

Análises histopatológicas, bioquímicas e moleculares sobre os 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.

**FABIANA DE CAMPOS GOMES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Profª. Dra. *Raquel Fantin Domeniconi*

**BOTUCATU – SP  
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Análises histopatológicas, bioquímicas e moleculares sobre os 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.

**FABIANA DE CAMPOS GOMES**

**PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. RAQUEL FANTIN DOMENICONI**

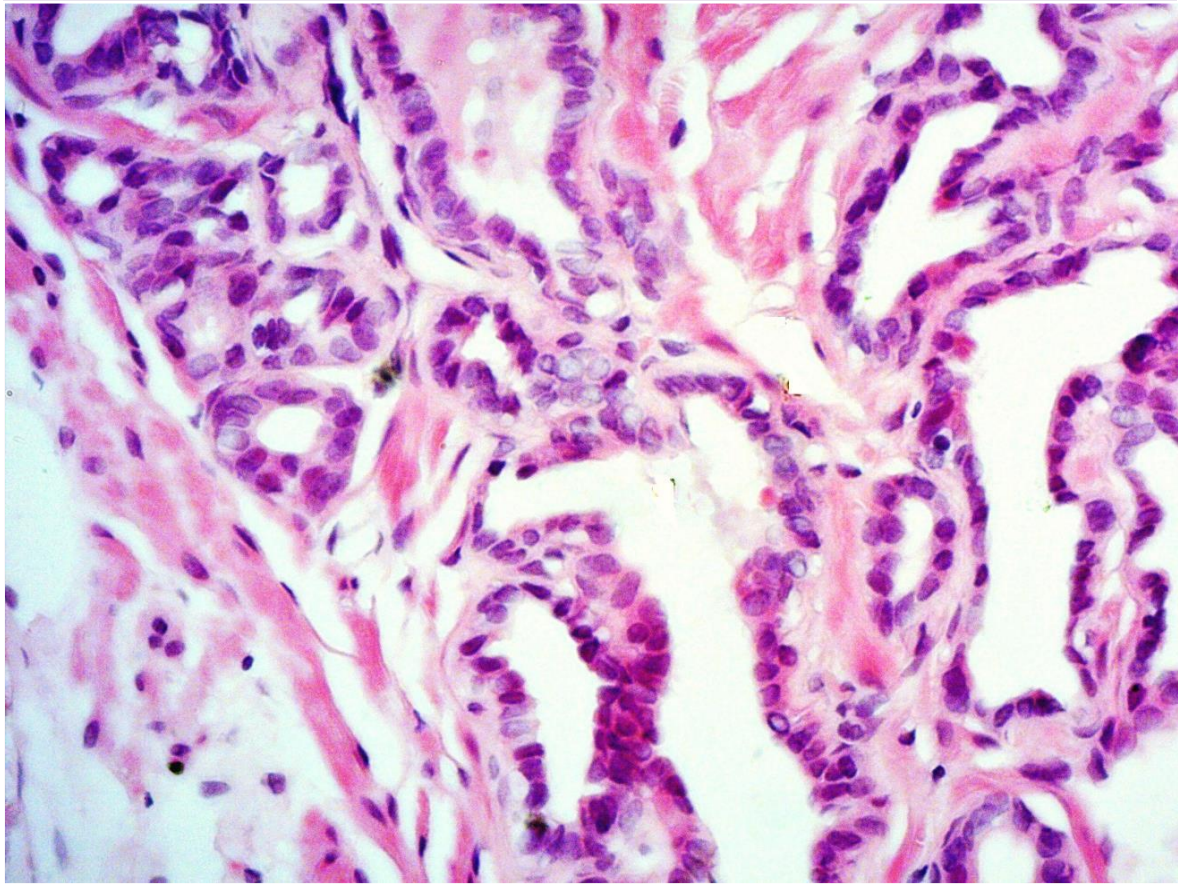
**PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Profa. Dra. *Raquel Fantin Domeniconi*

**BOTUCATU – SP  
2014**

Análises histopatológicas, bioquímicas e moleculares sobre os 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.



## *Dedicatória*

O Senhor é a minha rocha, a minha fortaleza e o meu libertador; o meu Deus é o meu rochedo, em quem me refugio. Ele é o meu escudo e o poder que me salva, a minha torre alta (18:1-2).

**Primeiramente a DEUS, a JESUS, a NOSSA SENHORA APARECIDA...**

Por guiar os meus passos, pelo dom da vida e pelo imenso amor incondicional.

**A minha Mãe...**

Por tudo, tudo que sempre fez por nós, e por tudo que seria capaz de fazer... Pelos ensinamentos e pela sua existência.

"Não existe falta de tempo, existe falta de interesse. Porque quando a gente quer mesmo, a madrugada vira dia. Quarta-feira vira sábado e um momento vira oportunidade." Pedro Bial.

"Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa".Albert Einstein.

"Diante dos olhos do CRIADOR você jamais será só mais um, e sim um a mais, pra fazer a diferença no mundo real e na vida de alguém". Fabiana de Campos Gomes.

# *Agradecimentos*

Primeiramente a DEUS por iluminar a minha vida, por conduzir o meu caminho e os meus passos, e por estar comigo em Todos os Momentos...

À minha Mãe, à vó Zenaide, aos meus irmãos Fabiano, Floriano, Floriana pelo apoio e incentivo para seguir em frente... Ao meu pai pelas broncas e contratempos que sempre foram uma alavanca para prosseguir adiante...

Aos meus familiares: os que estiveram comigo desde os primeiros passos: de SONHO e realização; FRACASSO e vitória, os que Permaneceram ao meu lado nestes Momentos: OBRIGADA!

À minha orientadora Profa. Dra. Raquel por oferecer e disponibilizar a oportunidade de iniciar os meus primeiros passos na pós-graduação, pelos ensinamentos, pelo voto de confiança e por acreditar que eu seria capaz mesmo sem me conhecer...

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wagner por despertar em mim a curiosidade de trabalhar com este mundo fantástico de moléculas... Pela orientação e todo conhecimento adquirido em cada conversa...

À agência FAPESP por todo suporte financeiro para realização e concretização deste Projeto incluindo: a disponibilização da Bolsa de Mestrado e do Auxílio Pesquisa.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, por todos os recursos fornecidos para nossa formação e pela disponibilização da Bolsa CAPES no início do Mestrado...

Aos funcionários da Pós-graduação pelos esclarecimentos e pelo excelente atendimento...

Ao Prof. Dr. Gustavo por partilhar o seu conhecimento, o seu “poder de investigação”, pela disponibilidade e atenção em tudo que sempre precisei, e pelo seu exemplo como pesquisador...

À Profa Dra. Patrícia por todas as vezes que “gritei socorro” sempre esteve disposta a me ajudar em tudo... No que fosse necessário...

Ao Prof. Dr. Renato pela disponibilidade todas as vezes que precisei e pelos conhecimentos transmitidos...

Ao Prof. Dr. Wilson e ao Prof. Dr. Sérgio pelas orientações e ensinamentos durante a realização do estágio docência...

Aos Professores (a)Dr. (a) Bruno, Anchieta e Cintia e aos demais Professores do departamento de Anatomia... obrigada pelo acolhimento e experiências trocadas...

Ao Prof. Dr. Wellerson por toda a disponibilidade em me ajudar no que no que fosse necessário... Os conhecimentos transmitidos e a contribuição de sempre na realização do nosso trabalho...

Ao Prof. Dr. Gilson Volpato pelos ensinamentos... Sem dúvida essencial para execução deste trabalho...

À secretaria do departamento de Anatomia Cristiane por toda atenção e disponibilidade em ajudar independente de qualquer coisa...

Ao Gelson... Sem dúvida fundamental para execução deste trabalho, obrigada pelo suporte técnico e principalmente pela amizade...

À Vanda por todo carinho e atenção de sempre... E pela manutenção e organização impecável do nosso ambiente de trabalho...

As meninas que passaram por aqui... Larissa e Tabata obrigada por tudo!!E pelos bons e inesquecíveis momentos compartilhados...

Aos Pós graduando Leonardo pelos momentos de descontração e por toda ajuda oferecida no decorrer destes anos, em especial a Beatriz pelo acolhimento, pelos ensinamentos no laboratório, apoio, incentivo e principalmente pela amizade...

Às meninas Roberta: sem dúvida fundamental para finalização deste trabalho, obrigada por estar comigo em todos os momentos que mais precisei! Pelo incentivo constante: “tenta outra vez”, “vamo-lá eu ajudo”, “calma Fabi vai dar certo” você sem dúvida faz parte deste trabalho!!! E você Veridiana... O meu muito obrigado por tudo e por sempre!!! E pela sua amizade sincera...

Às colegas: Ana Carolina por me “aturar” por tanto tempo, aos sábados e aos domingos no laboratório, eu sei que você adorava rs... Sem dúvida este trabalho também é seu... OBRIGADA! Talita obrigada pela ajuda quando solicitei...

Aos pós-graduandos do departamento de Morfologia do laboratório de Desreguladores Endócrinos e Carcinogênese (IB – UNESP - SP) pelo suporte técnico, recursos e pela disponibilidade sempre que precisei...

Aos pós-graduandos do departamento de Anatomia do laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (IB- UNICAMP – SP) em especial ao Patrick, a Letícia, Amanda e a Ana obrigada pelos insubstituíveis conhecimentos transmitidos... e por toda ajuda na realização das técnicas...

Ao João pela amizade e por partilhar os seus conhecimentos, pela contribuição na realização deste trabalho... Epor estar ao meu lado nos momentos de tristeza e alegria...

À minha “irmã” botucatuense: Natália Totti obrigada pela confiança e amizade! Por todos os momentos de felicidades, desabafos e angústias compartilhadas... E a senhora Dona Maria: muito obrigada por me acolher com carinho em sua casa, e por tudo que sempre fez por mim...

Ao seu Oriás e ao Olegário pelas caronas diárias e constantes, por todas as broncas ouvidas, as “enrolações” no horário de saída para que pudessem me esperar... Muito OBRIGADA!!!

Aos meus Prof. (a) de graduação Zé Luiz, Suzete, Otávio, Geisa e Luciana que sempre confiaram e sempre me motivaram a seguir adiante...Em especial a Profa Patrícia pela confiança, e por disponibilizar a possibilidade deste trabalho existir...

Aos meus colegas de turma Marcos, Sabrina, Mariane, Sílvia e Natália, obrigada pelos momentos compartilhados e a torcida constante: “mesmo desconhecendo, sabiam que concretizaria...”

Aos meus colegas de trabalho da época de Escola... Às Profas. Milene, Cristiane, Thaís, Neisa, Nílvia, Vilma, Ana Paula e Ivani obrigada por todo apoio e incentivo no inicio desta caminhada... E principalmente a Dona Norma por todo apoio incondicional nesta escolha...

E a todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para concretização deste sonho: OBRIGADA!!!

**“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de Gigantes” (Isaac Newton).**



## RESUMO

Em doses supra fisiológicas o Decanoato de Nandrolona (DN), associado ao exercício físico pode alterar os níveis androgênicos, afetando órgãos dependentes de andrógenos, incluindo a próstata. Estas alterações podem afetar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), favorecer o surgimento de lesões patológicas e ativar a via inflamatória. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar possíveis alterações na morfofisiologia da próstata ventral, de ratos adultos e envelhecidos, decorrentes do uso de DN associado ou não ao treinamento físico resistido (TFR). 56 ratos da linhagem Sprague-dawley foram divididos em oito grupos (n=7). Em seguida tratados por oito semanas e divididos em sedentários e treinados com ou sem uso de DN. Após este período o tratamento foi interrompido. Os animais adultos foram eutanasiados 48 horas após o período experimental, e os envelhecidos com 300 dias de idade. A próstata ventral foi processada para análises morfométrica, histopatológicas, imunoistoquímica e de *Western blotting*. A altura do epitélio da próstata mostrou-se alterada imediatamente após interrupção do TFR e/ou a administração de DN. As alterações observadas nos níveis de testosterona e estradiol plasmáticos, em animais adultos expostos ao DN e ao TFR, foram persistentes durante o processo de envelhecimento. A expressão dos receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) aumentou com uso de DN, na fase adulta e a expressão do ER  $\beta$  reduziu em todos os grupos envelhecidos tratados. O TFR foi determinante na redução do AR nos animais envelhecidos. Os animais que receberam DN e fizeram o TFR na fase adulta apresentaram maior ocorrência de lesões patológicas na próstata ventral, que levaram à ativação do TLR4. Também a expressão de TLR2, NOX1 e Nrf2 aumentou em grupos expostos ao DN. As lesões patológicas favoreceram o aumento da expressão de NF $\kappa$ B, IRF3 e MAPK, com a produção de TNF $\alpha$  e IL-6. Nos animais envelhecidos foi observado aumento na expressão de NF $\kappa$ B e produção de citocinas em animais submetidos ao TFR e DN, independentes de TLR2 e TLR4. Assim, concluímos que o DN, associado ou não ao TFR, alteram os níveis hormonais e ativam vias relacionadas ao processo inflamatório que refletem na homeostasia da próstata ventral.

## ABSTRACT

Anabolic-androgenic steroids are used by professional and recreational athletes who want to increase muscle mass. The Nandrolone Decanoate (ND) is the most widely used steroid among athletes. Together, ND and physical resistance training (PRT) may alter the androgen levels and lead to disturbances in the prostate homeostasis. The present study aimed to investigate the effects of the ND abusive use and PRT on adult and older rats' prostate. We evaluated whether ND at doses of 5mg/kg (twice a week, via i.m.), with or without physical exercises, is able to alter the prostate morphophysiology. **Materials and Methods:** 56 male Sprague-Dawley rats were divided into four groups (n=7): sedentary and trained groups, with or without ND. The animals were treated for eight weeks and then sacrificed 48h after the last injection (adults) or sacrificed with 300 days old. The prostate was removed and processed to morphometric and histopathological analyses and according to Western blotting techniques for NOX1, NrF2, TLR2 and 4, NFκB, IRF3, MAPK, IL-6 and TNFα expressions. The results showed that both ND and PRT altered the testosterone levels and estradiol level just in DN groups. ERα and ERβ increased in animals that used DN in adulthood and ER β expression decreased in treated groups aged. The PRT was involved in AR reducing in aged animals. DN and PRT during adulthood lead to pathological lesions of medium to high grade and activated TLR4. TLR2, Nox1 and Nrf2 expression were increased DN groups. The pathological lesions induced NFκB, IRF3 and MAPK expression, with TNF and IL-6 production. Despite no alterations were observed in the expression of TLR2 and TLR4 in SD2 and EV2 groups, NFκB and cytokine expressions were increased. Thus, we conclude that ND, associated or not to PRT alter hormone levels, triggers an inflammatory pathway and interferes with the prostate morphophysiology during adulthood and aging.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DN:** decanoato de nandrolona

**TFR:** treinamento físico resistido.

**AR:** receptor de andrógeno

**DHT:** diidrotestosterona

**ER $\alpha$ :** receptor de estrógeno  $\alpha$

**ER $\beta$ :** receptor de estrógeno  $\beta$

**EAA:** esteroide androgênico anabolizante

**PCNA:** antígeno nuclear de proliferação celular

**PAR4:** proteína pro apoptótica

**NOX1:** NADPH oxidase 1

**Nrf2:** fator de transcrição nuclear eritróide relacionado ao fator-2

**NF $\kappa$ B:** fator de transcrição  $\kappa$ B

**MAPKs:** proteínas de atividade mitogênica

**IRF3:** fator regulador de interferon

**TLR4:** receptor Toll-Like 4

**TLR2:** receptor Toll-Like 2

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral

**IL-6:** interleucina 6

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da próstata de roedores e de humanos.....	1
<b>Figura 2.</b> Vias de regulação e ativação do Nrf2.....	10
<b>Figura 3.</b> Ativação dos receptores Toll-like (TLR).....	11
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização do TLR4.....	12
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de resposta ao estresse oxidativo durante o exercício físico.....	19

## SUMÁRIO

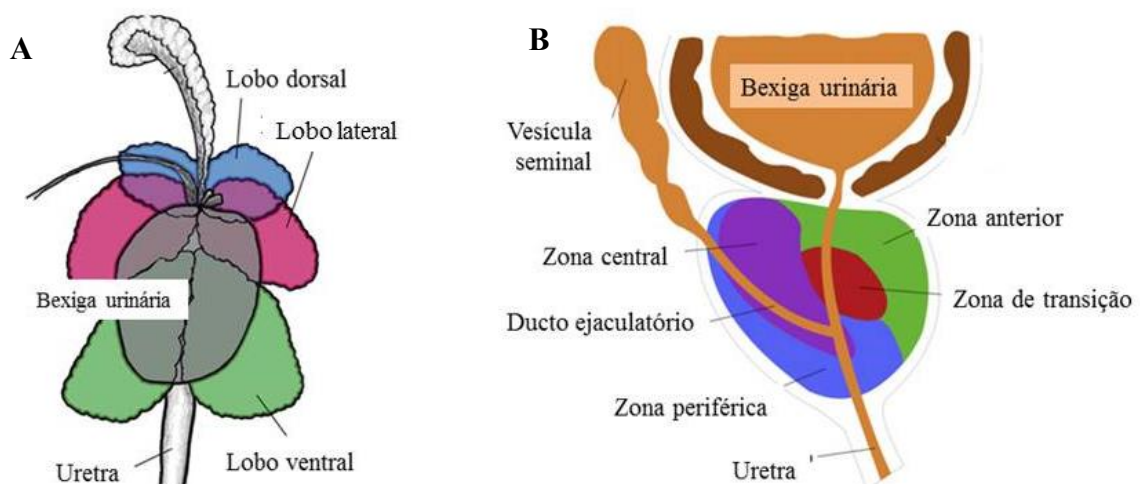
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<i>1.1 Próstata</i> .....	1
<i>1.2 Próstata e hormônios</i> .....	3
<i>1.3 Lesões patológicas na próstata</i> .....	6
<i>1.4 Estresse Oxidativo</i> .....	7
<i>1.6 Via de Sinalização do Processo Inflamatório</i> .....	10
<i>1.6.1 Receptores Toll-like (TLR)</i> .....	10
<i>1.6.2 Fator Nuclear – <math>\kappa</math>B (NF<math>\kappa</math>B)</i> .....	14
<i>1.6.3 Proteína de atividade mitogênica Kinase (MAPK)</i> .....	15
<i>1.6.4 Citocinas</i> .....	15
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	21
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
<b>4. RESULTADOS</b> .....	22
<i>Capítulo 1</i> .....	23
<i>Capítulo 2</i> .....	48
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
<i>Apêndice A</i> .....	77
<i>Apêndice B</i> .....	79
<i>Anexo A</i> .....	82

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino responsável pela secreção de proteínas e nutrientes que compõe o sêmen, fluido essencial para a viabilidade espermática (Aumüller, 1989; Hayward & Cunha, 2000; Taylor & Risbridger, 2008). A organização estrutural da próstata é, significativamente, variável entre as espécies. No entanto, roedores têm sido utilizados, como modelo biológico, para estudos da fisiologia e fisiopatologia da próstata (Roy-Burman *et al.*, 2004). O esquema da próstata de roedores e humanos está representado na figura 1A e B respectivamente.

Nos roedores, a próstata é constituída por quatro pares de lobos que circundam a uretra na base da bexiga urinária. Os lobos são denominados de acordo com a posição anatômica em ventral, lateral, dorsal e anterior ou glândula coaguladora (Figura 1A), sendo que cada lobo contribui com a produção de proteínas específicas que compõe o sêmen (Price & Williams-Ashman, 1961; Cunha *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1990; Colombel & Buttyan, 1995).



**Figura 1** – Esquema da próstata de roedores (1A) e de humanos (1B). (Adaptado de: Kelleher *et al.*, 2011; Franz *et al.*, 2013).

O lobo ventral por ser o mais responsivo aos andrógenos é o mais utilizado em pesquisas envolvendo lesões patológicas e manipulação hormonal (Hayashi *et al.*, 1991; Slayter *et al.*, 1994). De acordo com as características histológicas e funcionais o lobo ventral é subdividido em três regiões: proximal, intermediária e distal em relação à uretra. A região distal é caracterizada por alta atividade mitótica e a região proximal por intensa apoptose, desta forma, o equilíbrio do epitélio prostático depende das taxas de proliferação e morte celular nas regiões distal e proximal, respectivamente (Lee *et al.*, 1990; Yadav & Heermers, 2012).

De forma geral, a próstata é composta por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares (Aumüller & Adler, 1979) revestidas por epitélio secretor simples, constituído por células luminais, basais, intermediárias, neuroendócrinas e *stem cells* (Wang *et al.*, 2001; Zenzmaier, Untergasser, & Berger, 2008; Goldstein, Stoyanova, & Witte, 2010).

As **células luminais** ou secretoras são o tipo celular mais frequente, tanto no epitélio normal, quanto no epitélio com alterações patológicas. Caracterizam-se pela expressão de AR e pela secreção de proteínas como o antígeno específico prostático (PSA) e fosfatase ácida (PAP) em humanos (De Marzo *et al.*, 1999) e prostateína e probasina em roedores (Frick Aulitzky, 1991). As **células basais** formam o compartimento basal da glândula, são relativamente indiferenciadas, não apresentam atividade secretora e expressam proteína p63 que atua na interação do epitélio e estroma (McNeal, 1988; Kurita *et al.*, 2004). São andrógeno-responsivas, mas andrógeno-independentes, ou seja, podem ser estimuladas a proliferarem por ação androgênica ou fatores de crescimento derivados do estroma (De Marzo *et al.*, 1999; Taylor & Risbridger, 2008).

As **células intermediárias** representam subpopulação de células que se diferenciam em células luminais e neuroendócrinas (Zenzmaier, Untergasser & Berger, 2008). As **células neuroendócrinas** são escassas no epitélio prostático e AR-negativas, secretam neuropeptídeos

com funções autócrina e paracrina. (Huang *et al.*, 2006; Goldstein, Stoyanova, & Witte, 2010). As *stem cells* residem na camada basal e são descritas como células progenitoras de células basais (Signoretti & Loda, 2007; Zenzmaier, Untergasser & Berger, 2008; Goldstein, Stoyanova, & Witte, 2010).

O compartimento estromal é composto por vários tipos celulares incluindo as células musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos, e outros componentes tais como nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e matriz extracelular. Os fatores produzidos por células estromais geram sinais biológicos que exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Cunha & Hayward, 2002; Miki, 2010; Schauer & Rowley, 2011). Os fatores estromais implicam no controle, diferenciação, manutenção e outros aspectos fisiológicos da próstata. Desta forma, o desequilíbrio na interação do epitélio e estroma pode levar a alterações patológicas e o surgimento de lesões pré-malignas e malignas (Frick & Aulitzky, 1991; Cunha *et al.*, 1992; Miki, 2010).

