

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA

JOÃO SIMÃO DE MELO NETO

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE O USO DE ALTAS DOSES DE  
DECANOATO DE NANDROLONA E O EXERCÍCIO RESISTIDO  
DURANTE A FASE PÓS-PÚBERE SOBRE A PRÓSTATA DE  
RATOS EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

MARÍLIA

2014

João Simão de Melo Neto

**Efeitos da interação entre o uso de altas doses de Decanoato de Nandrolona e o exercício resistido durante a fase pós-púbere sobre a próstata de ratos em processo de envelhecimento**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Marília, Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Orientadora: Profa. Dra Raquel Fantin Domeniconi.

Marília

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina de Marília

Melo Neto, João Simão

Efeitos da interação entre o uso de altas doses de decanoato de nandrolona e o exercício resistido durante a fase pós-púbere sobre a próstata de ratos em processo de envelhecimento / João Simão de Melo Neto. -- Marília, 2014.

61 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde e Envelhecimento) – Faculdade de Medicina de Marília.

1. Neovascularização fisiológica. 2. Próstata. 3. Esteroides. 4. Anabolizantes. 5. Envelhecimento. 6. Exercício.

João Simão de Melo Neto

Efeitos da interação entre o uso de altas doses de Decanoato de Nandrolona e o exercício resistido durante a fase pós-púbere sobre a próstata de ratos em processo de envelhecimento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Marília, Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming

Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

Prof. Dr. Sérgio Pereira

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Data de Aprovação: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dr. Raquel Fantin Domeniconi, pela orientação, dedicação, apoio, transmissão de conhecimentos, experiências e constante incentivo durante a realização deste trabalho.

Em especial, aos meus pais, Valéria e Fábio, companheiros e conselheiros de sempre.

Aos Professores Dr. Spencer Luiz Marques Payão e Dr. Agnaldo Bruno Chies, pelo incentivo constante de pesquisas científicas e tecnológicas no âmbito da pós-graduação.

Aos Professores Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dr. Wagner José Fávaro, Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro, pelo apoio durante o transcorrer desta pesquisa.

À Professora Dra. Maria Angélica Spadella Santos pelas sugestões durante o exame de qualificação.

A todos os meus outros professores da pós-graduação que contribuíram com o conhecimento técnico-científico e suas experiências.

Aos Médicos e Professores Dr. Dionei Freitas de Moraes, Dr. Lélío Carli Batista, Dr. Ricardo Hideki Yanasse, pelas assistências ao longo da pesquisa.

Ao técnico de laboratório Gelson Rodrigues e aos colegas Fabiana de Campos Gomes, Ana Carolina Prado, Carla de Moraes, pelo auxílio e apoio na concretização desta dissertação.

Ao Doutorando Ivan José Vechetti Junior, pelo auxílio na padronização do protocolo experimental.

Às Secretárias da Pós-graduação Alessandra, Cristielle e Heloísa, pela disponibilidade e auxílio no esclarecimento de dúvidas com relação à pós-graduação.

À Bibliotecária Helena por todo suporte em todos os momentos necessário.

Às Professoras Maria Olga Fernandes Vasconcelos e Ana Eliza Zuliani Stroppa Marques, por todo incentivo a pesquisa e apoio durante toda minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos, por dividirem comigo as conquistas e derrotas.

À CAPES e ao Santander Universidades pelo apoio financeiro.

A Deus pela força e por iluminar os meus caminhos.

## RESUMO

O presente trabalho propõe investigar os efeitos da interação entre o uso abusivo de Decanoato de Nandrolona (DN) e atividade física, na estrutura da próstata de ratos adultos e envelhecidos. Pretende-se avaliar se o uso do DN, associado ou não ao exercício físico, em fase pós-púbere, interfere na morfofisiologia do envelhecimento da próstata. Cinquenta e seis ratos Sprague-Dawley machos com 90 dias de idades foram distribuídos em oito grupos. Os animais foram tratados durante oito semanas e divididos em grupos sedentários ou treinados, com ou sem uso de DN. Quatro grupos foram sacrificados 48 horas após as oito semanas de experimentação (grupos adultos) e outros quatro grupos aos 43 semanas de idade (grupos envelhecidos). A próstata foi coletada e processada para as análises histológica e imunoistoquímica para detecção da Aquaporina-1 (AQP1) e do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). Tanto o DN, como a atividade física, alteraram a estrutura da próstata ventral de ratos, bem como a expressão da AQP1 e do VEGF, em animais jovens e envelhecidos. Assim foi possível concluir que o uso do DN, associado ou não ao exercício físico, em fase pós-púbere, interfere na morfofisiologia do envelhecimento da próstata.

Palavras-chave: Neovascularização fisiológica. Próstata. Esteróides. Anabolizantes. Envelhecimento. Exercício.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the combined effects of exercise and high doses of ND on the prostate structure of postpubertal and aging rats. It is intended to evaluate whether ND, with or without exercise in post-pubescent, interferes in the aging prostate morphophysiology. Eight groups (07 animals each) of male Sprague-Dawley rats, 90 days old, were treated for 8 weeks. The animals were grouped according to the treatment: sedentary or exercising animals with or without DN. Four animal groups were euthanized after eight weeks of treatment and the other groups were euthanized when they are 43 weeks old. The prostate was dissected, removed and processed according to the histological, immunohistochemistry and Western blotting techniques for AQP1 and VEGF detection. Both, treatments with ND or the physical activity, altered the ventral prostate structure, as well as the AQP1 and VEGF expression of young and aged animals. Thus we concluded that ND with or without physical exercise in post-pubescent, interferes in the aging prostate morphophysiology.

**Key-Words:** Neovascularization, physiologic. Prostate. Steroids. Anabolic agents. Aging. Exercise.



## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Esquema da próstata em humanos (a) e em roedores (b). Valkenburg & Williams.<sup>7</sup>

Figura 2 – Etapas da angiogênese. Fatores angiogênicos estimulam a produção de proteases, que degradam a membrana basal perivascular, na sequência as células endoteliais migram e proliferam para formar o túbulo vascular. Koch & Distler<sup>39</sup>.

Figura 3 – Interações entre as diferentes isoformas do VEGF e seus respectivos receptores. Ferrara et al.<sup>42</sup>.

Figura 4 - Esquema adaptado de Cheidde & Schor<sup>48</sup> da estrutura da AQP. Cada isoforma é composta por cadeia polipeptídica simples com seis domínios que atravessam a membrana e as extremidades carboxi e amino terminais voltadas para o citoplasma.<sup>48</sup>

Figura 5 - Disposição dos grupos experimentais.

Figura 6 - Etapas do treinamento. A) colete adaptado com peso. B) animal com o colete e o peso localizado na região ventral do tronco. C) início do treinamento. D) animal sobre escada pós-série de treinamento. E) secagem do rato com toalha de algodão. F) período de aquecimento.

Figura 7 – Lobo ventral da próstata de ratos adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H). As setas indicam as fibras de colágeno esverdeadas. Tricrômico de Masson. Barra = 10µm.

Figura 8 - Lobo ventral da próstata de ratos adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H). Os asteriscos indicam as fibras de colágeno tipo I e as setas indicam as fibras reticulares. Reticulina de Gomori. Barra: 10µm.

Figura 9 - Imunolocalização da AQP1 na próstata ventral de ratos adultos (B, C, D, E), envelhecidos (F, G, H, I) e no rim (A) de rato adulto, utilizado como controle positivo. A AQP1 foi localizada na região basal do epitélio prostático (cabeça de seta) e no endotélio de canais vasculares no estroma da próstata (seta preta). Barra: 10µm.

Figura 10 – Imunolocalização do VEGF na próstata ventral de ratos adultos (B, C, D, E) e envelhecidos (F, G, H, I) e controle negativo (A). O VEGF foi localizado no ápice das células epiteliais prostáticas (seta preta) e no endotélio de canais vasculares no estroma da próstata (cabeça de seta). Barra: 10 $\mu$ m.

Figura 11 – Análise quantitativa da expressão da AQP1 e VEGF, por Western Blotting, na próstata ventral de ratos adultos (SV<sub>1</sub>, SD<sub>1</sub>, EV<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>) e envelhecidos (SV<sub>2</sub>, SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub>, ED<sub>2</sub>).

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Protocolo de treinamento físico resistido.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da massa corpórea e dos órgãos do sistema genital masculino nos grupos experimentais.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos volumes relativos do epitélio, do estroma e do lúmen da próstata ventral dos grupos experimentais, SV, SD, EV e ED.

Tabela 4 – Análise semiquantitativa das fibras de colágenos na próstata ventral de ratos adultos (SV<sub>1</sub>, SD<sub>1</sub>, EV<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>) e envelhecidos (SV<sub>2</sub>, SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub>, ED<sub>2</sub>).

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÃO .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Próstata.....	1
1.2 Próstata e Hormônios .....	2
1.3 Lesões Prostáticas .....	3
1.4 Vascularização .....	4
1.4.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).....	5
1.4.2 Aquaporina 1 (AQP1) .....	7
1.5 Treinamento físico resistido .....	8
1.6 Esteróide androgênico anabolizante (EAA).....	8
1.7 Justificativa .....	10
2 OBJETIVOS .....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
3.1 Grupos experimentais.....	12
3.2 Treinamento físico resistido através de saltos em meio líquido.....	13
3.3 Processamento do material.....	15
3.4 Morfologia e Morfometria .....	16
3.5 Imunoistoquímica.....	16
3.6 Western blotting .....	16
3.7 Análise dos Resultados.....	17
3.8 Análise Estatística .....	17
4 RESULTADOS .....	19
4.1 Peso corpóreo e de órgãos do sistema genital .....	19
4.2 Estereologia.....	21
4.3 Fibras de colágeno.....	23
4.4 Imunoistoquímica.....	26
4.5 Western blotting .....	29
5 DISCUSSÃO.....	30
5.1 Peso corpóreo e de órgãos do sistema genital .....	30
5.2 Estereologia.....	31
5.3 Fibras de colágeno.....	32

5.4 AQP1 e VEGF.....	33
6 CONCLUSÃO .....	35
REFERÊNCIAS .....	36
APÊNDICE A .....	47
ANEXO A.....	48

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Próstata

A próstata, é uma glândula acessória do sistema genital masculino responsável pela secreção de diversos nutrientes que compõem o líquido seminal e são essenciais para a motilidade e nutrição dos espermatozoides.<sup>1</sup> A organização estrutural da próstata é, significativamente, variável entre as espécies. Sendo assim, os roedores têm sido amplamente utilizados como modelos biológicos para estudos da fisiologia e fisiopatologia da próstata.<sup>2</sup>

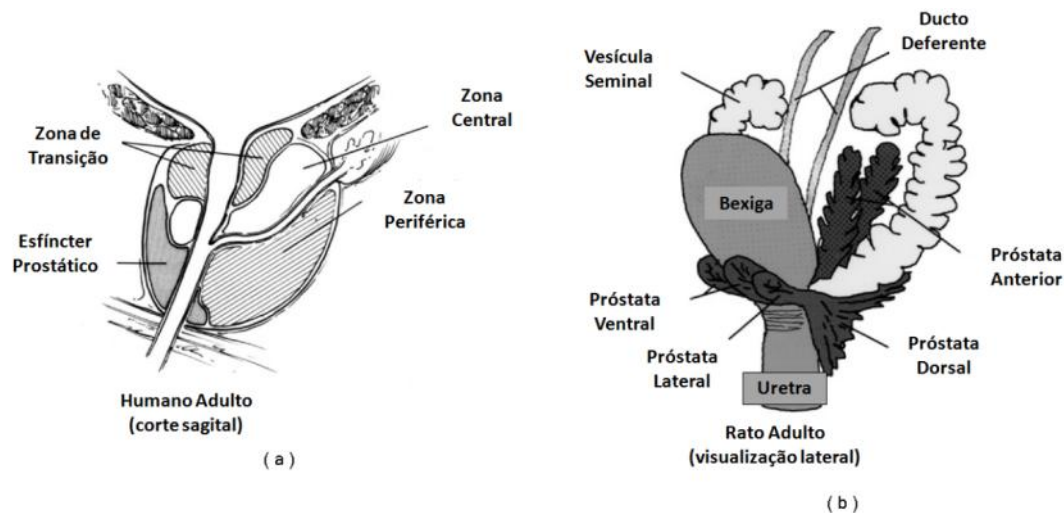
Em roedores, a próstata é formada por quatro pares de lobos distintos que envolvem a uretra na base da bexiga urinária. Os lobos prostáticos são nomeados de acordo com sua posição anatômica em lobo ventral, lobo lateral, lobo dorsal e lobo anterior ou glândula coaguladora (Figura 1), sendo que cada lobo contribui com produção de secreção específica para o sêmen.<sup>3-5</sup> O lobo ventral não possui homologia direta com a próstata humana, porém, por ser mais responsivo aos andrógenos, é o lobo mais utilizado em estudos que focam lesões prostáticas.<sup>6</sup>

A organização multilobar da próstata de roedores não é observada no homem adulto, no qual a próstata apresenta zonas distintas, estreitamente associadas, constituindo um órgão compacto.<sup>7</sup> Inicialmente, foram caracterizadas três zonas glandulares na próstata humana (Figura 1): a central, a periférica e a de transição; e uma região não glandular: o estroma fibromuscular anterior, todas dispostas ao redor da parte prostática da uretra.<sup>8,9</sup> Wendell-Smith<sup>10</sup> incluí outra região glandular, a zona periuretral, que refere-se a menos de 1% do tecido total da próstata.

De forma geral, a próstata é composta por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares<sup>11</sup> que são revestidas por epitélio secretor simples, constituído de células epiteliais secretoras (colunares), células basais e células neuroendócrinas, apoiadas em uma membrana basal.<sup>12</sup> Além disso, Dorkin & Neal<sup>13</sup> citam as células de transição e as *Stem Cells*. O estroma da próstata de roedores é delgado quando comparado ao espesso estroma da próstata humana.<sup>4,14</sup> O estroma prostático é composto por células e matriz extracelular, além de fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação. Também integram o estroma os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células do sistema imune. Estes componentes atuam de forma coordenada na regulação da função das células e na manutenção

da homeostase geral do tecido.<sup>15</sup> Assim, sabe-se que o compartimento estromal desempenha papel fundamental na regulação da proliferação e diferenciação das células epiteliais e desequilíbrio na interação normal entre estroma-epitélio pode levar a alterações patológicas, favorecendo a formação de lesões pré-malígnas e adenocarcinomas.<sup>16</sup>

Figura 1 – Esquema da próstata em humanos (a) e em roedores (b).



