



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rafael Arêas Vargas

**Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na
próstata de ratos**

Rio de Janeiro

2013

Rafael Arêas Vargas

Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na próstata de ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V297 Vargas, Rafael Arêas.

Análise da próstata de ratos submetidos à administração crônica de esteróide anabólico androgênico / Rafael Áreas Vargas. – 2013.
121 f.

Orientador: Luciano Alves Favorito.

Coorientador: Diogo Benchimol de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Próstata – Efeito de drogas 2. Esteróides anabólicos - Teses. 3. Nandrolona – Efeitos adversos. 4. Exercícios – Aspectos fisiológicos. 5. Anabolizantes – Efeitos adversos. I. Favorito, Luciano Alves. II. Souza, Diogo Benchimol. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.637:547.92

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rafael ArêasVargas

Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico na próstata de ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa de
Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas. Área de concentração: Sistema
Urogenital.

Orientadores:

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Bianca Martins Gregório
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Valter Javaroni
Hospital Geral de Bonsucesso

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Alves Favorito por ter me aceitado como orientando, pela dedicação, empenho, apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza pelo interesse, pelos ensinamentos e atenção dispendidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, aos pós-graduandos Bruno Félix, Jorge Medeiros, Carina Riberio e Suellen Costa pelas elucidações que contribuíram muito para esse trabalho, aos estagiário e técnicos que de certa forma tiveram sua parcela de contribuição.

Ao Prof. Dr. Francisco Sampaio, coordenador deste programa de pós-graduação, por prezar pela qualidade do serviço, me possibilitando participar de um excelente curso.

RESUMO

VARGAS, Rafael Arêas. *Título Efeito crônico da administração de esteróide anabólico androgênico*. 2013. 63f. Dissertação Mestrado em (Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são usados por atletas profissionais e amadores, com o objetivo de melhorar a capacidade atlética, aparência e massa muscular. Muitos efeitos adversos têm sido associados com o abuso de EAA, incluindo doenças do trato urogenital. Este estudo teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas no lobo ventral da próstata de ratos púberes e adultos cronicamente tratados com doses suprafisiológicas de EAA, usando métodos morfométricos. Foram estudados 39 ratos Wistar machos pesando entre 400 e 550 g. Os ratos foram divididos em quatro grupos: (a) ratos controle, com 105 dias de idade (C105) (n = 7); (b) ratos controle com 65 dias de idade (C 65) (n = 9), injectados com o veículo (óleo de amendoim); (c) ratos tratados com 105 dias de idade (T105) (n = 10) e (d) Os ratos tratados com 65 dias de idade (C 65) (n = 13). Os ratos tratados foram injectados com decanoato de nandrolona, numa dose de 10 mg.Kg⁻¹ de peso corporal. O hormônio esteróide e o veículo foram administrados por via intramuscular, uma vez por semana, durante oito semanas. Os ratos foram sacrificados aos 161 dias de idade (C105 e T105) e 121 dias de idade (C65 e T65) e do lóbulo ventral da próstata foi dissecada e processada para histologia. A altura do epitélio acinar foi medida em micrômetros em fotomicrografias com ampliação de 400x. As densidades de superfície do lúmen do epitélio e estroma foram calculadas pelo método de contagem de pontos, com uma grade de 100 pontos sobrepostos sobre imagens ampliadas em 200x. Todas as análises foram realizadas com o software ImageJ. O teste t de Student e ANOVA foram utilizados para a comparação de médias. Foi considerado significativo quando p<0,05. O peso e volume do lobo ventral da próstata mostraram diferenças entre os grupos C65, T65, C105 e T105. A altura do epitélio não mostrou nenhuma diferença entre os grupos C65 e T65 (p = 0,8509), mas o grupo T105 mostrou um aumento de 32% em relação ao C105 (p = 0,0089). No que diz respeito à densidade de superfície do lúmen não houve diferença entre C65 e T65 (p = 0,9031) mas uma diminuição de 19% em relação a T105 em comparação com C105 (p = 0,0061). Não houve diferença na densidade de superfície do epitélio entre C65 e T65 (p = 0,7375), mas o grupo T105 apresentou 51% de aumento (p = 0,0065) em comparação com o C105. Em relação à densidade superficial do estroma, não foram observadas diferenças entre C65 e T65 e entre C105 e T105. Finalmente, não houve diferença no padrão de colágeno entre C105 e T105, mas o grupo T65 mostrou uma predominância de fibras de colágeno tipo I em relação ao C65. A utilização de esteróides androgênicos anabólicos em ratos promove mudanças estruturais na próstata. Observamos mudanças estruturais na altura, volume e epitélio do lobo da ventral da próstata e uma predominância de fibras de colágeno.

Palavras-chave: Próstata. Anabolizantes esteróides. Nandrolona. Morfometria.

ABSTRACT

Anabolic-androgenic steroids (AAS) are used by professional and amateur athletes with the goal of improving athletic ability, appearance and muscle mass. Many adverse effects have been associated with AAS abuse, including disorders of the urogenital tract. This study aimed to assess the morphological modifications in the prostate ventral lobe of pubertal and adult rats chronically treated with supraphysiological doses of AAS using morphometric methods. We studied 39 male Wistar rats weighing between 400 and 550 g. The rats were assigned into four groups: (a) control rats, with 105 days of age (C105) (n = 7); (b) control rats with 65 days of age (C65) (n = 9), injected only with the vehicle (peanut oil); (c) treated rats, with 105 days of age (T105) (n = 10) and (d) treated rats with 65 days of age (T65) (n = 13). The treated rats were injected with nandrolone decanoate at a dose of 10 mg.Kg⁻¹ body weight. The steroid hormone and the vehicle were administered by intramuscular injection once a week for eight weeks. The rats were killed at 161 days of age (C105 and T105) and 121 days of age (C65 and T65) and ventral lobe of the prostate was dissected and processed for histology. The height of the acinar epithelium was measured in micrometers in photomicrographs of 400x magnification. The surface densities of the lumen, epithelium and stroma were calculated by the point intercepts method, with a grid of 100 points superimposed on 200x magnified images. All analyses were performed with the ImageJ software. Student's-t-test and One-way ANOVA was used for mean comparisons. For all cases, significance was set at 0.05. The weight and volume of the prostate ventral lobe showed differences between groups C65, T65, C105 and T105. The epithelium height showed no difference between groups C65 and T65 (p=0.8509), but the T105 group showed an increase of 32% compared to C105 (p=0.0089). The lumen surface density presented no difference between C65 and T65 (p=0.9031) but a decrease of 19% in T105 animals compared to C105 (p=0.0061). There was no difference in epithelium surface density between C65 and T65 (p=0.7375), but group T105 had a 51% increase (p=0.0065) in comparison to C105. Regarding stroma surface density, there were no differences between C65 and T65 or between C105 and T105. Finally, there was no difference in collagen pattern between C105 and T105, but T65 showed a predominance of collagen fibers type I compared to C65. The use of anabolic androgenic steroids in rats promotes structural changes in the prostate. We observed structural changes in the weight, volume and epithelium height of the prostate ventral lobe and a predominance of collagen fibers.

Keywords: Prostate. Anabolic-steroid. Nandrolone. Morphometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do decanoato de nandrolona	14
Figura 2 –	A e B – A, Diagrama sagital da próstata humana de um adulto mostrando a uretra distal (UD), uretra proximal (UP) e ducto ejaculatório (E). Essas estruturas são mostradas em relação às três principais regiões da próstata descrito por McNeal, 1983. Zona central (CZ), zona periférica (PZ) e zona de transição (TZ). B, Gráfico tridimensional representando as três zonas glandulares da próstata por McNeal (Lee <i>et al.</i> , 1989). Zona periférica (amarelo), zona central (vermelho), zona de transição (azul), estroma fibromuscular anterior (verde).....	15
Figura 3 –	Diagramas de dissecação frontal e sagital do complexo urogenital masculino ilustrando a posição anatômica da próstata de um adulto e estruturas associadas. As zonas da próstata descritas por McNeal (1983) estão indicadas: zona central (CZ), zona periférica (PZ), estroma fibromuscular anterior (AFS), zona de transição (TZ).....	16
Figura 4 –	Órgãos sexuais acessórios masculinos de um rato adulto. A, vista anterior, B, vista lateral, C, vista anterior com a bexiga defletida caudalmente. Glândula ampular do ducto deferente (AG); bexiga (B); glândula de coagulação (CG); próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP); vesícula seminal (SV); próstata ventral (VP); ducto deferente (VD); veia deferente (DV).....	17
Figura 5 –	Fotomicrografia da prostata ventral de rato mostrando as características morfológicas. A altura do epitélio acinar (amarelo) foi mensurada em micrômetros em fotomicrografias com um aumento de 400x usando o software Image J. HE, 400X.....	24
Figura 6 –	Fotomicrografia da próstata ventral de rato mostrando as características morfológicas. A densidade de superfície do lumen, epitélio e estroma do lobo ventral da prostate foram estimados pelo método de contagem de pontos, com uma grade de 100 pontos sobreposta em fotomicrografias usando o software Image J. HE, 200X.....	25
Figura 7 –	Peso (g) do lobo ventral da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p < 0.05$. A análise demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, bem como entre os grupos C105 e T105.....	27
Figura 8 –	Volume (cm ³) do lobo ventral da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p < 0.05$. A análise demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, bem como entre os grupos C105 e T105.....	27