### **1.2 Próstata e hormônios**

O desenvolvimento da próstata consiste em uma 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 eventos da diferenciação celular, ocorrem durante os períodos fetal e neonatal. Estes processos são dependentes de andrógenos que, inicialmente, atuam através do mesênquima. Posteriormente, os andrógenos passam atuar diretamente no epitélio glandular (Ho & Baxter, 1997; Vilamaior, Taboga, & Carvalho, 2006; Prins & Korach, 2008).

Durante o desenvolvimento da próstata existem dois períodos considerados críticos, o neonatal e a puberdade, pois nestas fases ocorre rápido crescimento glandular (Vilamaior, Taboga, & Carvalho, 2006). Os andrógenos regulam a proliferação e a diferenciação das



células epiteliais (Cunha *et al.*, 1987), bem como a morte celular programada (Isaacs, 1984; Kyprianou & Isaacs, 1988).

A síntese de andrógenos é regulada pelo eixo hipotálamo hipófise e gônada. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que estimula a adenohipófise a produzir o hormônio luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH), os quais se ligam a receptores nas células de Leydig e Sertoli, responsáveis pela produção de testosterona e estimulação da espermatogênese, respectivamente (Yadav & Heermers, 2012).

Os principais andrógenos, envolvidos no desenvolvimento da próstata, são a testosterona e DHT que atuam por meio da ligação com o AR (Cunha *et al.*, 1992). A testosterona é convertida, pela ação da 2-5 $\alpha$ -redutase, em DHT, a qual apresenta maior afinidade pelo AR, sendo, portanto mais ativa (Steers, 2001; Toorians *et al.*, 2003). A DHT é o principal hormônio atuante na próstata, sendo considerado 10 vezes mais potente que a testosterona, porque sua dissociação do AR é mais lenta (Droller, 1997; Yadav & Heermers, 2012).

Estudos em ratos da variedade *Norway* relataram que, com o avançar da idade, a expressão do AR 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 AR são regulados diferentemente nos lobos prostáticos; 3) as atividades dependentes e independentes de hormônios podem variar entre lobos prostáticos e sofrer alteração com a idade (Banerjee *et al.*, 2000).

Além dos andrógenos, outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona implicando nas funções normais ou patológicas (Weihua *et al.*, 2001; Cunha,

Hayward, & Wang, 2002; McPherson, Ellem, & Risbridger, 2008). Quando há baixa concentração de AR, os estrógenos atuam estimulando o crescimento e a proliferação das células estromais (Berry, Maitland, & Collins, 2008).

A biossíntese de estrógeno ocorre a partir de um substrato androgênico pela aromatização deste hormônio pela enzima aromatase (O' Donnell *et al.*, 2001; Risbridger, Ellem, & McPherson, 2007; Ellen & Risbridger, 2010). Os estrógenos se ligam aos receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) presentes no estroma e epitélio, respectivamente. Além disso, também a DHT, na próstata, pode ser convertida em 3 $\beta$ Adiol que exerce ação estrogênica ativando o ER $\beta$ , quando a conversão ocorre no estroma há aumento da atividade de estrógenos sobre os ER $\alpha$  (Sugiyama, 2010).

O ER $\alpha$  tem ação proliferativa e inflamatória, já ER $\beta$  atua de forma contrária, contribuindo para a inibição de mecanismos patológicos associados ao crescimento da glândula prostática (Leav *et al.*, 2001; Sugiyama, 2010; Gibbson & Saunders, 2012). Alterações na ativação destes receptores podem levar a ocorrência de processos patológicos incluindo a proliferação, inflamação e o câncer de próstata (Prins & korach, 2008; McPherson, Ellem, & Risbridger, 2008). Assim, o desequilíbrio nos mecanismos de ação e nos níveis de estrógeno pode induzir à inflamação e estabelecer o processo inflamatório (Lau *et al.*, 2000; Ellen & Risbridger, 2010).

Além da idade, também a exposição a andrógenos exógenos levam a alterações nos níveis hormonais. Os esteroides androgênicos anabolizantes (EAA) são exemplos de andrógenos exógenos que podem atuar como moduladores hormonais, influenciando os níveis circulantes de andrógenos e estrógenos bem como a disponibilidade desses hormônios aos órgãos (Bhasin *et al.*, 2006). Os EAAs vêm sendo utilizados de forma indiscriminada por indivíduos que visam aumento de massa e resistência muscular (Dohle, Smit, & Weber 2003).

O uso abusivo de EAAs pode levar ao desequilíbrio hormonal e, conseqüentemente, alterar a expressão dos receptores de andrógenos e estrógenos; comprometer a interação de estroma e epitélio; e, favorecer alterações na expressão de proteínas envolvidas nos processos de proliferação e morte celular como PCNA e PAR4 (Hart & El-Deiry, 2009; Zhao *et al.*, 2011).

### ***1.3 Lesões patológicas na próstata***

As principais lesões prostáticas são hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória (PIA), neoplasia intra-epitelial (NIP) e o câncer prostático (CP), sendo a idade o principal fator de risco para essas alterações (Leav *et al.*, 2001; De Marzo *et al.*, 2003).

A HPB é caracterizada por acentuado aumento de células estromais e epiteliais, cujas causas ainda são incertas (Lee & Peehl, 2004; Untergasser, Madersbacher, & Berger, 2005; Roehrborn, 2008). No entanto, alterações hormonais e desregulação dos fatores de crescimento estromal acarretam desequilíbrio na homeostase da glândula (Kramer, Mitteregger, & Marberger, 2007; Roehrborn *et al.*, 2008), podendo atuar como precursores de neoplasia intra-epitelial e carcinoma prostático (De Marzo *et al.*, 2007; De Nunzio *et al.*, 2011).

A PIA refere-se à lesão do epitélio prostático que ocorre em diferentes graus de inflamação intersticial, caracterizado por focos de epitélio glandular proliferativo com aspecto morfológico de atrofia simples ou de hiperplasia pós-atrótica. Os danos ocasionados no tecido decorrente da inflamação aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) favorecendo as desordens gênicas e proliferação do epitélio (De Marzo *et al.*, 1999).

Estudos apontam que a PIA pode ser precursora da NIP e/ou do CP (Putzi & De Marzo, 2000). A NIP consiste em alterações genótípicas e fenotípicas, acarretando na proliferação celular do ácino e promovendo alterações citológicas em diferentes graus de

acometimento. Clinicamente é caracterizada como lesão precursora de adenocarcinoma invasivo, cujos mecanismos ainda são incertos. Porém, estudos clínicos, apontam que homens com NIP de alto grau, apresentam risco de desenvolver CP (Brawer, 2005; Majumder *et al.*, 2008; Bostwick & Cheng, 2012). O CP é caracterizado pelo aumento acentuado do número de células que crescem além dos limites do órgão (Droller, 1997). O desenvolvimento do CP é de natureza endócrina e a possibilidade de ocorrência desta doença aumenta com o envelhecimento (Davies & Eaton, 1991).

De modo geral as patologias na próstata estão relacionadas a desordens hormonais, agentes infecciosos, processos inflamatórios e alterações gênicas que levam à geração de EROs e à ativação de vias que envolvem a produção de citocinas (Bayraktar *et al.*, 2010; Chughtai *et al.*, 2011; De Nunzio *et al.*, 2011). Em decorrência do processo inflamatório tem-se o aumento do número de linfócitos favorecendo a elevada produção de EROs (Khandrika *et al.*, 2008).

#### **1.4 Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desbalanço entre a produção de antioxidantes e oxidantes, tais como as EROs ou radicais livres (RLs) que são moléculas altamente instáveis e reativas (Elsbach & Weiss, 1983; Urso & Clarkson, 2003; Khandrika *et al.*, 2008; Sumimoto *et al.*, 2009), provenientes de processos biológicos (Berdard, Lardy, & Krause, 2007).

As EROs são produzidas pelas enzimas da família NADPH oxidase (NOX) que são proteínas transmembrana atuantes na transferência de elétrons através da membrana celular. Estas enzimas são as principais fontes de EROs celular (Segal & Shatwell, 1997). A redução do oxigênio molecular dependente da NOX é responsável por gerar EROs na célula, na forma

de íon superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é dismutado para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ) (Khandrika *et al.*, 2009; Shimada *et al.*, 2011).

São descritas cinco isoformas de NADPH: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5. Apesar da similaridade estrutural e funcional entre as isomorfias, seus mecanismos de ativação são diferentes (Bedard & Krause, 2007).

Na próstata tem sido identificada a NOX1 (Bedard & Krause, 2007). Esta enzima atua no processo de inflamação, especificamente na sinalização de TNF- $\alpha$ , angiotensina-II, fatores de crescimento, e na sinalização de hipertrofia e proliferação celular (Sumimoto, Miyano, & Takeya, 2005; Petry, Weitnauer, & Görlach, 2010). Além disso, estudos demonstraram que baixos níveis de EROs geradas por NOX podem atuar como mediadores da inflamação, apoptose, proliferação celular e angiogênese em vários cânceres humanos (Shimada *et al.*, 2011).

Os andrógenos são considerados os candidatos mais potentes na regulação do balanço de EROs na próstata, embora a relação entre o nível androgênico e a homeostase redox ainda não tenha sido caracterizada nessa glândula (Khandrika *et al.*, 2009). No câncer de próstata, os andrógenos aumentam a expressão das subunidades p22 e gp91 da NOX e a produção de EROs liberadas por NOX1 e NOX2 (Lu *et al.*, 2010). Contudo, Tam *et al.*, (2003) demonstraram que a suplementação com andrógenos reduziu o nível de EROs por infraregulação da expressão de NOX, elevando assim o nível de antioxidantes à normalidade.

Nos últimos anos, a associação entre o risco de CP e o EO tem sido reconhecida. Embora estudos recentes tenham indicado que o EO é maior no epitélio de pacientes com CP do que em homens sem a doença, a associação do EO mediado por EROs e o risco de CP ainda necessita de maiores investigações. Assim, muitos fatores que estão associados ao CP, como o desbalanço dos hormônios androgênicos e estrogênicos, insuficiência do sistema

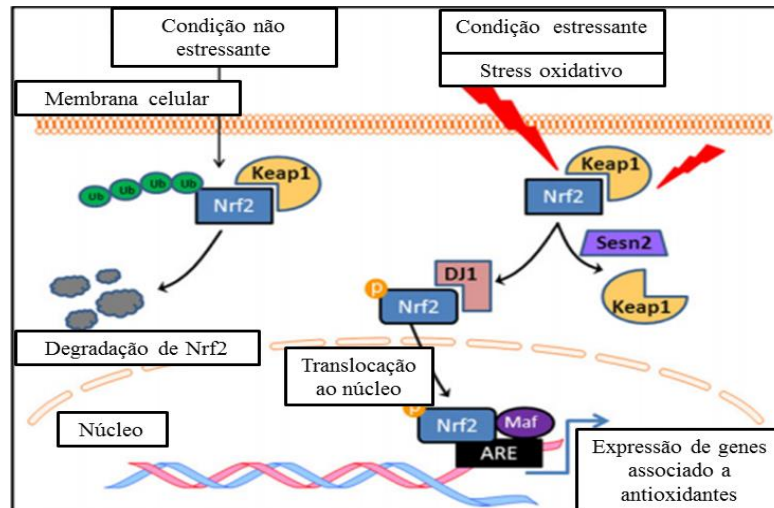
antioxidante e condições pré-malignas (NIP, PIA, HBP) podem estar relacionados ao EO (Partin *et al.*, 1993; Sakr *et al.*, 1993; Bostwick *et al.*, 2012).

Dentre as EROs que ocasionam o EO, o radical  $\text{OH}^\cdot$  é considerado o principal causador de danos celulares. Este radical é altamente reativo e pode interagir com moléculas biológicas. Outras EROs, como o peróxido de hidrogênio, podem estar envolvidas na ativação de proteínas de atividade mitogênica (MAPKs) (Circu & Aw, 2010; Son *et al.*, 2013).

### ***1.5 Antioxidantes***

Quando a produção de EROs excede a capacidade de moléculas antioxidantes há ativação do fator de transcrição nuclear eritróide relacionado ao fator-2 (Nrf2), que atua na regulação e expressão de genes codificadores de proteínas antioxidantes (Pendyala & Natarajan, 2010). Normalmente o Nrf2 é expresso no citoplasma na forma inativa. Os mecanismos de ativação do Nrf2 consistem na interação com outras proteínas resultando na translocação deste fator ao núcleo formando o complexo de transcrição que ativa genes específicos para produção de antioxidantes (Figura 2) (Grupte, Lyon, & Hsueh, 2013).

Os mecanismos de defesa envolvem: mecanismos de prevenção e reparação, e, defesas físicas e antioxidantes. Os antioxidantes são classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona (GSH) e glutathiona peroxidase (GSH Px); e, os não enzimáticos incluem a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), flavonóides e GSH (Valko *et al.*, 2007).



**Figura 2** - Vias de regulação e ativação do Nrf2. Em condições não estressantes Keap 1 associa ao Nrf2 para posterior degradação. Logo, em condições de estresse oxidativo, Sens 2 induz a degradação de Keap 1 liberando Nrf2. Nrf2 é fosforilado e ativado por DJ1 e translocado para núcleo onde irá ativar genes associado a antioxidantes Nrf2 - Nuclear Eritróide relacionado ao fator 2; Keap1 – proteína de citoesqueleto análoga a Kelp associada a ECH; DJ1 – proteína sensível *redox*; Ub, Maf, Sesn2 – proteínas pequenas (Adaptado de Grupte, Lyon, & Hsueh, 2013).

## 1.6 Via de Sinalização do Processo Inflamatório

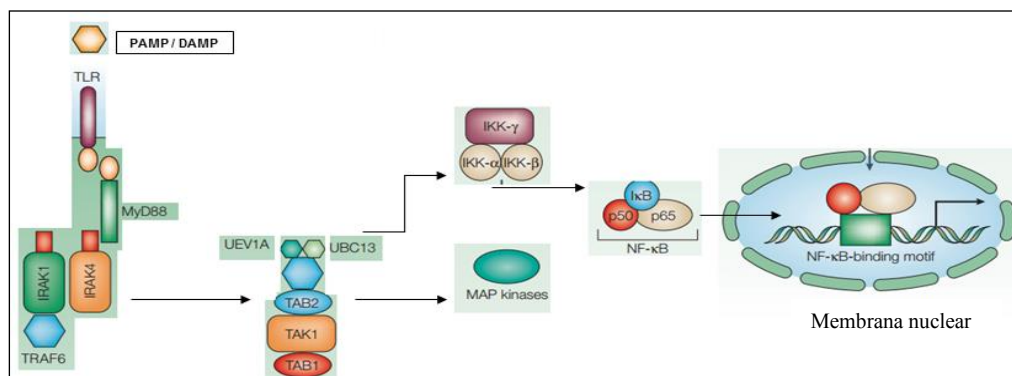
Inúmeras moléculas estão envolvidas no processo inflamatório e nas respostas a distúrbios celulares, incluindo os receptores Toll-Like 4 (TLR4), fator de transcrição  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e as MAPKs (Liew *et al.*, 2005 ; Arthur & Ley, 2013).

### 1.6.1 Receptores Toll-like (TLR)

Os TLRs são uma família de glicoproteínas transmembrana contendo domínio extracelular, com repetições ricas de leucina (LRRs), e domínio intracelular, homólogo aos receptores de interleucina (IL-1R) conhecido como domínio Toll/IL-1R (TIR) (Takeda, Kaisho & Akira, 2003; Akira & Takeda, 2004). Estes receptores têm papel fundamental na reparação de lesão tecidual induzida por inflamação (Akira & Takeda, 2004).

Os TLRs reconhecem diferentes classes de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os PAMPs referem-se a componentes moleculares de bactérias como lipolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos (PGN); e/ou fragmentos de DNA de outros agentes como fungos e vírus (Kawai & Akira, 2007). Já os DAMPs incluem moléculas endógenas liberadas pelo hospedeiro decorrente de necrose ou morte celular (McCarthy *et al.*, 2014).

Após o reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs pelos TLRs inicia a sinalização envolvendo moléculas adaptadoras como TIRAP-MAL, TRIF-TICAM1 e MyD88 (kawai & Akira, 2005). A associação com estas moléculas pode levar à fosforilação e translocação do NFκB para o núcleo para ativação de genes alvos e/ou de MAPKs (Figura 3) (Takeda & Akira, 2004; Kawai & Akira, 2007; Arthur & Ley, 2013).

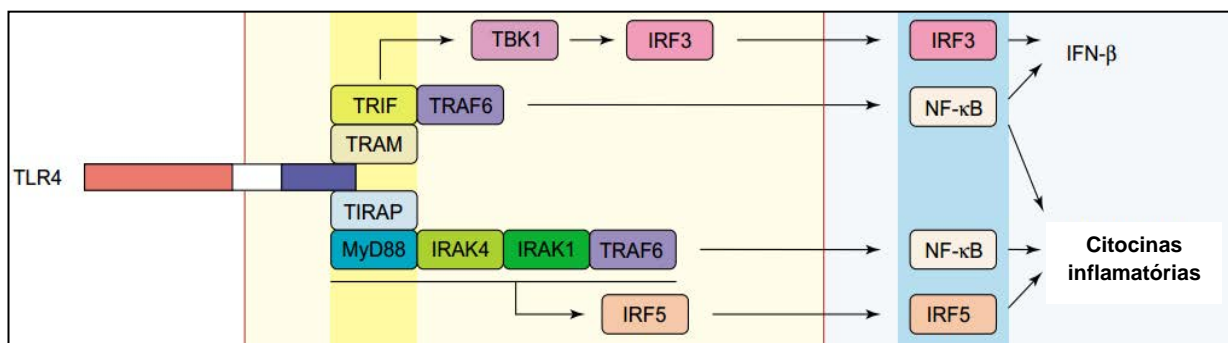


**Figura 3.** Ativação dos receptores TLR. Os TLRs quando ativados por PAMP ou DAMP gera cascata de eventos que inclui a associação com moléculas adaptadoras incluindo MyD88, e o recrutamento de proteínas Kinase (IRAK), IRAK4 e IRAK1. Quando há fosforilação de IRAK1 há recrutamento de TRAF6, após a degradação de IRAK1 tem se a formação do complexo TAK1, TAB1 e TAB2 que associa com UBC13 e UEV1A. TAK1 é fosforilado ativando o complexo de proteínas MAP kinases e IKK (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ). O complexo I $\kappa$ B no citoplasma é fosforilado e posteriormente degradado e ubiquitinizado permitindo a translocação do NF $\kappa$ B ao núcleo induzindo a expressão de genes alvos para a produção de citocinas pro e anti-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. MyD88 – Diferenciação Mielóide em resposta primária a proteína 88; IRAK – IL-1R associado a Kinase; TRAF6 – Fator de necrose tumoral associado ao receptor de fator 6; TAK1 – Kinase ativadora de TGF $\beta$ ; TAB – TAK1 que se liga a proteína 1; TAB2 – TAK1 que se liga a proteína 2; UCB13 – Ubiquitina conjugada a enzima 13; UEV1A – Ubiquitina conjugada a enzima E2 variante 1; MAP – Proteína ativadora mitogênica; IKK – inibidor do fator nuclear  $\kappa$ B (Adaptado de Akira & Takeda, 2004; Kawai & Akira, 2005).



Alguns receptores Toll-like iniciam a sinalização, exclusivamente, por MyD88 como por exemplo o TLR2 e outros receptores, como os TLR4 e TLR3, podem iniciar a sinalização independente de MyD88, levando à produção de outras moléculas envolvidas na inflamação como o Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Figura 4) (Takeda, Kaisho, & Akira, 2003).

O TLR4 está envolvido em diversos mecanismos tais como em processos de infecção, resposta auto-imune e inflamação crônica (Liew *et al.*, 2005). Na glândula prostática, de humanos, este receptor está localizado no compartimento basal (epitélio) e nas células do músculo liso e fibroblastos (estroma). Na próstata ventral de roedores, encontra-se em todos os tipos celulares descritos anteriormente com exceção dos fibroblastos, sendo identificado também no retículo endoplasmático rugoso (Quintar *et al.*, 2006; Gatti *et al.*, 2009). Os mecanismos de atuação destes receptores na próstata têm sido relatados no envolvimento em processos inflamatórios e proliferação celular, incluindo a carcinogênese (Quintar *et al.*, 2006). Desta forma, a estimulação de alguns TLRs pode aumentar a proliferação e a sobrevivência tumoral (Jego *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Via de sinalização do TLR4. Dependendo da molécula adaptadora associada ao domínio intracelular do receptor TLR4, ocorre a ativação do fator de transcrição  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e consequentemente a produção de citocinas inflamatórias ou IFN- $\beta$ , MyD88 – Diferenciação Mielóide em resposta primária a proteína 88; TIRAP – Receptor Toll associado Interleucina 1 (TIR) com domínio contendo proteína adaptadora; TRAM – TRIF relacionado a molécula adaptadora; TRIF – Receptor Toll/IL1 contendo domínio adaptador indutor de IFN-  $\beta$ ; IRAK – IL-1R associado a Kinase; TRAF6 – Fator de necrose tumoral associado ao receptor de fator 6; TBK1 - TANK {TRAF (fator associado ao receptor TNF - associado com o ativador de NF $\kappa$ B-ligante à kinase 1) ; IRF – Fator regulador de Interferon (Adaptado de Kawai & Akira, 2005).

Recentemente, a expressão aberrante do TLR4 foi encontrada na maioria dos carcinomas humanos, inclusive o CP (Dong *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que a expressão aumentada do TLR3, TLR4 e TLR9 correlaciona-se com a progressão do CP (González-Reyes *et al.*, 2011). Estudo recente demonstrou que a linhagem celular PC-3U para câncer de próstata expressou TLR4 e a ativação da sinalização do TLR4 resultou em uma resposta significativa de IL-6 (Hamidi *et al.*, 2012).

A participação destes receptores no câncer é controversa, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos e positivos da carcinogênese. A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos antineoplásicos em tumores desenvolvidos em camundongos e humanos (Rakoff- Nahoum & Medzhitov, 2009). A ativação dos TLRs pode causar a regressão do tumor através do aumento da permeabilidade vascular e por meio do recrutamento de leucócitos, os quais determinam a lise das células tumorais pelas células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas (Rakoff- Nahoum & Medzhitov, 2009). Assim, um dos efeitos mais promissores da estimulação dos TLRs por agonistas específicos na terapia do câncer é a ativação do sistema imune adaptativo (Krieg, 2007; Paone *et al.*, 2008; Galli *et al.*, 2010).