Fonte: Valkenburg & Williams.<sup>7</sup>

## 1.2 Próstata e Hormônios

A síntese de andrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Assim, o hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) para a circulação hipofisária que estimula a adenohipófise a produzir os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Estes hormônios são liberados na circulação sistêmica e alcançam os testículos, onde se ligam a receptores específicos localizados na membrana das células de Sertoli e de Leydig. O FSH inicia o processo de espermatogênese e o LH induz a produção de testosterona pelas células de Leydig. De forma geral, os órgãos do sistema genital masculino são influenciados por andrógenos e a próstata é considerada um órgão dependente de andrógeno.<sup>17,18</sup>

O desenvolvimento da próstata consiste em sequência complexa de eventos que ocorrem ao longo do desenvolvimento fetal e neonatal e, durante a puberdade. A proliferação das células epiteliais, a ramificação dos ductos e alguns passos da diferenciação celular, ocorrem durante os períodos fetal e neonatal. Estes processos são dependentes de andrógenos

que, inicialmente, atuam através do mesênquima. Mais tarde os andrógenos passam a atuar diretamente no epitélio glandular.<sup>19</sup>

Durante o desenvolvimento da próstata existem dois períodos considerados críticos, o neonatal e a puberdade, pois nestas fases ocorre um rápido crescimento glandular.<sup>20</sup> Os andrógenos regulam a proliferação e a diferenciação das células epiteliais,<sup>21</sup> bem como a morte celular programada.<sup>22,23</sup> Os principais andrógenos, envolvidos no desenvolvimento da próstata, são a testosterona e a diidrotestosterona (DHT), as quais agem mediadas por receptores de andrógeno.<sup>24</sup> A testosterona é convertida, pela ação da 5 $\alpha$ -redutase, em DHT, a qual apresenta maior afinidade pelo receptor de andrógeno, sendo portanto mais ativa.<sup>25</sup> A DHT foi considerada 10 vezes mais potente que a testosterona, porque sua dissociação do receptor de andrógeno é mais lenta.<sup>26</sup>

Estudos em ratos *Norway* mostraram que, com o avançar da idade, a expressão do receptor de andrógeno diminui nas células epiteliais do lobo ventral, mas aumenta nos lobos laterais e no lobo dorsal. Os autores discutem os resultados baseados no fato do envelhecimento acarretar a queda dos níveis séricos de testosterona, diminuindo desta forma, a disponibilidade do hormônio. Estas descobertas sugerem que: 1) a sensibilidade lobo-específica ao andrógeno pode ser dependente da disponibilidade do hormônio, bem como do seu receptor; 2) os níveis do receptor de andrógeno são regulados diferentemente nos lobos prostáticos; 3) as atividades hormônios-dependentes e independentes podem variar entre lobos prostáticos e podem alterar com a idade.<sup>27</sup> Desta forma, considerando a sensibilidade lobo-específica ao andrógeno, optou-se por estudar o lobo ventral por ser o mais responsivo aos andrógenos e, portanto, o mais utilizado em pesquisas que envolvam manipulação hormonal.<sup>6</sup>

### **1.3 Lesões Prostáticas**

Estudos experimentais têm focado no papel dos hormônios androgênicos e estrogênicos no desenvolvimento de lesões prostáticas.<sup>30,31</sup> Nos seres humanos, a próstata é acometida por diferentes patologias, dentre estas se destacam a hiperplasia benigna prostática (HBP) e o adenocarcinoma prostático ou câncer de próstata.<sup>32</sup> Algumas lesões prostáticas como a PIN (Neoplasia Intraepitelial Prostática) e a PIA (Atrofia Inflamatória Prolifetativa) são consideradas possíveis precursoras do câncer de próstata, e estudos recentes mostram que a maior parte dos carcinomas prostáticos pode ter início a partir da PIN e PIA.<sup>33,34</sup>



A idade é o fator de risco predominante para o desenvolvimento de alterações patológicas, na próstata humana. A HBP é uma proliferação benigna do epitélio e estroma da próstata que se desenvolve a partir da quarta década de vida e tem uma prevalência de quase 100% a partir da nona década de vida.<sup>35</sup> A atrofia prostática é muito comum em homens mais velhos e o câncer de próstata ou adenocarcinoma prostático é diagnosticado em até 80% dos homens a partir dos 80 anos.<sup>2</sup>

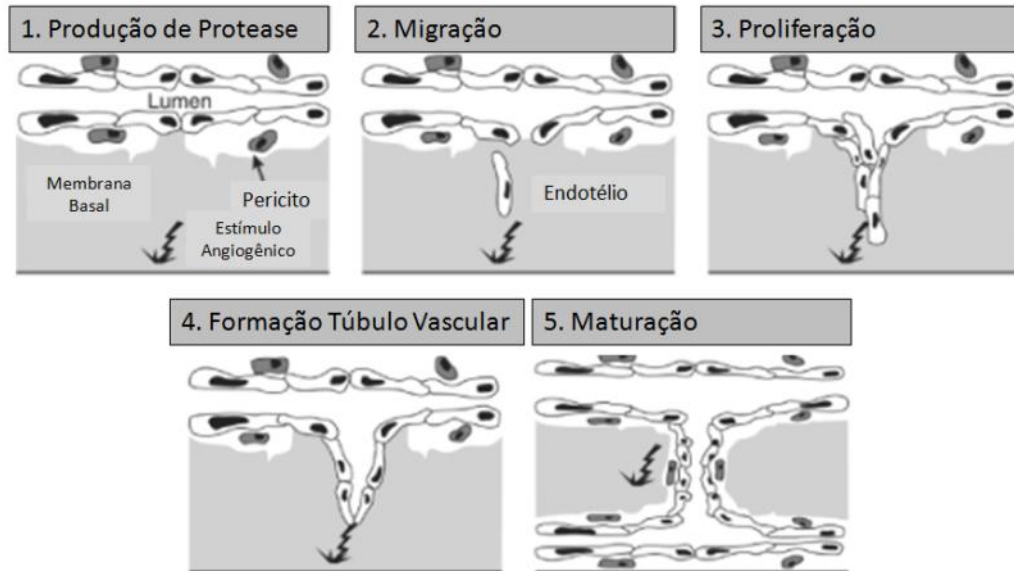
A HBP tem origem na zona de transição da próstata com alterações estromais, as quais secundariamente estimulam o crescimento e a diferenciação das células epiteliais.<sup>14</sup> Em geral, a HBP é caracterizada por um aumento significativo do número de células musculares lisas ou mesmo por um estroma nodular.<sup>36</sup> Em contraste, o câncer de próstata é uma doença epitelial, que em geral ultrapassa os limites do órgão.<sup>26</sup> No câncer de próstata, as células epiteliais ficam alteradas e, também, forma-se um novo ambiente estromal, denominado estroma reativo.<sup>15</sup> Sabe-se que as células estromais, associadas às células tumorais, produzem uma variedade de metaloproteinases de matriz que afetam a sinalização estroma-epitélio e, conseqüentemente, desencadeiam processos de crescimento, migração, angiogênese, apoptose e metástases prostáticas.<sup>15,16</sup> Desta forma, é sugerido que a progressão do tumor é co-dependente do compartimento estromal.<sup>15</sup>

Acredita-se que o crescimento prostático, na forma de hiperplasia prostática benigna ou adenocarcinoma, que ocorre durante o processo de envelhecimento da próstata, é devido ao desequilíbrio nas taxas normais de morte celular em comparação com a proliferação celular. Assim, o foco não está sendo apenas nas taxas aumentadas de proliferação celular, mas também na diminuição das taxas de morte celular como determinantes para o tamanho do tumor.<sup>27</sup>

#### **1.4 Vascularização**

O estroma reativo é um ambiente novo, criado em resposta às alterações patológicas da próstata, que apresenta aspectos diferentes do estroma normal, como por exemplo, o aumento da angiogênese.<sup>15</sup> A angiogênese é um processo complexo que envolve a divisão das células endoteliais, a degradação seletiva das membranas basais vasculares e da matriz extracelular circundante e a migração das células endoteliais (Figura 2).<sup>37,38</sup> Algumas proteínas estão envolvidas na angiogênese, dentre estas, o VEGF<sup>35,36</sup> e a AQP1<sup>37</sup>.

Figura 2 – Etapas da angiogênese. Fatores angiogênicos estimulam a produção de proteases, que degradam a membrana basal perivascular, na sequência as células endoteliais migram e proliferam para formar o túbulo vascular.



Fonte: Koch & Distler<sup>39</sup>.

#### 1.4.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

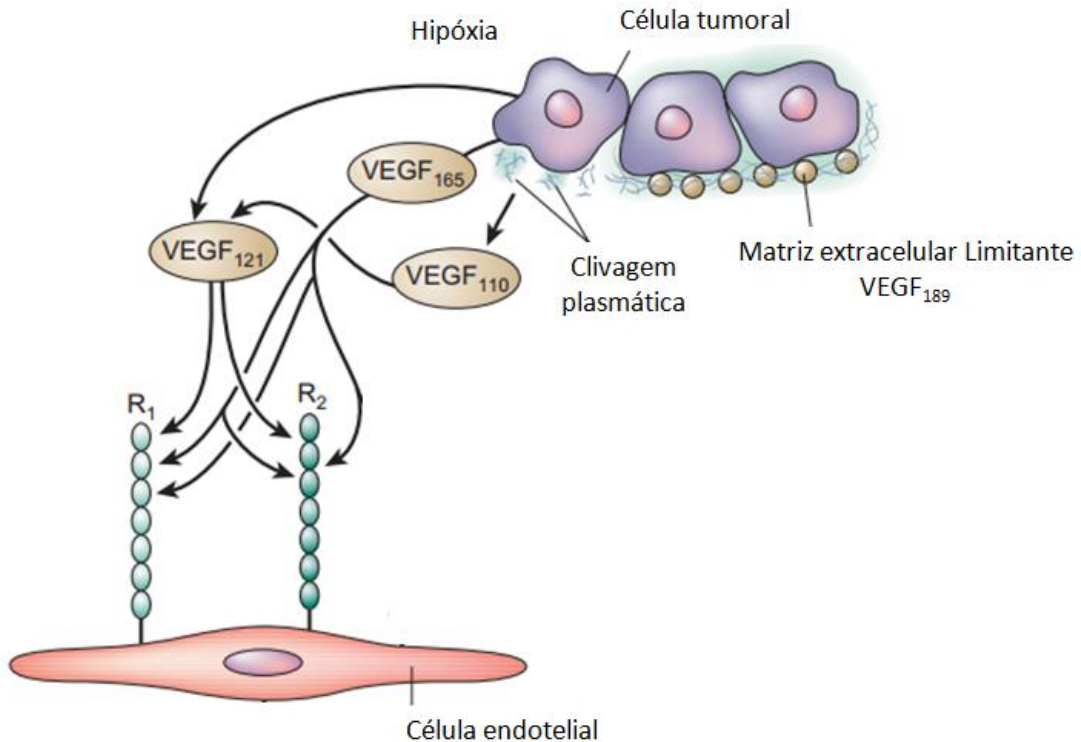
O VEGF, fator de crescimento endotelial vascular, é membro de uma família de proteínas composta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF).<sup>40</sup> O VEGF afeta, direta ou indiretamente, as atividades relacionadas ao processo de angiogênese, portanto, é considerado um fator relevante para estudos relacionados a este processo.<sup>37,38</sup> Apesar de ser considerado importante agente mitogênico para células endoteliais de artérias, veias e vasos linfáticos, o VEGF não apresenta atividade mitogênica, consistente e significativa, para outros tipos celulares.<sup>41</sup>

O gene do VEGF-A está organizado em oito éxons, separados por sete íntrons, sendo encontradas quatro isoformas, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>, as quais apresentam 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente. O VEGF liga-se, através de receptores (VEGFR-1 E VEGFR-2), em locais específicos na superfície das células endoteliais, em resposta a uma variedade de estímulos, como apresentado na figura 3.<sup>42</sup>

Estudos recentes enfatizam que o VEGFR-1 tem importante papel na hematopoiese e no recrutamento de células mononucleares. Porém, a maioria das ações do VEGF está relacionada à ativação do VEGFR-2, sendo este, portanto, o principal mediador dos efeitos:

mitogênico, angiogênico e de aumento da permeabilidade vascular do VEGF. O VEGF induz potente resposta angiogênica e possui papel essencial para a angiogênese,<sup>42</sup> portanto, está envolvido, em conjunto com outros polipeptídeos, na regulação de processos biológicos da glândula prostática.

Figura 3 – Interações entre as diferentes isoformas do VEGF e seus respectivos receptores.



Fonte: Ferrara et al.<sup>42</sup>.

Na próstata, o VEGF foi imunolocalizado no ápice das células epiteliais dos ácinos e no endotélio de vasos capilares e vênulas.<sup>43-45</sup> Segundo Jackson, Bentel & Tilley<sup>43</sup> a presença desta proteína no estroma prostático poderia estar relacionada à indução da expressão de proteases e colagenases intersticiais, as quais influenciariam na degradação da matriz extracelular, colaborando para a formação de novos vasos.