Figura 9 –	Altura do epitélio do lobo ventral de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$. A análise não demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, mas o grupo T105 apresentou um aumento de 32% comparado ao C105.....	28
Figura 10 –	A a D – Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de rato mostrando a altura do epitélio. A) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C65. HE 400X. B) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T65. HE 400X. C) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C105. HE 400X. D) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T105. HE 400X.....	29
Figura 11 –	Densidade do lúmen da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$. A densidade de superfície do lúmen não apresentou diferença entre C65 e T65 ($p = 0.9031$) e o grupo T105 apresentou uma diminuição de 19% comparado ao C105 ($p = 0.0061$).....	30
Figura 12 –	Densidade do epitélio da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$. A densidade de superfície do epitélio não apresentou diferença entre C65 e T65 ($p = 0.7375$), mas aumentou 51% no T105 em relação ao C105 ($p = 0.0065$).....	30
Figura 13 –	Densidade do estroma da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p > 0.05$. Não houve diferença na densidade de superfície do estroma entre C65 e T65, bem como entre C105 e T105.....	31
Figura 14 –	A a D – Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de rato mostrando as densidades de superfície. A) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C65. HE 200X. B) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T65. HE 200X. C) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C105. HE 200X. D) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T105. HE 200X.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C105 –	Ratos controle com 105 dias de idade
C65 -	Ratos controle com 65 dias de idade
CEUA –	Comitê de Ética no Uso de Animais
DHT –	Dihidrotestosterona
EAA –	Esteróide anabólico androgênico
FSH –	Hormônio folículo-estimulante
HE –	Hematoxilina e eosina
HPB –	Hiperplasia prostática benigna
kg –	Kilograma
LH –	Hormônio luteinizante
mg –	Miligrama
mL –	Mililitro
PA –	Próstata anterior
PAC –	Adenocarcinoma prostático
PD –	Próstata dorsal
PDL –	Próstata dorsolateral
PL –	Próstata lateral
PV –	Próstata ventral
T105 –	Ratos tratados com 105 dias de idade
T65 –	Ratos tratados com 65 dias de idade
RA –	Receptor de androgênio
UERJ -	Universidade Estadual do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS.....	13
1.1	Decanoato de Nandrolona.....	14
2	CARACTERÍSTICAS DA PRÓSTATA HUMANA E DO RATO.....	15
3	CONTROLE HORMONAL DA PRÓSTATA.....	19
4	OBJETIVO.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1	Animais.....	22
5.2	Grupos.....	22
5.3	Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos.....	22
5.4	Biometria.....	23
5.5	Microscopia de luz.....	23
5.6	Análises estatísticas.....	26
6	RESULTADOS.....	27
7	DISCUSSÃO.....	33
8	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36
	 APÊNDICE – The prostate after anabolic-androgenic steroids. a morphometrical study in rats.....	 40
	ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo científico.....	59
	ANEXO B - Comitê de ética em pesquisa.....	60
	ANEXO C - Protocolo para processamento de material.....	61
	ANEXO D - Protocolo para coloração com H&E.....	62
	ANEXO E - Protocolo para coloração com Picrosirius red.....	63

INTRODUÇÃO

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são amplamente utilizados por atletas profissionais e amadores, com o objetivo de melhorar a capacidade atlética, aparência e massa muscular. No entanto, muitos efeitos adversos têm sido associados com o abuso de EAA, incluindo perturbações do trato urogenital (1). O abuso de esteróides anabólicos androgênicos pode ser um fator etiológico na infertilidade masculina entre os atletas amadores. Os EAA e exercícios de resistência também podem induzir algumas alterações subclínicas no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (1,2).

As alterações testiculares resultantes do uso de EAA estão documentadas na literatura (3). Altas doses de decanoato de nandrolona reduz o volume dos testículos e comprimento dos túbulos seminíferos em ratos (4). Contudo, estudos sobre as alterações estruturais da próstata após EAA são escassos na literatura (5).

Um estudo experimental com ratos demonstrou que a alteração nos níveis séricos de testosterona pode causar alterações morfológicas no tecido da próstata (6). A administração exógena de EAA tem efeitos profundos sobre a próstata humana, incluindo um aumento do volume da próstata, a redução da taxa de fluxo de urina e a alteração dos padrões de esvaziamento (7).

1 ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

EAA são derivados sintéticos do hormônio masculino testosterona. Compostos de EAA são indicados atualmente para o tratamento de anemia refratária, angioedema hereditário, câncer de mama e estados de fome (5,8). Sua utilização também é farmacologicamente importante no tratamento de condições médicas como deficiência de crescimento e osteoporose (2,4).

No entanto, EAA têm sido usados por atletas profissionais e amadores, de ambos os sexos desde a pré-adolescência até a idade adulta com o objetivo de melhorar a habilidade atlética, a aparência e a massa muscular (2,3,4,8).

As doses e as combinações destes componentes usados pelos atletas são geralmente excessivas podendo chegar a até 100 vezes a dose terapêutica (3,4,5,8). Muitos efeitos adversos têm sido associados com o abuso de EAA, incluindo distúrbios da função endócrina e imunológica, alterações na pele, no sistema homeostático e no trato urogenital (5).

O abuso dos EAA tornou-se uma questão de saúde pública (9,10) e, nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada ao seu papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com dados publicados que apontam para a maior ocorrência de hipertensão, insuficiência cardíaca, cardiomiopatia, arritmias e morte súbita (9,11).

Em camundongos que foram submetidos à doses suprafisiológicas de EAA, o tempo de vida foi diminuído, sendo verificado grande ocorrência de tumores renais, glomerulonefropatia e hepatite peliosa (12,13).

Com relação ao sistema urogenital, os EAA diminuem os níveis de testosterona endógena e de hormônios gonadotróficos, assim como o peso testicular, contagem de espermatozóides e a motilidade dos espermatozóides (14).

Os androgênios exercem seus efeitos biológicos através de um único receptor intracelular que está presente no trato reprodutivo, bem como, em muitos tecidos não-reprodutivos como osso, músculo esquelético, cérebro, fígado, rim e adipócitos. Os EAA se ligam ao mesmo receptor que a testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) (14).

Os EAA mais usados e aprovados pela *US Food and Drug Administration* são o decanoato de nandrolona (Deca Durabolin[®]), a oxandrolona (Oxandrin[®]), oximetolona (Anadrol[®]) e stanozolol (Winstrol[®])(14). Neste estudo trabalhamos especificamente com o decanoato de nadrolona, por isso, a detalharemos melhor.

1.1 Decanoato de Nandrolona

A nandrolona foi sintetizada primeiramente em 1950 (15) e em 1953 (16). Ela é metabolizada de maneira similar à testosterona, e seus principais metabólitos são a 3-norandrosterona, um derivado 5α , e a 2-noreticoplanolone, um derivado 5β (17). Foi demonstrado que a nandrolona, assim como a testosterona, pode sofrer aromatização (18). Apesar da sua similaridade com a testosterona, a nandrolona tem maior efeito anabólico. A substituição de um átomo de hidrogênio no grupo metil C19 da testosterona cria um novo centro assimétrico em C10, que pode ser responsável por favorecer a relação anabólico-androgênica da droga (14).

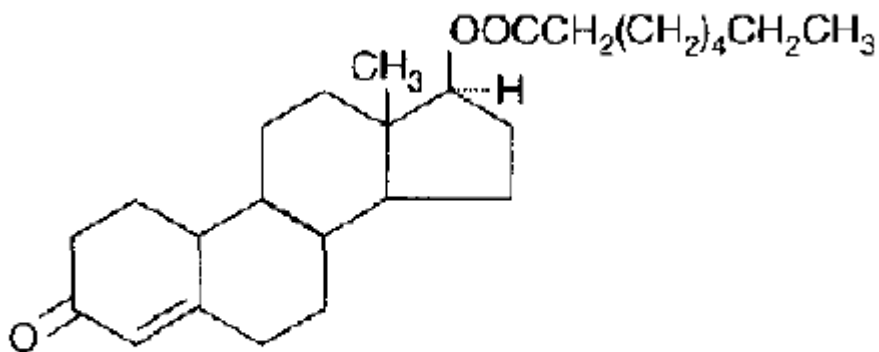


Figura 1 – Estrutura química do decanoato de nandrolona (Reproduzido de Shahidi, 2011) (11).

2 CARACTERÍSTICAS DA PRÓSTATA HUMANA E DO RATO

A próstata humana é uma glândula acessória do sistema genital masculino responsável pela secreção e armazenamento de uma ampla gama de produtos do líquido seminal (19,20).

Sua secreção fornece aos espermatozoides condições ideais de sobrevivência e viabilidade durante e após a ejaculação. Histologicamente é composta por unidades secretoras túbulo-acinares, envoltas por um estroma rico em células musculares lisas (19).

Os andrógenos têm sido apontados como o fator extrínseco de maior importância, atuando nos eventos que levam ao seu desenvolvimento embrionário e à maturação funcional assim como na homeostase do órgão maduro em diferentes fases da vida (21,22).

A próstata humana pode ser dividida anatomicamente em lobos (23) ou funcionalmente em zonas, de acordo com McNeal (24).