De modo geral, os TLRs são considerados fatores chaves para a estimulação do sistema imunitário e várias moléculas podem interferir em sua funcionalidade, como os níveis elevados de testosterona que desencadeiam efeito supressivo nas respostas imunes via sinalização TLRs (Quintar *et al.*, 2006). Embora haja alteração na expressão destes receptores por diferentes mecanismos, a ativação normalmente ocorre através da translocação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF- $\alpha$  e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Akira

& Takeda, 2004; Galli *et al.*, 2010). Em alguns casos, pode haver a sinalização por vias alternativas que não levam à ativação do fator de transcrição NFκB (Sakai *et al.*, 2002).

### **1.6.2 Fator Nuclear – κB (NFκB)**

A família NFκB inclui cinco membros: RelA (p65); c-Rel; RelB; NFκB1 (p50/p105); NFκB2 (p52/p100) (Sun & Anderson, 2002). O NFκB pode ser ativado por diferentes mecanismos tais como, produção de citocinas pro inflamatórias ou moléculas produzidas por agentes infecciosos, fatores de ativação de células B e por estresse celular. Correspondente a estes mecanismos tem-se a ativação da via clássica, alternativa ou atípica, respectivamente (Lee *et al.*, 2007).

O NFκB é inativado pela associação com a proteína inibidora IκB. As IκBs ligam-se aos dímeros de NFκB, formando o complexo NFκB-IκB que pode ser deslocado entre citoplasma e núcleo de células em repouso, porém esse complexo é principalmente citoplasmático. Quando há ativação dos receptores Toll-Like pode ocorrer à degradação do complexo NFκB-IκB induzido pela fosforilação do IκB e, posteriormente, o NF-κB é translocado para o núcleo (Figura 2) (Sun & Anderson, 2002; Takeda, Kaisho, & Akira 2003; Hayden & Ghosh, 2004).

A via de sinalização do NFκB desempenha papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse (Pahl, 1999). A ampla distribuição dos sítios de ligação do NFκB no genoma permite a regulação de um vasto número de genes e a participação em processos celulares fundamentais, como apoptose, proliferação e diferenciação (Pham *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005).

### ***1.6.3 Proteína de atividade mitogênica Kinase (MAPK)***

As proteínas MAPKs são subdivididas em subgrupos que incluem: Kinases reguladoras de sinais extracelulares (ERKs), c-Jun Kinases N-terminal e p38 MAPKs que estão envolvidas nos processos de desenvolvimento, diferenciação, crescimento e regulação do ciclo celular (Son *et al.*, 2013; Darling & Cook, 2014).

A regulação da atividade das MAPKs pode ser mediada por inúmeros fatores, tais como estresse oxidativo, citocinas e fator de crescimento TGF- $\beta$ , ativando a subunidade p38 MAPKs por cascata de sinalização do complexo Kinase (Koul, Pal & Koul, 2013).

Existem diferenças na ativação das MAPKs, sendo a p38 MAPK ativada em resposta aos sinais de estresse e por citocinas inflamatórias (Koul, Pal & Koul, 2013). A ativação destas proteínas inclui uma cascata de eventos sinalizada por receptores de superfície celular, levando a fosforização de MAPKs por meio de sinais intracelulares em resposta aos mecanismos fisiológicos e patológicos (Boutos, Chevet & Metrakos, 2008). A p38 MAPKs é a mais responsiva a estímulos estressores e a outros fatores que podem desencadear a inflamação (Son *et al.*, 2013).

### ***1.6.4 Citocinas***

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas produzidas, em células do sistema imune ou outros tipos celulares, em resposta a estímulos inflamatórios (Moldoveanu, Shephard, & Shek, 2001). Independente do tipo de citocina e da ação local, em geral, elas facilitam o recrutamento de linfócitos, neutrófilos, monócitos e outros tipos de células ao local da inflamação para reparação tecidual (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Kim, Cha, & Surh, 2010). As respostas mediadas pelas citocinas podem ser reguladas pela quantidade de moléculas pró e anti-inflamatórias, desta forma, estão envolvidas na fase crônica e aguda da resposta inflamatória (Moldoveanu, Shephard, & Shek, 2001). Entre as principais citocinas

envolvidas na fase aguda tem-se a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) (Borish *et al.*, 2003).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com funções pró-inflamatórias em células imunes e não imunes (Seguchi *et al.*, 1992). Seus mecanismos moleculares indutores de resposta nas células do CP ainda não foram elucidados, assim como também o papel desta citocina na próstata em resposta à presença de outras citocinas como IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Huising, Kruiswijk & Flik, 2006).

### ***1.7 Treinamento Físico Resistido (TFR) e Esteroide Androgênico Anabolizantes (EAA)***

TFR é tipo de exercício físico realizado de forma estruturada, planejada e progressiva, com um complemento de carga. A quantidade, frequência, duração e intensidade do exercício regulam os efeitos no organismo (Brogårdh & Lexell, 2012). Neste tipo de exercício, o músculo deve executar força contra uma resistência, em intensidade acima da capacidade aeróbica do músculo. Desta forma, é necessário que o treinamento seja de alta intensidade e curta duração (Texeira *et al.*, 2012; Murtona & Greenhaffb, 2013).

Diferentes modalidades de exercício físico têm sido utilizadas em pesquisas envolvendo o câncer de próstata (Galvão *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2012; Rundqvist *et al.*, 2013). Além disso, Friedenreich, Neilson & Lynch (2010) mostraram que a atividade física promove redução no risco de desenvolvimento câncer de próstata, e que o exercício intenso possivelmente altera os níveis hormonais que estão associados com a etiologia da alteração patológica. As variações nas taxas hormonais são decorrentes do tipo do exercício físico podendo levar à redução dos níveis de testosterona circulante (Hackney, 2001). Os casos em que há associação entre o exercício e o uso de DN as alterações podem ser mais intensas, ocasionando danos a vários órgãos que são dependentes de andrógenos (Shokri *et al.*, 2010).

Os EAA são derivados sintéticos da testosterona (Clark *et al.*, 1997). São descritos, aproximadamente, 60 tipos de EAAs, os quais apresentam diferenças na estrutura química e nos efeitos metabólicos. O Decanoato de Nandrolona (DN) é o mais prescrito por apresentar menores efeitos adversos (Clark & Henderson, 2003; Shokri *et al.*, 2010).

Em doses farmacológicas, os EAAs são utilizados no tratamento de doenças, tais como disfunção hipogonadal, deficiência no crescimento, em portadores de HIV e câncer de mama (Mullgan & Schambelan, 2002; Dudgeon *et al.*, 2006; Karbalay-Doust & Noorafshan, 2006; Shokri *et al.*, 2009;). Além disso, estimulam a síntese de proteínas presentes nos músculos estriados esqueléticos (efeito anabólico). Por esse motivo, há muito tempo estes hormônios sintéticos têm sido utilizados de forma ilícita por atletas e não atletas para aumentar a massa muscular, a força e/ou desempenho na prática de atividade física (Dohle *et al.*, 2003). Os indivíduos utilizam estes compostos em doses suprafsiológicas de 10 a 100 vezes maiores que as doses terapêuticas (Clark *et al.*, 1997). O uso indiscriminado e abusivo de EAA, entre adolescentes e adultos, sem fins terapêuticos tem-se tornado um problema de saúde pública, despertando a atenção da comunidade científica.

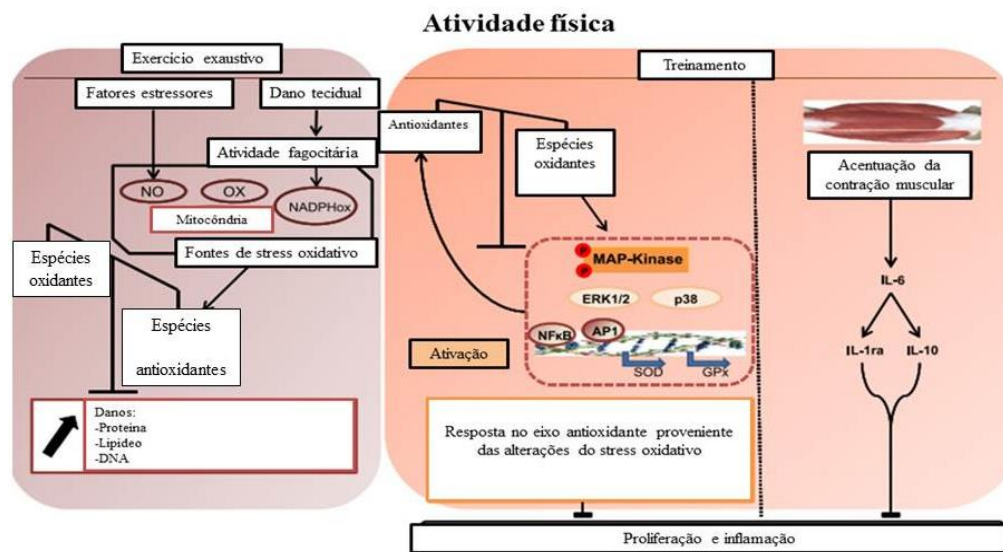
De fato, existe uma variedade desses anabolizantes, sendo auto administrados e utilizados em doses elevadas. Embora o uso de EAA esteja associado a efeitos colaterais, os efeitos tóxicos após administração da EAA não são notificados pelos indivíduos e, portanto, é difícil de serem quantificados. É cada vez mais evidente que o abuso está associado a efeitos adversos graves que afetam o sistema nervoso central, cardiovascular, músculo-esquelético, endócrino e genital (Socas *et al.*, 2005).

Os EAA podem induzir alterações subclínicas no eixo hipófise-hipotálamo-gônada. Primariamente, podem reduzir os níveis circulantes da testosterona total e livre, bem como os níveis de hormônio luteinizantes (Lucia *et al.*, 1996) e, ainda, alterar a função reprodutiva masculina levando à azoospermia e oligozoospermia (Torres-Calleja *et al.*, 2001). Além disso,

os EAA possuem alguns efeitos adversos como: atrofia testicular (Dudgeon *et al.*, 2006); distúrbios hepáticos (Socas *et al.*, 2005); alterações nos sistemas genital e urinário (Karbalay-Doust & Noorafshan, 2006); alterações na qualidade do esperma (Nagata *et al.*, 1999) e na estrutura dos testículos (Noorafshan *et al.*, 2005). Há outros relatos na literatura que mencionam alterações comportamentais decorrentes do uso de EAA (Hartgens & Kuipers, 2004).

Desta forma, o uso abusivo e sem orientação médica dos EAAs leva ao aumento no interesse por estudos relacionados aos seus efeitos colaterais que, podem ser desde efeitos psicológicos, até alterações morfológicas em órgãos alvo, como por exemplo, a próstata (Froenher *et al.*, 1999). 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 mostraram que a prática de atividade física pode ser um fator protetor e exercer efeitos diretos sobre a diminuição do risco de CP (Rebillard *et al.*, 2013). Os mecanismos biológicos envolvidos estão relacionados às alterações nos níveis plasmáticos de hormônios androgênicos circulantes, no balanço energético da função imune e nos mecanismos de defesa antioxidantes (Friedenreich & Thune, 2001). Assim, quando o exercício é monitorado, pode haver resposta adaptativa do organismo e, conseqüentemente, equilíbrio entre a produção de EROs e antioxidantes no controle ou progressão de doenças, tais como o CP (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001; Rebillard *et al.*, 2013). Porém, na ausência de planejamento entre o tempo da atividade física, frequência e o controle da intensidade, pode haver o aumento de EROs e redução nos níveis de antioxidantes gerando uma condição de estresse oxidativo (Figura 5).



**Figura 5** - Mecanismos de resposta ao estresse oxidativo durante o exercício físico. No exercício exaustivo há aumento espécies oxidantes (EO) gerando o estresse oxidativo e danos estruturais em proteínas, lipídeos e DNA. Já no treinamento tem se uma resposta adaptativa com redução de EO e aumento de antioxidantes, consequentemente a ativação dos fatores de transcrição como NFκB, e produção de citocinas anti-inflamatória, estes eventos contribuem para regulação da proliferação e inflamação. AP1 - proteína ativadora 1; ERK - sinal-regulador kinase extracelular; GPx - glutatona peroxidase; IL - interleucina; MAP-Kinase - proteína mitogênica-ativadora kinase; NADPHox - NADPH oxidase; NF-kB - fator nuclear-kB; NO - óxido nítrico; SOD – superóxido dismutase; XO - xantina oxidase (Adaptado de Rebillard *et al.*, 2013).



## 2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, não foram completamente compreendidos os mecanismos que determinam a evolução de lesões prostáticas. Tal fato, leva à necessidade de estudar este órgão sob diferentes condições hormonais. Atualmente, sabe-se que 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 de seu desenvolvimento e função. Assim, torna-se importante conhecer os efeitos do uso abusivo de EAA, já que este tipo de testosterona exógena vem sendo administrado frequentemente e, de forma ilícita, com intuito de aumentar a massa muscular.

Outro fator importante, que ocasiona alterações na próstata, é o processo de envelhecimento. Durante esta fase há diminuição dos níveis de antioxidantes intracelulares enzimáticos e não enzimáticos, e da atividade de enzimas supressoras de EROs. Assim, considerando a idade como fator determinante no desenvolvimento de lesões prostáticas e o fato deste ser um órgão dependente da ação de hormônios, parece 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 o ambiente prostático durante o processo de envelhecimento.

Não há estudos na literatura que relatem os efeitos do uso de EAA associado ao exercício físico durante a juventude, e suas repercussões na próstata em processo de envelhecimento. Assim indagamos, qual seria o papel do exercício físico associado ao DN? Será que o exercício poderia minimizar os efeitos do DN e de fato exercer papel protetor? Após interrupção do tratamento e com o tempo, a morfofisiologia da próstata poderia ser restaurada?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se o uso do DN, associado ou não ao exercício físico, entre a juventude e a fase adulta, interfere na morfofisiologia da próstata adulta e envelhecida.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar os efeitos de doses suprafsiológicas de DN, associado ou não à prática de treinamento físico resistido, em animais adultos e envelhecidos sobre os seguintes parâmetros:

- Hormonais e histológicos;
- Receptores de andrógeno e estrógeno;
- Moléculas envolvidas em vias de estresse oxidativo e inflamação;

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados foram apresentados na forma de artigos científicos:

**Capítulo 1:** O Decanoato de Nandrolona e o treinamento físico resistido favorecem a ocorrência de lesões patológicas e ativam resposta inflamatória na próstata ventral.

**Capítulo 2:** O decanoato de nandrolona e o treinamento físico resistido modulam a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos na próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos

# *Capítulo 1*

**O Decanoato de Nandrolona e o treinamento físico resistido favorecem a ocorrência de lesões patológicas e ativam resposta inflamatória na próstata ventral.**

Fabiana de Campos Gomes<sup>1</sup>, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>2</sup>, Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro<sup>1</sup>, Wagner José Fávaro<sup>2, 3</sup>, Raquel Fantin Domeniconi<sup>1</sup>.

(1) Departamento de Anatomia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil.

(2) Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil.

(3) Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, Brasil.

**\*Autor correspondente:**

Fabiana de Campos Gomes, Departamento de anatomia, Instituto de Biociências - IBB Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: [facamposgomes@gmail.com](mailto:facamposgomes@gmail.com)

**Palavras chaves:** Inflammation; Nandrolone; Exercise; Prostate.

## RESUMO

A idade é fator determinante no desenvolvimento de lesões prostáticas. Durante o envelhecimento há aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos níveis de antioxidantes intracelulares. Além disso, fatores externos como uso indiscriminado de esteroides anabólicos androgênicos (EAA) como o Decanoato de Nandrolona (DN), e o exercício físico alteram a disponibilidade de hormônios androgênicos, e podem favorecer o aparecimento de lesões patológicas. No presente trabalho, foi investigado se o uso do DN, associado ou não ao treinamento físico resistido (TFR), interfere nas vias relacionadas à resposta inflamatória na próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos. Ratos da linhagem Sprague-dawley foram distribuídos em quatro grupos experimentais: sedentário com e sem DN, exercício com ou sem DN. Os animais realizaram o TFR e receberam DN duas vezes/semana (5 mg/kg, via intramuscular - i.m), durante oito semanas. Os ratos adultos foram eutanasiados imediatamente após o término do tratamento e os envelhecidos permaneceram sem tratamento até completar 300 dias de idade. A próstata ventral foi coletada e destinada às análises histopatológicas e moleculares, para detecção de proteínas pro e antioxidantes (NOX1 e Nrf2), fatores transcricionais (NFκB, IRF3 e MAPK), receptores toll-like (TLR2 e TLR4) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-α). Os animais adultos que receberam DN e fizeram o TFR apresentaram maior ocorrência de lesões patológicas com ativação do TLR4. Houve acentuada expressão de IL-6 no grupo que realizou o TFR. Já o grupo exposto ao DN, além da suprarregulação de TLR4, também apresentou superexpressão de TLR2, NOX1, Nrf2, e TNF-α via MAPK. Animais que receberam DN e fizeram o TFR apresentaram aumento nos níveis de NFκB, IRF3, IL-6, TNF-α e NOX1, e redução de Nrf2. Nos animais envelhecidos, os TLR2 e TLR4 não foram expressos. Os grupos TFR+DN apresentaram lesões patológicas na fase adulta e no envelhecimento, seguidas por alterações moleculares. Nós concluímos que o DN associado ou não ao TFR, favorece o surgimento de neoplasias na próstata na fase adulta e no envelhecimento, ativando vias envolvidas na resposta inflamatória.

## INTRODUÇÃO

EAA são derivados sintéticos da testosterona (Clark *et al.*, 1997) que podem ser utilizados no tratamento de doenças, tais como disfunção hipogonadal, osteoporose e câncer de mama (Basaria *et al.*, 2001; Mullgan & Schambelan, 2002). O Decanoato de Nandrolona (DN) é o EAA mais prescrito por apresentar menores efeitos adversos (Clark & Henderson, 2003; Shokri *et al.*, 2010). Estes hormônios sintéticos são utilizados de forma ilícita e em doses suprafisiológicas por indivíduos com o intuito de aumentar a massa muscular, a força e o desempenho na prática de atividade física (Dohle *et al.*, 2003). Em geral, o uso de EAA está associado à prática de atividade física de alta intensidade e curta duração, com sobrecarga de peso que excede a capacidade aeróbica do músculo (Chung *et al.*, 2007; Shokri *et al.*, 2010).

O uso indiscriminado de EAA leva a alterações subclínicas no eixo hipófise-hipotálamo-gônada (Chung *et al.*, 2007; Franconi *et al.*, 2012). A próstata é um órgão andrógeno dependente (Isaacs *et al.*, 1984) e, desequilíbrio nos níveis de andrógenos e estrógenos do organismo, favorecem a ocorrência de lesões patológicas (Ellem & Risbridger, 2010, Roehrborn, 2008; DE Marzo *et al.*, 2007). As lesões patológicas na próstata podem ser atribuídas ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), estabelecendo uma condição de estresse oxidativo (EO) (Khandrika & Kumar *et al.*, 2008).

Na próstata, a principal enzima que atua na produção de EROs é a NOX1 (Bedard & Lardy *et al.*, 2007). Esta enzima atua nos processos de inflamação e proliferação celular, e em processos tumorais (Sumimoto & Miyano, *et al.*, 2005). A desregulação na produção de EROs pode ser compensada pela ativação de fator antioxidante como o Nrf2 (Pendyala & Natarajan, 2010). Quando o aumento de EROs excede a capacidade antioxidante é estabelecido o processo inflamatório (Khandrika & Kumar *et al.*, 2008), envolvendo a participação de receptores toll-like (TLRs) que atuam no reconhecimento de padrões

moleculares associado a patógenos (PAMPs) ou a danos celulares (DAMPs) (Kawai & Akira, 2005; Mccarthy *et al.*, 2014).

Os principais receptores envolvidos no reconhecimento de DAMPs são os TLR2 e TLR4 (Erridge, 2010; Mccarthy *et al.*, 2014). Esses receptores são responsáveis pelo início da resposta imune de sinalização intracelular, ativando moléculas adaptadoras MyD88 (fator de diferenciação mielóide em resposta primária a proteína 88) ou TRIF (receptor Toll/IL1 contendo domínio adaptador indutor de IFN- $\beta$ ) (Lorne *et al.*, 2010, Kawai & Akira, 2010), os fatores transcricionais NF $\kappa$ B (fator nuclear de transcrição  $\kappa$ B), MAPK (proteína quinase de atividade mitogênica) e IRF3 (fator regulador de Interferon 3), que conseqüentemente levam à produção de citocinas inflamatórias de fase aguda ou crônica, tais como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Dohle *et al.*, 2003). Até o momento, nenhum estudo investigou os efeitos do TFR, associado ao uso de DN, sobre o estresse oxidativo e a via inflamatória mediada por TLRs no tecido prostático.

Manipulações hormonais levam à interrupção dos processos normais do desenvolvimento da próstata e a consequência destas alterações pode acarretar efeitos irreversíveis na função do órgão. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se o uso do DN, associado ou não ao TFR, interfere na estrutura da próstata ventral, favorecendo o estresse oxidativo alterando a expressão de moléculas envolvidas em vias relacionadas à resposta inflamatória durante a fase adulta, e ao longo do processo de envelhecimento.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Animais***

Ratos machos (n=56) da linhagem *Sprague dawley* (13 semanas de idade), obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas



(CEMIB/ UNICAMP), foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do IBB-UNESP/Botucatu, com acesso livre à ração e água filtrada e condições controladas de luz (12/12) e temperatura ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ). 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.

### ***Delineamento experimental***

Os ratos foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais ( $n=7/\text{grupo}$ ), sendo quatro grupos adultos, eutanasiados com 140-150 dias de idade; e quatro grupos envelhecidos, eutanasiados com 300-310 dias de idade (Figura 1). **SV<sub>1</sub>**: Grupo controle adulto, sedentário, não fizeram uso de esteroide. **SV<sub>2</sub>**: Grupo controle envelhecido, sedentário, não fizeram uso de esteroide. **SD<sub>1</sub>**: Grupo adulto, sedentário, fez uso de esteroide. **SD<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, sedentário, fez uso de esteroide. **EV<sub>1</sub>**: Grupo adulto, submetido ao exercício físico, sem uso de esteroide. **EV<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, submetido ao exercício físico, sem uso de esteroide. **ED<sub>1</sub>**: Grupo adulto, submetido ao exercício físico, fez uso de esteroide. **ED<sub>2</sub>**: Grupo envelhecido, submetido ao exercício físico, fez uso de esteroide.