A maioria das células do corpo é, potencialmente, capaz de produzir o VEGF, porém a hipóxia eleva sua produção.<sup>40</sup> Segundo revisão realizada por Dvorak *et al.*<sup>38</sup> a superexpressão do VEGF está associada à angiogênese em diferentes condições patológicas e fisiológicas. Além disso, o VEGF torna os vasos sanguíneos, que suprem os tumores, altamente

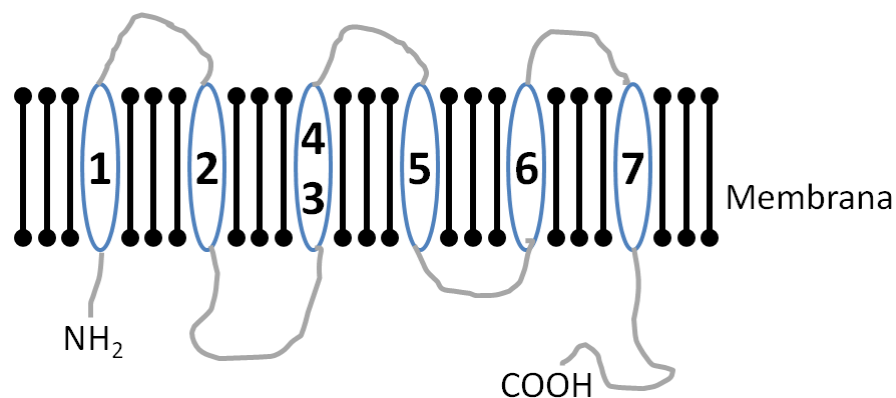
permeáveis para circulação de macromoléculas.<sup>38</sup> Esta afirmação se baseia no fato da concentração de proteínas plasmáticas, bem como a quantidade de líquido no estroma de tecidos com tumores, serem mais altas quando comparadas ao estroma de tecidos normais.

#### 1.4.2 Aquaporina 1 (AQP1)

Além do VEGF, estudos têm mostrado que a AQP1 também está envolvida na angiogênese, particularmente na cicatrização de feridas, na regeneração de órgãos e, possivelmente, na propagação de tumores.<sup>46</sup>

A AQP1, pertence a uma família de proteínas pequenas “membrane-spanning”, cujos monômeros têm de 26 a 34 kDa. Essas proteínas são expressas na membrana plasmática de células envolvidas no transporte de fluidos. As proteínas dessa família organizam-se nas membranas como homotetrâmeros. Cada monômero, consiste de seis domínios “membrane-spanning”  $\alpha$ -hélice, com as extremidades carboxi e aminoterminal orientadas para o citoplasma, contendo um poro de água distinto (Figura 4). Dois subgrupos têm sido definidos, aquaporinas AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 e AQP8 que parecem ser altamente seletivas à água, e as aquagliceroporinas AQP3, AQP7 e AQP9 que transportam também glicerol e outros solutos menores.<sup>47</sup>

Figura 4 - Esquema adaptado de Cheidde & Schor<sup>48</sup> da estrutura da AQP. Cada isoforma é composta por cadeia polipeptídica simples com seis domínios que atravessam a membrana e as extremidades carboxi e amino terminais voltadas para o citoplasma.<sup>48</sup>



A AQP1 está envolvida no transporte e reabsorção de líquidos ao longo do sistema genital masculino. Esta AQP está presente nas células endoteliais que circundam os canais vasculares localizados no espaço intertubular do epidídimo; na borda de microvilos e na membrana basolateral das células não ciliadas dos ductos eferentes; na ampola do ducto

deferente, na glândula seminal e na próstata de ratos.<sup>49-52</sup> Recentemente, a expressão dos genes da AQP1 foi detectada no epitélio secretor da próstata de camundongos, enfatizando o papel na secreção de fluidos prostáticos.<sup>53</sup>

A expressão da AQP1 é elevada em tecidos submetidos à hipóxia,<sup>54</sup> e o aumento da AQP1 estimula a migração de células endoteliais e angiogênese, independentemente de processos tumorais.<sup>55</sup> Além disso, este canal é um excelente marcador de aumento da microestrutura vascular para alguns tumores, incluindo o adenocarcinoma prostático, o que pode ser uma consequência da angiogênese e da necessidade de remover o edema tumoral.<sup>56</sup>

### **1.5 Treinamento físico resistido**

Quando a atividade física é realizada de forma estruturada, planejada e principalmente de forma progressiva é denominado treinamento físico, podendo ser classificado conforme seu objetivo. O treinamento de resistência é realizado com um complemento de carga, seja esta por peso, massa corporal ou ainda por dispositivos elásticos. Os efeitos do exercício depende da dose do treinamento, sendo controlado pela quantidade, frequência, duração e intensidade.<sup>57</sup> Durante o exercício resistido o músculo deve exercer força contra uma resistência, com uma carga bem acima da capacidade aeróbica do músculo, sendo então de alta intensidade e curta duração, em contrações que levam à fadiga.<sup>58</sup>

Conforme revisado por Friedenreich, Neilson & Lynch<sup>59</sup>, a atividade física promove redução no risco de homens desenvolverem câncer de próstata, relatando que o exercício intenso possivelmente altera os níveis hormonais que estão associados com a etiologia da alteração patológica. Logo, em revisão narrativa, Hackney<sup>17</sup> discorreu que o exercício resistido pode reduzir os níveis de testosterona circulantes. Além disso, Teixeira et al.<sup>60</sup> complementaram que o exercício resistido pode prevenir doenças que afetam a próstata.

Neste estudo, optou-se por utilizar um protocolo de treinamento físico resistido, por ser o mais indicado para ganho de massa muscular e o mais utilizado em academias visando aumentar força e hipertrofia.

### **1.6 Esteroide androgênico anabolizante (EAA)**

Os esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) são derivados sintéticos da testosterona<sup>61</sup> e estimulam a síntese de proteínas presentes nos músculos estriados

esqueléticos (efeito anabólico). Por este motivo, há muito tempo estes hormônios sintéticos têm sido utilizados por atletas e não atletas para aumentar a massa muscular, a força e/ou desempenho na prática de atividade física.<sup>62</sup>

Estes esteroides são farmacologicamente importantes no tratamento de uma variedade de disfunções, tais como osteoporose,<sup>63,64</sup> deficiências no crescimento, algumas desordens sanguíneas,<sup>65</sup> angioedema hereditário, câncer de mama, desnutrição, anemia refratária,<sup>66</sup> no tratamento de disfunções renais que promovam anemias, hemodiálises, e casos de falência renal,<sup>67-69</sup> em portadores de HIV, e em pacientes hipogonadais limítrofes.<sup>70,71</sup>

No entanto, os EAA vêm sendo utilizados sem indicação médica e em doses altas por homens e mulheres, atletas profissionais, atletas recreativos, pré-púberes e adolescentes.<sup>65</sup> Os indivíduos utilizam estes compostos em doses supra-fisiológicas 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas.<sup>61</sup> O uso indiscriminado e abusivo de EAA entre adultos e adolescentes sem fins terapêuticos tem-se tornado um problema de saúde pública, despertando a atenção da comunidade científica.

Na atualidade, existe um número crescente de relatos de abuso de EAA por atletas não-competitivos e, especialmente, por fisiculturistas. De fato, existe uma variedade desses anabolizantes, sendo auto-administrados e utilizados em doses elevadas. Embora o uso de EAA esteja associado a efeitos colaterais, os efeitos tóxicos após administração da EAA não são notificados pelos indivíduos e, portanto, é difícil de serem quantificados. É cada vez mais evidente que o abuso está associado a efeitos adversos graves que afetam os sistemas nervoso central, cardiovascular, músculo-esquelético, endócrino e genital.<sup>72</sup>

Os EAA podem induzir a algumas alterações subclínicas no eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Primariamente, podem reduzir os níveis circulantes da testosterona total e livre, bem como os níveis de hormônio luteinizantes e,<sup>73</sup> ainda, alterar a função reprodutiva masculina levando a azoospermia e oligozoospermia.<sup>74</sup> Além disso, os EAA possuem alguns efeitos adversos como: atrofia testicular;<sup>70</sup> alterações no trato urogenital;<sup>66</sup> alterações na qualidade do esperma<sup>75</sup> e na estrutura dos testículos.<sup>76</sup> Há outros relatos na literatura que mencionam alterações comportamentais decorrentes do uso de EAA.<sup>77</sup>

A ação dos EAA sintéticos (EAAs), bem como seus metabólitos, em diferentes tecidos é semelhante à observada pelos andrógenos endógenos. O uso abusivo e sem orientação

médica dos EAAs leva a aumento no interesse por estudos relacionados aos seus efeitos colaterais que, podem ser desde efeitos psicológicos, até alterações morfológicas em tecidos alvo, como por exemplo, a glândula prostática e o possível papel desses EAA no surgimento de câncer prostático.<sup>78</sup>

O Decanoato de Nandrolona (DN) é um derivado sintético da testosterona<sup>63,67</sup> e é o EAA mais utilizado entre os atletas, especialmente, do sexo masculino, por apresentar menores efeitos adversos.<sup>65</sup> Poucos estudos na literatura foram encontrados sobre o efeito do DN na próstata de roedores. Karbalay-Doust & Noorafashan<sup>66</sup> avaliaram, através de métodos estereológicos, os efeitos do DN na próstata, utilizando doses baixas (abaixo da dose terapêutica indicada), ainda assim, os resultados demonstraram atrofia prostática.

Apesar do DN, em altas doses, levar à desregulação hormonal e exercer efeitos colaterais adversos em órgãos dependentes de andrógeno, talvez o uso deste esteroide associado ao exercício físico possa ter menor impacto no organismo. Alguns estudos mostram que a prática de atividade física pode ser um fator protetor e exercer efeitos diretos sobre a diminuição do risco de câncer na próstata. Os mecanismos biológicos envolvidos estão relacionados às alterações nos níveis plasmáticos de hormônios anabólico-androgênicos circulantes, no balanço energético, na função imune e nos mecanismos de defesa antioxidantes.<sup>79</sup> Além disso, na literatura especializada, há trabalhos<sup>80,81</sup> que relacionam a atividade física com a angiogênese. Segundo Kraus *et al.*<sup>80</sup> o exercício físico agudo aumenta os níveis circulantes do VEGF e estes achados são complementados por outros na literatura que relacionam a atividade física com o crescimento capilar.<sup>81</sup>

## **1.7 Justificativa**

Os processos de desenvolvimento, proliferação e diferenciação das células da próstata, bem como a manutenção da atividade funcional e da morfologia deste órgão, são regulados por andrógenos. Conseqüentemente, a queda dos níveis androgênicos, que ocorre com o envelhecimento, leva a um desequilíbrio hormonal que é determinante no aparecimento de alterações patológicas na próstata.

Até o momento, não foram completamente compreendidos os mecanismos que determinam a evolução das doenças prostáticas. Este fato, leva a necessidade de se estudar este órgão sob diferentes condições hormonais. Provavelmente, as manipulações hormonais

levam à interrupção dos processos normais do desenvolvimento da próstata e a consequência destas alterações pode acarretar efeitos permanentes nos processos normais do desenvolvimento e da função da glândula.

Considerando a idade como fator determinante no desenvolvimento de patologias prostáticas e o fato deste ser um órgão dependente da ação de hormônios, parece ser extremamente relevante entender se o uso de esteroides anabolizantes, associados ou não ao exercício físico, no período de transição entre a juventude e a fase adulta, alteraria a estrutura e a micro-vascularização da próstata ventral durante o processo de envelhecimento. A linhagem de ratos Sprague-Dawley é especialmente utilizada em pesquisas biológicas relacionadas ao envelhecimento e ao câncer, por este motivo foi considerada adequada como modelo experimental para este estudo.

## **2 OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se o uso do EAA, associados ou não ao exercício físico resistido, em fase pós-púbere, interfere na morfofisiologia do envelhecimento da próstata.

Para tanto, após o período experimental, pretende-se investigar se a atividade física resistida e/ou o EAA levam a alterações na estrutura geral da próstata, com ênfase no estroma prostático; e, na expressão das proteínas AQP1 e VEGF na próstata de animais adultos e envelhecidos.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 56 ratos machos, virgens, da linhagem Sprague-Dawley, obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, IBB-UNESP, Botucatu, em gaiolas plásticas (30x16x19 cm) com um único animal por gaiola, foram alimentados com dieta comum sólida (ração Nuvilab) e água *ad libitum*, e mantidos sob condições adequadas de luminosidade (ciclo claro/escuro 12 horas) e temperatura (23 à 25°C).

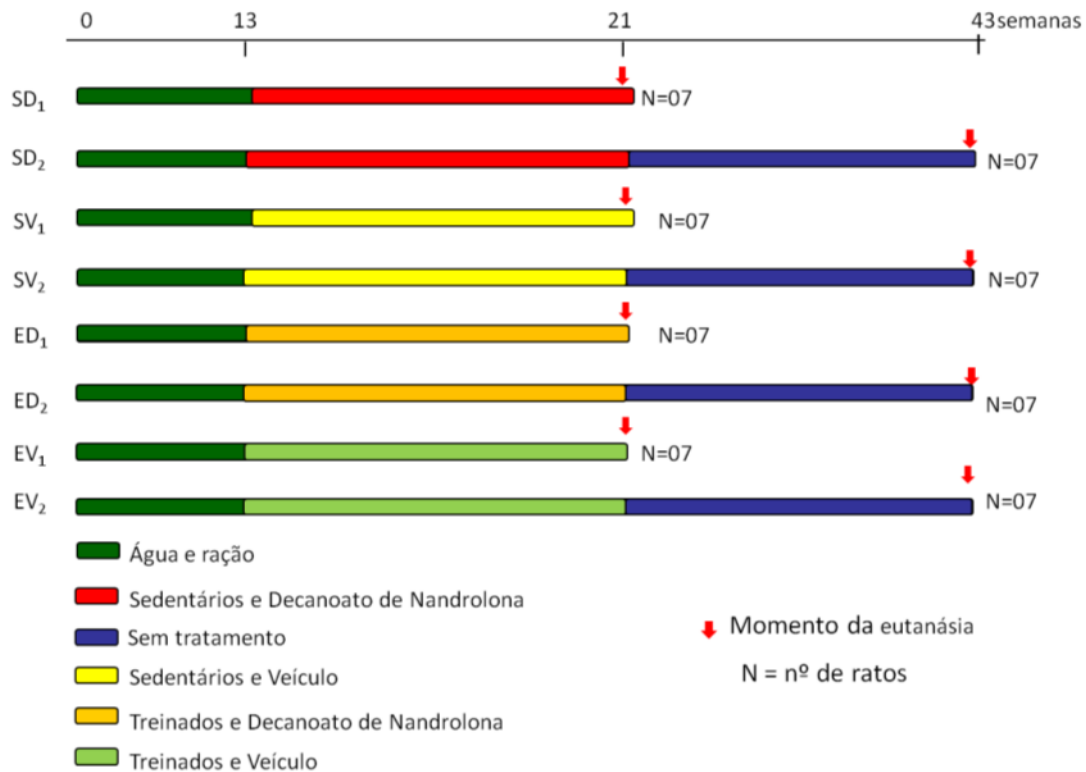
Todo o experimento e os procedimentos cirúrgicos deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBB/UNESP, sob o protocolo nº 385 (ANEXO A). A pesquisa foi realizada após a aprovação desta Comissão e de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

#### 3.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais (07 animais cada), sendo 04 grupos adultos, sacrificados com 21 semanas de idade e outros 04 grupos envelhecidos, sacrificados com 43 semanas de idade, dispostos em (Figura 5):

- **SV<sub>1</sub>**: Grupo controle adulto, sedentários, que não fizeram uso de esteroide.
- **SV<sub>2</sub>**: Grupo controle envelhecido, sedentários, que não fizeram uso de esteroide.
- **SD<sub>1</sub>**: Grupo adulto, sedentários, que fizeram uso de esteroide.
- **SD<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, sedentários, que fizeram uso de esteroide.
- **EV<sub>1</sub>**: Grupo adulto, submetidos ao exercício físico, sem uso de esteroide.
- **EV<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, submetidos ao exercício físico, sem uso de esteroide.
- **ED<sub>1</sub>**: Grupo adulto, submetidos ao exercício físico, que fizeram uso de esteroide.
- **ED<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, submetidos ao exercício físico, que fizeram uso de esteroide.