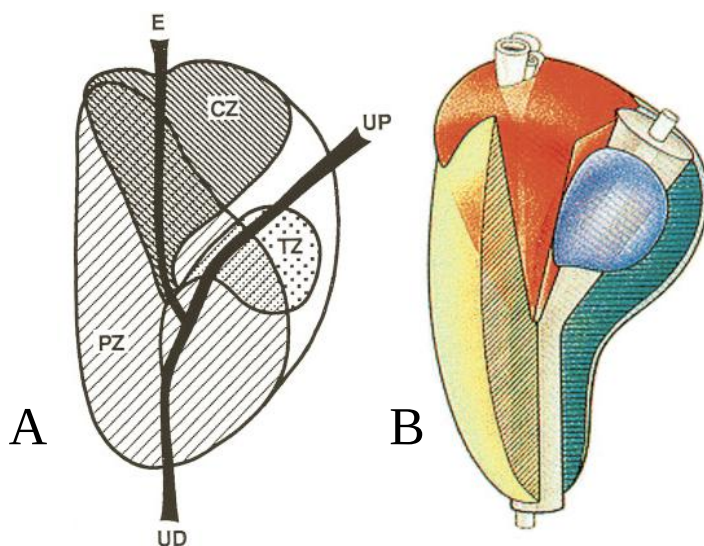
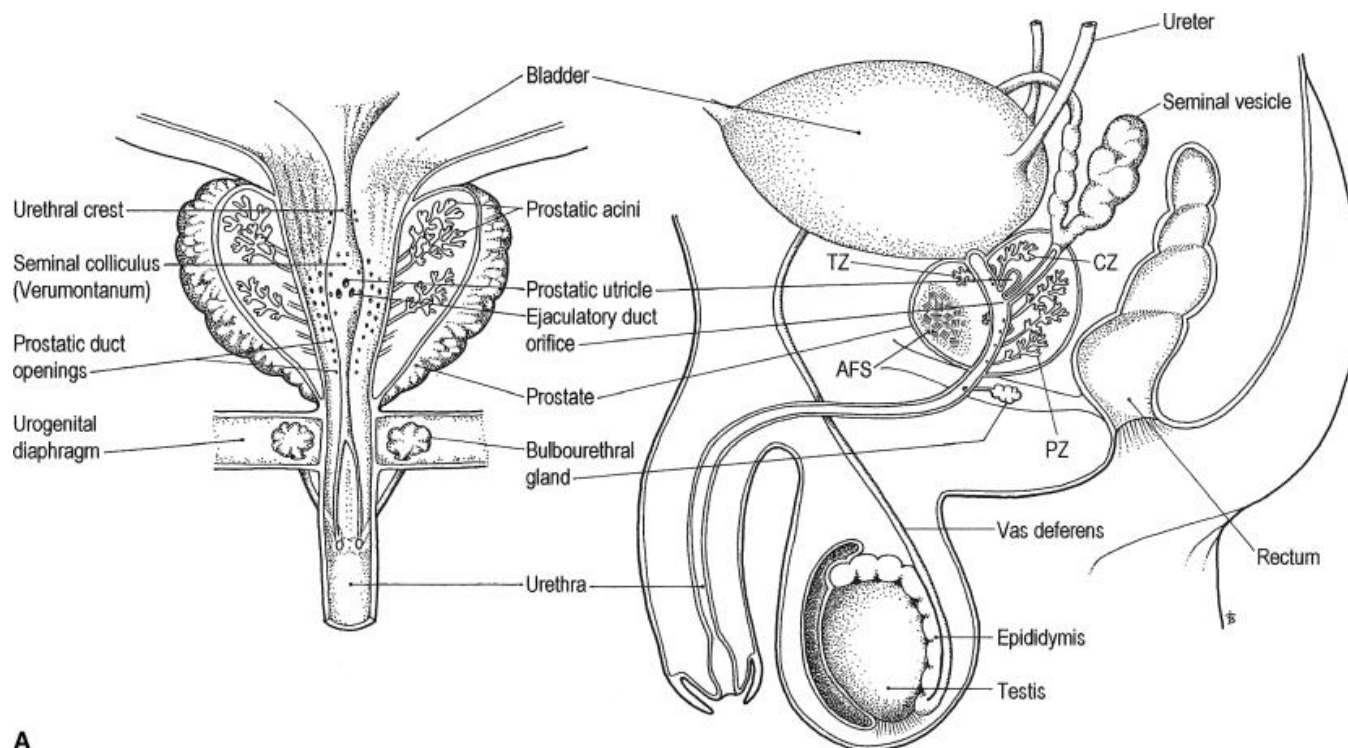


Figura 2 – A, Diagrama sagital da próstata humana de um adulto mostrando a uretra distal (UD), uretra proximal (UP) e ducto ejaculatório (E). Essas estruturas são mostradas em relação às três principais regiões da próstata descrito por McNeal, 1983(24). Zona central (CZ), zona periférica (PZ) e zona de transição (TZ). B, Gráfico tridimensional representando as três zonas glandulares da próstata por McNeal. Zona periférica (amarelo), zona central (vermelho), zona de transição (azul), estroma fibromuscular anterior (verde). (Reproduzido de Timms, 2008) (25).

O aspecto anterior ou ventral da glândula é quase inteiramente fibromuscular, enquanto a região glandular ocupa a porção posterior do tecido e envolve os ductos ejaculatórios à medida que eles entram na uretra de cada lado do verumontanum (25).



A

Figura 3 – Diagramas de dissecação frontal e sagital do complexo urogenital masculino ilustrando a posição anatômica da próstata de um adulto e estruturas associadas. As zonas da próstata descritas por McNeal, 1983 (24) estão indicadas: zona central (CZ), zona periférica (PZ), estroma fibromuscular anterior (AFS), zona de transição (TZ), de acordo com Timms, 2008 (25).

Comparada com a compacta glândula humana, a próstata adulta de ratos pode ser anatomicamente dividida em diferentes glândulas (25): próstata anterior (PA) ou glândula de coagulação (GC), próstata dorsal (PD), próstata lateral (PL) e próstata ventral (PV) com demonstrado na figura 4. Frequentemente as próstatas dorsal e lateral são consideradas em combinação e designados como próstata dorsolateral (PDL), uma vez que partilham um sistema de ductos (26).

Ratos e humanos apresentam tipos celulares similares no epitélio de suas próstatas (secretora, basal e neuroendócrina), que presumivelmente realizam as mesmas funções fisiológicas, mas a proporção varia entre as espécies. Ambas as espécies possuem células epiteliais colunares que secretam proteínas prostáticas e fluidos das suas superfícies apicais para o lúmen (26).

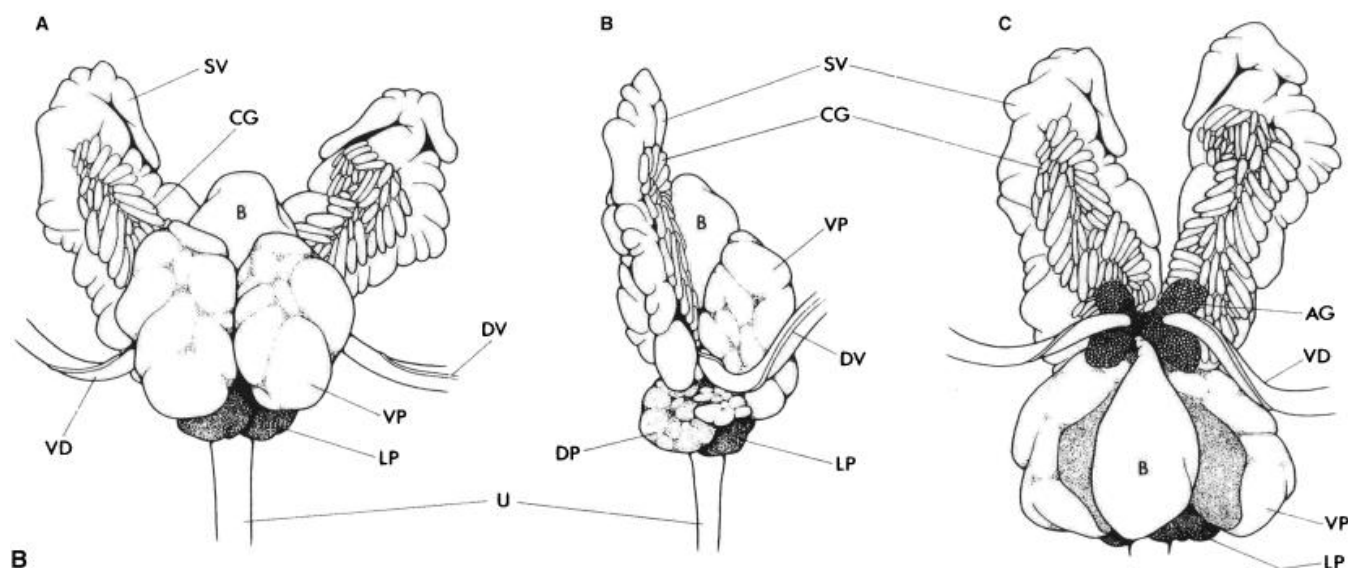


Figura 4 - Órgãos sexuais acessórios masculinos de um rato adulto. A, vista anterior, B, vista lateral, C, vista anterior com a bexiga defletida caudalmente. Glândula ampular do ducto deferente (AG); bexiga (B); glândula de coagulação (CG); próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP); vesícula seminal (SV); próstata ventral (VP); ducto deferente (VD); veia deferente (DV).