Os ratos adultos foram submetidos ao protocolo experimental por oito semanas e eutanasiados 48 horas após o término do protocolo. Os ratos envelhecidos foram submetidos ao protocolo experimental por oito semanas, durante a fase jovem-adulta, em seguida estes protocolos foram interrompidos e os animais foram eutanasiados com 300-310 dias (Figura 1).

### ***Tratamento e Treinamento Físico Resistido***

Os grupos SD<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>, SD<sub>2</sub>, ED<sub>2</sub> receberam injeções intramusculares (i.m.) de DN (Deca-Durabolin<sup>®</sup>, Schering-Plough, São Paulo, SP, Brazil), ao longo de 8 semanas. Foram

administradas duas doses de 5mg/kg peso corpóreo por semana, conforme protocolo realizado por Shokri *et al.*, (2009). Esta dosagem, segundo Pope & Katz (1988), 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, pelo mesmo período dos animais que receberam DN.

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos ao treinamento físico com sessões de saltos em cilindro de PVC, contendo água a 30°C a uma profundidade de 38 cm, três vezes por semana, durante oito semanas consecutivas. Na primeira semana, os ratos dos grupos treinados passaram por período de adaptação ao exercício físico em meio líquido. Após a adaptação, os animais realizaram quatro séries com 10 saltos, intervaladas por 60 segundos, com sobrecarga progressiva, de 50% do peso corporal (segunda e terceira semana), 60% do peso corporal (quarta e quinta semana) e 70% do peso corporal (sexta, sétima e oitava semana), três vezes por semana. A sobrecarga de peso foi colocada na região ventral do tórax dos animais por meio de um colete.

O período de oito semanas estabelecido para as injeções de DN, 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 (Kolasa *et al.*, 2004; Shokri *et al.*, 2009). Assim, este período foi considerado suficiente para possíveis repercussões no eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Os ratos foram pesados semanalmente e o consumo de água e ração foi mensurado diariamente.

### ***Processamento do material***

Os animais dos grupos adultos foram sacrificados 48 horas após a última sessão de saltos, e os grupos envelhecidos foram sacrificados com 300-310 dias de idade. Para a eutanásia, os animais foram colocados em câmara de CO<sub>2</sub> e, na sequência, decapitados em

guilhotina. Órgãos do sistema genital masculino, incluindo o complexo prostático foram coletados e pesados.

Parte dos lobos ventrais da próstata foi fixada em formol tamponado a 10%, incluídos em paraplástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA) e cortados em secções de 4 µm de espessura para obtenção de lâminas histológicas, as quais foram coradas com Hematoxilina-Eosina. Outra parte da próstata ventral foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido, armazenada em freezer a -80°C e destinada para a rotina de *Western blot*.

Para análise histopatológica da próstata ventral, cinco lâminas por grupo (n=5) foram analisadas e fotografadas em microscópio AxioVision (Zeiss). As patologias foram identificadas conforme as classificações descritas por Shappell *et al.*, 2004 e as ocorrências foram registradas em percentual (%).

As amostras de tecido congelado foram homogeneizadas com tampão de extração (Trisma base 100mM/ EDTA 10mM/ Fluoreto de sódio 100mM/ Pirofosfato de sódio 10mM/ ortovanadato de sódio 10 mM/ PMSF 2mM/ Aprotina 0,1mg/ml). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos. As proteínas, extraídas do sobrenadante, foram quantificadas usando a técnica de Bradford (1976) e aplicadas em gel SDS-poliacrilamida de diferentes porcentagens de acordo com o peso molecular das proteínas. A eletroforese foi realizada em amperagem constante (50 mA) com tampão de corrida contendo SDS.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose que foram bloqueadas por 1 hora em BSA (5%) ou leite desnatado e incubadas *overnight* com os anticorpos: TLR2 polyclonal Rb Ig - 1/300 (Abbiotec); TLR4 polyclonal Rb IgG - 1/500 (Abcam); β-actin polyclonal Rb IgG - 1/500 (Biorbyt); TNF-α polyclonal Rb IgG - 1/250 (Biorbyt); IL-6 polyclonal Rb IgG - 1/250 (Abbiotec); NOX1 polyclonal Rb IgG - 1/300 (Biorbyt); Nrf2 monoclonal Ms IgG - 1/1000 (Abcam); MAPK Rb IgG - 1/500 polyclonal

(Millipore). Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Abcam).

A reação foi revelada utilizando-se substrato quimioluminescente (Amersham ECL™ Prime, GE Healthcare). Foi realizada a 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. Foi utilizada a  $\beta$ -actina para normalização da leitura de intensidade da marcação da banda.

### ***Análise estatística***

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, seguido pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste *t* pareado para comparação dos seguintes grupos: SV vs SD; SV vs EV; SD vs ED; EV vs ED. Foram considerados estatisticamente diferentes, o nível de significância  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada com o *software Instat* (versão 3.0 – programa GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA) e para os gráficos foi utilizado o *Prism* (versão 5.0 programa GraphPad Prism® (Trial, Espanha)).

## **RESULTADOS**

### ***Lesões patológicas na próstata***

Todos os grupos experimentais, com exceção do grupo adulto sedentário veículo apresentaram lesões patológicas tais como alterações adaptativas celular e histopatológicas na próstata ventral (Tabela 1 e Figura 2).

Em relação aos grupos de animais adultos, aqueles submetidos ao TRF e ao DN apresentaram ocorrência de alterações adaptativa celular e histopatológica. Em 100% dos animais que receberam o DN foi observada metaplasia e em 80% dos animais que receberam

DN e nos exercitados foram identificados neoplasias e outras patologias como focos inflamatórios, além de incidências de inflamação multifocal e neoplasia intraepitelial prostática (NIP). Além disso, 40% dos animais adultos submetidos ao TFR e 20% dos animais que receberam DN apresentaram ocorrência de adenocarcinoma de baixo grau (Tabela 1 e Figura 2).

Nos animais envelhecidos, as lesões mais comuns identificadas em todos os grupos foram atrofia e metaplasia. Além disso, também foi evidenciada NIP nos grupos SV<sub>2</sub>, SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub>, dos quais apenas o SV<sub>2</sub> apresentou ocorrência de adenocarcinoma *in situ*.

### ***Moléculas envolvidas no processo inflamatório***

Nos animais SD<sub>1</sub>, o DN foi determinante no aumento da expressão do TLR2 (1.79-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.010$ ; Figura 3 B). O DN e o TFR foram determinantes no aumento da expressão do TLR4 (2.21-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.012$ ; 2.17-*fold increased* em EV<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.002$ ; Figura 3 C).

As proteínas NF- $\kappa$ B, IRF3, e MAPK, envolvidas nos mecanismos de resposta inflamatória e as citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foram alteradas com os tratamentos nas diferentes idades (Figuras 3 e 4). Na fase adulta, os ratos que fizeram o TFR (EV<sub>1</sub>) apresentaram menor expressão de NF- $\kappa$ B (1.91-*fold reduced* em EV<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub> e 4.61-*fold reduced* em EV<sub>1</sub> vs. ED<sub>1</sub>,  $p = 0.003$  em ambas comparações; Figura 3 D). Ao contrário, nos animais envelhecidos, o uso do DN e o TFR (grupos SD<sub>2</sub> e EV<sub>2</sub>) elevaram a expressão de NF- $\kappa$ B ( $p < 0.0001$  em ambas as comparações, sendo 3.59-*fold increased* em SD<sub>2</sub> vs. ED<sub>2</sub> e 4.61-*fold increased* em EV<sub>2</sub> vs. ED<sub>2</sub>; Figura 3 D).

Em animais adultos, o TFR associado ou não ao DN (grupos EV<sub>1</sub>, ED<sub>1</sub>), induziu à superexpressão de IRF3 (4.57-*fold increased* em EV<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = < 0.0001$ ; 2.33-*fold increased* em ED<sub>1</sub> vs. SD<sub>1</sub>,  $p = 0.026$ ; Figura 3 E). Já nos animais envelhecidos, a associação

entre o TFR e DN (grupo ED<sub>2</sub>) reduziu a expressão de IRF3 (1.41-*fold reduced* em ED vs. SD  $p = 0.018$ ; Figura 3 E). No grupo adulto, somente o tratamento com DN promoveu aumento na expressão da MAPK (1.18-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.007$ ; Figura 3 F); em contrapartida, nos animais envelhecidos e exercitados (grupo EV<sub>2</sub>), a expressão desta proteína diminuiu (1.42-*fold reduced* em EV<sub>2</sub> vs. SV<sub>2</sub>,  $p = 0.018$ ; Figura 3 F).

De forma geral, o DN ou TFR isolados, alteraram a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias (Figura 4 A). Observou-se que o DN isoladamente foi determinante no aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em animais adultos e envelhecidos (1.36- *fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. ED<sub>1</sub>,  $p = 0.0079$  e 1.35-*fold increased* em SD<sub>2</sub> vs. ED<sub>2</sub>,  $p = 0.003$ ; Figura 4 B). Resultados semelhantes foram encontrados para a IL-6 na fase adulta nos grupos que receberam DN (1.91-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.010$ ; Figura 4 C). O aumento de IL-6 também foi observado no grupo que realizou o TFR na fase adulta (1.76-*fold increased* em EV<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.0002$ ; Figura 4 C). Nos animais envelhecidos e exercitados (grupo EV<sub>2</sub>), a expressão desta citocina diminuiu (1.28-*fold reduced* em EV<sub>2</sub> vs. SV<sub>2</sub>,  $p = 0.032$ ; Figura 4 C). O DN isolado induziu a produção de NOX1 nos animais adultos (1.71-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.0001$ ; 1.35-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. ED<sub>1</sub>,  $p = 0.0018$ ) e nos envelhecidos (1.60-*fold increased* em SD<sub>2</sub> vs. ED<sub>2</sub>,  $p = 0.002$ ; Figuras 5 A e B). Nos animais envelhecidos e treinados (grupo EV<sub>2</sub>), a NOX1 também aumentou em comparação ao grupo ED<sub>2</sub> (1.41-*fold increased* em EV<sub>2</sub> vs. ED<sub>2</sub>,  $p = 0.004$ ), apesar de ter diminuído em relação ao grupo controle (1.21-*fold reduced* em EV<sub>2</sub> vs. SV<sub>2</sub>,  $p = 0.022$ ; Figura 5 B).

A expressão de Nrf2 foi maior apenas no grupo adulto que recebeu DN (1.96-*fold increased* em SD<sub>1</sub> vs. SV<sub>1</sub>,  $p = 0.017$ ; Figura 5 C). Ao longo do envelhecimento, os grupos que receberam DN e aqueles submetidos ao TFR (grupos SD<sub>2</sub> e EV<sub>2</sub>) apresentaram redução na expressão de Nrf2 (1.50-*fold reduced* em SD<sub>2</sub> vs. SV<sub>2</sub>,  $p = 0.013$ ; 1.80-*fold reduced* em EV<sub>2</sub> vs. SV<sub>2</sub>,  $p = 0.001$ ; Figura 5 C).

## DISCUSSÃO

Com o avanço da idade, o sistema imunológico apresenta alterações graduais nas células do sistema imunológico. Este sistema pode ser progressivamente ativado, gerando respostas inflamatórias envolvidas na fisiopatologia de doenças relacionadas à idade ou a fatores externos (Balistreri *et al.*, 2009). Neste estudo observamos lesões histopatológicas relacionadas a alterações na expressão de moléculas envolvidas no processo inflamatório.

Assim, animais adultos expostos ao DN e submetidos ao TFR apresentaram lesões patológicas na próstata ventral, as quais desencadearam a ativação do sistema imunológico por meio dos receptores TLR2 e TLR4. Esta ativação foi observada nos grupos que apresentaram lesões típicas de inflamação de fase aguda e crônica. Segundo Pradere *et al.*, (2013), lesões agudas ou crônicas envolvem diretamente a ativação de TLR2 e TLR4.

O TLR4 tem sido identificado tanto em mecanismos de resposta inflamatória como no favorecimento de processos tumorais (Palsson-McDermott *et al.*, 2009; Pradere *et al.*, 2013). Além disso, a expressão deste receptor pode ser modulada pela disponibilidade de testosterona na próstata de ratos (Quintar *et al.*, 2006). Nesse trabalho, animais adultos expostos ao DN e ao TRF apresentaram queda nos níveis de testosterona plasmática; já os animais adultos e tratados com DN tiveram redução dos níveis de 17- $\beta$  estradiol (dados não mostrados). Esses resultados mostram que desequilíbrios nas taxas hormonais favorecem alterações na estrutura da próstata, na expressão de TLR4, e, conseqüentemente, ativam a resposta inflamatória (Leimgruber *et al.*, 2013).

Além do TLR4, também o TLR2 foi superexpresso no grupo SD<sub>1</sub>, sugerindo que o DN modula a expressão destes receptores. Embora o reconhecimento de padrões moleculares para a ativação dos TLR2 e TLR4 sejam similares (Akira & Takeda, 2003), estes receptores podem sinalizar vias distintas de moléculas precursoras da resposta imune (Kawai & Akira, 2007).

Assim, desequilíbrio das taxas hormonais promove alterações na estrutura da próstata ventral, favorecendo a ativação de TLRs, com intuito de reparar danos teciduais.

Nossos resultados mostraram superexpressão do TLR4, e este quando é ativado pode sinalizar através da via canônica ou não canônica, as quais desencadeiam respostas imunes completamente distintas (Kawai & Akira, 2007). Os grupos adultos que realizaram o TFR apresentaram aumento na expressão de IL-6, apesar da redução na expressão de NF $\kappa$ B. A produção de IL-6 está diretamente relacionada à intensidade da contração muscular durante a atividade física (Rebillard *et al.*, 2013). A liberação da IL-6 pode suprimir a produção de TNF- $\alpha$ , ou favorecer a progressão do processo inflamatório (Pedersen *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 2011). Estes relatos justificam os resultados encontrados no grupo que realizou o TFR (grupo EV<sub>1</sub>), o qual não apresentou alterações na expressão do TNF- $\alpha$  e, além disso, apresentou diferentes lesões inflamatórias.

Nossos dados mostraram que o aumento da expressão da NOX1, em geral, foi diretamente associado à incidência de lesões patológicas, com ênfase no grupo SD1. A produção de EROs ocorre em processos celulares normais (Bedard & Krause, 2007). Porém, o aumento acentuado na produção de EROs está associado com lesão do tecido ou danos no DNA que são manifestações de condições patológicas associadas com infecção ou envelhecimento (Bedard & Krause, 2007; Khandrika *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2011)

A NOX1 tem sido identificada na fase aguda e crônica de lesões patológicas na próstata (Bedard *et al.*, 2007; Khandrika *et al.*, 2008). Estudos envolvendo o câncer de próstata demonstraram que a produção de EROs, oriundas do metabolismo de NOX1, está inversamente relacionada aos níveis de andrógenos (Tam *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009). Nesse contexto, o aumento na expressão de NOX1 no grupo SD<sub>1</sub> foi acompanhado também pelas alterações na expressão de TLR2 e TLR4, evidenciando a ativação de resposta de reparação tecidual (Erridge, 2010).



Nossos resultados mostraram que o aumento da expressão de TLR4 foi acompanhado pelo aumento do IRF3, indicando ativação de via independente de MyD88. O IRF3 sinaliza a produção de interferons que apresentam importante papel nas respostas imunes (Sin *et al.*, 2012). Provavelmente, este fator promoveria alterações na produção de interferons para os grupos que fizeram uso de DN ou TFR, uma vez que diferentes isoformas de interferons foram identificadas na próstata e estão envolvidas no desenvolvimento de neoplasias (Kramer *et al.*, 2007).

Os TLR2 e TLR4 podem atuar simultaneamente nos mecanismos da fase crônica de processos tumorais (Pradere *et al.*, 2003), ou isoladamente dependendo do tipo de câncer e órgão acometido (Hong-Zhen *et al.*, 2009), incluindo a próstata (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2011; Hamidi *et al.*, 2011). Nossos achados indicam que estes receptores podem ter atuado sinergicamente ou isoladamente na resposta de sinalização de ativação de MAPK frente às neoplasias malignas que acometeram o grupo SD1. Outros fatores, como o estresse oxidativo, a IL-1 (envolvida no processo de proliferação celular) e o TNF- $\alpha$  (relacionado à apoptose em neoplasias benignas da próstata) também podem ativar a via de sinalização da MAPK (Ricote *et al.*, 2003; Ricote *et al.*, 2004; Koul *et al.*, 2013). Para o grupo SD<sub>1</sub>, observamos o aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, sugerindo para o TNF- $\alpha$  papel limitador na progressão das lesões histopatológicas identificadas neste grupo.

Provavelmente, o aumento da produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo SD<sub>1</sub> foi decorrente da ativação da proteína ativadora do fator transcricional AP-1, via MAPK (Mccarthy *et al.*, 2014). Assim, o aumento da NOX1 favoreceu a ocorrência das neoplasias em resposta à ativação desta via inflamatória envolvendo a MAPK, que pode ser ativada em resposta à estímulos estressores, como aumento na produção ROS e citocinas inflamatórias (McCubrey *et al.*, 2006; Kant *et al.*, 2011).

O aumento da produção de NOX1 foi acompanhado pelo aumento de Nrf2 no grupo SD<sub>1</sub>, evidenciando mecanismo de compensação para eliminação de EROs. O Nrf2 é o principal fator regulador da produção excessiva de EROs (Gupte *et al.*, 2013). Além disso, os resultados avaliados mostraram que não houve alteração significativa na expressão de NFκB para este grupo. Isto deve estar diretamente associado ao aumento na produção de Nrf2, já que este fator atua na regulação da ativação do NFκB (Kim *et al.*, 2010).

Para alguns parâmetros avaliados, os efeitos do uso de DN e do TFR foram reduzidos com o período de interrupção do tratamento, ou seja, algumas alterações observadas foram imediatas e não persistiram ao longo do envelhecimento.

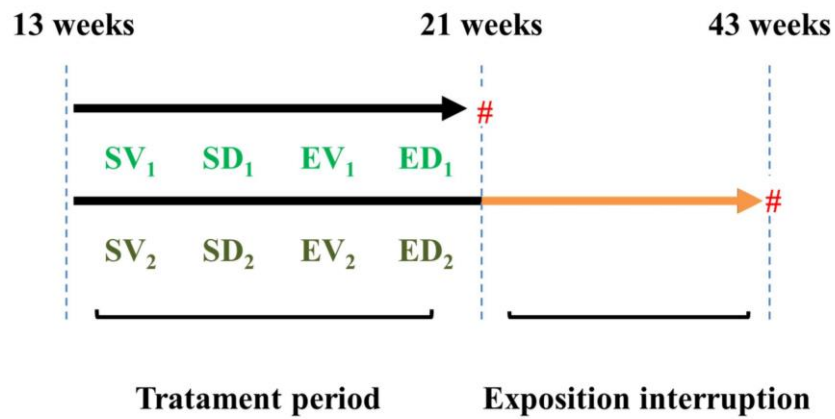
Nos animais envelhecidos não foram observadas alterações na expressão dos receptores TLR2 e TLR4. Certamente, estes resultados têm relação direta com a baixa incidência de neoplasias pré-malignas, uma vez que os TLR2 e TLR4 estão envolvidos na resposta imediata ao processo inflamatório, nos mecanismos de reparação tecidual ou em processos tumorais (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2011; Pradere *et al.*, 2013).

Os animais envelhecidos tratados com DN isoladamente e os que haviam realizado o TFR (grupos SD<sub>2</sub> e EV<sub>2</sub>) tiveram aumento na produção de NOX1, acompanhada pela redução de Nrf2. A expressão do NFκB também aumentou nos animais que receberam DN e realizaram o TFR, independentemente dos TLRs. Além disso, foram observados, para alguns grupos, aumento na produção de TNF-α (grupo SD<sub>2</sub>) e redução na expressão de IL-6 (grupo EV<sub>2</sub>). O TNF-α pode ser produzido independente da ativação do TLR4 e, além disso, a produção de IL-6 e TNF-α tem relação direta com a idade (Agrawal *et al.*, 2006; Balistreri *et al.*, 2009). Nossos dados sugerem que a ativação do NFκB ocorreu independente da alteração na expressão de TLRs, por meio das vias alternativa e atípica de ativação de NFκB. Estas vias podem ser sinalizadas pela ativação de membros específicos de TNFs ou outras citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse celular (Hayden, & Ghosh, 2004; Lee *et al.*, 2007).

Neste trabalho foram discutidas alterações neoplásicas e moleculares na próstata de animais tratados com DN e submetidos ao TFR. No entanto, animais que associaram o uso de DN com TFR também apresentaram alterações histopatológicas e na expressão de algumas proteínas na próstata, como NFκB, IRF3, TNF- $\alpha$  e NOX1. Provavelmente, estas alterações favorecerão o surgimento de neoplasias malignas com o avançar da idade, pois o NFκB e TNF- $\alpha$  podem atuar nos processos apoptóticos do câncer (Pradere *et al.*, 2013), e desempenhar ação pró-apoptótica em neoplasias benignas da próstata (Ricote *et al.*, 2003). Além disso, os animais adultos e envelhecidos que fizeram o TFR e receberam o DN (grupos ED<sub>1</sub> e ED<sub>2</sub>) apresentaram lesões na próstata, com prevalência de metaplasia. Alterações estruturais na próstata de animais submetidos ao TFR associado ao DN podem ser atribuídas ao exercício físico isoladamente (Shokri *et al.*, 2010) ou aos efeitos isolados do próprio DN (Takahashi *et al.*, 2004; Karbalay-Doust, 2006; Chung *et al.*, 2007).

Quando o DN e o TFR estão associados, podem estabelecer mecanismos de compensação, já que durante a atividade física resistida há redução dos níveis de testosterona circulante (Hackney *et al.*, 2001), e o DN, por ser um EAA (Clark *et al.*, 1997), pode momentaneamente repor os níveis de andrógeno, amenizando os efeitos imediatos na próstata, simulando um falso e momentâneo efeito benéfico à glândula.

Desta forma, concluímos que o DN, associado ou não ao TFR, ativa vias relacionadas ao processo inflamatório em resposta às alterações morfológicas e fisiológicas na próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos. Segundo nossos dados, não somente o DN, mas também a modalidade de atividade física resistida promovem mudanças irreversíveis na morfofisiologia da próstata. Esses achados poderão trazer novas perspectivas para os adeptos dentro da interface hormônio-atividade física.