Figura 5 - Disposição dos grupos experimentais.



Os grupos SD<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>, SD<sub>2</sub>, ED<sub>2</sub> receberam injeções intramusculares (i.m.) de esteroide anabolizante androgênico, Decanoato de Nandrolona, que foram aplicadas 10 mg/kg/semana conforme protocolo realizado por Shokri et al.<sup>65</sup>, sendo dispostas em 5mg/Kg peso corpóreo de Deca Durabolin<sup>®</sup>, duas vezes por semana, ao longo de 07 semanas. Esta dosagem, segundo Pope & Katz<sup>82</sup>, equivale à dose abusiva administrada por atletas, ou seja, 10 a 100 vezes maior que a dose terapêutica. Os grupos SV<sub>1</sub>, EV<sub>1</sub>, SV<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub> receberam injeções i.m. de veículo (0,2 mL/Kg peso corpóreo de propilenoglicol), duas vezes por semana, após contato com água rasa.

### 3.2 Treinamento físico resistido através de saltos em meio líquido

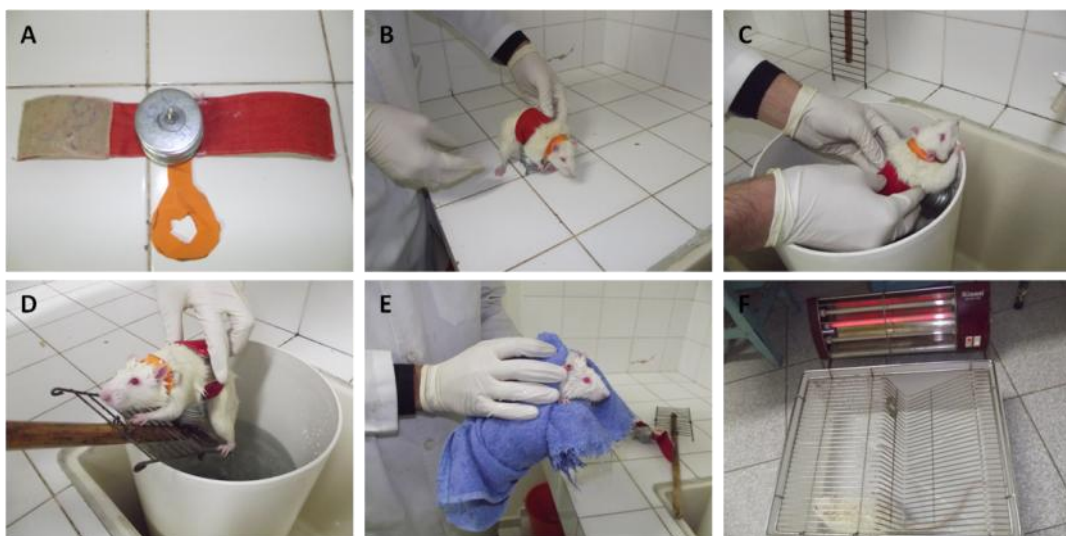
Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a treinamento físico com sessões de saltos em cilindro de PVC, contendo água a 30°C<sup>83</sup> a uma profundidade de 38 cm, durante oito semanas consecutivas. Na primeira semana, os ratos dos grupos treinados passaram por período de adaptação ao exercício físico em meio líquido. Neste período, os animais foram colocados em contato com a água e submetidos a séries progressivas de saltos.

Após a adaptação, os animais realizaram quatro séries com 10 saltos, intervaladas por 60 segundos, com sobrecarga progressiva, de 50% (segunda e terceira semana), 60% (quarta e quinta semana) e 70% (sexta, sétima e oitava semana) do peso corporal, três vezes por semana (Tabela 1). A sobrecarga de peso foi colocada na região ventral do tórax dos animais por meio de um colete (Figura 6).

Tabela 1 - Protocolo de treinamento físico resistido.

<b>Dia de treinamento</b>	<b>Treinamento – Sobrecarga (% Peso corporal)</b>
1°	Contato com água rasa
2°	Natação por 10 min. sem carga
3°	02 séries de 05 saltos (50%)
4°	04 séries de 05 saltos (50%)
5°	04 séries de 09 saltos (50%)
6° ao 20°	04 séries de 10 saltos (50%)
21° ao 35°	04 séries de 10 saltos (60%)
36° ao 54°	04 séries de 10 saltos (70%)

Figura 6 - Etapas do treinamento. A) colete adaptado com peso. B) animal com o colete e o peso localizado na região ventral do tronco. C) início do treinamento. D) animal sobre escada pós-série de treinamento. E) secagem do rato com toalha de algodão. F) período de aquecimento.



Durante todo o período de treinamento físico, os animais pertencentes aos grupos sedentários,  $SV_1$ ,  $SD_1$ ,  $SV_2$  e  $SD_2$ , que não realizaram treinamento físico, foram colocados em uma caixa com água rasa, também a 30°C, de forma que não precisassem saltar, apenas para serem submetidos ao contato com a água. Após cada sessão de treinamento físico, os animais foram secos com toalha de algodão e mantidos aquecidos por 30 minutos. Após esse intervalo os ratos retornaram às caixas com ração e água *ad libitum*.

Vale ressaltar que o período de sete semanas estabelecido para as aplicações de injeções de decanoato de nandrolona, bem como para o treinamento físico, foram definidos respeitando-se o período suficiente para que ocorra uma espermatogênese, a qual varia de 48-56 dias.<sup>65,84</sup> Assim, este período foi considerado suficiente para possíveis repercussões no eixo hipotálamo-hipófise-testículo.

Durante todo o experimento, os animais foram pesados semanalmente para verificar possíveis alterações no peso corpóreo (peso do início do experimento – peso no final do experimento).

### 3.3 Processamento do material

Após 48 horas<sup>85</sup> da última sessão de saltos, os ratos pertencentes aos grupos experimentais  $SV_1$ ,  $SD_1$ ,  $EV_1$  e  $ED_1$  foram sacrificados para compor o grupo dos adultos. Os ratos dos grupos  $SV_2$ ,  $SD_2$ ,  $EV_2$  e  $ED_2$  foram sacrificados após 43 semanas, para compor o grupo de animais envelhecidos. Para eutanásia, os animais foram colocados em câmara de  $CO_2$  e, na sequência, decapitados em guilhotina. O complexo prostático dos ratos (uretra + tecido prostático associado) e outros órgãos, dependentes de andrógeno, do sistema genital (testículo, epidídimo, gordura epididimária) foram coletados e pesados, para verificar possíveis alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada.

Em seguida, os lobos ventrais das próstatas foram dissecados, divididos e destinados parte para congelamento e outra parte para fixador histológico, sendo processados para rotina das técnicas histológicas, imunoistoquímica e *Western blotting*. As amostras destinadas ao estudo histológico e de imunoistoquímica foram pré-fixadas em formol tamponado a 10%, o qual foi constantemente gotejado sobre os tecidos. Após a pré-fixação, os fragmentos de tecidos foram imersos no líquido fixador por 24 horas, lavados em água corrente e colocados em álcool 70%. Na sequência, foram submetidos às rotinas para inclusão em paraplástico

(Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA) e microtomia (4µm de espessura). Para os estudos de *Western Blotting*, as amostras foram congeladas e armazenadas em Freezer – 80°C até o momento de serem submetidas à rotina.

### **3.4 Morfologia e Morfometria**

Os cortes histológicos destinados à análise morfológica e morfométrica, foram submetidos às colorações: Reticulina de Gomori (para investigar as fibras reticulares) e Tricrômico de Masson (para colágeno geral). Para a análise estereológica foram utilizadas duas lâminas, coradas com Tricrômico de Masson, obtidas dos cinco animais de cada grupo experimental. Através do programa de análise de imagens AxioVision (Zeiss) foi feita captura de 36 campos (200x) histológicos de cada animal e as imagens seguiram para análise morfométrico-estereológica.

### **3.5 Imunoistoquímica**

Cortes desparafinizados foram submetidos à recuperação da atividade antigênica em tampão citrato de sódio, no microondas, em seguida, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena do tecido e bloqueio proteico pré-primário. O material foi incubado com anticorpos policlonais anti-AQP1 (AB 2219, Chemicon-Millipore, USA, 1:300) e anti-VEGF (ab 46154, ABCAM, 1:100), *overnight*. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados, em anticorpo secundário diluído (A0545 Sigma, USA) 1:70 por 1 hora a 37°C, e seguiram para outra lavagem e revelação com Diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram montadas com lamínulas e em sequência observadas e analisadas.

### **3.6 Western blotting**

Para o processamento da eletroforese, as amostras obtidas foram homogeneizadas em tampão de extração contendo Tris 0,05M pH 7,5, Triton X100, NaCl e inibidores (proporção de 30 mg de tecido/100µl de tampão de extração). Os homogenatos obtidos foram centrifugados e os sobrenadantes resultantes solubilizados e aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12%. Após a eletroforese, os “spots” correspondentes às proteínas foram eletrotransferidos para uma membrana imobilizadora. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em BSA (5%) e incubada *overnight* com os anticorpos policlonais anti-AQP1(AB 2219, Chemicon-Millipore, USA), anti-VEGF (ab 46154, ABCAM) e anti-β-actina (orb10033, Biorbyt), diluídos 1:250. A membrana foi lavada e incubada com o anticorpo

secundário conjugado à peroxidase (Sigma), durante uma hora. Após a lavagem, a reação foi revelada utilizando-se substrato DAB, então as membranas foram escaneadas e analisadas.

### 3.7 Análise dos Resultados

As lâminas obtidas a partir das rotinas histológica e imunoistoquímica, foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio AxioPhot – 2 com câmera digital, modelo AxioCam HR, Zeiss do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - *Campus* de Botucatu.

As fibras de colágenos, visualizadas por meio das colorações Reticulina de Gomori e Tricrômico de Masson, foram analisadas e classificadas de acordo com a intensidade da reação em forte (+++), moderado (++) e fraco (+).

Para a análise morfométrico-estereológica descrita por Weibel<sup>86</sup> foi utilizado uma grade de 168 pontos sobre as imagens fotografadas da coloração de Tricrômico de Masson. Desta forma, foi obtido o volume relativo (%) do epitélio, do estroma e do lúmen da próstata nos diferentes grupos experimentais. Foi utilizado para esta análise o *software ImageJ* 1.47, versão para *Windows* (*National Institutes of Health, United States Code, USA*), seguida por análise estatística.

As lâminas resultantes das rotinas de imunoistoquímica foram observadas, visando imunolocalizar as proteínas AQP1 e VEGF nos diferentes grupos experimentais. Com o objetivo de confirmar a reação específica e a eficiência da técnica e dos reagentes empregados, foram realizados controles negativo e positivo.

A quantificação dos resultados obtidos em *Western Blotting* foi realizada por meio de análise semiquantitativa de densitometria das bandas, realizada pelo *software ImageJ* 1.47, versão para *Windows* (*National Institutes of Health, United States Code, USA*), seguida por análise estatística. Para normalização da leitura de intensidade da marcação da banda, foi utilizada a  $\beta$ -actina.

### 3.8 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados estereológicos da próstata, bem como do peso dos órgãos e da quantificação das bandas obtidas pelo *Western blotting*, foi utilizada análise de variância - ANOVA, seguida pelo teste de Tuckey-Kramer. As diferenças foram consideradas

estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Todos os grupos foram comparados com seus respectivos controles,  $SV_1$  e  $SV_2$ , os demais grupos foram comparados sempre que apresentavam variável em comum. A análise estatística foi realizada no programa InStat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Peso corpóreo e de órgãos do sistema genital**

O peso corpóreo final dos animais que fizeram uso de DN foi menor em relação ao peso inicial, apenas nos grupos de animais adultos, ou seja, aqueles que foram sacrificados 48 horas após as oito semanas de experimento. Assim, o DN determinou a perda de peso corpóreo nestes grupos de animais (Tabela 2).

Em contrapartida, nestes mesmos grupos, o peso relativo da próstata ventral foi maior nos animais que fizeram uso de DN. O peso do epidídimo não diferiu entre os grupos experimentais. Já os testículos apresentaram redução de peso nos grupos EV1 e ED1, apesar de não apresentarem diferenças nos pesos relativos, e foi observada tendência na redução do peso em SD1. Em relação ao peso da gordura epididimária relativa, foi menor no grupo de animais adultos que fizeram uso de DN (Tabela 2).