Humanos têm uma contínua camada de células basais entre as células secretoras e a membrana basal, enquanto que os ratos têm menos células basais e uma descontínua camada em torno das glândulas (22). As células neuroendócrinas são dispersas e raras na próstata humana, e ainda mais raras no rato (27).

A próstata humana tem um estroma fibromuscular robusto, já a próstata de rato tem um componente estromal muito modesto (26).

Ambas as espécies possuem próstata e glândulas acessórias que se desenvolvem dos ductos de Wolff e do seio urogenital, e são andrógeno-sensíveis (26,28).

A PA do rato é considerada análoga à zona central da próstata humana, que é raramente um sítio de transformação neoplásica em humanos (26). A PDL do rato é considerada mais similar à zona periférica humana, que é a zona em que ocorre a maioria dos carcinomas (29). Essas analogias, contudo, são limitadas à medida que são baseadas exclusivamente em dados descritivos e precisam ser reavaliadas usando técnicas moleculares (30).

A PV é a mais utilizada em estudos translacionais pois este é o mais similar à próstata humana no que se refere à influência dos androgênios sobre sua fisiologia e morfologia (31). Além disso, a próstata ventral tem uma quantidade mínima de dobras no epitélio, a próstata

dorsolateral tem uma quantidade intermediária de dobras epiteliais e a próstata anterior possui uma grande quantidade de dobras (26).

A PV consiste de dois lobos discretos que são anexados à uretra por uma camada de tecido conjuntivo e por uma série de ductos revestidos por, principalmente, epitélio cubóide que drenam para a uretra (32). O lobo ventral é evidente, gelatinoso e semelhante à folha, mas pode ser difícil identificá-lo sem uma dissecção microscópica. Os ductos do lobo ventral entram na uretra ventralmente. A única característica histológica importante do lobo ventral é a de que ele tem um epitélio colunar simples com poucas dobras (26).

3 CONTROLE HORMONAL NA PRÓSTATA

O controle da diferenciação e da atividade prostática é bastante complexo, e depende de uma soma de fatores extrínsecos (hormonais, imunológicos, alimentares e genéticos) e intrínsecos (33).

Dentre os androgênios, a forma hidroxilada da testosterona, a DHT, é a de maior ação na próstata, devido à alta afinidade com os receptores de androgênio (RA). Vários outros hormônios como os estrogênios, os glicocorticoides, a prolactina e a insulina, também têm sido implicados no controle da próstata (34).

Os fatores intrínsecos influenciam as principais populações celulares do órgão por meio de mecanismos parácrinos, autócrinos e intracelulares. Correspondem, na sua maioria, a diferentes tipos de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal, o de queratinócito, o de fibroblastos e o tipo insulina (35).

Assim, a maior importância dos androgênios na regulação da função e crescimento prostático é devida a sua ação direta, via ligação com RAs ou via mecanismos indiretos decorrentes do estímulo à secreção dos fatores de crescimento. Estes, por sua vez, irão estimular atividades específicas nas células prostáticas, como a proliferação das células epiteliais e estromais (36).

Durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, as células mesenquimais do complexo prostático em desenvolvimento são as primeiras a expressar RA e, então, sob estímulo androgênico, liberam fatores como o fator de crescimento de fibroblastos-10 que agem sobre as células epiteliais induzindo a formação dos ductos prostáticos e seu padrão de ramificação característico (21,34,37,38). Por sua vez, a ação direta dos androgênios se aplica principalmente para a regulação da atividade secretora das células epiteliais (39).

Em resumo, as interações entre as populações celulares do estroma e do epitélio são essenciais para o controle do desenvolvimento, morfologia e fisiologia prostática (36). Desse modo, evidências indicam que o desequilíbrio nessas interações é decisivo na instalação e na progressão das doenças que acometem o órgão (40).

A próstata é um dos órgãos mais sujeitos a alteração durante o envelhecimento, apresentando frequentemente um crescimento disfuncional, como é o caso da hiperplasia prostática benigna (HPB), bem como a alta ocorrência de tumores malignos, como o

adenocarcinoma prostático (PAC) (35,41). Por esse motivo, a compreensão do controle do funcionamento e a diferenciação das células prostáticas são de grande relevância (36).

Os androgênios, juntamente com outros esteroides sexuais, constituem uma classe de hormônios derivados do colesterol. Visto a influência dos androgênios sobre a homeostasia e o crescimento da próstata, as terapias de supressão androgênica são amplamente utilizadas no tratamento da HPB e do PAC (36).

Contudo, só encontramos um trabalho na literatura (5) que avaliou diretamente os efeitos de um EAA, o decanoato de nandrolona, no tecido prostático de ratos. Porém, este estudo utilizou materiais e métodos diferentes dos nossos e também obteve resultados bem distintos dos apresentados no presente estudo.

4 OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo avaliar as alterações morfológicas do lobo ventral da próstata de ratos púberes e adultos, cronicamente tratados com doses suprafisiológicas de decanoato de nandrolona.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Trinta e nove ratos machos adultos Wistar pesando 400 – 550 g foram mantidos em biotério com iluminação artificial controlada (12h ciclo claro-escuro), temperatura (23 – 24°) e oferecido ração comercial e água *ad libitum*.

5.2 Grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos: ratos controle, com 105 dias de idade (C105) (n=7) e 65 dias de idade (C65) (n=9), submetidos à injeção de veículo (óleo de amendoim com 10% álcool benzóico) e ratos tratados, com 105 (T105) (n=10) e 65 dias de idade (T65) (n=13), submetidos à injeção de decanoato de nandrolona (Deca Durabolin 50 mg.mL⁻¹ Organon) na dose de 10 mg.Kg⁻¹ de peso corporal. Tanto o hormônio esteróide quanto o veículo foram administrados por injeção intramuscular no membro posterior uma vez por semana durante oito semanas (13).

5.3 Sacrifício dos animais e coleta dos tecidos

Com 161 dias de idade (C105 e T105) e com 121 dias de idade (C65 e T65), os ratos foram mortos por overdose anestésica (tiopental sódico, 100 mg/Kg, injetado por via intraperitoneal).

A próstata foi retirada em bloco, e estes foram fixados em formaldeído 4%.

5.4 Biometria

O bloco retirado, após 48 horas da fixação, foi dissecado sob magnificação com auxílio de microscópio cirúrgico (MU-M19, D. F. Vasconcellos, São Paulo, Brasil) para separação dos lobos ventrais. Cada um destes foi pesado e seu volume medido pelo teste de Sherle (42).

5.5 Microscopia de Luz

Os fragmentos para análise em microscopia de luz foram processados conforme protocolo padrão do laboratório (anexo C), para inclusão em parafina e cortados em 5µm de espessura por micrótomo (CUT 4060, Olympus, Tóquio, Japão).

A altura do epitélio acinar foi medido em cortes corados por hematoxilina e eosina (HE), de acordo com o protocolo padrão do laboratório (anexo D). Para tanto foi considerado a distância linear, medida em micrometros, entre superfície luminal do urotélio e sua membrana basal. Foi utilizado a função “straight line” do software ImageJ versão 1,43 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). para esta análise. A média de cada animal foi calculada após 250 medições realizadas em pelo menos 25 campos diferentes com aumento de 400X.

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso com Animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, protocolado sob o nº: CEUA/036/2012.



Figura 5 – Fotomicrografia da próstata ventral de rato mostrando as características morfológicas. A altura do epitélio acinar (amarelo) foi mensurada em micrômetros em fotomicrografias com um aumento de 400x usando o software Image J. HE, 400X.

As densidades de área do lúmen acinar, do epitélio e do estroma foram calculadas nos mesmos cortes corados por HE, com auxílio do software ImageJ através da função “cell counter”. Em cada campo histológico, foi aplicado uma grade de 100 pontos e os pontos incidentes sobre o lúmen, epitélio e estroma foram contados e expressos em porcentagem. Para cada animal, a média foi determinada em 25 campos com aumento de 200X.