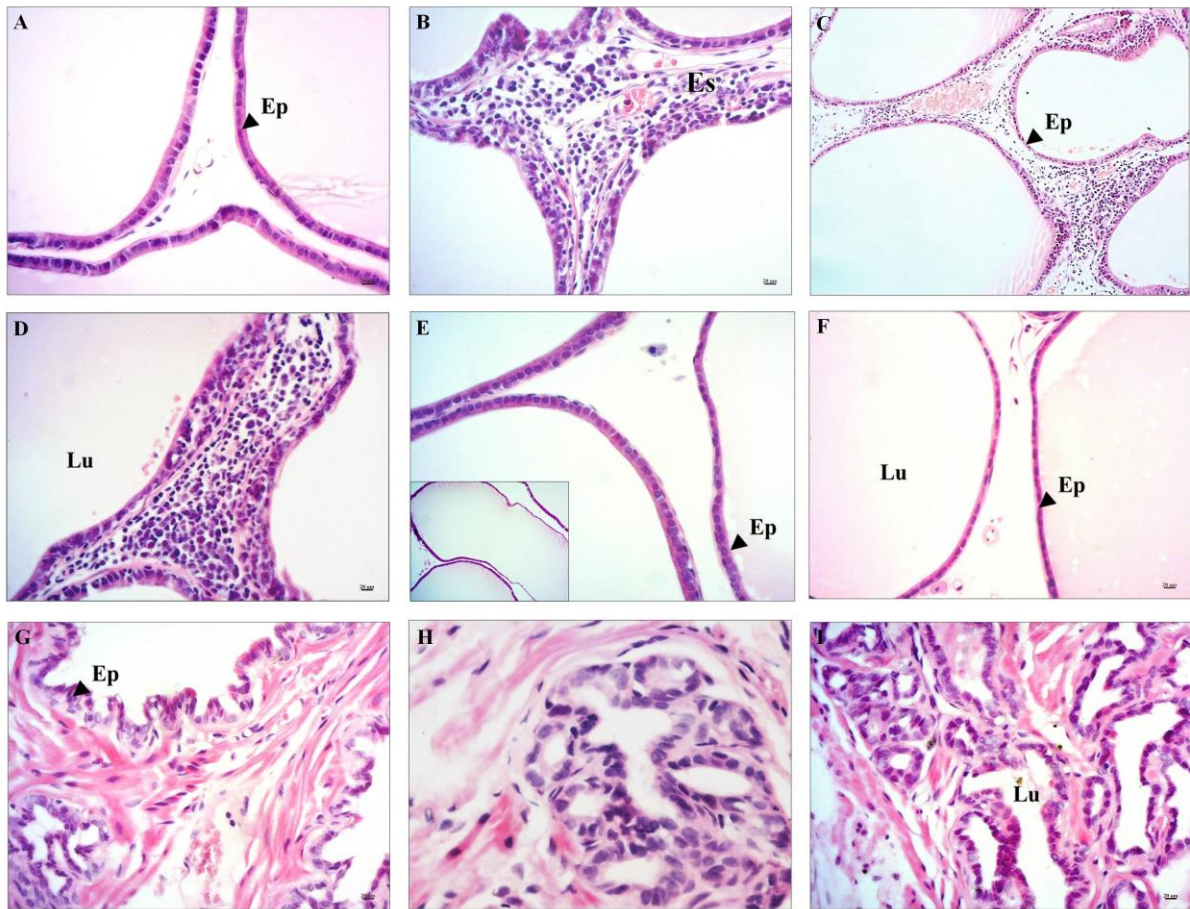


**Figura 1** – Delineamento experimental. Os grupos experimentais foram dispostos da seguinte forma: SV – sedentário + veículo; SD – sedentário + decanoato de nandrolona; EV – exercício + veículo; ED – exercício + decanoato de nandrolona; 1 – adultos; 2 – envelhecidos; # - Eutanásia. Período de tratamento correspondente a 8 semanas e interrupção do tratamento após a 21 semana.

**Tabela 1** – Percentual de lesões patológicas identificadas na próstata ventral de ratos.

<b>Histotipos (%)</b>	<b>SV<sub>1</sub></b>	<b>SD<sub>1</sub></b>	<b>EV<sub>1</sub></b>	<b>ED<sub>1</sub></b>	<b>SV<sub>2</sub></b>	<b>SD<sub>2</sub></b>	<b>EV<sub>2</sub></b>	<b>ED<sub>2</sub></b>
<b>Foco inflamatório (FI)</b>	-	80	80	40	20	-	-	40
<b>Inflamação multifocal (IM)</b>	-	20	40	-	20	-	-	20
<b>Atipia reacional inflamatória (ARI)</b>	-	-	20	-	-	-	-	20
<b>Metaplasia (MP)</b>	-	100	80	100	100	80	80	100
<b>Atrofia (AT)</b>	-	40	60	60	40	80	40	60
<b>Hiperplasia (HP)</b>	-	20	20	60	-	20	-	-
<b>Neoplasia intra-epitelial (NIP)</b>	-	20	20	-	20	20	20	-
<b>Adenocarcinoma (AC)</b>	-	20	40	20	20	-	-	-

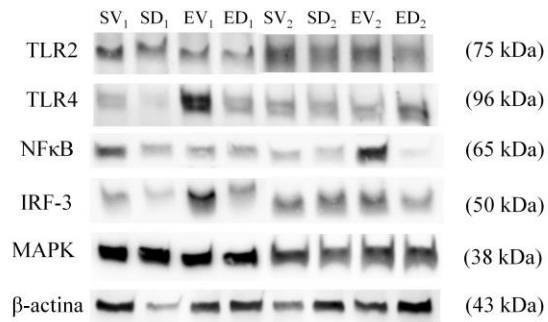
Dados expressos em % sendo n=5/ grupo. Ausência de alterações patológicas (-). 1) rato com 90 dias de idade, 2) ratos com 300 dias de idade.



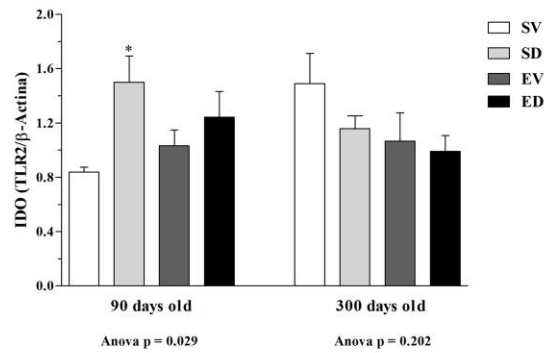
**Figura 2:** Lesões histopatológicas na próstata ventral. Imagens representativas das lesões visualizadas nos grupos: adultos e envelhecidos. Em destaque a coloração de H&E foi utilizada para visualização de estroma e núcleo. Ep e cabeça de seta – epitélio; Es – estroma; Lu – Lúmen. A) Controle, (B) Foco inflamatório, (C) Inflamação multifocal, (D) Atipia reacional inflamatória epitelial, (E) Metaplasia, (F) Atrofia epitelial, (G) Hiperplasia, (H) Neoplasia intra-epitelial, (I) Adenocarcinoma microinvasivo.

## 3.A

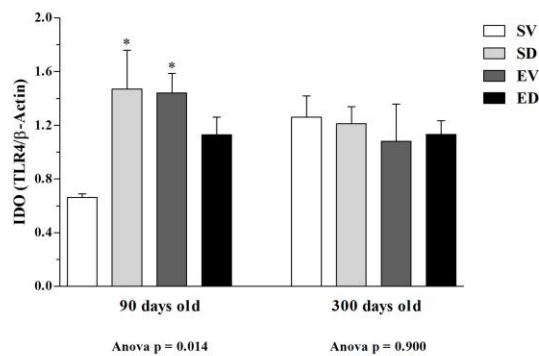
## Molecules involved in the inflammatory process



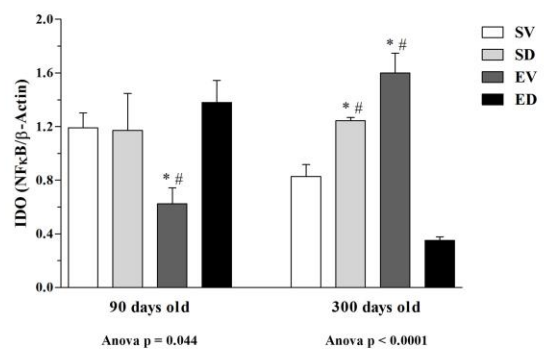
## 3.B



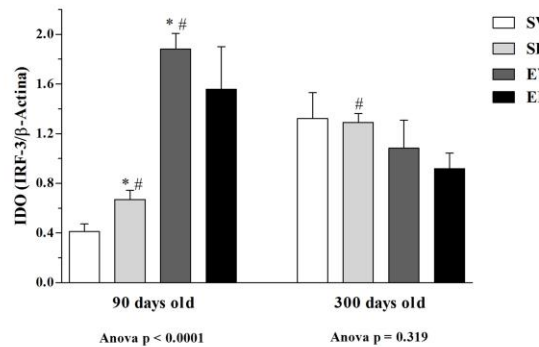
## 3.C



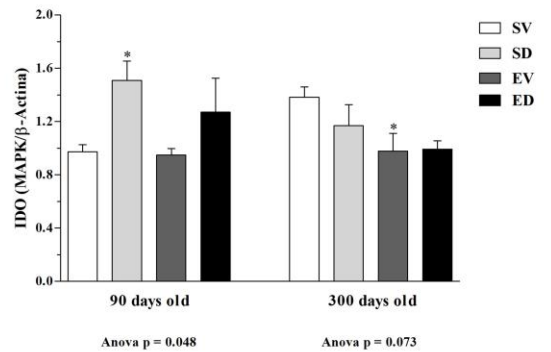
## 3.D



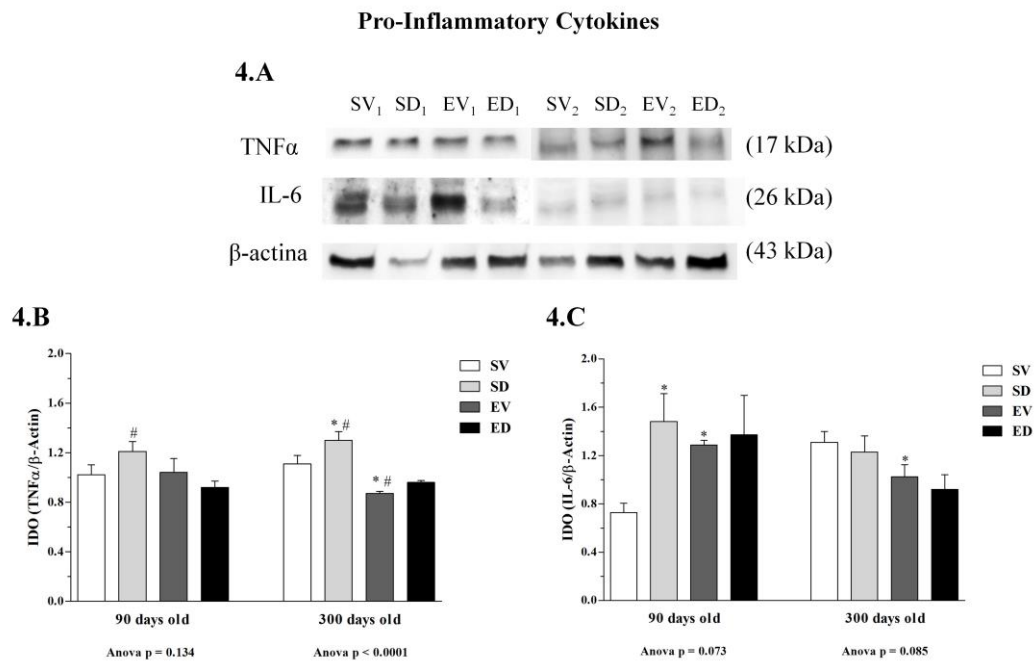
## 3.E



## 3.F

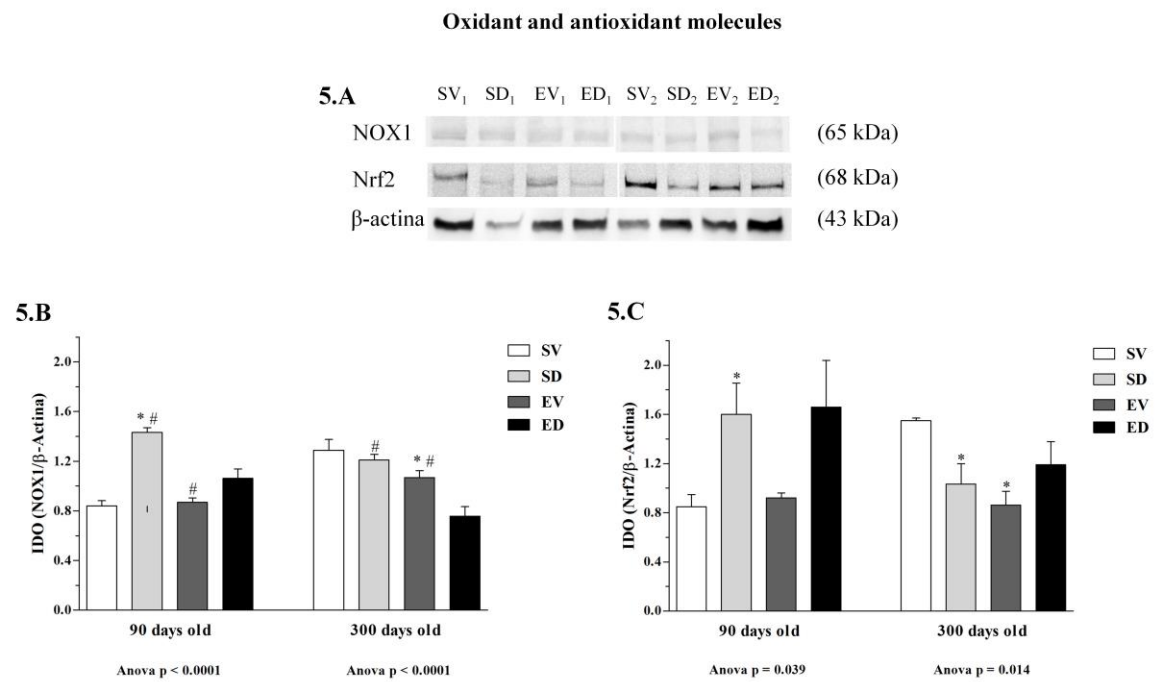


**Figura 3** - Expressão das proteínas TLR2, TLR4, NFκB, IRF3, MAPK e β-actina (A). TLR2 (B), TLR4 (C), NFκB (D), IRF3 (E) e MAPK (F). Os símbolos representam diferenças estatísticas entre as seguintes comparações: \* (SV vs SD); (SV vs EV) e # (SD vs ED); (EV vs ED). Todos os dados foram submetidos à Anova.



**Figura 4** - Expressão das proteínas TNF- $\alpha$  e IL-6 (A). TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C). Os símbolos representam diferenças estatísticas entre as seguintes comparações: \* (SV vs SD); (SV vs EV) e <sup>#</sup> (SD vs ED); (EV vs ED). Todos os dados foram submetidos à Anova.





**Figura 5** - Expressão das proteínas NOX-1 e Nrf2 (A). NOX-1 (B), Nrf2 (C). Os símbolos representam diferenças estatísticas entre as seguintes comparações: \* (SV vs SD); (SV vs EV) e # (SD vs ED); (EV vs ED). Todos os dados foram submetidos à Anova.

## REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Immunology**. v.4, p. 499-511, 2004.
- BALISTRERI, C. R.; COLONNA-ROMANO, G.; LIO, D.; CANDORE, G.; CARUSO, C. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. **J Clin Immunol**. v.29, n. 4, p. 406-415.
- BASARIA, S. WAHLSTROM, J. T.; DOBS AS. Clinical review Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n.11, p.5108-5117, 2001.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiol**, v. 87, p. 245-313, 2007.
- BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie**. v.89, n.9, p.1107-1112. 2007.
- CHUNG, T.; KELLEHER, S.; LIU, P. Y.; CONWAY, A. J.; KRITHARIDES, L.; HANDELSMAN, D. J. Effects of testosterone and nandrolone on cardiac function: a randomized, placebo-controlled study. **Clin Endocrinol**. v.66.n.2, p.235-245, 2007.
- CLARK, A. S.; HARROLD, E. V. FAST, A. S. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Horm Beha**. v. 31, p.35-46, 1997.
- CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Review: Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.27, p. 413-436, 2003.
- DE MARZO, A. M.; NAKAI, Y.; NELSON, W. G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. **Urol Oncol**. v.25, p. 398-400, 2007.
- DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **World J Urol**. v.21, n.5, p.341-345, 2003.
- ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen: androgen ratio in the prostate gland. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v.118, n.4-5, p.246-51. 2010.
- ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? **J Leukoc Biol**. v.87,n.6, p.989-999, 2010.
- FRANQUNI, J. V.; DO NASCIMENTO, A. M.; DE LIMA, E. M.; BRASIL, G. A.; HERINGER, O. A.; CASSARO, K. O.; DA CUNHA, T. V.; MUSSO C.; SILVA SANTOS, M. C.; KALIL, I. C.; ENDRINGER, D.C.; BOËCHAT, G. A.; BISSOLI, N. S.; DE ANDRADE, T. U. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids**. v.78, n.3, p. 379-385, 2013.
- GONZALEZ-REYES S, GONZALEZ LO, GONZALEZ JM, FERNANDEZ JMF, AGUIRRE A, ESCAFF S, SUAREZ A, VIZOSO FJ. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. **BMC Cancer**. v.10, n. 665, p. 2407-2410, 2011.
- HACKNEY, A. C. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men: alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Curr Pharm Des**. v.7, n.4, p. 261-273, 2001.
- HAMIDI, A.; BULOW, V. V.; HAMIDI, R.; WINSSINGER, N.; BARLUENGA, S.; LANDSTRÖM. Polyubiquitination of Transforming Growth Factor (TGF)-associated Kinase 1 Mediates Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Response to Different Inflammatory Stimuli. **Journal of Biological Chemistry**. v.287, n.1, p.123-133, 2011.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- $\kappa$ B. **Genes & Development**. v.18, n.20, p.2195-2224, 2004.

- ISAACS, J. T. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. **Prostate**. v. 5, p. 545-547, 1984.
- KANT,S.; SWAT, W.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.Y.; NEEL, B.G.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. J. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. **Genes Dev**. v.25, n.1, p. 2069-2078, 2011.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**. v.17, p.338-344, 2005.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**. v.19, p. 24-32, 2007.
- KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; MARONI, P.; KOU, H. K. Oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**. v.21, n.2, p.125-136, 2009.
- KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutat Res**. v.7, n.2, p.12-23, 2010.
- KOUL, H. K.; PAL, M.; KOUL, S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Genes Cancer**. v.4, p. 342-359, 2013.
- KRAMER, G.; MITTEREGGER, D.; MARBERGER, M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? **Eur Urol**. v.51, n.5, p.1202-1216, 2007.
- LEE, C. H.; JEON, Y. T.; KIM, S. H.; SONG, Y. S. NF- $\kappa$ B as a potential molecular target for cancer therapy. **Biofactors**, v. 29, p. 19-35, 2007.
- LEIMGRUBER, C.; QUINTAR, A. A.; GARCÍA, L. N.; PETITI, J. P.; DE PAUL, A. L.; MALDONADO, C. A. Testosterone abrogates TLR4 activation in prostate smooth muscle cells contributing to the preservation of a differentiated phenotype. **J Cell Physiol**. v.7, p. 1551-1560, 2013.
- LORNE, E.; DUPONT, H.; ABRAHAM, E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? **Intensive Care Med**. v.36, n. 11, p.1826-1835, 2010.
- MCCARTHY, C. G.; GOULOPOULOU, S.; WENCESLAU, C. F.; SPITLER, K.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**., v. 306, n. 2, p. H184-H196, 2014.
- MCCUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. **Antioxid Redox Signal**. v. 8, p. 1775-1789, 2006.
- PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; DOYLE, S. L.; MCGETTRICK, A. F.; HARDY, M.; HUSEBYE, H.; BANAHAN, K.; GONG, M.; GOLENBOCK, D.; ESPEVIK, T.; O'NEILL, L. A. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. **Nat Immunol**. v.10, n.6, p.579-586, 2009.
- PENDYALA, S.; NATARAJAN, V. Redox regulation of Nox proteins. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, p. 265-271, 2010.
- POPE, H. G. JR; KATZ, D. L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am J Psychiatry**, v. 145, n. 4, p. 487-490, 1988.
- PRADERE JP1, DAPITO DH, SCHWABE RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**. v.12, p.2013.
- QUINTAR, A. A.; ROTH, F. D.; DE PAUL, A. L.; AOKI, A.; MALDONADO, C. A. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. **Biol Reprod**., v. 75, n. 5, p. 664-672, 2006.
- REBILLARD, A.; LEFEUVRE-ORFILA, L.; GUERITAT, J.; CILLARD, J. Prostate cancer and physical activity: adaptive response to oxidative stress. **Free Radic Biol Med J**., v. 60, p. 115-124, 2013.

RICOTE, M.; ROYUELA, M.; GARCÍA-TUÑÓN, I.; BETHENCOURT, F. R.; PANIAGUA, R.; FRAILE, B. Pro-apoptotic tumor necrosis factor-alpha transduction pathway in normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. **J Urol.** v. 3, p. 787-790, 2003.

RICOTE, M.; GARCÍA-TUÑÓN, I.; BETHENCOURT, F. R.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R.; ROYUELA, M. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. **Cancer.** v.7, p.1388-1396, 2004.

ROEHRBORN, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **Int J Impot Res.**, v. 20, n. 3, p. S11-S18, 2008.

SAUER, H.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cell Physiol Biochem.** v. 4, p. 173-186, 2001.

SHELLER, J. CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta.** v.5, p.878-888, 2011.

SHAPPELL, S. B.; THOMAS, G. V.; ROBERTS, R. L.; HERBERT, R.; ITTMANN, M. M.; RUBIN, M. A.; HUMPHREY, P. A.; SUNDBERG, J. P.; ROZENGURT, N.; BARRIOS, R.; WARD, J. M.; CARDIFF, R. D. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor Meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. **Cancer Res.** v.64, p. 2270–2305, 2004.

SHOKRI, S.; AITKEN, R. J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI, F. M.; KASHANI, I.; EJTEMAEIMEHR, S.; AHMADIAN, S.; MINAEI, B.; NARAGHI, M. A.; BARBARESTANI, M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 106, n. 4, p. 324-330, 2010.

SIN, W. X.; LI, P.; YEONG, J.P.; CHIN, K. C. Activation and regulation of interferon- $\beta$  in immune responses. **Immunol Res.** v. 53, p. 25-40, 2012.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox Family NAD(P)H oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 677-686, 2005.