Entre os grupos de animais envelhecidos, ou seja, sacrificados com 43 semanas de idade, não houve diferença, estatisticamente significativa, para o peso corpóreo ou dos órgãos avaliados e para o peso da gordura epididimária (Tabela 2).



Tabela 2 - Média e desvio padrão do ganho ou perda de massa corpórea e dos órgãos do sistema genital masculino nos grupos experimentais. Os símbolos representam diferença significativa com  $p < 0.05$ , por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer, sendo “\*” em comparação ao respectivo controle, e “#” em comparação à variável em comum. “S” representa grupos sedentários; “E” exercício; “D” uso de Decanoato de Nandrolona; “V” uso de veículo; “1” animais eutanasiados adultos; “2” eutanasiados ao longo do processo de envelhecimento.

	SV <sub>1</sub>	SD <sub>1</sub>	EV <sub>1</sub>	ED <sub>1</sub>	SV <sub>2</sub>	SD <sub>2</sub>	EV <sub>2</sub>	ED <sub>2</sub>
<b>Peso Corporal (g)</b>	52.9 ± 8.0	-6.4 ± 3.7*	29.3 ± 6.4 <sup>#</sup>	-18.6 ± 7.7*	196.4 ± 22.8	182.9 ± 20.8	166.4 ± 17.7	142.1 ± 9.0
<b>Peso Próstata ventral (g)</b>	0.71 ± 0.04	0.97 ± 0.05*	0.48 ± 0.06 <sup>#</sup>	1.03 ± 0.07*	0.79 ± 0.05	0.76 ± 0.06	0.76 ± 0.08	1.02 ± 0.13
<b>Peso Relativo Próstata ventral (%)</b>	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01*	0.10 ± 0.01 <sup>#</sup>	0.24 ± 0.02*	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.02
<b>Peso Testículo direito (g)</b>	1.98 ± 0.03	1.76 ± 0.04	1.67 ± 0.08*	1.69 ± 0.07*	1.93 ± 0.07	1.88 ± 0.05	1.90 ± 0.19	1.70 ± 0.19
<b>Peso Relativo Testículo direito (%)</b>	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.04
<b>Peso epidídimo direito (g)</b>	0.69 ± 0.01	0.66 ± 0.01	0.59 ± 0.05	0.60 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.73 ± 0.01	0.72 ± 0.03	0.74 ± 0.06
<b>Peso relativo epidídimo direito (%)</b>	0.13 ± 0.003	0.14 ± 0.005	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.004	0.12 ± 0.004	0.13 ± 0.01
<b>Peso gordura epididimária (g)</b>	7.93 ± 0.47	5.42 ± 0.34*	6.72 ± 1.73 <sup>#</sup>	3.89 ± 0.30*	14.1 ± 1.96	11.19 ± 1.19	11.53 ± 2.00	9.06 ± 0.53
<b>Peso Relativo da gordura epididimária (%)</b>	1.48 ± 0.07	1.12 ± 0.08	1.37 ± 0.18 <sup>#</sup>	0.88 ± 0.06*	2.25 ± 0.29	1.95 ± 0.17	1.94 ± 0.29	1.63 ± 0.09

## 4.2 Estereologia

Os grupos de animais adultos submetidos à atividade física, com ou sem o uso de DN, e os animais sedentários que foram tratados com DN, apresentaram atrofia no epitélio se comparados ao grupo controle, tendo sido mais acentuada no grupo que ingeriu DN sem a prática de atividade física (Tabela 3).

Quando analisados os animais envelhecidos, os grupos que fizeram uso de DN, independentemente da prática de atividade física, mostraram hipertrofia epitelial em relação ao grupo controle, porém esta hipertrofia foi mais acentuada no grupo de animais que não praticou atividade física. Em contrapartida, o grupo de animais exercitados, que não foi tratado com DN, apresentou atrofia do epitélio em relação ao controle (Tabela 3).

Em relação ao volume do estroma, apresentou-se aumentado nos dois grupos de animais adultos que praticaram atividade física, quando comparados ao controle. Já entre os animais envelhecidos, este aumento no volume do estroma foi revertido no grupo que fez uso de DN. O volume relativo do lúmen prostático apresentou-se diminuído nos grupos SD2 e EV2 em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) dos volumes relativos do epitélio, do estroma e do lúmen da próstata ventral dos grupos experimentais, SV, SD, EV e ED. \* = comparação dos grupos tratados com o controle; # = comparação entre grupos que apresentam variável comum;  $p < 0,05$ .

	<b>Grupos</b>	<b>Volume relativo de epitélio (%)</b>	<b>Volume relativo do estroma (%)</b>	<b>Volume relativo do lúmen (%)</b>
<b>ADULTOS</b>	<b>SV<sub>1</sub></b>	16.38 ± 1.46	23.04 ± 2.57	60.60 ± 3.79
	<b>SD<sub>1</sub></b>	12.96 ± 2.08*#	24.21 ± 2.25	62.84 ± 4.25
	<b>EV<sub>1</sub></b>	14.37 ± 2.00*	24.87 ± 2.91*	60.76 ± 3.95
	<b>ED<sub>1</sub></b>	13.99 ± 1.15*	24.66 ± 3.63*	61.36 ± 3.52
<b>ENVELHECIDOS</b>	<b>SV<sub>2</sub></b>	13.33 ± 1.43	23.03 ± 4.20	63.63 ± 4.78
	<b>SD<sub>2</sub></b>	17.56 ± 3.15*#	23.41 ± 3.09	59.03 ± 4.27*
	<b>EV<sub>2</sub></b>	12.21 ± 1.54*#	29.19 ± 2.45*#	58.60 ± 2.36*#
	<b>ED<sub>2</sub></b>	14.25 ± 0.84*	23.64 ± 1.77	62.11 ± 2.24

### 4.3 Fibras de colágeno

A análise de nossos dados mostrou que o DN leva ao aumento de fibras de colágeno geral, tanto nos grupos adultos, quanto durante o processo de envelhecimento (Figura 7).

A quantidade de fibras reticulares, bem como o colágeno geral, aumentou nos grupos adultos que fizeram uso de DN. Já, para os animais envelhecidos, foi observada redução na quantidade de fibras reticulares em todos os grupos (SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub> e ED<sub>2</sub>) quando comparados aos animais do grupo controle (SV<sub>2</sub>) (Figura 8).

A intensidade da reação, para ambas as colorações, está exposta na tabela 4.

Tabela 4 – Análise semiquantitativa das fibras de colágenos na próstata ventral de ratos adultos (SV<sub>1</sub>, SD<sub>1</sub>, EV<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>) e envelhecidos (SV<sub>2</sub>, SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub>, ED<sub>2</sub>).

	SV <sub>1</sub>	SD <sub>1</sub>	EV <sub>1</sub>	ED <sub>1</sub>	SV <sub>2</sub>	SD <sub>2</sub>	EV <sub>2</sub>	ED <sub>2</sub>
<b>Tricrômico de Masson</b>	++	+++	++	+++	++	++	+	+++
<b>Reticulina de Gomori</b>	+	++	+	++	+++	+	+	++

Figura 7 – Lobo ventral da próstata de ratos adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H). As setas indicam as fibras de colágeno esverdeadas. Tricrômico de Masson. LU- Lúmen; EP – Epitélio; ES – Estroma. Barra = 10µm.

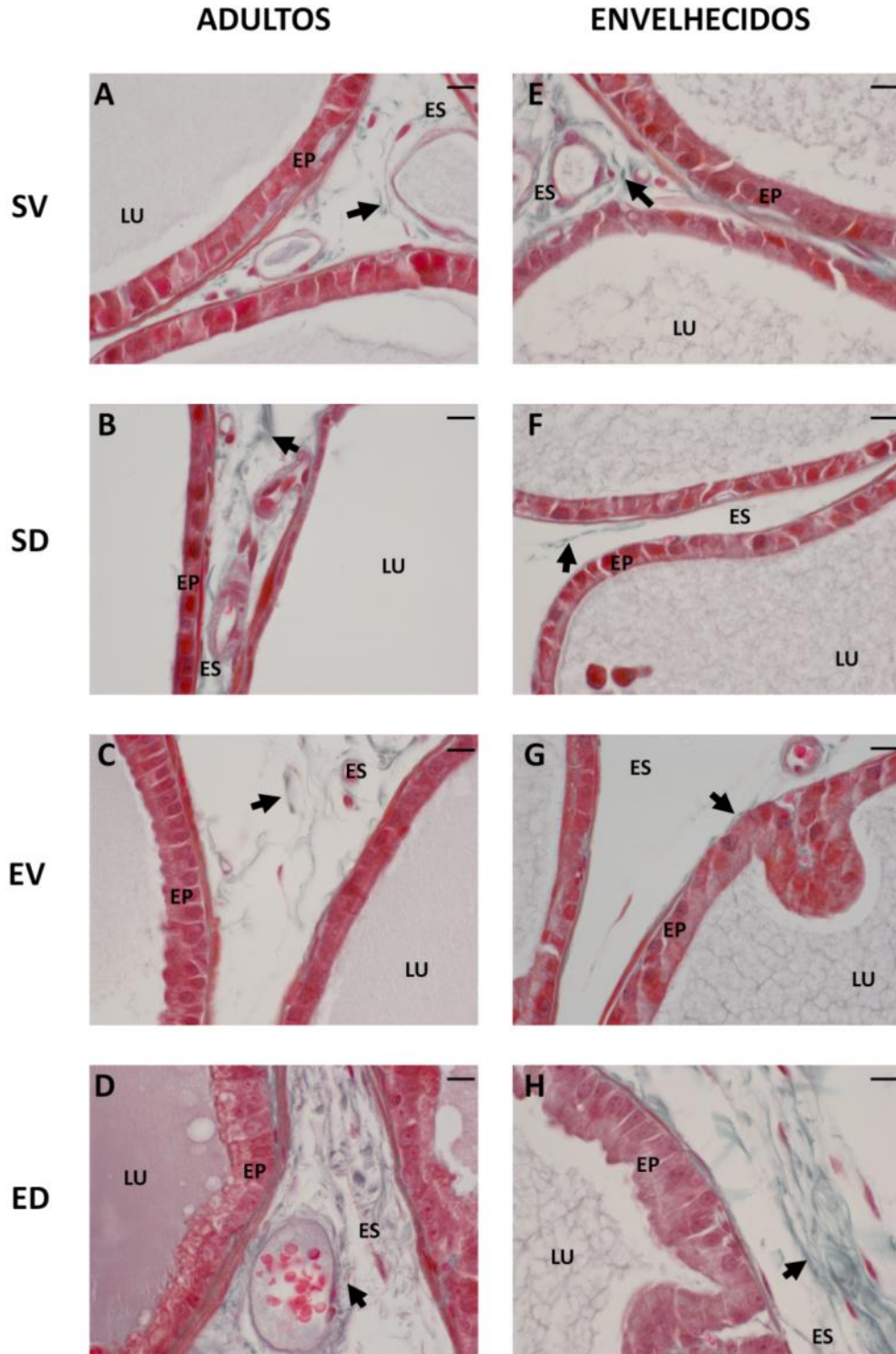
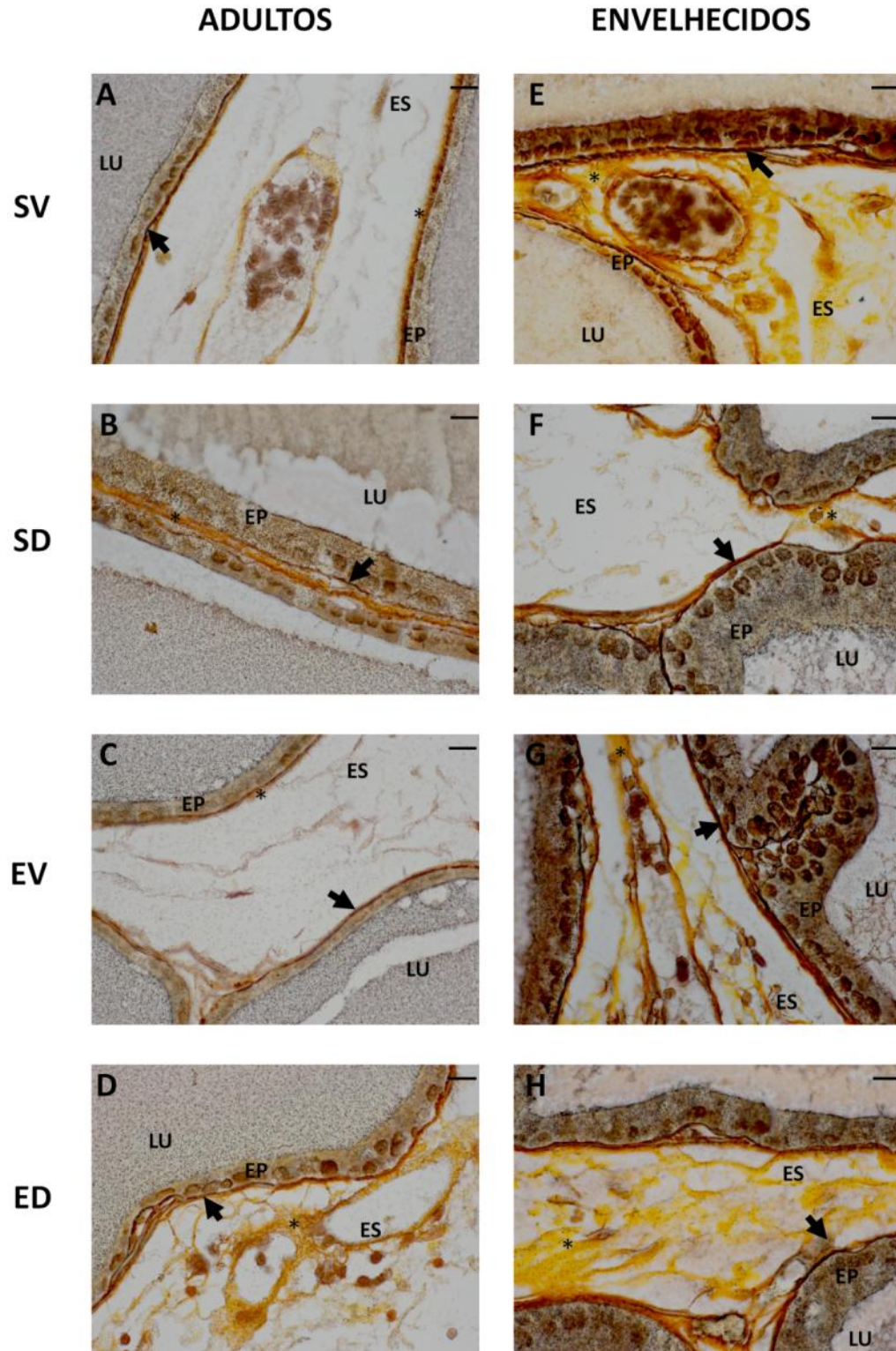


Figura 8 - Lobo ventral da próstata de ratos adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H). Os asteriscos indicam as fibras de colágeno tipo I e as setas indicam as fibras reticulares. Reticulina de Gomori. LU- Lúmen; EP – Epitélio; ES – Estroma. Barra: 10µm.



