pm$ 2.5	-	-	-
PeM*	27.4 $\pm$ 4.2 ^a	56.4 $\pm$ 5 ^b	73.3 $\pm$ b.3 ^c	75.2 $\pm$ 2.7	67.9 $\pm$ 2.1	78.8 $\pm$ 2.3	38.3 $\pm$ 3.1 ^a	22.3 $\pm$ 2.2 ^b	44.9 $\pm$ 4.8 ^a
PaB*	70.6 $\pm$ 3.1 ^a	56.3 $\pm$ 9.2 ^a	95.9 $\pm$ 2.4 ^b	73.0 $\pm$ 9.1 ^a	33.3 $\pm$ 6.2 ^b	35.5 $\pm$ 7.1 ^b	-	-	-
PaM*	76.5 $\pm$ 4.3 ^a	37.6 $\pm$ 7.1 ^b	16.4 $\pm$ 4.8 ^c	77.3 $\pm$ 4.0 ^a	68.0 $\pm$ 3.5 ^b	66.0 $\pm$ 1.6 ^b	29.6 $\pm$ 2.2 ^a	24.0 $\pm$ 2.5 ^a	15.2 $\pm$ 1.5 ^b
SM*	51.1 $\pm$ 5.3	47.7 $\pm$ 6.5	49.9 $\pm$ 7.8	60.1 $\pm$ 2.4 ^a	66.0 $\pm$ 3.6 ^a	70.8 $\pm$ 2.9 ^b	16.4 $\pm$ 1.2 ^a	9.8 $\pm$ 1.6 ^b	18.1 $\pm$ 1.1 ^a











5. CONCLUSÕES

- Este estudo revelou que o desenvolvimento pós-natal da próstata de fêmeas de gerbilos foi mais precoce e morfologicamente distinto do que ocorre nos machos da mesma espécie;
- Pode-se observar que o BPA exerceu um efeito antiproliferativo sobre a glândula prostática de machos e fêmeas PND8;
- As fêmeas foram mais susceptíveis ao BPA durante o desenvolvimento pós-natal;
- Com as metodologias empregadas neste estudo não foi possível afirmar se as alterações observadas nas próstatas de gerbilos neonatos são ativacionais (transitórias) ou organizacionais (permanentes). Para tanto, são necessários novos estudos que avaliem a próstata destes indivíduos durante a vida adulta e senil.
- Estes resultados são de grande relevância para a saúde pública, visto que toda a humanidade, desde a vida intrauterina até a senescência, está exposta a níveis crescentes de químicos de ruptura endócrina, tais como o BPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*. 2003;71(7):402-13.
2. Custodio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291(4):463-74.
3. Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007;290(10):1233-47.
4. Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat*. 2002;184(4):341-5.
5. Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(8):946-55.
6. Biancardi MF, Perez AP, Goes RM, Santos FC, Vilamaior PS, Taboga SR. Prenatal testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil prostate. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(11):1298-309.
7. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256-69.
8. Wilson JD. The critical role of androgens in prostate development. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):577-90, ix.
9. Hayward SW, Cunha GR. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am*. 2000;38(1):1-14.
10. Valkenburg KC, Williams BO. Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer*. 2011;2011:895238.
11. Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol*. 2003;253(2):165-74.
12. Campos SG, Zanetoni C, Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *Int J Exp Pathol*. 2008;89(1):13-24.
13. F.C.A. Santos S.R. Taboga. Female prostate: a review about the biological repercussions of this gland in humans and rodents. *Animal reproduction*. 2006;3:3-18.
14. Da Silva DA, Zanatelli M, Shinohara FZ, Goes RM, Dos Santos FC, Vilamaior PS, et al. Effects of exposure to estradiol and estradiol plus testosterone on the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Microscopy research and technique*. 2013;76(5):486-95.
15. Fochi RA, Santos FC, Goes RM, Taboga SR. Progesterone as a morphological regulatory factor of the male and female gerbil prostate. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(6):373-86.
16. Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Goes RM, Taboga SR. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(7):723-33.
17. Sanches BD, Biancardi MF, Dos Santos FC, Goes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. Budding process during the organogenesis of the ventral prostatic lobe in mongolian gerbil. *Microscopy research and technique*. 2014.
18. Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*. 2004;25(3):330-7.
19. Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008;76(6):641-59.

20. Meeks JJ, Schaeffer EM. Genetic regulation of prostate development. *J Androl.* 2011;32(3):210-7.
21. Pu Y, Huang L, Prins GS. Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Developmental Biology.* 2004;273(2):257-75.
22. Thomson AA, Cunha GR, Marker PC. Prostate development and pathogenesis. *Differentiation.* 2008;76(6):559-64.
23. Wu X, Xu K, Zhang L, Deng Y, Lee P, Shapiro E, et al. Differentiation of the ductal epithelium and smooth muscle in the prostate gland are regulated by the Notch/PTEN-dependent mechanism. *Dev Biol.* 2011;356(2):337-49.
24. Thomsen MK, Francis JC, Swain A. The role of Sox9 in prostate development. *Differentiation.* 2008;76(6):728-35.
25. Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reproductive toxicology.* 2007;23(3):374-82.
26. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Scivolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, et al. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* 1999;13(8):966-77.
27. Berman DM, Desai N, Wang X, Karhadkar SS, Reynon M, Abate-Shen C, et al. Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol.* 2004;267(2):387-98.
28. Cunha GR, Tuohimaa P, Visakorpi T. Steroids and prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2004;92(4):219-20.
29. Trapman J, Brinkmann AO. The androgen receptor in prostate cancer. *Pathol Res Pract.* 1996;192(7):752-60.
30. Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology.* 1998;139(3):874-83.
31. Prins GS, Birch L. Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology.* 1997;138(5):1801-9.
32. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 2009;63(2):142-8.
33. Godoy A, Kawinski E, Li Y, Oka D, Alexiev B, Azzouni F, et al. 5alpha-reductase type 3 expression in human benign and malignant tissues: a comparative analysis during prostate cancer progression. *Prostate.* 2011;71(10):1033-46.
34. 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.
35. Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2010;118(4-5):246-51.
36. Rochel-Maia SS, Santos FC, Alonso-Magdalena P, Goes RM, Vilamaior PS, Warner M, et al. Estrogen receptors alpha and beta in male and female gerbil prostates. *Biology of reproduction.* 2013;88(1):7.
37. Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, et al. Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus. *Biology of reproduction.* 2011;84(4):734-42.
38. Rasier G, Toppari J, Parent AS, Bourguignon JP. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Molecular and cellular endocrinology.* 2006;254-255:187-201.
39. Degen GH, Bolt HM. Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health.* 2000;73(7):433-41.
40. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(19):7014-9.

41. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013;53(4):421-30.
42. Michalowicz J. Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(2):738-58.
43. Goloubkova T, Spritzer PM. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2000;44:323-30.
44. Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(1-2):83-95.
45. Mercea P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;112(2):579-93.
46. Castro B, Sanchez P, Torres JM, Preda O, del Moral RG, Ortega E. Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5alpha-reductase isozymes in rat prostate. *PLoS One*. 2013;8(2):e55905.
47. Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reproductive toxicology*. 2011;31(1):1-9.
48. Behmer OA, Tolosa EMCd, Neto AF. Manual de práticas para histologia normal e patológica. EDART-EDUSP. 1976:329.
49. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.
50. Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat*. 1981;132(Pt 3):357-70.