TAKAHASHI, M.; TATSUGI, Y.; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. **Endocr J.**, v. 51, n. 4, p. 425-434, 2004

TAM NN, GAO Y, LEUNG YK, HO SM. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **Am J Pathol.**, v.163, p. 2513–2522, 2003

YANG, H-Z.; CUI, B.; LIU, H-Z, MI, S.; YAN, J.; YAN, H-M.; HUA, F.; LIN, H.; CAI, W-F.; WEN-XIE, J.; LV, XI, WANG, X- X; XIN, B. M.; Zhan, K. M.; Hu, Z. W. Blocking TLR2 Activity Attenuates Pulmonary Metastases of Tumo. **Plos One.** V.4, n. 8, p. e6520, 2009.

## *Capítulo 2*

**O decanoato de nandrolona e o treinamento físico resistido modulam a expressão dos receptores androgênicos e estrogênicos na próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos**

Fabiana de Campos Gomes<sup>1\*</sup>, João Simão de Melo Neto<sup>4</sup>, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>2</sup>, Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro<sup>1</sup>, Wagner José Fávaro<sup>2, 3</sup>, Raquel Fantin Domeniconi<sup>1</sup>.

(1) Departamento de Anatomia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil.

(2) Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil.

(3) Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP, Brasil.

(4) Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília - SP, Brasil.

**\*Autor correspondente:**

Fabiana de Campos Gomes, Departamento de anatomia, Instituto de Biociências - IBB Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: [facamposgomes@gmail.com](mailto:facamposgomes@gmail.com)

**Palavras chaves:** Testosterona; Próstata; Esteroide; Exercício.

## RESUMO

O Decanoato de nandrolona (DN) é um esteroide androgênico anabolizante (EAA) que em altas doses pode promover desequilíbrio nas taxas hormonais e comprometer o funcionamento de órgãos dependentes de andrógenos. Este estudo foi realizado com intuito de avaliar efeitos do DN, isolado ou associado à prática de treinamento físico resistido (TFR), sobre a morfofisiologia da próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos. Os ratos da linhagem Sprague-dawley foram divididos em quatro grupos experimentais (n=7): sedentário com e sem DN, treinados com e sem DN. Todos os grupos foram tratados durante a fase adulta por oito semanas, neste período, realizaram o TFR (saltos em água) e receberam o DN duas vezes/ semana (5 mg/Kg). Após este período, o tratamento foi interrompido. Os ratos adultos foram eutanasiados imediatamente, e os envelhecidos somente aos 300 dias de idade. O sangue foi coletado para avaliar os níveis plasmáticos de testosterona e estradiol; e, a próstata ventral foi processada para análises morfométrica e moleculares para avaliar os receptores de andrógeno (AR) e estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). Animais adultos e envelhecidos, expostos aos diferentes tratamentos, tiveram redução de testosterona. O estradiol aumentou em todos os grupos tratados com DN. Os animais adultos tratados apresentaram redução na altura do epitélio e aumento na expressão dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  apenas nos grupos que receberam DN. Para os animais envelhecidos, houve redução na expressão de AR no grupo treinado e de ER $\beta$  em todos os grupos tratados. Identificamos que os fatores DN e TFR, isolados ou combinados, alteram a morfofisiologia da próstata ventral. Assim, DN e a modalidade TFR alteram os níveis hormonais plasmáticos e dos receptores androgênicos e estrogênicos na próstata, refletindo na homeostasia desse órgão.

## INTRODUÇÃO

O DN é um esteroide androgênico anabolizante (EAA) (Clark & Henderson, 2003; Shokri *et al.*, 2009), que vem sendo usado de forma ilícita por atletas e não atletas, associado ao exercício físico, com intuito de aumentar a massa, força e resistência muscular (Dohle *et al.*, 2003). O uso indiscriminado deste EAA pode ocasionar efeitos adversos, inclusive em órgãos do sistema genital masculino dependentes de andrógenos (Socas *et al.*, 2005, Karbalay-Doust & Noorafashan, 2006). Além do DN, também a atividade física, dependendo de sua intensidade e duração, pode alterar os níveis de testosterona circulante (Hackney, 2001).

O desequilíbrio nos níveis de andrógenos e estrógenos compromete o funcionamento da próstata (Cunha *et al.*, 1992; Berry, Maitland, & Collins, 2008). Estes hormônios atuam por meio de receptores específicos, incluindo o receptor de andrógeno (AR), e os receptores de estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER  $\beta$ ) (Sugiyama *et al.*, 2010). A ação dos andrógenos na próstata está associada ao equilíbrio nos mecanismos de proliferação e diferenciação das células epiteliais, já os estrógenos atuam nos mecanismos normais e patológicos da próstata (Cunha *et al.*, 1987; Hayward & Cunha, 2000; McPherson, Ellem, & Risbridger, 2008).

Alterações na expressão dos receptores de andrógenos e estrógenos podem favorecer a ocorrência de lesões na próstata (Berry, Maitland, & Collins, 2008, Gibson & Saunders, 2012). Estas alterações podem ocorrer naturalmente ao longo do processo de envelhecimento, ou pelo uso de substâncias que atuam como moduladoras sobre a expressão dos receptores hormonais (Dohle, Smit, & Weber 2003; Bhasin *et al.*, 2006).

Tendo em vista que o DN e o exercício físico podem alterar os níveis de hormônios circulantes no organismo, propusemos nesse trabalho avaliar os efeitos do DN em altas doses, associado ou não à prática de exercício físico resistido, na morfofisiologia da próstata de animais adultos e envelhecidos.



## **METODOLOGIA**

Para este estudo foram utilizados 56 ratos machos (13 semanas de idade), virgens, da linhagem *Sprague dawley*, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do IBB-UNESP/Botucatu, em condições adequadas de luminosidade (12h ciclo claro/escuro) e temperatura (23°C). Durante todo período experimental, os animais receberam ração (Nuvilab) e água *ad libitum*. O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBB/UNESP (Protocolo nº 385).

### ***Grupos experimentais***

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais (sete animais/grupo) de acordo com seus respectivos tratamentos e faixas etárias. Dados apresentados na Figura 1.

Os grupos SV e EV receberam injeções intramusculares de veículo (0,2 ml/Kg peso corpóreo de propilenoglicol), enquanto que os grupos SD e ED receberam injeções intramusculares (i.m.) de EAA, administradas duas vezes por semana (totalizando 10 mg/kg/semana) no período da manhã, ao longo de oito semanas, conforme protocolo realizado por Shokri *et al.*, (2009). Esta dosagem, segundo Pope & Katz (1988), equivale à dose abusiva administrada por atletas, ou seja, 10 a 100 vezes maior que a dose terapêutica.

### ***Treinamento físico resistido***

Os animais foram submetidos a sessões de saltos em cilindro de PVC, contendo água a 30°C (Harri & Kuusela, 1986) a uma profundidade de 38 cm. Inicialmente, os grupos dos animais treinados passaram por período de adaptação e, posteriormente, foram submetidos ao

treinamento com sobrecarga final de 70% do peso corpóreo (Tabela 1). A sobrecarga foi colocada em um colete fixado na região ventral do tórax dos animais.

O protocolo do treinamento foi realizado durante oito semanas sendo três vezes/semana. Os animais eram submetidos a quatro séries de 10 repetições com intervalos de 60 segundo para repouso. Os grupos sedentários eram colocados em recipientes com água rasa (30°C) com o intuito de simular o estresse do contato com a água.

O período de oito semanas estabelecido para o protocolo experimental foi definido respeitando-se o período suficiente para que ocorra uma espermatogênese (48-56 dias) (Kolasa *et al.*, 2004; Shokri *et al.*, 2009). Assim, acreditamos que esse intervalo de tempo do tratamento seja o mínimo necessário para possíveis repercussões no eixo hipotálamo-hipófise-testículo.

### ***Processamento do material***

Os animais foram submetidos à câmara de CO<sub>2</sub> e guilhotinados para eutanásia e coleta de sangue para dosagem hormonal. Os ratos adultos foram eutanasiados 48 horas (Greiwe *et al.*, 1999) após a última sessão de saltos, já os animais em processo de envelhecimento foram eutanasiados com aproximadamente 43 semanas, conforme figura 2. Os animais foram pesados ao longo do período experimental.

A próstata ventral foi dissecada, fixada em formalina tamponada 10% e incluída em paraplástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). Em seguida foi realizada microtomia com cortes de 4 µm de espessura, os quais foram corados em Hematoxilina e Eosina e destinados às análises morfométricas. Outra parte do órgão foi imersa em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C para a rotina de *Western blotting*.

### ***Dosagem hormonal***

Amostras de sangue foram coletadas, por ruptura dos vasos cervicais, em tubos heparinizados, os quais foram centrifugadas por 20 min. O plasma sanguíneo foi armazenado em *Bio Frezeer* (-80°). Os níveis de testosterona e 17-Beta estradiol foram determinados usando a técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA).

### ***Morfometria***

A captura das imagens e as medidas da altura do epitélio prostático foram realizadas no programa AxioVision (Zeiss), em aumento de 400X. Foram obtidas imagens de 10 campos aleatórios da região intermediária, sendo realizadas três medidas/campo em cinco animais/grupo.

### ***Western blotting***

Para o processamento da eletroforese, as amostras 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 centrifugados e os sobrenadantes resultantes foram distribuídos aleatoriamente para obtenção de três *pools* (n=6) sendo armazenados em freezer -80°C. Posteriormente, os *pools* foram descongelados e aplicados em gel SDS-poliacrilamida de 10 e 12%. Após a realização da eletroforese, os “spots” correspondentes às proteínas foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em leite em pó desnatado a 5%, e incubada com os seguintes anticorpos e diluições:  $\beta$  actina (1:500), AR (1:500), Er $\alpha$  1:250 e Er $\beta$  (1:500). A membrana foi lavada em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, anti rabbit Abcam 1:20000 ( $\beta$  actina, AR, Er $\alpha$ , Er $\beta$ ) por 2 horas. Após a lavagem a reação foi revelada utilizando-se substrato quimioluminescente para

*Western blotting* (AMERSHAM ECL™ PRIME, GE Healthcare). Os dados foram normalizados com a proteína  $\beta$ -actina e expressos em porcentagem.

### ***Análise Estatística***

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), em seguida, todos os dados foram avaliados pela análise de variância (Anova). Para as análises semi quantitativas de *Western blotting* e as avaliações dos níveis de testosterona e estradiol aplicou-se o pós-teste Tuckey Kramer. Já para os dados morfométricos foram analisados pelo pós-teste Kruskal-Wallis, Para todas as análises estatísticas foram consideradas as seguintes comparações: SV vs SD; SV vs EV; SV vs SD; SD vs ED; EV vs ED, sendo considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

A análise estatística foi realizada no programa InStat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA), já os resultados foram expostos em gráficos elaborados no programa *Graphpad Prism 4.02 Updater*.

## **RESULTADOS**

### ***Dosagem hormonal e Receptores***

Nossos resultados mostraram que a atividade física foi determinante na diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona, nas diferentes idades (Figura 2 A). E os grupos adultos e envelhecidos tratados com DN, apresentaram níveis reduzidos de estradiol (Figura 2 B).

A análise da expressão do AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  estão representadas nas Figuras 3 A-D. A expressão do AR manteve-se semelhante entre os grupos adultos tratados em comparação ao controle; e nos grupos envelhecidos, o AR manteve-se próximo dos níveis do grupo controle, com exceção do grupo EV<sub>2</sub> que teve sua expressão diminuída (Figura 3 B). Houve aumento da expressão dos ERs  $\alpha$  e  $\beta$  nos ratos adultos tratados com DN (SD<sub>1</sub> e ED<sub>1</sub>) (Figura 3 C e D).

Os animais envelhecidos tratados apresentaram redução na expressão apenas do ER $\beta$  (Figura 3D).

### *Análise morfométrica*

Os dados referentes à altura do epitélio prostático estão representados na Figura 4. Nos animais adultos, todos os grupos submetidos aos diferentes tratamentos apresentaram redução da altura epitelial em comparação ao controle (Figura 4 A). Nos envelhecidos não foram observadas alterações significativas.

## **DISCUSSÃO**

Nossos resultados mostraram que a atividade física foi determinante na diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona. Estudos relatam que a elevação ou depressão dos níveis de testosterona circulantes estão relacionadas à intensidade e duração da atividade física (Hackney, 2001). Resultados de uma pesquisa, relacionando níveis de testosterona com treinamento físico, mostraram que a concentração de testosterona circulante de atletas foi mais baixa se comparada à de indivíduos sedentários, já o nível de LH, cortisol e prolactina não apresentaram alterações significativas (revisão realizada por Liu *et al.*, 2009).

De acordo com Hackney (2001), o exercício com intensidade moderada a forte, resulta em queda dos níveis de testosterona, pois segundo os autores o exercício leva à diminuição do fluxo sanguíneo testicular e, conseqüentemente, à redução na produção e secreção da testosterona endógena. Por outro lado, os baixos níveis de testosterona poderiam ter efeitos protetores para o coração e vasos sanguíneos, diminuindo o risco de doenças coronarianas.

Os grupos de animais envelhecidos, submetidos ao treinamento físico na juventude, mantiveram os baixos níveis de testosterona, similar ao dos animais adultos. Assim, segundo

nossos dados, o efeito do exercício sobre a baixa produção de testosterona persistiu durante o processo de envelhecimento.

O nível de testosterona circulante não foi alterado em animais adultos tratados com DN se comparados aos animais do grupo controle. Entretanto, houve queda da concentração de testosterona nos animais envelhecidos que receberam DN na juventude. Assim, nossos dados mostraram que quando a administração de DN foi interrompida os níveis de testosterona reduziram. Possivelmente, os níveis de testosterona permaneceram normais nos animais adultos, por causa da administração exógena do hormônio. Quando a fonte exógena foi interrompida, houve queda abrupta dos níveis séricos de testosterona.

Estudos anteriores, mostraram que a administração de EAA leva à queda na concentração de testosterona (Calzada *et al.*, 2001, Chung *et al.*, 2007). Provavelmente, os efeitos no eixo hipotálamo-hipófise-gônada que regulam a produção de testosterona podem persistir por um longo período.

Os níveis de estradiol diminuíram nos grupos adultos e envelhecidos, tratados com DN. De acordo com o discutido por Chung *et al.*, (2007), o DN pode ser considerado um andrógeno puro que age sozinho nos receptores de andrógeno, mas esse hormônio sintético é minimamente convertido em estradiol e seu metabólito  $5\alpha$  reduzido tem atividade androgênica pouco efetiva, levando, à redução dos níveis de estradiol quando há administração de DN. Assim, os efeitos dos esteroides exógenos podem competir com os endógenos, devido às diferenças na susceptibilidade à aromatização e na capacidade de conversão em DHT.

A expressão do AR manteve-se próxima dos níveis dos grupos controle independente do tratamento, com exceção do grupo EV<sub>2</sub> que teve sua expressão diminuída. Assim, a queda dos níveis plasmáticos de testosterona, observada em nossos resultados, não foi acompanhada pela diminuição na expressão do AR. Trabalhos relatam que baixos níveis circulantes de

testosterona em homens com câncer de próstata, recentemente diagnosticados e não tratados, foram correlacionadas com maior expressão de AR (Heinlein & Chang, 2004).

A biossíntese de estrógenos, geralmente, ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (O' Donnell *et al.*, 2001; Risbridger *et al.*, 2007). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desses hormônios com receptores estrogênicos específicos  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2002). Segundo Risbridger *et al.*, (2007), a resposta estrogênica completa no tecido prostático requer mecanismos parácrinos, tanto mediados por receptores  $\alpha$  do estroma bem como receptores  $\beta$  do epitélio.

Nossos resultados mostraram que os grupos SD<sub>1</sub> e <sub>2</sub> e ED<sub>1</sub> e <sub>2</sub>, todos submetidos ao tratamento com DN, tiveram os níveis plasmáticos de estradiol reduzidos, em contraste com o aumento da expressão dos ERs nos grupos adultos. Segundo revisado por Sugiyama *et al.*, (2010), na próstata, a DHT é metabolizada em 3 $\beta$ Adiol, um metabólito estrogênico que não requer aromatase para a sua síntese. O 3 $\beta$ Adiol é abundante na próstata e é um ligante natural do ER $\beta$  (Morani *et al.* 2008). Assim, 3 $\beta$ Adiol tem afinidade pelos ERs, em especial, ativa o ER $\beta$ , podendo ser considerado mediador da ação antiproliferativa do ER $\beta$ . Em conjunto, o AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$  e o 3 $\beta$ Adiol são os principais responsáveis pela regulação bioquímica da próstata (Sugiyama *et al.*, 2010).

Nos animais adultos, observamos alterações semelhantes na expressão dos ER $\alpha$  e  $\beta$ . Experimentos caracterizaram o importante envolvimento dos ER $\alpha$  nos mecanismos prostáticos, conjuntamente às ações exercidas pelos ER $\beta$ , sendo os efeitos estrogênicos produto de um balanço dinâmico entre ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Weihua *et al.*, 2002).

Nos animais envelhecidos houve redução da expressão ER $\beta$  em todos os grupos experimentais (SD<sub>2</sub>, EV<sub>2</sub> e ED<sub>2</sub>). A função destes receptores na próstata está relacionada à diferenciação e homeostasia do epitélio (Imamov *et al.*, 2004).

Normalmente, a redução destes receptores tem relação direta com o processo de envelhecimento, sendo esperada a diminuição da expressão dos ER $\beta$ . Durante este período, a queda na expressão destes receptores pode levar a processos patológicos tais como PIN (Böttner & Jarry, 2013). Sendo assim, a redução do ER $\beta$  nos animais tratados em comparação ao grupo controle pode ser devido às consequências ocasionadas durante o período de tratamento na fase adulta.

Estudos realizados por Jiahua *et al.*, (2005) identificaram redução de mRNA para ER $\beta$  na próstata de cães envelhecidos. Esta diminuição foi observada no epitélio e no estroma. Sugere-se, que as taxas de células epiteliais e estromais têm relação direta com a idade, implicando na expressão destes receptores e favorecendo o surgimento de neoplasias. Assim, nossos resultados mostraram que, as alterações na expressão do ER $\beta$  têm sido consideradas normais ao longo do envelhecimento. No entanto, o tratamento pode ter acentuado a redução na expressão destes receptores.

Com relação as análises morfométricas do epitélio verificou-se nos animais adultos, que todos os grupos submetidos aos diferentes tratamentos apresentaram redução da altura epitelial em comparação ao controle. Nos envelhecidos não foram observadas alterações significativas.

A diminuição observada na altura do epitélio está relacionada aos baixos níveis de testosterona endógena observada nesses grupos. Os principais andrógenos, envolvidos no desenvolvimento da próstata, são a testosterona e a diidrotestosterona (DHT), as quais agem mediadas pelo AR (Cunha *et al.*, 1992). Os andrógenos regulam a proliferação e a diferenciação das células epiteliais (Cunha *et al.*, 1987), bem como a morte celular



programada (Isaacs, 1984; Kyprianou & Isaacs, 1988). Assim, na próstata normal há equilíbrio nas taxas de morte celular e proliferação celular.

Apesar do grupo SD<sub>1</sub> não ter apresentado diferença significativa nos níveis de testosterona plasmática, houve tendência na queda de concentração deste hormônio no sangue, como já discutido, anteriormente, os efeitos dos esteroides exógenos podem competir com os esteroides endógenos, porém há diferenças na forma de atuação de ambos (Chung *et al.*, 2007). Assim, a administração de DN manteve os níveis, aparentemente, normais de testosterona no grupo SD<sub>1</sub>, no entanto sua capacidade de conversão em DHT difere da testosterona endógena.

De forma geral, o DN, associado ou não ao treinamento físico resistido, durante a fase pós-púbere, interferiu na morfofisiologia da próstata do adulto e ao longo do processo de envelhecimento. Não só o DN, mas também a modalidade de atividade física resistida alteram os níveis hormonais que refletem na homeostasia da próstata ventral.

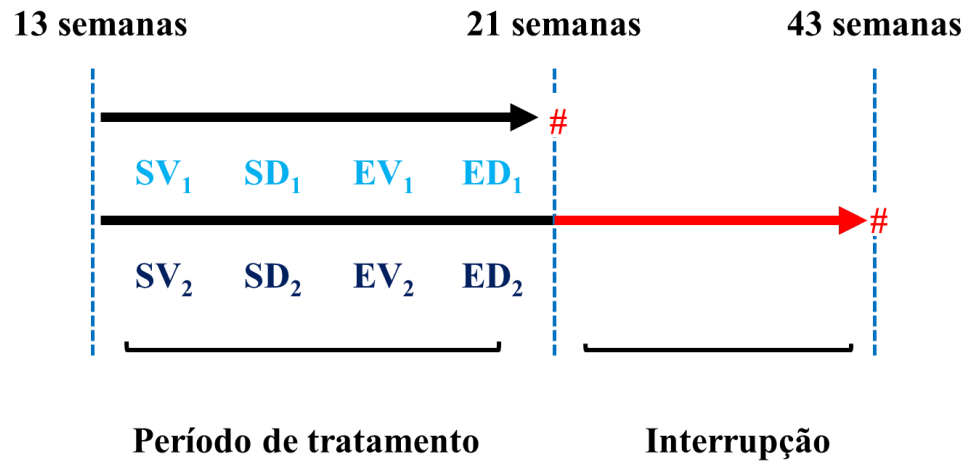
## REFERÊNCIAS

- BHASIN, S.; CALOF O. M.; STORER, T. W.; LEE, M. L.; MAZER, N. A.; JASUJA, R.; MONTORI, V. M.; GAO, W.; DALTON, J. T.; Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. **Nature Reviews Endocrinology**. v.2, p.142-159, 2006.
- BERRY, P.A.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. **Mol Cell Endocrinol**. v.25, n 288, p. 30-37, 2008.
- BÖTTNER, M.; THELEN, P.; JARRY, H.; Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v.139, p.245-251, 2013.
- CALZADA, L.; TORRES-CALLEJA, J.; MARTINEZ, J. M.; PEDRÓN, N. Measurement of androgen and estrogen receptors in breast tissue from subjects with anabolic steroid-dependent gynecomastia. **Life Sci**. v.69, n.13,1465-1469, 2001.
- CHUNG, T.; KELLEHER, S.; LIU, P. Y.; CONWAY, A. J.; KRITHARIDES, L.; HANDELSMAN, D. J. Effects of testosterone and nandrolone on cardiac function: a randomized, placebo-controlled study. **Clin Endocrinol**. v.66, n.2, p.235-245, 2007.
- CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Review: Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.27, p. 413-436, 2003.
- CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; COOKE, P. S.; MEE, S.; BIGSBY, R. M.; HIGGINS, S. J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrinol Rev**. v.8, p. 338-362, 1987.
- CUNHA, G. R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A. A.; BOUTIN, E. L.; FOSTER, B. A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **J. Androl**. v.13, p. 465- 475, 1992.
- DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **World J Urol**. v.21, n.5, p.341-345, 2003.
- GIBSON, D. A.; SAUNDERS, P. T. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. **Mol Cell Endocrinol**. v.30, n. 2, p.361-372, 2012.
- GREIWE, J. S.; HICKENR, R. C.; HANSEN, P. A.; RACETTE, S. B.; CHEN, M. M.; HOLLSYZ, J. O. Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. **Journal of Applied Physiology**. v.87, p.222-226, 1999.
- HACKNEY, A. C. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men: alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Curr Pharm Des**. v.7, n.4, p. 261-273, 2001.
- HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiol Clin North Am**. v.38, n.1, p.1-14, 2000.
- HARRI, M.; KUUSELA, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**. v.126, p.189-197, 1986.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocr Rev**. v.25, n.2, p.276-308, 2004.
- IMAMOV, O.; MORANI, A.; SHIM, G. J.; OMOTO, Y.; THULIN-ANDERSSON, C.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.22, n.101, p. 9375-9380, 2004.
- ISAACS, J. T. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. **Prostate**. v.5, p. 545-557, 1984.