#### **4.4 Imunoistoquímica**

A Aquaporina-1 foi imunolocalizada nos vasos sanguíneos e músculos liso ao redor do epitélio prostático de todos os grupos estudados (Figura 9). O VEGF foi localizado na região apical do epitélio dos ácinos, nos capilares e vasos sanguíneos, além de ter sido fracamente marcado no estroma prostático (Figura 10).

Figura 9 - Imunolocalização da AQP1 na próstata ventral de ratos adultos (B, C, D, E), envelhecidos (F, G, H, I) e no rim (A) de rato adulto, utilizado como controle positivo. A AQP1 foi localizada na região basal do epitélio prostático (cabeça de seta) e no endotélio de canais vasculares no estroma da próstata (seta). LU- Lúmen; EP – Epitélio; ES - Estroma. Barra: 10µm.

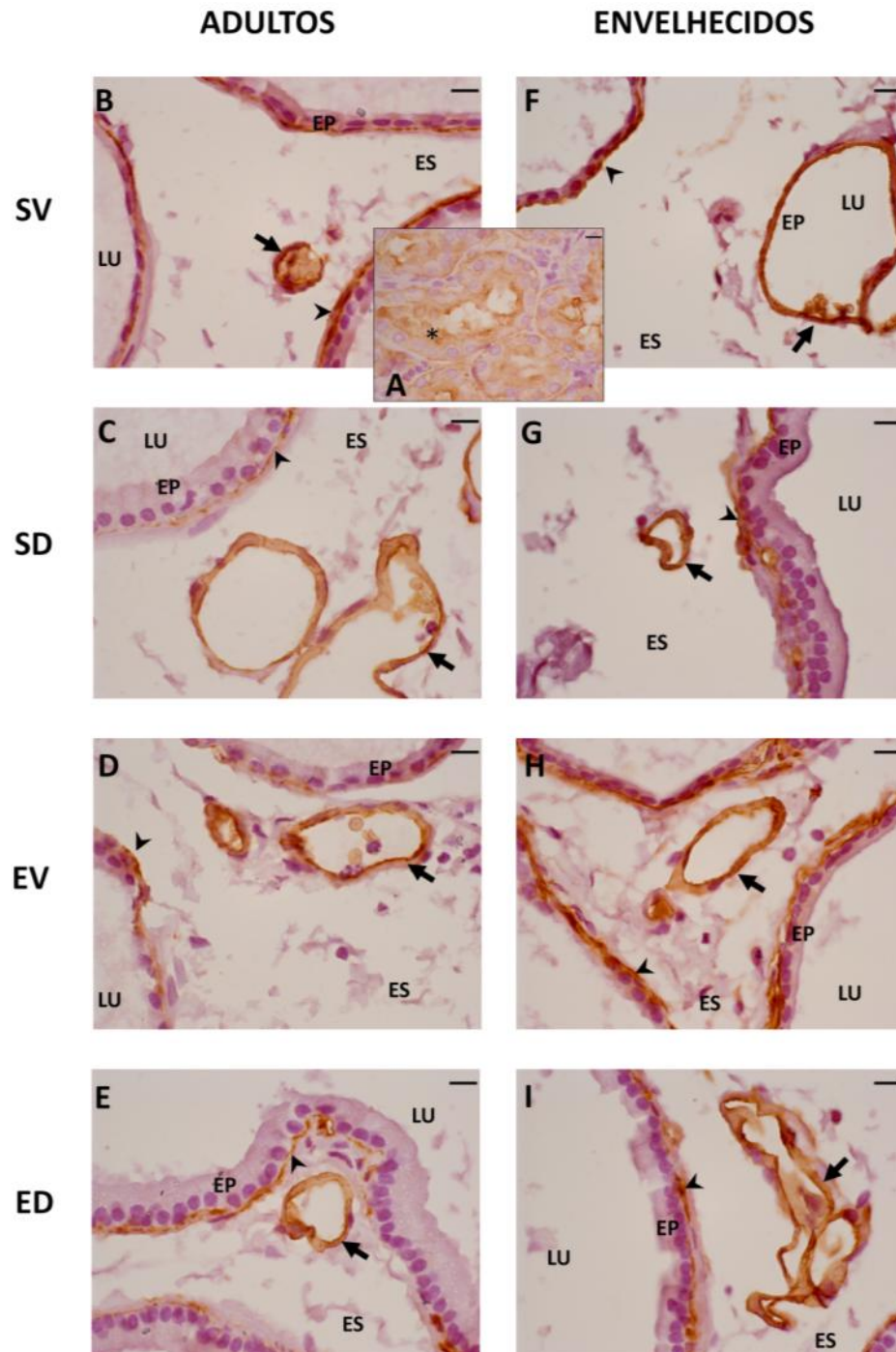
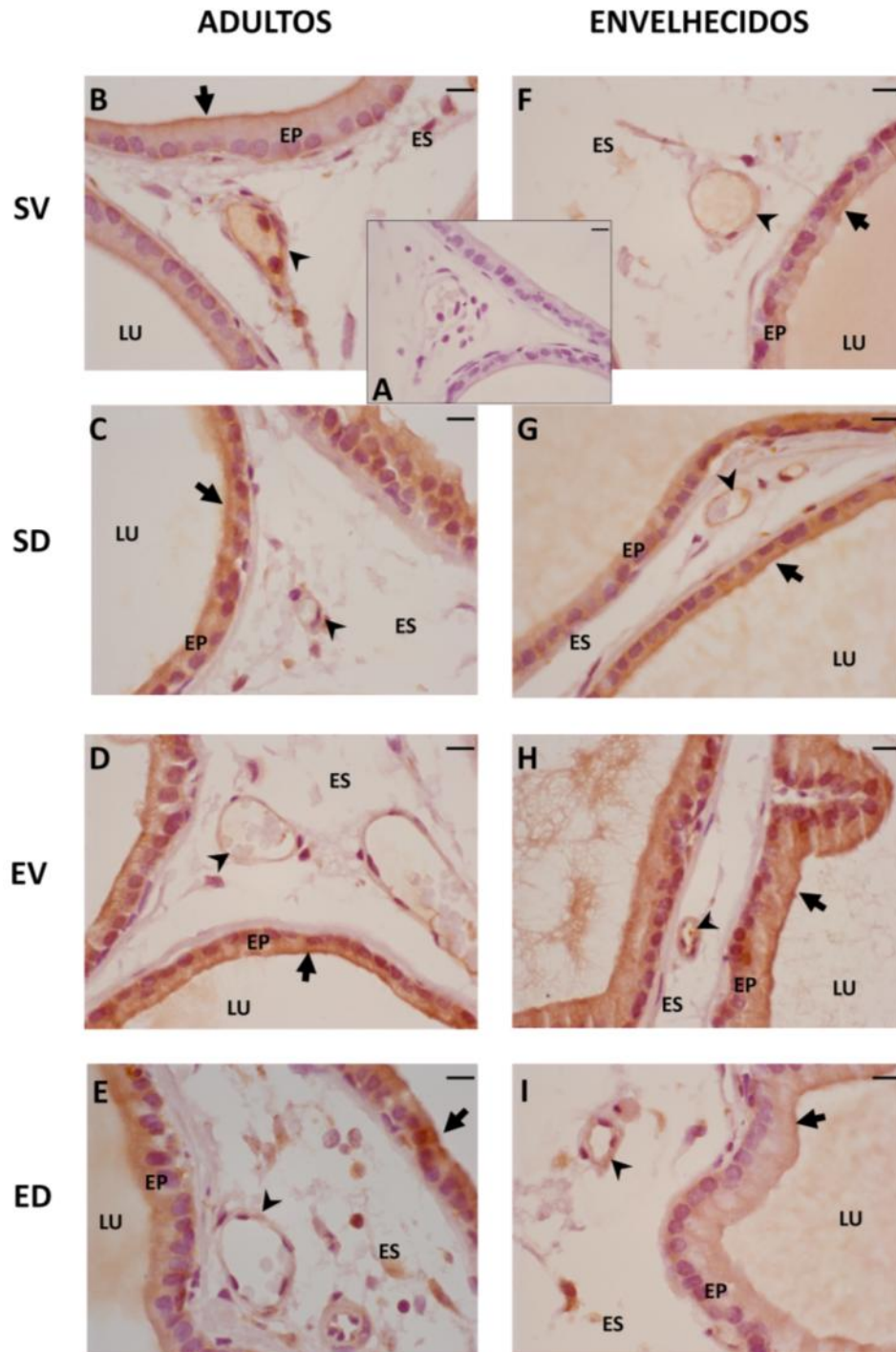




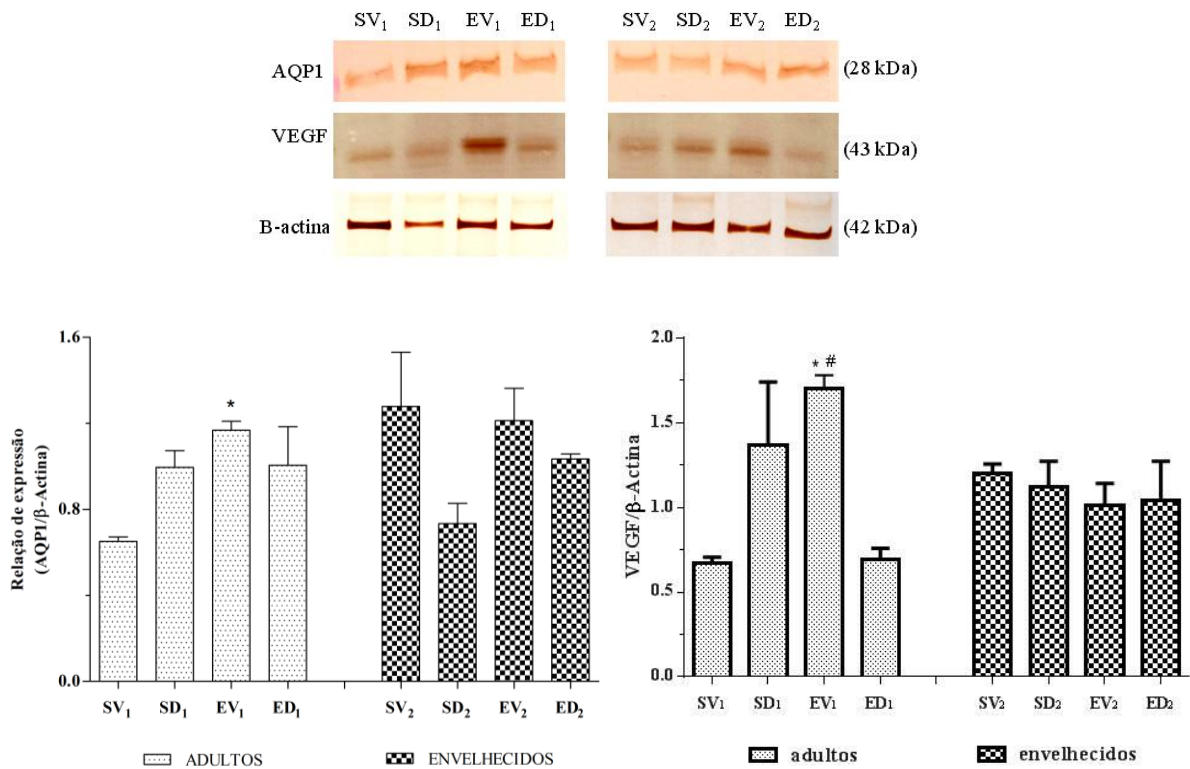
Figura 10 – Imunolocalização do VEGF na próstata ventral de ratos adultos (B, C, D, E) e envelhecidos (F, G, H, I) e controle negativo (A). O VEGF foi localizado no ápice das células epiteliais prostáticas (seta) e no endotélio de vasos sanguíneos no estroma da próstata (cabeça de seta). LU- Lúmen; EP – Epitélio; ES - Estroma. Barra: 10µm.



#### 4.5 Western blotting

A expressão da AQP1 e VEGF foi maior nos animais adultos submetidos ao treinamento físico resistido ( $EV_1$ ) e, ao longo do processo de envelhecimento, não foram encontradas alterações na expressão destas proteínas (Figura 11).

Figura 11 – Análise quantitativa da expressão da AQP1 e VEGF, por *Western Blotting*, na próstata ventral de ratos adultos ( $SV_1$ ,  $SD_1$ ,  $EV_1$ ,  $ED_1$ ) e envelhecidos ( $SV_2$ ,  $SD_2$ ,  $EV_2$ ,  $ED_2$ ).