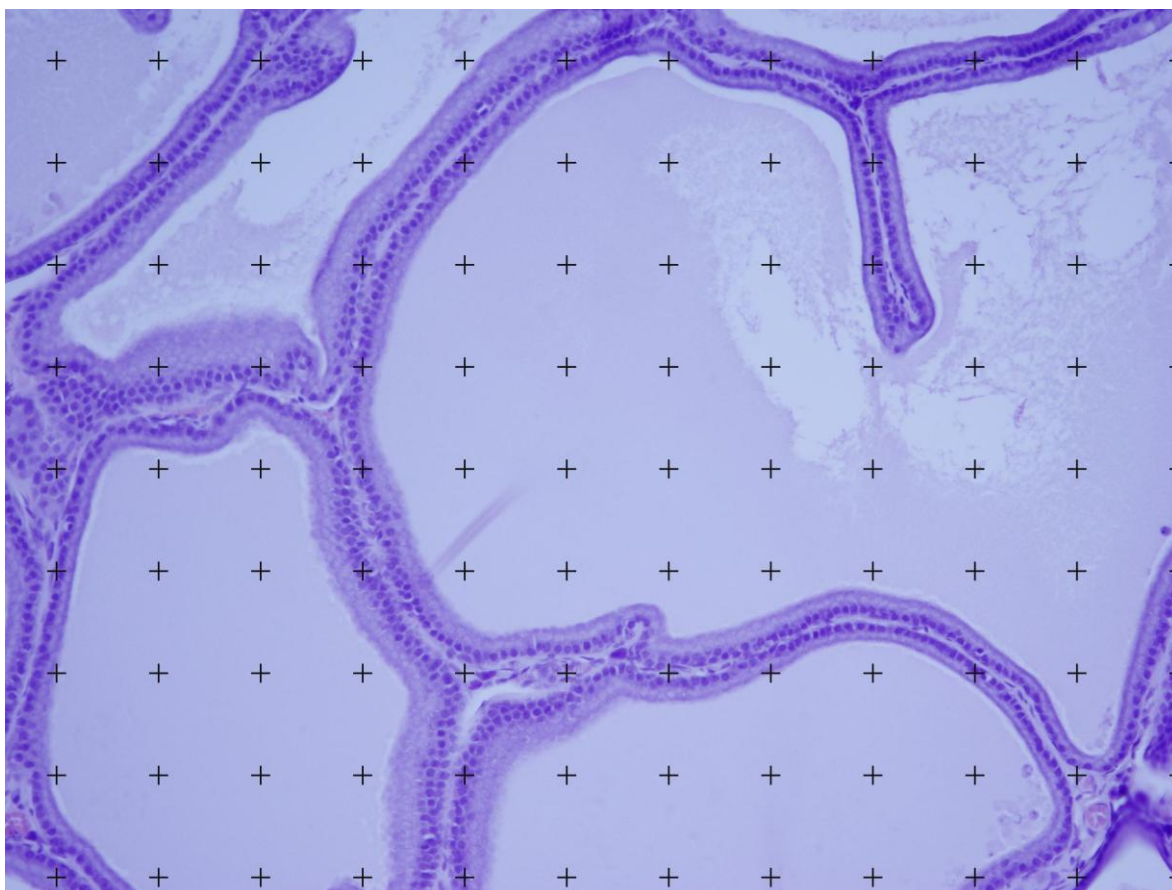


Figura 6 - Fotomicrografia da próstata ventral de rato mostrando as características morfométricas. A densidade de superfície do lumen, epitélio e estroma do lobo ventral da próstata foram estimados pelo método de contagem de pontos, com uma grade de 100 pontos sobreposta em fotomicrografias usando o software Image J. HE, 200X.

A avaliação do padrão do colágeno foi feita qualitativamente, em cortes corados por Picrosirius Red de acordo com protocolo anexado (anexo E), observados sob luz polarizada, com uma magnificação de 400X (43). Estas imagens foram utilizadas para diferenciar os tipos de colágeno III (visto em verde) e I (vermelho / laranja) (43).

Todas as imagens de microscopia de luz convencional, polarizada foram capturadas por uma câmera DP71 acoplada ao microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão).

5.6 Análise Estatística

As médias dos grupos foram comparadas pelo teste t de Student e pela ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Em todos os casos, a significância foi fixada em um valor de probabilidade de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6 RESULTADOS

O peso ($p < 0.0001$) e o volume ($p = 0.0004$) das próstatas demonstraram diferença entre os grupos C65, T65, C105 e T105, conforme as figuras 6 e 7. Contudo entre os animais da mesma idade (C65 e T65, e C105 e T105) não houve diferença.

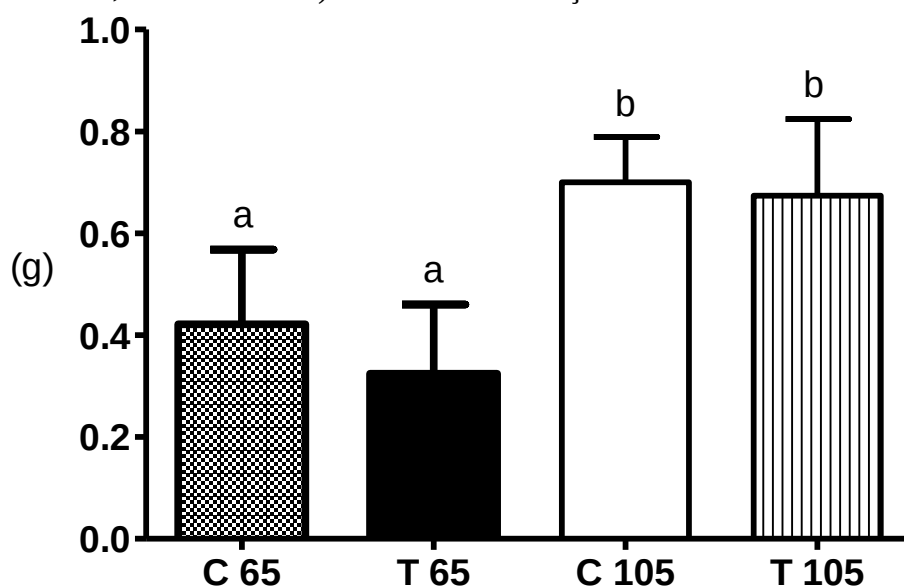


Figura 7 – Peso (g) do lobo ventral da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p < 0.05$. A análise demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, bem como entre os grupos C105 e T105.

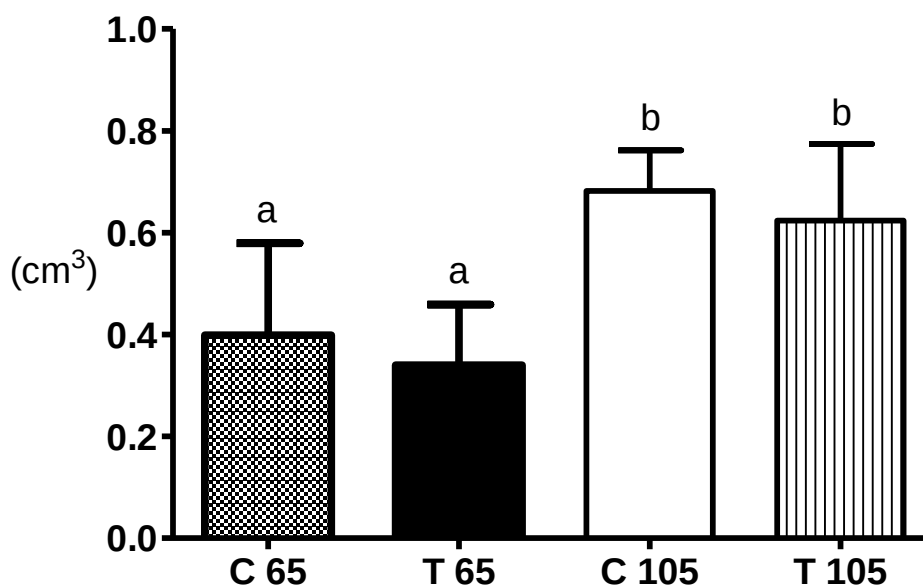


Figura 8 – Volume (cm³) do lobo ventral da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p < 0.05$. A análise demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, bem como entre os grupos C105 e T105.

A altura do epitélio não apresentou diferença entre os grupos T65 e o grupo C65 ($p=0.8509$). Contudo o grupo T105 apresentou um aumento de 32% quando comparado ao grupo C105 ($p=0.0089$) neste parâmetro, como representado na figura 9.

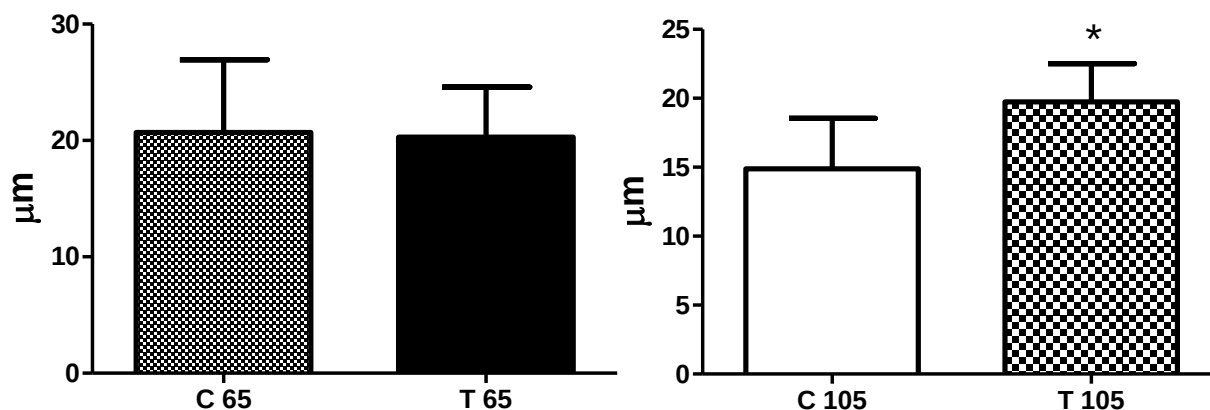


Figura 9 – Altura do epitélio do lobo ventral de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p<0.05$. A análise não demonstrou diferença entre os grupos C65 e T65, mas o grupo T105 apresentou um aumento de 32% comparado ao C105.