- JIANG, J.; CHANG, H-L.; SUGIMOTO, Y.; LIN, Y. C. Effects of Age on Growth and ER, mRNA Expression of Canine Prostatic Cells. **Anticancer Research**. v.25, p. 4081-4090, 2005.
- KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFASHAN, A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. **Micron.**, v.37, p.617-23, 2006.
- KOLASA, A.; MARCHLEWICZ, M.; VENDA-RÓZEWICKA, L.; WISZNIIEWSKA, B. Morphology of the testis and the epididymis in rats with dihydrotestosterone (DHT) deficiency. **Rocz Akad Med Bialymst.**v.49, n.1, p.117-119, 2004.
- KYPRIANOU, N.; ISAACS, J. T. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. **Endocrinology**. v.122, p.552-562, 1988.
- LIU, T.C. KUO C-H. WANG P. S. Exercise and Testosterone. **Adaptive Medicine**.v.1,n.1,p. 26-31, 2009.
- MCPHERSON, S. J.; ELLEM, S. J., RISBRIDGER, G. P. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 660-670, 2008.
- MORANI, A.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. **J Intern Med**. v.264, n.2, p.128-142, 2008.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 22, n.3, p. 289-318, 2001.
- POPE, H. G. JR; KATZ, D. L. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am J Psychiatry**. v. 145, n. 4, p. 487-490, 1988.
- RISBRIDGER, G. P.; ELLEM, S.; MCPHERSON, S. J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. **J Mol Endocrinol.**, v. 39, p. 183-188, 2007.
- SHOKRI, S.; AITKEN, R. J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI, F. M.; KASHANI, I.; EJTEMAEIMEHR, S.; AHMADIAN, S.; MINAEI, B.; NARAGHI, M. A.; BARBARESTANI, M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 106, n. 4, p. 324-330, 2010.
- 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.**, v. 39, p. 1-4, 2005.
- SUGIYAMA, N.; BARROS, R. P.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 21, n. 9, p. 545-552, 2010.
- WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L. C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J. I.; JENSEN, E. V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 6330- 6335, 2001.

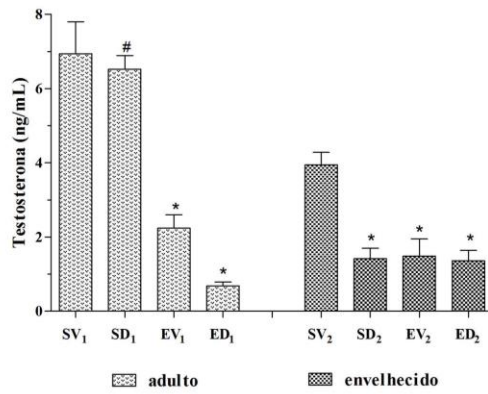
**Tabela 1** - Protocolo de treinamento físico resistido (TFR).

<b>Protocolo de treinamento</b>		
<b>Dia do treinamento</b>	<b>Treinamento - Sobrecarga (% Peso corporal)</b>	
1°	Contato com a água	
2°	Natação	<b>Adaptação</b>
3°	2 séries de 5 saltos (40%)	
4°	2 séries de 7 saltos (40%)	
5°	2 séries de 9 saltos (50%)	
6° ao 20°	4 séries de 10 saltos (50%)	
21° ao 35°	4 séries de 10 saltos (60%)	<b>Treinamento</b>
36° ao 54°	4 séries de 10 saltos (70%)	

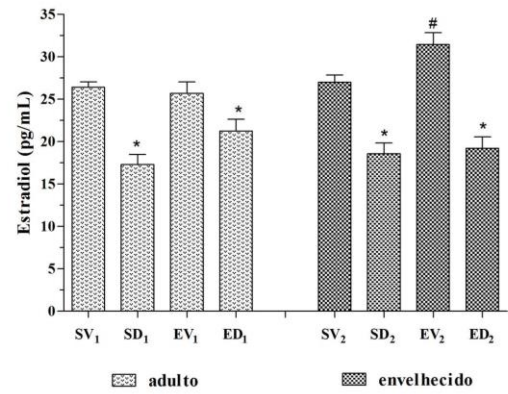


**Figura 1** - Delineamento experimental – Disposição dos grupos experimentais. SV – sedentário + veículo; SD – sedentário + decanoato de nandrolona; EV – exercício + veículo; ED – exercício + decanoato de nandrolona; 1 – adultos; 2 – envelhecidos; # - Eutanásia.

## 2.A

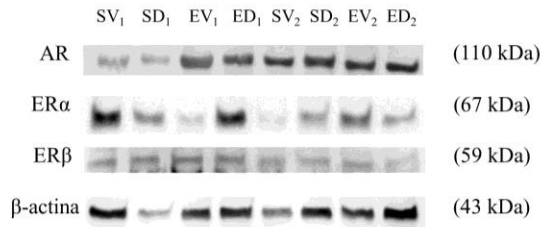


## 2.B

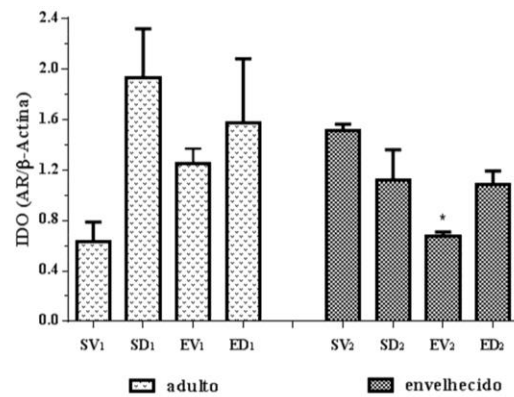


**Figura 2** - Níveis de testosterona (A) e estradiol (B). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e aplicado o pós teste Tukey Kramer, sendo considerado  $p \leq 0,0001$ . \* (SV vs SD; SV vs EV; SV vs ED). # (SD vs ED; EV vs ED).

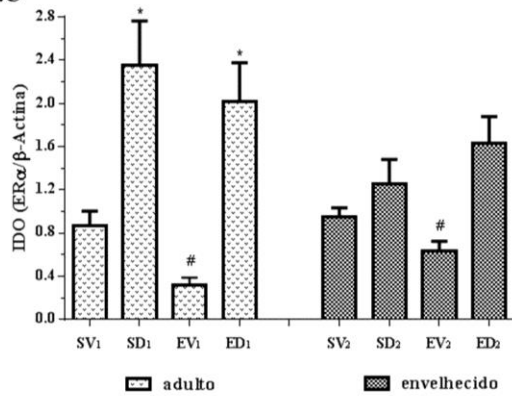
3.A



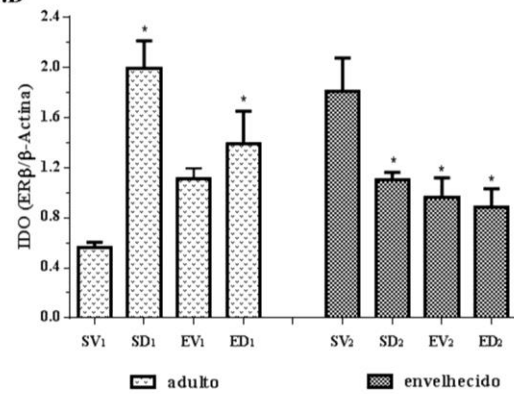
3.B



3.C

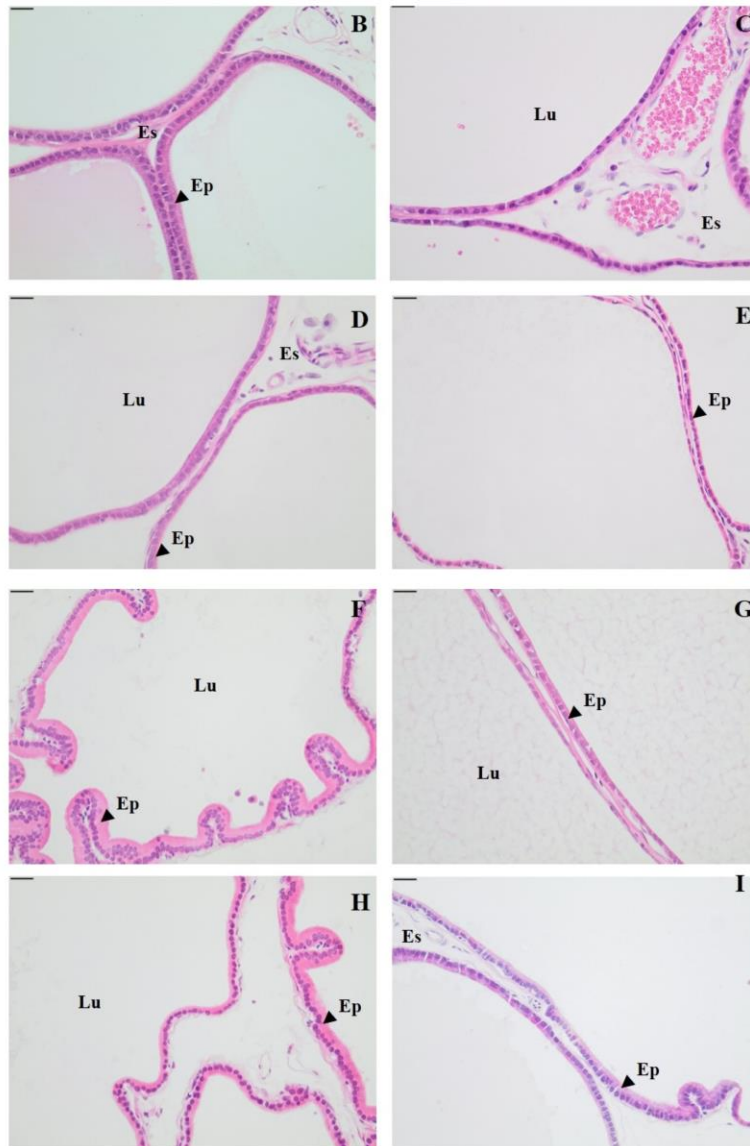
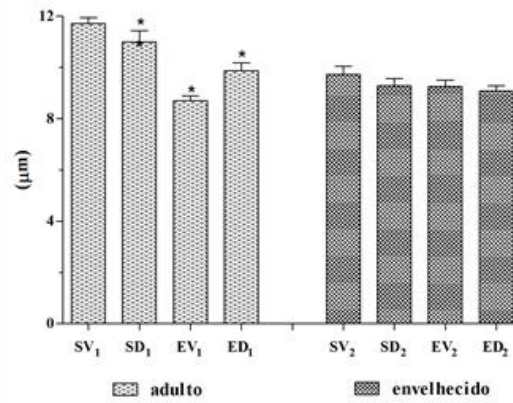


3.D



**Figura 3** – Análise da expressão dos receptores de andrógenos (B) e estrógenos  $\alpha$  (C) e  $\beta$  (D). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e aplicado o pós teste Tukey Kramer, sendo considerado  $p \leq 0,05$ . \* (SV vs SD; SV vs EV; SV vs ED). # (SD vs ED; EV vs ED).

## 4. A



**Figura 4. A** - Análise morfométrica da altura do epitélio na próstata ventral de ratos adultos e envelhecidos. Os dados foram submetidos a análise de variância (Anova), e pelo pós-teste Kruskal Wallis, sendo considerado  $p < 0.05$ . \* (SV vs SD; SV vs EV; SV vs ED). # (SD vs ED; EV vs ED). **B-I** - Histologia da próstata ventral de ratos adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H) representado em ambos os respectivos grupos: sedentário veículo (SV) e com DN (SD), exercitados veículo (EV), e com DN (ED). Ep e cabeça de seta – epitélio; Es – estroma; Lu – Lúmen.



## 5. CONCLUSÕES

- De forma geral, concluímos que o DN, associado ou não ao TRF, durante a fase pós-púbere, interfere na morfofisiologia da próstata do adulto e ao longo do processo de envelhecimento.
- Para alguns parâmetros avaliados, os efeitos do DN e do TFR foram reduzidos com o período de interrupção do tratamento, porém, algumas alterações persistiram na próstata envelhecida, mesmo após o tratamento ter sido interrompido.
- Não só o DN, mas também a modalidade TFR levam a mudanças importantes na homeostase do organismo, alterando os níveis hormonais e ativando vias relacionadas ao processo inflamatório que refletem em alterações na morfofisiologia da próstata.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Immunology**. v.4, p. 499-511, 2004.
- ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol**. v.13, n.9, p. 679-692, 2013.
- AUMÜLLER, G., ADLER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. **Cell Tissue Res**. v. 98, n.1, p.145-158, 1979.
- AUMÜLLER G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. **Anat Embryol**, v.179, n.6, p.519-531, 1989.
- BANERJEE, S.; BANERJEE P P.; BROWN TR. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. **Endocrinology**. v.141, p.821-822, 2000.
- BAYRAKTAR, N.; KILIC, S.; BAYRAKTAR, M. R, Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. **J Clin Lab Anal**, v.24, p.25-30, 2010.
- BHASIN, S.; CALOF O. M.; STORER, T. W.; LEE, M. L.; MAZER, N. A.; JASUJA, R.; MONTORI, V. M.; GAO, W.; DALTON, J. T.; Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. **Nature Reviews Endocrinology**. v.2, p.142-159. 2006.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiol**, v. 87, p. 245-313, 2007.
- BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie**. v.89, n.9, p.1107-1112. 2007.
- BERRY, P.A.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. **Mol Cell Endocrinol**. v.25, n 288, p. 30-37, 2008.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.11, n.2, p. 460-475, 2003.
- BOSTWICK, D. G.; CHENG, L. Precursors of prostate cancer. **Histopathology**. v.1, p.24-27, 2012.
- BÖTTNER, M.; THELEN, P.; JARRY, H.; Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. **J Steroid Biochem Mol Biol**. v.139, p.245-251, 2013.
- BOUTROS, T.; CHEVET, E.; METRAKOS, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacol Rev**. v.60, n.3, p.261-310, 2008.
- BRAWER, M. K. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. **Rev Urol**. v.7, p.11–18, 2005.
- BROGÅRDH, C.; LEXELL, J. Effects of Cardiorespiratory Fitness and Muscle-Resistance Training After Stroke. **Exercise and Sports for Health Promotion, Disease, and Disability**. v. 4, n.11, p. 901–907, 2012.
- BROWN, J. A.; DORFMAN, D. M.; MA, F. R.; *et al.*. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **J Immunol**. v. 170, p. 1257–1266, 2003.
- CHUGHTAI, B.; LEE, R.; TE, A.; KAPLAN, S. Inflammation and benign prostatic hyperplasia: clinical implications. **Curr Urol Rep**. n.12, v.4, p.274-277, 2011.
- CLARK, A. S.; HARROLD, E. V. FAST, A. S. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. **Horm Beha**. v. 31, p.35–46, 1997.

- CLARK, A. S.; HENDERSON, L. P. Review: Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.27, p. 413-436, 2003.
- COLOMBEL, M. C.; BUTTYAN, R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. **Methods Cell Biol.**, v.46, p.369-385, 1995.
- CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; COOKE, P. S.; MEE, S.; BIGSBY, R. M.; HIGGINS, S. J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrinol Rev.** v.8, p. 338–362, 1987.
- CUNHA, G. R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A. A.; BOUTIN, E. L.; FOSTER, B. A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **J. Androl.** v.13, p. 465- 475, 1992.
- CUNHA, G. R.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, v. 70, p.473- 485, 2002.
- DARLING, N. J.; COOK, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. **Biochim Biophys Acta.** v. 14, p. S0167-4889, 2014.
- DAVIES, P.; EATON, C. L. Regulation of prostate growth. **Journal of Endocrinology.**, v. 131, p. 5-11, 1991.
- DE MARZO, A.M.; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **Am J Pathol.** v.155, p.1985-1992, 1999.
- DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E. A.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Human prostate cancer precursors and pathobiology. **Urology**, v.62, n.5, p. 55-62, 2003.
- DE MARZO, A. M.; NAKAI, Y.; NELSON, W. G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. **Urol Oncol.**, v.25, p. 398-400, 2007.
- DE NUNZIO, C.; KRAMER, G.; MARBERGER, M.; MONTIRONI, R.; NELSON, W.; SCHRÖDER, F.; SCIARRA, A.; TUBARO, A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. **Eur Urol.** v.60, n.1, p.106-117, 2011.
- DOHLE, G. R.; SMIT, M.; WEBER, R. F. Androgens and male fertility. **World J Urol.** v.21, n.5, p.341-345, 2003.
- DONG, H.; STROME, S. E.; SALOMAO, D. R.; *et al.*. Tumor-associated B7–H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med.**, v.8, p.793–800, 2002.
- DROLLER, M. J. Medical approaches in the management of prostatic disease. **Br. J. Urol.**, v.79, p. 42-52, 1997.
- DUDGEON, W. D.; PHILIPS, K. D.; CARSON, J. A.; BREWER, R. B.; DURSTINEI, J. L.; HAND, G. A. Counteracting muscle wasting in HIV- infected individuals. **British HIV Association HIV Medicine.** v.7, p. 299-310, 2006
- ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen: androgen ratio in the prostate gland. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.118, n.4-5, p.246-251. 2010.
- ELSBACH, P.; WEISS, P. A reevaluation of the roles of O<sub>2</sub>-dependent and O<sub>2</sub>-independent microbicidal systems of phagocytes. **Rev Infect Dis.** v.5, p. 843-53, 1983.
- FRANZ, M. C.; ANDERLE, P.; BÜRZLE, M.; SUZUKI, Y.; FREEMAN, M. R.; HEDIGER, M. A.; KOVACS, G. Zinc transporters in prostate cancer. **Mol Aspects Med.** v.34, n.2-3, p.735-741, 2013.

- FRICK, J.; AULITZKY, W. Physiology of the Prostate. **Infection**. v.19, p. 115-118,1991.FRIEDENREICH, C.M., THUNE, I. A review of physical activity and prostate cancer risk. **Cancer Causes Control**. Jun. v.12. n.5, p.461-475, 2001.
- FRIEDENREICH, C. M.; NEILSON, H. K.; LYNCH, B. M. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. **Eur J Cancer**. v.46, n.14, p. 2593-2604, 2010.
- FROENHER, M.; FISCHER, R.; LEIKE, S.; HAKENBERG, O. W.; NOACK, B.; WIRTH, M. P. Intratesticular leiomyosarcom in a young man after high dose with oral-turinabol. **Cancer**. v.86, n.8, p. 1571-1575, 1999.
- GALLI, R.; STARACE, D.; BUSÀ, R.; *et al.*. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. **J Immunol**., v.184, p.6658-69, 2010.
- GATTI, G.; QUINTAR, A. A.; ANDREANI, V.; NICOLA, J. P.; MALDONADO, C. A.; MASINI-REPISO, A. M.; RIVERO, V. E.; MACCIONI, M. Expression on Toll-Like Receptor 4 in the Prostate Gland and its association with the severity of Prostate cancer. **The Prostate**. v.69, p. 1387-1397, 2009.
- GALVÃO, D. A.; TAAFFE, D. R.; SPRY, N.; JOSEPH, D.; NEWTON, R. U. Acute versus chronic exposure to androgen suppression for prostate cancer: impact on the exercise response. **J Urol**. v.186, n.4, p.1291-1297, 2011.
- GOLDSTEIN, A. S.; STOYANOVA, T.; WITTE, O. N. Primitive origins of prostate cancer: in vivo evidence for prostate-regenerating cells and prostate cancer-initiating cells. **Mol Oncol**. v.4, n.5, p.385-396, 2010.
- GONZALEZ-REYES, S.; GONZALEZ L. O.; GONZALEZ, J. M.; FERNANDEZ, J. M. F.; AGUIRRE, A.; ESCAFF, S.; SUAREZ, A.; VIZOSO, F. J. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. **BMC Cancer**. v.10, n. 665, p. 2407-2410, 2011.
- GUPTA, A. A.; LYON, C. J.; HSUEH, W. A. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. **Curr Diab Rep**. v.13, n.3, p.362-371, 2013.
- HACKNEY, A. C. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men: alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Curr Pharm Des**. v.7, n.4, p. 261-273, 2001.
- HAMIDI, A.; BULOW, V. V.; HAMIDI, R.; WINSSINGER, N.; BARLUENGA, S.; LANDSTRÖM. Polyubiquitination of Transforming Growth Factor (TGF)-associated Kinase 1 Mediates Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Response to Different Inflammatory Stimuli. **Journal of Biological Chemistry**., v.287, n.1, p.123-133, 2011.
- HART, L. S.; EL-DEIRY, W.S. Cell death: a new Par-4 the TRAIL. **Cell**. v.138, n. 2, p. 220-222, 2009.
- HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med.**, v.34, p.513-554, 2004.
- HAYASHI, N.; SUGIMURA, Y.; KAWAMURA, J.; DONJACOUR, A. A.; CUNHA, G. R. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biol Reprod**. v.45, n.2, p.308-321, 1991.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- $\kappa$ B. **Genes & Development**. v.18, n.20, p.2195-2224, 2004.
- HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiol Clin North Am**. v.38, n.1, p.1-14, 2000.
- HO, P. J.; BAXTER, R. C. Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. **Clin Endocrinol**. v. 46, n.3, p.333-342, 1997.
- HUANG, J.; YAO, J. L.; DI SANT'AGNESE, P. A.; YANG, Q.; BOURNE, P. A.; NA, Y. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. **Prostate**. v.66, n.13, p.1399-1406, 2006.