\* = comparação dos grupos tratados com o controle; # = comparação entre grupos que apresentam variável comum;  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Peso corpóreo e de órgãos do sistema genital

Os grupos de animais adultos, tratados com DN, perderam peso corpóreo quando comparados ao grupo controle, esses dados concordam com resultados previamente descritos, para altas doses de DN.<sup>87,88</sup> Há relatos na literatura que descrevem o efeito do DN como sendo dependente da dose administrada, assim, o uso de esteroides em baixas doses leva ao ganho de peso corpóreo.<sup>89</sup> Os mecanismos envolvidos na redução do peso corpóreo, por doses supra-fisiológicas de EAA, estariam relacionados à redução da produção de testosterona endógena, à excessiva conversão de testosterona em estradiol, bem como ao aumento da oxidação lipídica.<sup>90-92</sup>

O presente estudo mostrou que o tratamento com DN foi determinante para o aumento do peso da próstata ventral, nos animais adultos. Resultados semelhantes foram relatados para ratos hipertensivos tratados com DN.<sup>88</sup> Segundo Takahashi et al.<sup>93</sup>, foi possível observar hipertrofia prostática nos níveis macro e microscópicos tanto em ratos que receberam associação de diferentes EAAs como em ratos que foram tratados apenas com DN ( $8,33 \times 10^{-2}$  mg/g). Em contraste, Karbalay-Doust & Noorafshan<sup>66</sup> verificaram redução no peso e no volume da próstata após 14 semanas de uso do DN (3 mg/kg). Talvez esta discrepância possa estar relacionada com diferenças no período e dose da administração do DN.

É conhecido que os andrógenos regulam a proliferação, a diferenciação e a morte programada das células epiteliais prostáticas.<sup>21-23</sup> Os principais andrógenos, envolvidos no desenvolvimento da próstata, são a testosterona e a diidrotestosterona (DHT), as quais agem mediadas por receptores de andrógeno.<sup>24</sup> Desta forma, tendo em vista que a próstata é um órgão dependente de andrógeno e que o lobo ventral é o mais responsivo a variações hormonais, alterações na estrutura da próstata são esperadas para animais submetidos a tratamento hormonal.

As diferenças no peso dos testículos observadas neste trabalho, também foram descritas por Shokri et al.<sup>65</sup>. Os autores discutiram que o uso de andrógenos exógenos suprime os níveis dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante, oriundos da hipófise, os quais apresentam efeitos sobre o desenvolvimento dos testículos. Os andrógenos exógenos exercem efeito *feedback* negativo no eixo hipotálamo-hipófise-gônada que resultam na

supressão da testosterona endógena, assim, a queda nos níveis intratesticulares de testosterona leva à atrofia testicular.<sup>94</sup>

Além do uso do DN, também a atividade física reduziu o peso dos testículos. Alguns autores sugerem que, durante o exercício físico, o fluxo de sangue para os testículos é reduzido, esta redução leva à queda dos níveis de secreção da testosterona, conseqüentemente, afeta a estrutura dos testículos.<sup>17</sup>

O presente trabalho mostrou redução do peso da gordura epididimária nos animais adultos que fizeram uso de DN. Relatos anteriores mostraram que a gordura abdominal é alvo de andrógenos administrados e que há alteração no peso desta gordura quando animais são tratados com andrógenos.<sup>95</sup> Sabe-se que os adipócitos apresentam receptores de andrógenos<sup>96</sup> e que há relação entre a produção de tecido adiposo e os andrógenos.<sup>95</sup> No entanto, não foi encontrada, na literatura ao alcance, justificativa para a redução da gordura abdominal. Segundo nossos dados, a redução do peso da gordura epididimária está diretamente relacionada à redução do peso corpóreo dos animais.

Entre os grupos de animais envelhecidos, não houve diferença, significativa, para o peso corpóreo ou dos órgãos avaliados e para o peso da gordura epididimária. Para estes parâmetros avaliados, o tempo de interrupção dos treinamentos e da administração de DN foi suficiente para reverter as alterações observadas nos animais sacrificados 48 horas após o período de experimentação.

## 5.2 Estereologia

As análises estereológicas evidenciaram diferenças estruturais na próstata ventral de animais submetidos aos diferentes tratamentos. Tanto a atividade física como a suplementação hormonal alteram os níveis de andrógeno circulantes, levando ao desequilíbrio na homeostasia do órgão, a atividade física devido ao *feedback* negativo no eixo hipotálamo-hipófise -gônada que altera a produção de testosterona testicular<sup>65</sup> e o DN devido ao aumento do nível de andrógeno circulante, que influencia na proliferação celular.<sup>97,98</sup>

A atrofia observada no epitélio dos animais adultos submetidos aos tratamentos, também foi relatada por Karbalay-Coust & Noorafshan<sup>66</sup> para animais tratados com DN. Segundo os autores, esses resultados são atribuídos a vias distintas de ação dos andrógenos

nos tecidos prostáticos. Aparentemente, houve mecanismo compensatório para o volume do estroma, o qual se mostrou aumentado nos animais exercitados.

Os animais envelhecidos, que fizeram uso de DN na juventude, apresentaram hipertrofia epitelial em relação ao grupo controle. Segundo nossos dados, a atividade física atenuou esta hipertrofia epitelial quando foi associada ao tratamento hormonal. Já os animais submetidos à atividade física apenas, sem uso de DN, apresentaram atrofia epitelial. Bem como nos animais adultos, a atividade física parece ter influenciado no aumento do volume do estroma, porém, durante o processo de envelhecimento, o aumento no volume do estroma foi revertido no grupo que fez uso de DN.

A diminuição do volume relativo do lúmen prostático nos grupos SD<sub>2</sub> e EV<sub>2</sub> parece estar relacionada à compensação dos aumentos do volume do epitélio ou do estroma.

### **5.3 Fibras de colágeno**

Baseado em nossos resultados, o esteroide leva ao aumento de fibras de colágeno, no estroma da próstata, tanto nos grupos adultos, quanto durante o processo de envelhecimento. Em trabalho prévio, Gonçalves et al.<sup>99</sup> mostrou tendência de aumento na síntese de colágeno no estroma da próstata ventral de gerbilos submetidos ao tratamento com andrógenos. As fibras de colágeno parecem ser fator determinante em processos patológicos, visto que sua fragmentação resulta em aumento do stress oxidativo e de infiltrados inflamatórios.<sup>100</sup>

Alguns trabalhos indicam possível relação entre estes componentes da matriz extracelular com processos de angiogênese. Assim, as fibras de colágeno estariam envolvidas na migração e agrupamento celular para formação de novos vasos sanguíneos.<sup>101,102</sup>

Após inibir o fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) na próstata, Tuxhorn et al.<sup>102</sup>, observaram redução do número e da densidade dos vasos sanguíneos. O TGF- $\beta$ , importante mediador do processo de reparação e na diferenciação de fibroblastos, apresenta-se aumentado no estroma reativo, este fator promove a síntese de colágeno e apresenta papel importante na angiogênese.<sup>102,103</sup> Desta forma, o aumento das fibras de colágenos está associado com o aumento da angiogênese, principalmente com a produção de fator proangiogênico (VEGF).

## 5.4 AQP1 e VEGF

A AQP1 apresentou padrão de localização semelhante em todos os grupos experimentais, tendo sido observada nos vasos e músculo liso ao redor do epitélio prostático, semelhante aos resultados descritos na literatura<sup>104,105</sup>.

Em relação ao VEGF, a imunistoquímica mostrou que este fator está localizado na região apical do epitélio dos ácinos, nos capilares e vasos da próstata, estes dados estão de acordo com estudos prévios<sup>43-45</sup>. O papel do VEGF no estroma da próstata ainda não foi elucidado, entretanto foi sugerido, para outros tecidos, que o VEGF, no estroma, induz a expressão de proteases e colagenases intersticiais que influenciariam a degradação de matriz extracelular, contribuindo para a formação de novos vasos.<sup>43</sup>

Nossos dados mostraram que o treinamento físico resistido, sem administração de DN, aumentou a expressão da AQP1 e do VEGF em animais adultos. Estes resultados sugerem que, o exercício físico levou à redução do fluxo sanguíneo na próstata, bem como é relatado para outros órgãos do sistema genital masculino<sup>17</sup>. Esta diminuição do fluxo sanguíneo originou um ambiente com níveis reduzidos de oxigênio que foi responsável pela indução da expressão da AQP1 e do VEGF. Trabalhos anteriores<sup>54,106</sup> demonstraram que a hipóxia leva à indução da expressão da AQP1 e do VEGF.

Também há relação entre a expressão da AQP1 e do VEGF na angiogênese tumoral. Segundo Saadoun et al.<sup>46</sup>, a AQP1 estimula a migração de células endoteliais e é fundamental para atrair fatores indutores de angiogênese. Os autores descreveram que a ausência da AQP1, em camundongos geneticamente modificados, reduziu a formação de vasos e o desenvolvimento do tumor implantado. No entanto, estes animais tiveram desenvolvimento normal sem problemas aparentes de vascularização. Desta forma, conforme revisado por Clapp & Escalera<sup>55</sup>, fica claro que os mecanismos responsáveis pela angiogênese normal, são diferentes dos mecanismos envolvidos na angiogênese tumoral. Os autores sugerem que a AQP1 passa por alterações durante o processo de neovascularização patológica e assim, contribui para a formação de vasos tumorais com fenótipo anormal.

No entanto, em nosso trabalho, a correlação encontrada entre o aumento da expressão da AQP1 e do VEGF, nos animais adultos, provavelmente seja explicada pela hipóxia causada pela atividade física, e não como consequência de um processo tumoral, tendo sido

considerada uma angiogênese normal. Pois é conhecido que a AQP1 pode estimular a migração de células endoteliais e a angiogênese, independentemente, de processos tumorais,<sup>55</sup> assim como o VEGF.

Durante o processo de envelhecimento, os níveis de expressão da AQP1 e VEGF foram reestabelecidos para próximo do nível do grupo controle. Entretanto, observou-se que durante o envelhecimento os níveis de AQP1 e VEGF aumentam naturalmente no grupo controle ( $SV_1$  comparado a  $SV_2$ ). Montico et al.<sup>107</sup> mostraram resultado similar na expressão de VEGF em ratos com 300 dias de idade. Possivelmente este aumento da expressão destas proteínas aumenta a habilidade de estimular a vascularização.

Segundo Saadoun et al.<sup>46</sup>, a inexistência de correlação direta nos níveis de expressão da AQP1 e do VEGF, entre os animais envelhecidos, pode ser indicativo que a formação de vasos sanguíneos segue os processos fisiológicos normais. Assim, analisando estes parâmetros, nossos resultados sugerem que para estes protocolos experimentais utilizados, não há angiogênese patológica.

## 6 CONCLUSÃO

Baseado em nossos resultados foi possível observar que:

- O DN e a atividade física alteram a estrutura da próstata ventral de ratos;
- O exercício físico resistido interfere na expressão da AQP1 e do VEGF, em animais jovens;

Portanto, o uso do DN, associados ou não ao exercício físico, em fase pós-púbere, interfere na morfofisiologia do envelhecimento da próstata.



## REFERÊNCIAS

1. Aumüller G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat. Embryol.* 1989;179: 519-31.
2. Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11: 225-54.
3. Price D, Williams-Ashman HG. The accessory reproductive glands of mammals. In: Young WC, editor. *Sex and internal secretions.* 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1961;366–448.
4. Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka S, Liao S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morfological and functional activities. *Biol Reprod.* 1990;43:1079-86.
5. Colombel MC, Buttyan R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. *Methods Cell Biol.* 1995;46:369-85.
6. Slayter MV, Anzano MA, Kadomatsu K, Smith JM, Sporn MB. Histogenesis of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. *Cancer Res.* 1994;54:1440-5.
7. Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1963;12:1–27.
8. McNeal JE. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol.* 1984;15: 7709-24.
9. Fine SW, Reuter VE. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology.* 2012;60(1):142-52.
10. Wendell-Smith C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin Anat.* 2000;13: 207-13.

11. Aumüller G, Adler G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.* 1979;198:145-58.
12. Abrahamsson PA, Lilja H. Partial characterization of a thyroid-stimulating hormone-like peptide in neuroendocrine cells of the human prostate gland. *Prostate.* 1989;14:71-81.
13. Dorkin TJ, Neal DE. Basic science aspects of prostate cancer. *Semin Cancer Biol.* 1997;8(1):21-7.
14. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988;12:619-33.
15. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001;166:2472-83.
16. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation.* 2002;70:473- 85.
17. Hackney AC. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men: alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Curr Pharm Des.* 2001 Mar;7(4):261-73.
18. Yadav N, Heemers HV. Androgen action in the prostate gland. *Minerva Urol Nefrol.* 2012 Mar;64(1):35-49.
19. Ho PJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;16(2):145-54.
20. Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. *Anatomic Rec.* 2006;288(A):885-92.
21. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinol Rev.* 1987;8:338–62.
22. Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate.* 1984;5:545–57.
23. Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology.* 1988;122:552–62.

24. Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, Foster BA. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl.* 1992;13:465-75.
25. Toorians AW, Kelleher S, Gooren LJ, Jimenez M, Handelsman DJ. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5207-11.
26. Droller MJ. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol.* 1997;79:42-52.
27. Banerjee S, Banerjee PP, Brown TR. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology.* 2000;141:821-2.
28. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:6330-5.
29. Timms BG, Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82:173–83.
30. Scarano WR, Vilamaior PSL, Taboga SR. Tissue Evidence of the Testosterone Role on the Abnormal Growth and Aging Effects Reversion in the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Prostate. *Anat Rec.* 2006;288(A):1190–200.
31. Scarano WR, Sousa DE, Campos SGP, Corradi LS, Vilamaior PSL, Taboga SR. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. *Int J Exp Path.* 2008;89:25-37.
32. Billis A. *Uropatologia: Próstata: Guia prático para o diagnóstico anatopatológico.* 1ª Edição. Goiânia: Editora UFG, 212, 1997.
33. Naz RK. *Prostate: Basic and clinical aspects.* Boca Raton: CRC Press; 1997.
34. Woenckhaus J, Fenic I. Proliferative inflammatory atrophy: a background lesion of prostate cancer? *Andrologia.* 2008;40:134–7.