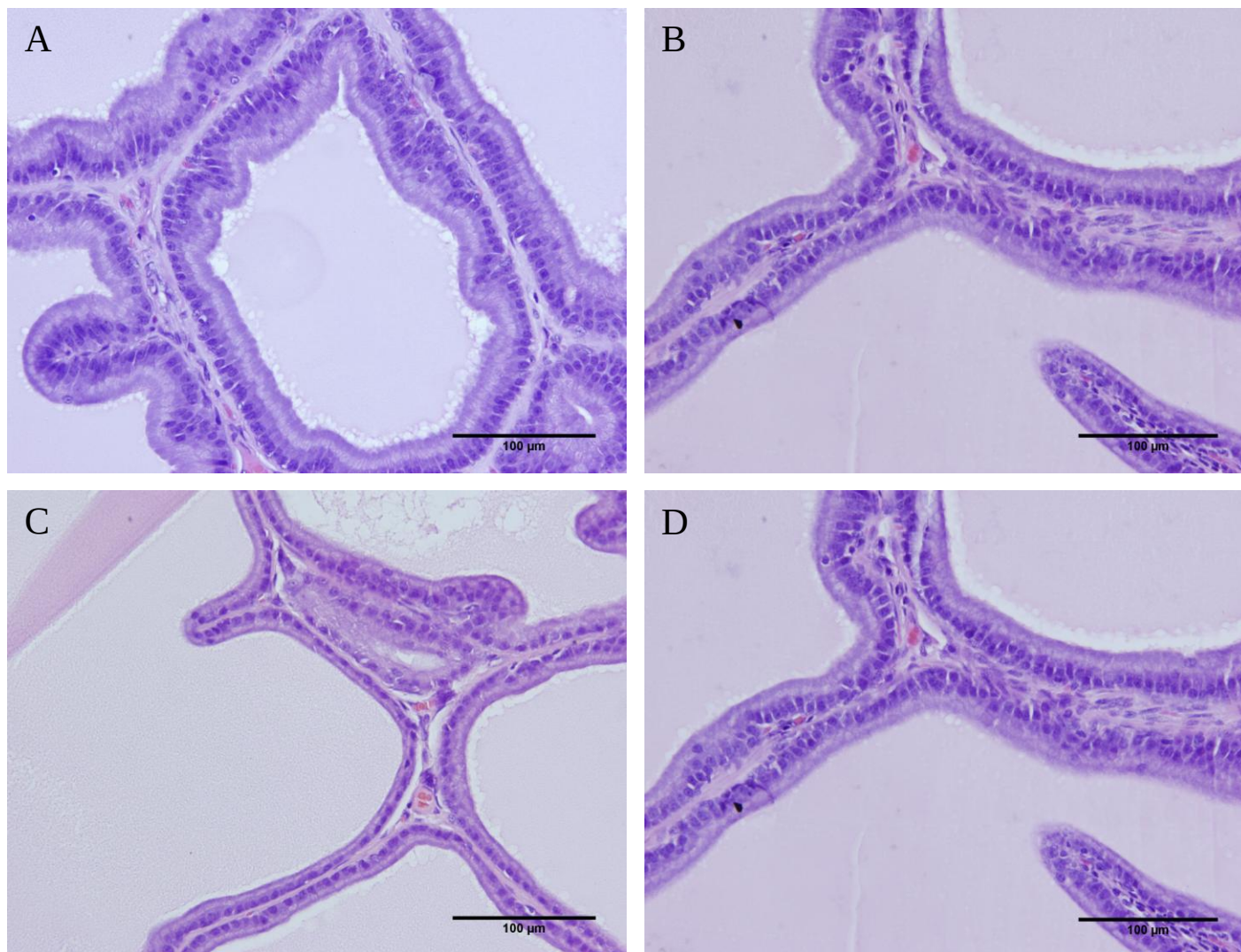


Figura 10 – Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de rato mostrando a altura do epitélio. A) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C65. HE 400X. B) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T65. HE 400X. C) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C105. HE 400X. D) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T105. HE 400X.

Quanto à densidade do lúmen verificou-se que o tratamento não promoveu alteração significativa entre os grupos C65 e T65($p=0.9031$). Mas em relação ao grupo T105, houve uma diminuição de 19% comparado ao grupo C105 ($p=0.0061$).

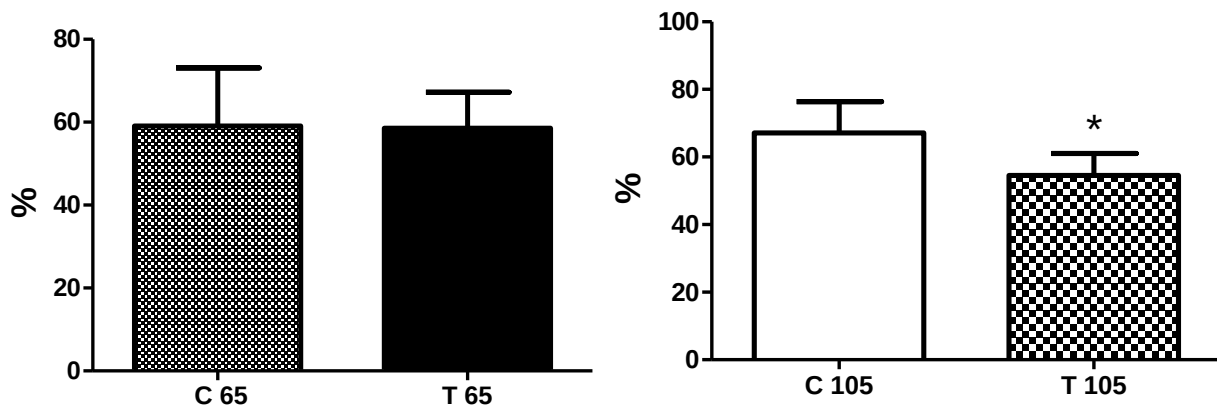


Figura 11 – Densidade do lúmen da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$. A densidade de superfície do lúmen não apresentou diferença entre C65 e T65 ($p = 0.9031$) e o grupo T105 apresentou uma diminuição de 19% comparado ao C105 ($p = 0.0061$).

Novamente, a densidade de epitélio não sofreu alteração significativa entre os grupos C65 e T65 ($p = 0.7375$), porém no grupo T105 ocorreu um aumento de 51% comparado ao grupo C105 ($p = 0.0065$).

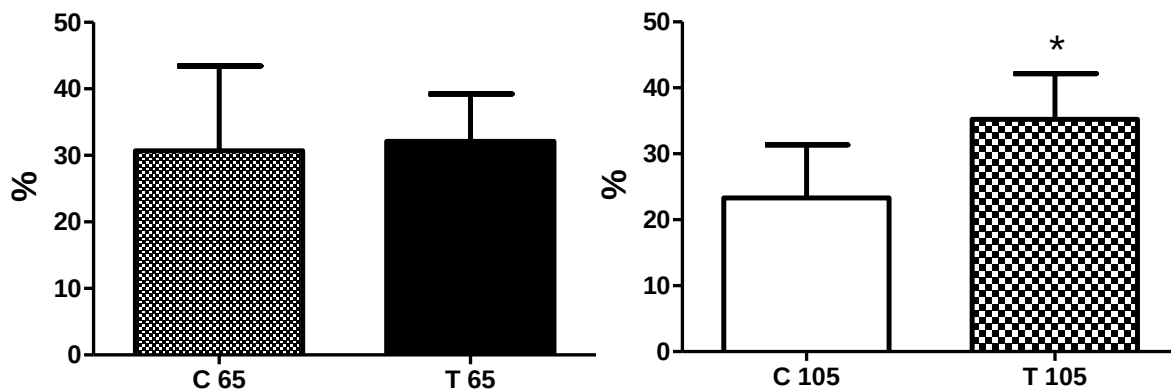


Figura 12 – Densidade do epitélio da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0.05$. A densidade de superfície do epitélio não apresentou diferença entre C65 e T65 ($p = 0.7375$), mas aumentou 51% no T105 em relação ao C105 ($p = 0.0065$).

Em relação à densidade do estroma não houve diferença nem entre os grupos C65 e T65 ($p = 0.3819$) nem entre os grupos C105 e T105 ($p = 0.3216$).

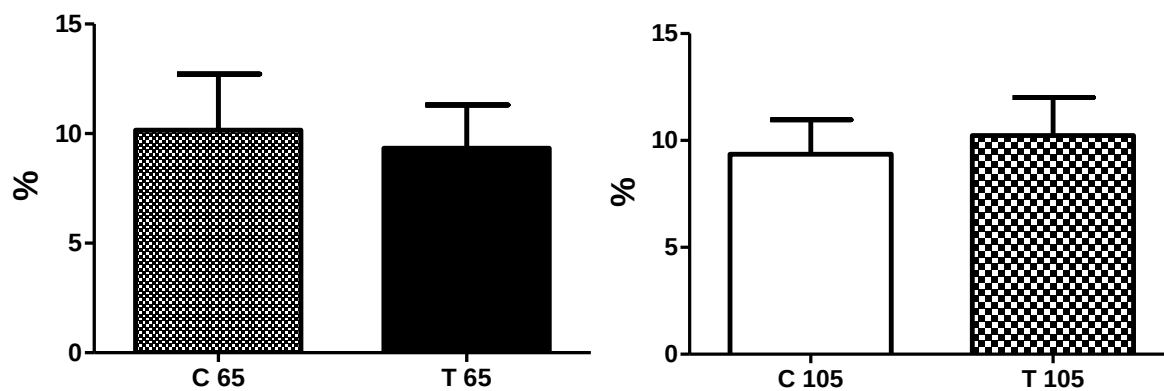


Figura 13 – Densidade do estroma da próstata de ratos controle e tratados. Dados expressos em média e desvio padrão. $p>0.05$. Não houve diferença na densidade de superfície do estroma entre C65 e T65, bem como entre C105 e T105.