- HUISING, M. O.; KRUISWIJK, C. P.; FLIK, G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. **Journal of Endocrinology**. v.189, p.1-25, 2006.
- ISAACS, J. T. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. **Prostate**. v.5, p. 545–557, 1984.
- JEGO, G.; BATAILLE, R.; GEFFROY-LUSEAU, A.; DESCAMPS, G.; PELLAT-DECEUNYNCK, C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. **Leukemia**. v.20, p.1130–1137, 2006.
- KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFASHAN, A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. **Micron**. v.37, p.617-23, 2006.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**. v.17, p.338-344, 2005.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**. v.19, p. 24-32, 2007.
- KELLEHER, S. L.; MCCORMICK, N. H.; VELASQUEZ, V.; LOPEZ, V. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. **Adv Nutr**. v.2, p.101-111, 2011.
- KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; MARONI, P.; KOU, H. K. Oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**. v.21, n.2, p.125-136, 2009.
- KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutat Res**. v.7, n.2, p.12-23, 2010.
- KOUL, H. K.; PAL, M.; KOUL, S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Genes Cancer**. v.4, p. 342-359, 2013.
- KRAMER, G.; MITTEREGGER, D.; MARBERGER, M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? **Eur Urol**. v.51, n.5, p.1202-1216, 2007.
- KRIEG AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. **J Clin Invest**. v.117, p.1184–1194, 2007.
- KURITA, T.; MEDINA, R. T.; MILLS, A. A.; CUNHA, G. R. Role of p63 and basal cells in the prostate. **Development**. v.131, n.20, p. 4955-4964, 2004.
- KYPRIANOU, N.; ISAACS, J. T. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. **Endocrinology**. v.122, p.552–562, 1988.
- LAU, K. M.; LASPINA, M.; LONG, J.; HO, S. M. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. **Cancer Res**. v. 60, n. 12, p. 3175-3182, 2000.
- LEAV, I.; LAU, K. M.; ADAMS, J. Y.; MCNEAL, J. E.; TAPLIN, M. E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S. M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **Am J Pathol**. v. 159, n. 1, p. 79-92, 2001.
- LEE, C.; SENSIBAR, J. A.; DUDEK, S. M.; HIIPAKKA, S.; LIAO, S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. **Biol. Reprod**. v. 43, p. 1079-1086, 1990.
- LEE, K. L.; PEEHL, D. M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **J Urol**. v. 172 n. 5, p. 1784-1791, 2004.
- LEE, C. H.; JEON, Y. T.; KIM, S. H.; SONG, Y. S. NF- $\kappa$ B as a potential molecular target for cancer therapy. **Biofactors**, v. 29, p. 19-35, 2007.
- LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J. W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Current medicinal chemistry**. v.8, n.7, p. 829-838, 2001.

LIEW, F. Y.; XU, D.; BRINT, E. K.; O'NEILL, L. A. J. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Reviews Immunology**. v.5, p. 446-458, 2005.

LU, J. P.; MONARDO, L.; BRYSKIN, I.; HOU, Z. F.; TRACHTENBERG, J.; WILSON, B. C.; PINTHUS, J. H. Androgen induce oxidative stress and radiation resistance in prostate cancer cells though NADPHoxidase. **Prostate Cancer and Prostatic Disease**. v.13, n.1,p. 39-46, 2010.

LUCIA, A.; CHICHARRO, J. L.; PEREZ, M.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; LEGIDO, J. C. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. **J Applied Physiology**, v. 81, n. 6, p. 2627-2636, 1996.LIU, T. C.; KUO, C. H. WANG P. S. Exercise and Testosterone. **Adaptive Medicine**.v.1, n.1, p. 26-31, 2009.

LUO, J. L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. **J Clin Invest**.v.115, p.2625–2632, 2005.

MAJUMDER, P. K.; GRISANZIO, C.; O'CONNELL, F.; BARRY, M.; BRITO, J. M.; XU, Q.; GUNEY, I.; BERGER, R.; HERMAN, P.; BIKOFF, R.; FEDELE, G.; BAEK W. K.; WANG, S.; ELLWOOD-YEN, K.; WU, H.; SAWYERS, C. L.; SIGNORETTI, S.; HAHN, W. C.; LODA, M.; SELLERS, W. R. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. **Cancer Cell**, v. 14, n.2, p. 146-155, 2008.

MCCARTHY, C. G.; GOULOPOULOU, S.; WENCESLAU, C. F.; SPITLER, K.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**., v. 306, n. 2, p, H184-H196, 2014.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **Am J Surg Pathol**., v. 12, p. 619-633, 1988.

MCPHERSON, S. J.; ELLEM, S. J., RISBRIDGER, G. P. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 660-670, 2008.

MIKI, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. **Int J Urol**., v. 17, n. 2, p. 139-147, 2010.

MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports Med**., v. 31, n. 2, p. 115-144, 2001.

MULLGAN, K.; SCHAMBELAN, M. Anabolic treatment with GH, IGF-I, or anabolic steroids in patients with HIV-associated wasting. **International Journal of Cardiology**, v. 85, p. 151-159, 2002.

MURTONA, A. J.; GREENHAFFB, P. L. 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**, In Press, 2013.

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**.v.115, p.373–379, 1999.

NEWTON, R. U.; TAAFFE, D. R.; SPRY, N.; CORMIE, P.; CHAMBERS, S. K.; GARDINER, R. A.; SHUM, D. H.; JOSEPH, D.; GALVÃO, D. A. Can exercise ameliorate treatment toxicity during the initial phase of testosterone deprivation in prostate cancer patients? Is this more effective than delayed rehabilitation? **BMC Cancer**, v. 12, p. 432, 2012.

NOORAFSHAN, A.; KARBALAY-DOUST, S.; ARDEKANI, F. M. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. **APMIS**, v. 113, p. 122-125, 2005.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 22, n.3, p. 289-318, 2001.

- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v.18, p. 6853–6866, 1999.
- PAONE A, STARACE D, GALLI R, *et al.* Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- $\alpha$ -dependent mechanism. **Carcinogenesis**. v.29, p.1334–1342, 2008.
- PARTIN, A.W.; GETZENBERG, R. H.; CARMICHAEL, M. J.; VINDIVICH, D.; YOO, J.; EPSTEIN, J. I.; COFFEY, D. S. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Cancer Res**. v.53, p.744-746, 1993.
- PHAM, C.G.; BUBICI, C.; ZAZZERONI, F. *et al.*. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. **Cell**. v.119, p.529–542, 2004.
- PEDERSEN, B. K., HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**. v. 80, n. 3, p. 1055-1081, 2000.
- PENDYALA, S.; NATARAJAN, V. Redox regulation of Nox proteins. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, p. 265-271, 2010.
- PETRY, A.; WEITNAUER, M.; GÖRLACH, A. Receptor activation of NADPH oxidases. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 13, n. 4, p. 467-487, 2010.
- PRICE, D.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G. The accessory reproductive glands of mammals. In: Young, W.C, editor. **Sex and internal secretions**. 3rd ed. **Baltimore: Williams and Wilkins**, p. 366–448, 1961.
- PRINS, G. S, KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids**. v.73, n.3, p.233-244. 2008.
- PUTZI, M. J.; DE MARZO, A. M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology**. v. 56, p. 828–832, 2000.
- QUINTAR, A. A.; ROTH, F. D.; DE PAUL, A. L.; AOKI, A.; MALDONADO, C. A. Toll-like receptor 4 in rat prostate: modulation by testosterone and acute bacterial infection in epithelial and stromal cells. **Biol Reprod.**, v. 75, n. 5, p. 664-672, 2006.
- RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nat Rev Cancer**. v.9, p.57–63, 2009.
- REBILLARD, A.; LEFEUVRE-ORFILA, L.; GUERITAT, J.; CILLARD, J. Prostate cancer and physical activity: adaptive response to oxidative stress. **Free Radic Biol Med J.**, v. 60, p. 115-124, 2013.
- RIDDELL, J. R.; BSHARA, W.; MOSER, M. T. SPERNYAK JA, FOSTER BA, GOLLNICK SO. Peroxiredoxin 1 Controls Prostate Cancer Growth through Toll-Like Receptor 4-Dependent Regulation of Tumor Vasculature. **Cancer Research.**, v.71, n.5, p. 1637-1646, 2011.
- RISBRIDGER, G. P.; ELLEM, S.; MCPHERSON, S. J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. **J Mol Endocrinol.**, v. 39, p. 183-188, 2007.
- ROEHRBORN, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **Int J Impot Res.**, v. 20, n. 3, p. S11-S18, 2008.
- ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; HAGENKORD, J., COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocr. Relat. Cancer.**, v. 11, p. 225-254, 2004.
- RUNDQVIST, H.; AUGSTEN, M.; STRÖMBERG, A.; RULLMAN, E.; MIJWEL, S.; KHARAZIHA, P.; PANARETAKIS, T.; GUSTAFSSON, T.; ÖSTMAN, A. Effect of Acute Exercise on Prostate Cancer Cell Growth. **PLoS ONE**. v. 8, n. 7, p. 675-679, 2013.

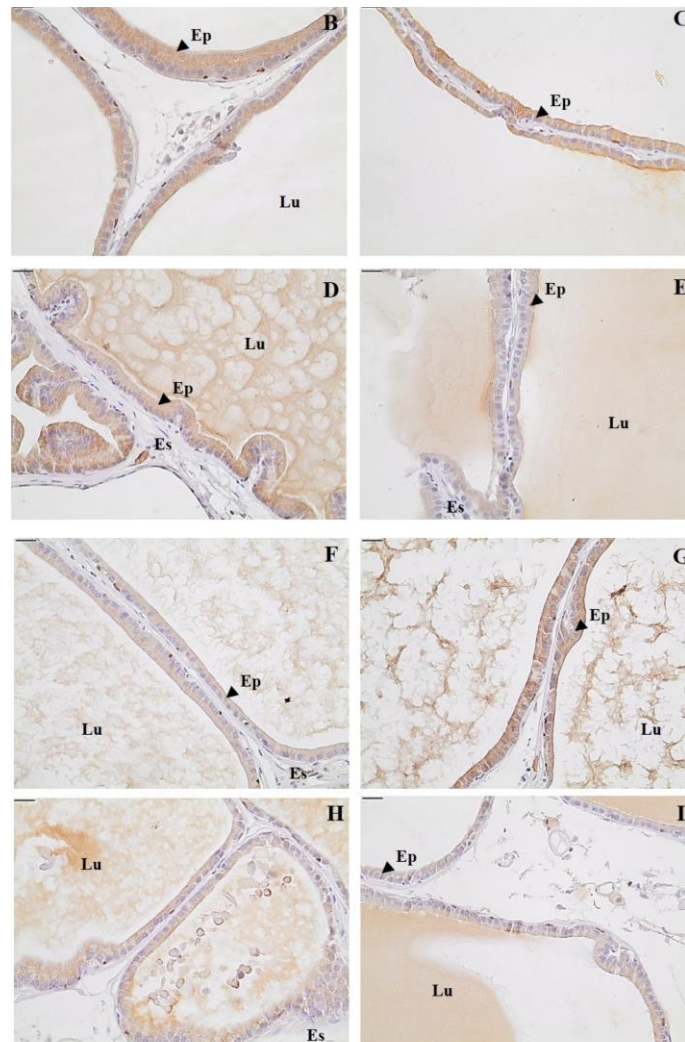
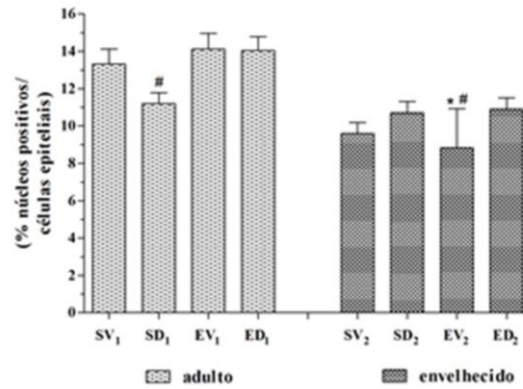
- SABBISSETTI, V.; NAPOLI, A. D.; SEELEY, A.; AMATO, A. M.; O'REGAN, E.; GHEBREMICHAEL, M.; LODA, M.; SIGNORETTI, S. p63 Promotes Cell Survival through Fatty Acid Synthase. **PLoS ONE**. v.14, n.6, 2009.
- SAKAI, N.; WADA, T.; FURUICHI, K.; IWATA, Y.; YOSHIMOTO, K.; KITAGAWA, K.; KOKUBO, S.; KOBAYASHI, M.; TAKEDA, S.; KIDA, H.; KOBAYASHI, K.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; YOKOYAMA, H. p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant**. v.17, n.6, p. 998-1004. 2002.
- SAKR, W. A.; HAAS, G. P.; CASSIN, B. F.; PONTES, J.E.; CRISSMAN, J.D. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **J Urol**. v.150, p.379-385, 1993.
- SCHAUER, I. G.; ROWLEY, D. R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, n. 4-5, p. 200-210, 2011.
- SEGAL, A. W.; SHATWELL, K. P. The NADPH Oxidase of Phagocytic Leukocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.832, p. 215-221, 1997.
- SEGUCHI, T.; YOKOKAWA, K.; SUGAO, H.; NAKANO, E.; SONODA, T.; OKUYAMA, A.; Interleukin-6 activity in urine and serum in patients with bladder carcinoma. **J Urol**, v.148, p.791-794, 1992.
- SHIMADA, K.; CROTHER, T. R.; KARLIN, J.; DAGVADORJ, J.; CHIBA, N.; CHEN, S.; RAMANUJAN, V. K.; WOLF, A. J.; VERGNES, L.; OJCIUS, D. M.; RENTSENDORJ, A.; VARGAS, M.; GUERRERO, C.; WANG, Y.; FITZGERALD, K. A.; UNDERHILL, D. M.; TOWN, T.; ARDITI, M. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. **Immunity**. v.36, p. 401-414, 2012.
- SHOKRI, S.; AITKEN, R. J.; ABDOLVAHHABI, M.; ABOLHASANI, F.; GHASEMI, F. M.; KASHANI, I.; EJTEMAEIMEHR, S.; AHMADIAN, S.; MINAEI, B.; NARAGHI, M. A.; BARBARESTANI, M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 106, n. 4, p. 324-330, 2010.
- SIGNORETTI, S.; LODA, M. Prostate stem cells: from development to cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 3, p. 219-224, 2007.
- SLAYTER, M. V.; ANZANO, M. A.; KADOMATSU, K.; SMITH, J. M.; SPORN, M. B. Histogenic of induced prostate and seminal vesicle carcinoma in Lobund-Wistar rats: a system for histological scoring and grading. **Cancer Res**, v. 54, p. 1440-1445, 1994.
- SON, Y.; KIM, S.; CHUNG, H.T.; PAE, H.O. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. **Methods Enzymol**. v. 528, p. 27-48, 2013.
- 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**, v. 39, p. 1-4, 2005.
- STEERS, W. D. 5alpha-reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 58, n. 6 Suppl 1, p. 17-24, 2001.
- SUGIYAMA, N.; BARROS, R. P.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 9, p. 545-552, 2010.
- SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox Family NAD(P)H oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 677-686, 2005.
- SUN, Z.; ANDERSSON, R. NF-kB activation and inhibition: A review. **Shock**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2002.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-346, 2003.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Immunology**, v. 16, p. 3-9, 2004.



- TAM, N. N.; GAO, Y.; LEUNG, Y. K.; HO, S. M. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **Am J Pathol.**, v.163, p. 2513–2522, 2003.
- TAYLOR, R. A.; RISBRIDGER, G. P. Prostatic Tumor Stroma: A Key Player in Cancer Progression. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, p. 6, p. 490-497, 2008.
- TEIXEIRA, G. R.; FÁVARO, W. J.; PINHEIRO, P. F.; CHUFFA, L. G.; AMORIM, J. P.; MENDES, L. O.; FIORUCI, B. A.; OBA, E.; MARTINS, O. A.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E. Physical exercise on the rat ventral prostate: steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. **Scand J Med Sci Sports**. v.22, n.5, p.86-92, 2012.
- TOORIANS, A. W.; KELLEHER, S.; GOOREN, L. J.; JIMENEZ, M.; HANDELSMAN, D. J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. **J Clin Endocrinol Metab**. v.88, p.5207-5211, 2003.
- 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**. v.68, p.1769-1774, 2001.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Exp Gerontol.**, v. 40, n. 3, p. 121-128, 2005.
- URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Freeradicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The Inter-national Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, n.1, p. 44–84. 2007.
- VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. **Anatomic Rec.**, v. 288, n. A, p. 885-892, 2006.
- ZHAO, H.; LO, Y. H.; MA, L.; WALTZ, S. E.; GRAY, J. K.; HUNG, M. C.; WANG, S. C. Targeting tyrosine phosphorylation of PCNA inhibits prostate cancer growth. **Mol Cancer Ther.** v.10, n.1, p.29-36, 2011.
- WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v. 68, n. 4-5, p 270-279, 2001.
- WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L. C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J. I.; JENSEN, E. V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 6330- 6335, 2001.
- YADAV, N.; HEEMERS, H. V. Androgen action in the prostate gland. **Minerva Urol Nefrol.**, v. 64, n. 1, p. 35-49, 2012.
- ZENZMAIER, C.; UNTERGASSER, G.; BERGER, P.; Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. **Exp Gerontol.**, v. 43, n. 11, p. 981-985, 2008.

## APÊNDICE A

## 1. A



**Figura 1. A:** Índice da frequência de células positivas para p33 na próstata ventral de ratos. \* (SV vs SD; SV vs EV; SV vs ED) <sup>#</sup> (SD vs ED; EV vs ED). Os dados foram submetidos a análise de variância (Anova), e pelo pós teste Kruskal Wallis, sendo considerado  $p < 0.05$ . **B-I:** Imunoistoquímica de p33 na próstata ventral de ratos: adultos (A, B, C, D) e envelhecidos (E, F, G, H). Representado em ambos os respectivos grupos: sedentário veículo (SV) e com DN (SD), exercitados veículo (EV) e com DN (ED). Ep e cabeça de seta – epitêlio; Es – estroma; Lu – Lúmen; seta – núcleos positivos para p33.

### ***Imunoistoquímica de p63***

A análise da imunorreatividade para p63 está representada nas Figuras 1.

As alterações no índice de p63 foram observadas apenas nos envelhecidos que foram exercitados (EV<sub>2</sub>) (Figura 1 A).

O p63 é necessário para o desenvolvimento das células basais na próstata (Sabbisetti *et al.*, 2009). Sendo assim, neste trabalho os resultados mostraram que os animais submetidos aos diferentes tratamentos não sofreram alterações diretas no número de células positivas para o p63, com exceção dos animais treinados no grupo dos envelhecidos (Figura 1 A). Ou seja, houve alterações mínimas no número de células basais p63 positivas entre os grupos experimentais adultos e envelhecidos (Figura 1 B-I).

Como já discutido anteriormente alguns tipos de exercício físico levam à queda do nível de testosterona circulante (Hackney, 2001). Considerando estudos prévios, o p63 tem papel importante na regulação, desenvolvimento e diferenciação do epitélio prostático (Whelhua *et al.* 2001), portanto a alteração encontrada no grupo EV<sub>2</sub> sugere relação com a redução do epitélio prostático e no número de células luminais, devido a atuação destas proteínas na homeostasia epitelial (Imamov *et al.*, 2005).

Heinlein & Chang (2004) relataram que ratos machos adultos submetidos à castração, perderam 70% das células epiteliais secretoras da próstata, devido à apoptose e à redução dos níveis de DHT, porém as populações de células basais epiteliais e estromais foram relativamente pouco afetadas. Esses dados podem explicar porque, em nosso experimento, observamos poucas alterações na frequência das células basais.

## APÊNDICE B

**Tabela 1.** Parâmetros biométricos para peso corporal e dos órgãos do sistema genital.

	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>Ganho de 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

Os símbolos representam: “\*” Os símbolos representam: “\*” em comparação ao respectivo controle, e “#” em comparação à variável em comum. p < 0.05

### ***1. Peso corpóreo e relativo dos órgãos do sistema genital masculino***

Os animais adultos que receberam DN apresentaram redução do peso corpóreo quando comparados ao grupo controle (Tabela 1), esses dados concordam com resultados previamente descritos, para altas doses de DN (Teseng, *et al.*, 1994; Bauman, Richerson & Britt, 1998). 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 (Choo, Emery & Rothwell, 1991). Os mecanismos envolvidos na redução do peso corpóreo, decorrentes de doses suprafisiológicas de EAA, estão relacionados à redução da produção de testosterona endógena e ao aumento da oxidação lipídica (Hickson & Kurowski, 1986; Guzmán *et al.*, 1991).

Associada à redução do peso corpóreo, foi observada redução do peso da gordura epididimária nos animais adultos que fizeram uso de DN (Tabela 1). Relatos anteriores mostraram que a gordura abdominal é alvo de andrógenos e que há alteração no peso desta gordura abdominal quando animais são tratados com andrógenos (Serazin-Leroy *et al.*, 2000). Sabe-se que os adipócitos apresentam receptores de andrógenos (Pergola *et al.*, 1990) e que há relação entre a produção de tecido adiposo e os andrógenos, bem como semelhança na função da gordura abdominal e epididimária (Serazin-Leroy *et al.*, 2000).

Na fase adulta, houve aumento do peso da próstata ventral dos animais que fizeram uso de DN (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados em ratos hipertensos tratados com DN (Tseng *et al.*, 1994). Segundo Takahashi *et al.*, (2004), 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 (2006) verificaram redução no peso e no

volume da próstata após 14 semanas de uso do DN (3 mg/kg). Esta discrepância de resultados está relacionada com diferenças no período e dose da administração do DN.

A diminuição do peso dos testículos observada nos animais dos grupos EV<sub>1</sub> e ED<sub>1</sub> (Tabela 1), também foram descritas por Shokri *et al.*, (2009). Os autores discutiram que o uso de andrógenos exógenos suprime os níveis dos hormônios FSH e LH da hipófise, afetando o desenvolvimento dos testículos. Sendo assim, 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 (Feinberg, Lumia & McGinnis, 1997).

Além do uso de DN, a atividade física também 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 (Hackney, 2001). Neste trabalho, observamos a queda da testosterona circulante nos animais exercitados.

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 alterações promovidas pelo DN e exercício físico.

## ANEXO A



## *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. Dr. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro**  
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 19019-970 Botucatu SP Brasil  
Tel 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 5744 e-mail: dt@ibb.unesp.br