35. Damjanov I, Linder J. *Anderson's Pathology*, ed 10, 2: 2166–2230 Mosby-Year Book Inc.: St Louis, Mo, 1996.
36. Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Impotence Research*. 2008;20(3):11–8.
37. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931-4.
38. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146(5):1029-39.
39. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 2:S3.
40. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*. 2013 Feb;273(2):114-27.
41. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. 1997;18(1):4-25.
42. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
43. Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1997 Jun;157(6):2323-8.
44. Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Hayek OR, Knight C, Shabsigh A, Taille ADL, Buttyan R. Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in the Rat Ventral Prostate Gland and the Early Effects of Castration. *The Prostate*. 2000;43:184–94.
45. Fávoro WJ, Cagnon VHA. Effect of combined hormonal and insulin therapy on the steroid hormone receptors and growth factors signalling in diabetic mice prostate. *Int J Exp Pathol*. 2010; 91(6): 537–545.

46. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*. 2005;434(7034):786-92.
47. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 200;278:F13-28.
48. Cheidde L, Schor N. Revisão: transportadores de água. *Rev Ass Med Brasil*. 1999;45(1):71-8.
49. Brown D, Verbavatz JM, Valenti G, Lui B, Sabolic I. Localization of the CHIP28 water channel in reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. *Eur J Cell Biol*. 1993; 61(2): 264-73.
50. Fisher PB. Prostate Cancer – CHI Conference. Advances in understanding diagnostics and therapy. *J Drugs*. 1998;1(1):63-6.
51. Domeniconi RF, Orsi AM, Justulin LA, Leme Beu CC, Felisbino SL. Immunolocalization of aquaporins 1,2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res*. 2008;332(2):329-35.
52. Hermo L, Smith CE. Thirsty business: cell, region, and membrane specificity of aquaporins in the testis, efferent ducts, and epididymis and factors regulating their expression. *J Androl*. 2011;32(6):565-75.
53. Zhu C, Luong R, Zhuo M, Johnson DT, McKenney JK, Cunha GR, Sun Z. Conditional expression of the androgen receptor induces oncogenic transformation of the mouse prostate. *J Biol Chem*. 2011; 286(38):33478-88.
54. Tie L, Lu N, Pan XY, Na Y, Gao JW, Lin YH, Yu HM, Li XJ. Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 protein in prostate cancer cells in a p38-dependent manner. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29:269-80.
55. Clapp C, Escalera GM. Aquaporin-1: a novel promoter of tumor angiogenesis. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 2006;17(1).

56. Mobasheri A, Airley R, Hewitt SM, Marples D. Heterogeneous expression of the aquaporin 1 (AQP1) water channel in tumors of the prostate, breast, ovary, colon and lung: a study using high density multiple human tumor tissue microarrays. *Int J Oncol.* 2005;26(5):1149-58.
57. Brogårdh C, Lexell J. Effects of Cardiorespiratory Fitness and Muscle-Resistance Training After Stroke. *Exercise and Sports for Health Promotion, Disease, and Disability.* 2012;4(11):901-7.
58. Murtona AJ, Greenhaffb PL. Resistance exercise and the mechanisms of muscle mass regulation in humans: Acute effects on muscle protein turnover and the gaps in our understanding of chronic resistance exercise training adaptation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2013; In Press.
59. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2010 Sep;46(14):2593-604.
60. Teixeira GR, Fávoro WJ, Pinheiro PF, Chuffa LG, Amorim JP, Mendes LO, Fioruci BA, Oba E, Martins OA, Martinez M, Martinez FE. Physical exercise on the rat ventral prostate: steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports* 2012; 22: e86-e92.
61. Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav.* 1997;31:35-46.
62. Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World J Urol.* 2003;21(5):341-5.
63. Gordon PL, Frassetto LA. Management of Osteoporosis in CKD Stages 3 to 5. *American Journal of Kidney Diseases.* 2010;55(5):941-56.
64. Crandall C. Combination Treatment of Osteoporosis: A Clinical Review. *Journal of Women`s Health & Gender-Based Medicine.* 2002;11(3).
65. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahhabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Ejtemaeimehr S, Ahmadian S, Minaei B, Naraghi MA, Barbarestani M. Exercise and

Supraphysiological Dose of Nandrolone Decanoate Increase Apoptosis in Spermatogenic Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2009;106:324-30.

66. Karbalay-Doust S, Noorafashan A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. *Micron*. 2006;37:617-23.

67. Johnson CA. Use of androgens in patients with failure renal. *Seminars in Dialysis*. 2000;13(1):36-9.

68. Deicher R, Horl WH. Hormonal adjuvants for the treatment of renal anaemia. *European Journal of Clinical Investigation*. 2005;35(3):75-84.

69. Johanse KL, Painter PL, Sakkas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T. Effects of Resistance Exercise Training and Nandrolone Decanoate on Body Composition and Muscle Function among Patients Who Receive Hemodialysis: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17:2307-14.

70. Dudgeon WD, Philips KD, Carson JA, Brewer RB, Durstinei JL, Hand GA. Counteracting muscle wasting in HIV- infected individuals. *British HIV Association HIV Medicine*. 2006;7:299-310.

71. Mullgan K, Schambelan M. Anabolic treatment with GH, IGF-I, or anabolic steroids in patients with HIV-associated wasting. *International Journal of Cardiology*. 2002;85:151-9.

72. Socas L, Zumbado M, Pérez-Luzardo O, Ramos A, Pérez C, Hernandez Jr B. Hepatocellular adenomas associated with anabolic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br J Sports Med*. 2005;39:1-4.

73. Lucia A, Chicharro JL, Perez M, Serratos L, Bandres F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Applied Physiology*. 1996;81(6):2627-36.

74. Torres-Calleja J, Gonzalez-Unzaga M, Decelis-Carrillo R, Calzada-Sanchez L, Pedron N. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. *Life Sci*. 2001;68:1769-74.

75. Nagata S, Kurosawa M, Mima K, Nambo Y, Fujii Y, Watanabe G, Taya K.. Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormones in the stallion. *J. Reprod. Fertil.* 1999;115:373–9.
76. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS.* 2005;113:122-5.
77. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med.* 2004;34:513-54.
78. Froenher M, Fischer R, Leike S, Hakenberg OW, Noack B, Wirth MP. Intratesticular leiomyosarcom in a young man after high dose with oral-turinabol. *Cancer.* 1999;86(8): 1571-5.
79. Friedenreich CM, Thune I. A review of physical activity and prostate cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2001;12(5):461-75.
80. Kraus RM, Stallings HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol.* 2004;96(4):1445-50.
81. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis.* 2005;8(3):263-71.
82. Pope HG, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry.* 1988;145(4):487-90.
83. Harri M, Kuusela P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiol Scand.* 1986;126:189-97.
84. Kolasa A, Marchlewicz M, Venda-Rózewicka L, Wiszniewska B. Morphology of the testis and the epididymis in rats with dihydrotestosterone (DHT) deficiency. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2004;49(1):117-9.
85. Greiwe JS, Hickenr RC, Hansen PA, Racette SB, Chen MM, Hollsyz JO. Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *Journal of Applied Physiology.* 1999;87:222-6.



86. Weibel ER, Paumgartner D. Integrated stereological and biochemical studies on hepatocytic membranes. II. Correction of section thickness effect on volume and surface density estimates. *J Cell Biol.* 1978;77(2):584-97.
87. Bauman DH, Richerson JT, Britt AL. A comparison of body and organ weights, physiologic parameters, and pathologic changes in target organs of rats given combinations of exercise, anabolic hormone, and protein supplementation. *Am J Sports Med.* 1998;16:397-402.
88. Tseng YT, Rockhold RW, Hoskins B, Ho IK. Cardiovascular toxicities of nandrolone and cocaine in spontaneously hypertensive rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1994 Jan;22(1):113-21.
89. Choo JJ, Emery PW, Rothwell. Dose-dependent effects of an anabolic steroid, nandrolone phenylpropionate (Durabolin), on body composition and muscle protein metabolism in female rats. *Ann Nutr Metabol.* 1991;35:141-7.
90. Hickson RC, Kurowski TG. Anabolic steroids and training. *Clin Sports Med.* 1986;5(3):461-9.
91. Ryan AJ. Anabolic steroids are fool's gold. *Fed Proc.* 1981;40(12):2682-8.
92. Guzmán M, Saborido A, Castro J, Molano F, Meigas. Treatment with anabolic steroids increases the activity of the mitochondrial outer carnitin palmitoyltransferase in rat liver and fast-twitch muscle. *Biochem Pharm* 1991;41:833-5.
93. Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T. Endocrinological and pathological effects of anabolic androgenic steroids in male rats. *Endocrine Journal* 2004;51:425-34.
94. Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolic androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav* 1997;62:23–30.
95. Serazin-Leroy V, Morot M, Mazancourt PD, and Giudicelli Y. Androgen regulation and site specificity of angiotensinogen gene expression and secretion in rat adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:E1398–405.
96. Pergola G, Xu X, Yang S, Giorgino R, and Bjorntorp P. Up-regulation of androgen receptor binding in male rat fat pad adipose precursor cells exposed to testosterone: study in a whole assay system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990;37:553–8.

97. Hudak SJ, Hernandez J, Thompson LM. Role of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors in the management of prostate cancer. *Clin Intern Aging*. 2006;1(4):425-31.
98. Nicholson TM, Ricke WA. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*. 2011; 82(4-5):189-99.
99. Gonçalves BF, Zanetoni C, Scarano WR, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR, Campos SGP. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Experimental and Molecular Pathology*. 2010;88(1):96–106.
100. Bianchi-Frias D, Vakar-Lopes F, Coleman IM, Phymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *Plos one*. 2010;5(9):e1250.
101. Elkin M, Ariel I, Miao HQ, Nagler A, Pines M, de-Groot N, Hochberg A, Vlodaysky I. Inhibition of Bladder Carcinoma Angiogenesis, Stromal Support, and Tumor Growth by Halofuginone 1. *Cancer Res*. 1999;59(4111).
102. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$  Activity Decreases Angiogenesis in a Human Prostate Cancer-reactive Stroma Xenograft Model 1. *Cancer Res*. 2002;62(6021).
103. Delella FK, Felisbino SL. Doxazosin treatment alters stromal cell behavior and increases elastic system fibers deposition in rat prostate. *Microscopy Research and Technique*. 2010;73(11):1036–44.
104. Lu DY, Li Y, Bi ZW, Yu HM, Li XJ. Expression and immunohistochemical localization of aquaporin-1 in male reproductive organs of the mouse. *Anat Histol Embryol*. 2008;37:1-8.
105. Jung SI, Lee HS, Kim HS, Ahn K, Park K. Effects of castration on the expression of aquaporins and apoptosis in the ventral prostate. *J Mens Health*. 2012;9:238-44.
106. Jones LW, Antonelli J, Masko EM, Broadwater G, Lascola CD, Fels D, Dewhirst MW, Dyck JRB, Nagendran J, Flores CT, Betof AS, Nelson ER, Pollak M, Dash RC, Young ME, Freedland SJ. Exercise modulation of the host-tumors interaction in an orthotopic model of murine prostate cancer. *J Apply Physiol*. 2012;113:263-72.

107. Montico F, Hetzl AC, Cândido EM, Cagnon VHA. Angiogenic and Tissue Remodeling Factors in the Prostate of Elderly Rats Submitted to Hormonal Replacement. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296:1758–67.

## APÊNDICE A

Consumo de ração e ingestão d'água no período de treinamento de exercício dos ratos eutanasiados com 21 e 43 semanas, e no período pós-treinamento dos ratos envelhecidos. *BW* – peso corporal; PE – Período durante as oito semanas de experimento; PT – período após o término do treinamento. Os símbolos representam diferenças significativas, por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer. \* $p < 0,05$ , em comparação ao grupo  $SE^{PT}$ ; e  $p < 0,01$ , com relação aos grupos  $EV^{PT}$  e  $ED^{PT}$ . #  $p < 0,05$ , em relação aos grupos  $EV^{PE}$  e  $ED^{PE}$ .

Grupos	Consumo ração	Ingestão d'água
	(g/100g <i>BW</i> /dia)	(ml/100g <i>BW</i> /dia)
<b>SV<sub>1</sub></b>	7,13 ± 0,10	9,09 ± 0,26
<b>SD<sub>1</sub></b>	7,45 ± 0,21	9,43 ± 0,38
<b>EV<sub>1</sub></b>	7,45 ± 0,18	9,79 ± 0,73
<b>ED<sub>1</sub></b>	7,74 ± 0,23	9,52 ± 0,14
<b>SV<sub>2</sub><sup>PE</sup></b>	4,94 ± 0,07	9,45 ± 0,34
<b>SD<sub>2</sub><sup>PE</sup></b>	5,04 ± 0,07	10,98 ± 0,45 <sup>#</sup>
<b>EV<sub>2</sub><sup>PE</sup></b>	5,86 ± 0,18	9,09 ± 0,57
<b>ED<sub>2</sub><sup>PE</sup></b>	5,06 ± 0,06	9,27 ± 0,30
<b>SV<sub>2</sub><sup>PT</sup></b>	5,26 ± 0,12 <sup>*</sup>	8,90 ± 0,48
<b>SD<sub>2</sub><sup>PT</sup></b>	5,85 ± 0,19	8,68 ± 0,71
<b>EV<sub>2</sub><sup>PT</sup></b>	5,99 ± 0,13	9,89 ± 0,63
<b>ED<sub>2</sub><sup>PT</sup></b>	5,95 ± 0,09	9,43 ± 0,55

## ANEXO A



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



## *Certificado*

Certificamos que o Protocolo nº **385-CEUA**, sobre “Efeitos da interação entre o uso de altas doses de Decanoato de Nandrolona e o exercício resistido durante a fase pós-púbere sobre a próstata de ratos em processo de envelhecimento”, sob a responsabilidade de **Raquel Fantin Domeniconi**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 08 de março de 2012.

**Prof.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente da CEUA

Instituto de Ciências - Diretoria Técnico Acadêmica  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil  
Tel. 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br