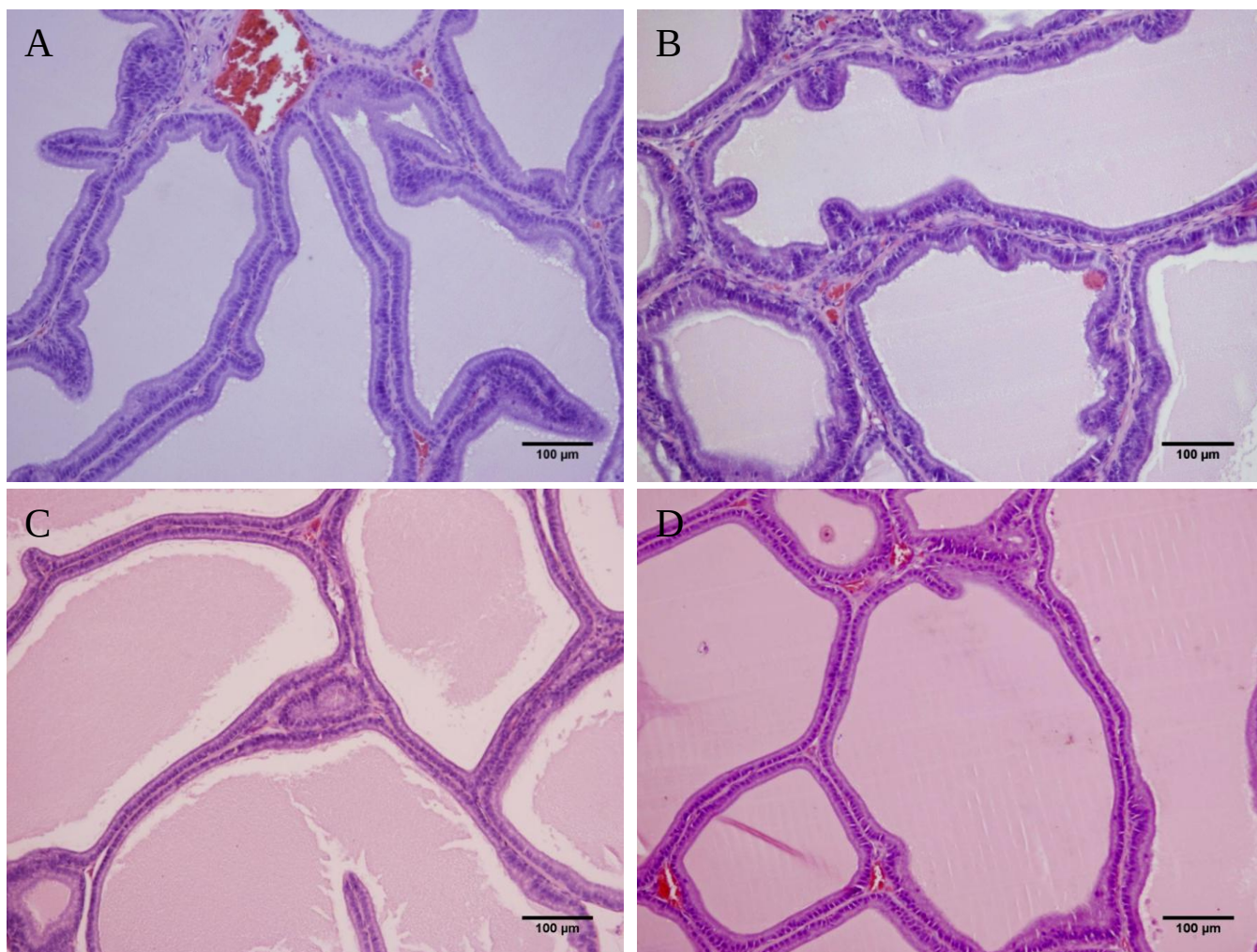


Figura 14 – Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de rato mostrando as densidades de superfície.
A) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C65. HE 200X. B) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T65. HE 200X. C) Lobo ventral da próstata de rato do grupo C105. HE 200X. D) Lobo ventral da próstata de rato do grupo T105. HE 200X.

Os resultados do padrão de colágeno foram obtidos de modo qualitativo, analisados sob polarização, comparando-se também ambas as idades entre elas. Estes resultados não mostraram diferenças aparentes entre os grupos C105 e T105, contudo o grupo T65 apresentou um tipo de colágeno diferente do apresentado pelo grupo C65.

7 DISCUSSÃO

Esteróides anabólicos androgênicos são derivados sintéticos da testosterona e são importantes farmacologicamente por serem utilizados no tratamento de várias condições médicas como a deficiência de crescimento, algumas doenças do sangue e osteoporose. Os androgênios desempenham um papel crucial no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos tais como, epidídimo, ducto deferente, vesícula seminal, próstata e pênis (6). O uso de EAA pode levar a diversas alterações no corpo, inclusive no sistema genital masculino (9,10).

O estudo de alterações estruturais após o uso de EAA é bem conhecida no testículo (3,5). Altas doses de decanoato de nandrolona reduzem o volume dos testículos e o tamanho dos túbulos seminíferos em ratos (4). É claramente conhecido que o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), da glândula hipófise, exercem efeitos de promoção do crescimento no desenvolvimento dos testículos e que a administração de androgênios exógenos suprime os níveis séricos de LH e FSH em humanos e em ratos (3).

Como a próstata é influenciada pelos níveis séricos de testosterona, o uso de EAA também pode acarretar alterações morfológicas do tecido prostático (6). Pode-se sugerir que ocorram mudanças funcionais como doenças da próstata e subfertilidade após o uso de EAA.

Androgênios são necessários para a puberdade, fertilidade e função sexual masculina. Altos níveis de testosterona intratesticular, secretado pelas células de Leydig, são necessários para a espermatogênese (14). De maneira semelhante a testosterona é um hormônio crítico para o desenvolvimento, crescimento e manutenção da próstata. A enzima 5-alfa-redutase parece desempenhar um importante papel por converter androgênios em DHT, que age no núcleo celular de órgãos-alvos, tais como as glândulas acessórias masculinas, pele e próstata. A morfogênese prostática não é determinada geneticamente, mas pela exposição a androgênios produzidos pelos testículos no feto (31).

Na idade da maturidade sexual, a atividade secretora do epitélio e a diferenciação do músculo liso são também mantidas por androgênios. Na próstata, o epitélio e o estroma expressam RAs e por isso são capazes de mediar ações androgênicas (8,12,14,31).

Portanto, em resposta aos androgênios, as células da próstata interagem de uma maneira autócrino-parácrina, dessa forma estes hormônios influenciam sob vários aspectos o crescimento dessa glândula em estados normais e patológicos (8,12,31).

Diversos estudos têm demonstrado que a próstata sofre alterações marcantes no epitélio e no estroma após ablação hormonal e cirúrgica. Esses procedimentos levam à uma diminuição na função glandular, com consequente diminuição na espessura do epitélio e no volume estromal (2,31).

A próstata de roedor tem uma estrutura complexa, consistindo de uma próstata ventral (PV), próstata lateral (PL) e próstata anterior ou glândula de coagulação (44). O lobo ventral é um dos principais alvos da ação androgênica na próstata de ratos, sendo por conta disso, o mais utilizado em estudos experimentais (31). Além disso, a próstata ventral tem uma quantidade mínima de dobras epiteliais diferentemente dos outros lobos da próstata de ratos (26), por este motivo, neste estudo decidiu-se avaliar a morfologia do lobo ventral.

Em um trabalho foram avaliadas as alterações estruturais da próstata de ratos após o tratamento com EAA em animais com peso entre 250 e 300g por 14 semanas (5). Deste estudo concluiu-se que o decanoato de nandrolona causa atrofia nos componentes da próstata de ratos. Em nosso estudo observamos que o uso de EAA causa alteração na morfologia da próstata após um tratamento mais curto (8 semanas); e as alterações são mais brandas em animais púberes e mais severas em animais adultos.

Apesar de utilizarmos uma metodologia semelhante, os resultados foram bem distintos do trabalho de Karbalay-Dust (5). A altura do epitélio aumentou 32 % entre os grupos 105 dias (parâmetro não alterado no artigo prévio); em relação ao lúmen, epitélio e estroma, foi demonstrado que o uso de EAA diminui a densidade de todos os três componentes, já em nosso trabalho, onde fizemos análise da densidade de superfície, demonstramos que o lúmen diminui, o epitélio aumenta e o estroma não se altera com o tratamento com EAA.

O uso de EAA em ratos promove mudanças estruturais na próstata. Nós observamos mudanças estruturais no peso, volume e na altura do epitélio do lobo ventral da próstata, bem como, uma predominância de fibras mais espessas. Essas alterações parecem ser mais severas em animais adultos.

8 CONCLUSÃO

O uso de altas doses de esteróide anabólico androgênico, como o decanoato de nandrolona, promove alterações estruturais na próstata.

Este estudo também sugere que essas alterações estruturais da próstata, podem ser mais significativas em indivíduos adultos jovens do que em indivíduos na puberdade.

REFERÊNCIAS

1. Lucia A, Chicharro JL, Perez M, Serratosa L, Bandres F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol* 1996; 81: 2627– 36.
2. Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effects of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol. Behav.* 1997; 62: 23-30.
3. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS.* 2005; 113: 122-125.
4. Shokri S, Aiteken RJ, Abdolvahhabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Ejtemaieimehr S, Ahmadian S, Minaei B, Naraghi MA, Barabarestani M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2009; 106: 324-330.
5. Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. *Micron.* 2006; 37:617-623.
6. Justulin, LA, Ureshino RP, Zanoni M. et al.: Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 354-364.
7. Wemyss-Holden SA, Hamdy FC, Hastie KJ. Steroid abuse in athletes, prostatic enlargement and bladder outflow obstruction is there a relationship? *Br J Urol.* 1994; 74(4):476-478.
8. Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroids on the sexual behavior of intact male rat. *Horm. Behav.* 1997; 31: 35-46.
9. Pereira-Junior PP., Chaves EA, Costa-e-Souza RH, Masuda MO, Carvalho ACC, Nascimento JHM. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur. J. Physiol.* 2006; 96: 487-494.
10. Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE. Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart.* 2004; 90: 473-475.
11. Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci RT, Turillazzi E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001; 125:253-255.
12. Bronson FH, Matherine CM. Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1997; 29: 615-619.

13. Fortunato RS, Marassi MP, Chaves EA, Nascimento JHM, Rosenthal D, and Carvalho DP. Chronic Administration of Anabolic Androgenic Steroid Alters Murine Thyroid Function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38:256-261, 2006.
14. Shahidi TN. Review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther.* 2001; 23:1355-1390.
15. Birch AJ. Hydroaromatic steroids hormones. 10-Nortesterone. *J Chem Soc.* 1950; 367-368.
16. Wilds AL, Nelson NA. The facile synthesis of 19-nortesterone and 19-norandrostendione from estone. *J Am Chem Soc.* 1953; 75:5366-5369.
17. Engel LL, Alexander J, Wheeler M. Urinary metabolites of administered 19-nortesterone. *J Biol Chem.* 1958; 231:159-165.
18. Gaillard JL, Silberzahn P. Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. *J Biol Chem.* 1987;262:5717-5722.
19. Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr.* 1963; 12:1-27.
20. Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int Rev Cytol.* 1990; 121:127-231.
21. Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006; 288(8):885-92.
22. Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology.* 2003; 253: 165–174.
23. Standring, S. Gray's anatomy. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1256 p.
24. McNeal JE. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr.1983 Urol.* 4:3–33.
25. Timms BG. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation.* 2008; 76: 565-577.
26. Roy-Burman P, Wu H, et al.. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 2004; 11(2): 225-54.
27. Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI. A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *PNAS.* 1998; 95: 15382–15387.

28. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*. 2004 March 15; 64:2270–2305.
29. Xue L, Yang K, Newmark H, Lipkin M. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 995–999.
30. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes and Development*. 2000; 14: 2410–2434.
31. Bruchovsky N, Lesser B, et al. Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam. Horm.* 1975; 33: 61-102.
32. Jesik CJ, Holland JM, Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate*. 1982; 3:81-97.
33. Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate*. 1997; 31:131-8.
34. Cunha G, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev*. 1987; 8: 338-62.
35. Griffiths K, Denis LJ. Further insights into endocrine disease: regulation of prostatic growth. In: *The 4th International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia*. Paris; 1997. p. 1-40.
36. Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. *Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(8): 946-55.
37. Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, et al. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ*. 2001; 8: 192-200.
38. Bruni-Cardoso A, Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF. Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129(6): 805-15.
39. Cunha GR, Young P. Inability of Tfm (testicular feminization) epithelial cells to express androgen-dependent seminal vesicle secretory proteins in chimerical tissue recombinants. *Endocrinology*. 1991; 128: 3293-8.

40. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2912-23.
41. Taboga SR, Vidal BC. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004; 35(1): 11-6.
42. Sherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970; 26:57-60.
43. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International.* 1996; 20(1): 15–27.
44. Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod.* 1991; 45(2): 308- 21

APÊNDICE - The prostate after anabolic-androgenic steroids. A morphometrical study in rats.

THE PROSTATE AFTER ANABOLIC-ANDROGENIC STEROIDS. A MORPHOMETRICAL
STUDY IN RATS.

Rafael Arêas **Vargas**; Leonardo Pires **Oliveira**; Stephan **Frankenfeld**;; Diogo Benchimol **de Souza**; Waldemar Silva **Costa**; Luciano Alves **Favorito**, Francisco José Barcellos **Sampaio**
Urogenital Research Unit of State University from Rio de Janeiro – Brazil

Running head: **Prostate after Anabolic Steroids**

Key words: Prostate, **Anabolic Steroids**, nandrolone, morphometry,

Correspondence Address

Luciano Alves Favorito MD, PhD

Rua Professor Gabizo 104/201 - Tijuca - Rio de Janeiro -RJ - Brazil

CEP: 20271-062

Telephone: 55(21) 25876499

Fax: 55(21) 38728802/25876121

E-mail: lufavorito@yahoo.com.br

Supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) and *Rio de Janeiro* State Research Foundation (FAPERJ).

ABSTRACT

Purpose: Anabolic-androgenic steroids (AAS) are used by professional and amateur athletes with the goal of improving athletic ability, appearance and muscle mass. Many adverse effects have been associated with AAS abuse, including disorders of the urogenital tract. This study aimed to assess the morphological modifications in the prostate ventral lobe of pubertal and adult rats chronically treated with supraphysiological doses of AAS using morphometric methods.

Methods: We studied 39 male Wistar rats weighing between 400g and 550 g. The rats were divided into four groups: (a) control rats, with 105 days of age (C105) (n = 7); (b) control rats with 65 days of age (C65) (n = 9), injected only with the vehicle (peanut oil); (c) treated rats, with 105 days of age (T105) (n = 10) and (d) treated rats with 65 days of age (T65) (n = 13). The treated rats were injected with nandrolone decanoate at a dose of 10 mg.Kg⁻¹ body weight. The steroid hormone and the vehicle were administered by intramuscular injection once a week for eight weeks. The rats were killed at 161 days of age (C105 and T105) and 121 days of age (C65 and T65) and ventral lobe of the prostate was dissected and processed for histology. The height of the acinar epithelium was measured in micrometers in photomicrographs of 400x magnification. The surface densities of the lumen, epithelium and stroma were calculated by the point intercepts method, with a grid of 100 points superimposed on 200x magnified images. All analyses were performed with the ImageJ software. Student's-t-test was used for mean comparisons. In all cases, significance was set at 0.05.

Results: The weight (p<0.0001) and volume (p=0.0004) of the prostate ventral lobe showed differences between groups C65 and T65 and between C105 and T105. The epithelium height showed no difference between groups C65 and T65 (p=0.8509), but the T105 group showed an increase of 32% compared to C105 (p=0.0089). Concerning the lumen surface density presented

no difference between C65 and T65 ($p=0.9031$) and a decrease of 19% for regarding to T105 compared to C105 ($p=0.0061$). There was no difference in epithelium surface density between C65 and T65 ($p=0.7375$), but was 51% higher ($p=0.0065$) in T105 comparison with C105. Regarding stroma surface density, there were no differences between C65 and T65 or between C105 and T105. Finally, there was no difference in collagen pattern between C105 and T105, but T65 showed a predominance of collagen fibers compared to C65.

Conclusion: The use of anabolic androgenic steroids in rats promotes structural changes in the prostate. We observed structural changes in the weight, volume and epithelium height of the prostate ventral lobe and a predominance of collagen fibers.

INTRODUCTION

Anabolic androgenic steroids (AAS) are widely used by professional and amateur athletes with the goal of improving athletic ability, appearance and muscle mass. However, many adverse effects have been associated with AAS abuse, including disorders of the urogenital tract (1). Abuse of anabolic androgenic steroids may be an etiological factor in male infertility among recreational power athletes. Anabolic androgenic steroids and endurance exercise can also induce some subclinical alterations in the hypothalamic-pituitary-gonadal (H-P-G) axis (1,2).

The testicular changes resulting from AAS use are well documented in the literature (3). High doses of nandrolone decanoate reduce the volume of the testis and length of seminiferous tubules in rats (4). Studies of the structural changes in the prostate after AAS are scarce in the literature (5).

An experimental study with rats demonstrated that changes in the serum levels of testosterone can cause morphological alterations in prostate tissue (6). The administration of exogenous androgenic-anabolic steroids has been demonstrated to have profound effects on the human prostate gland, including an increase in prostatic volume, reduction of urine flow rate and alteration in voiding patterns (7).

This study aimed to assess the morphological modifications in the prostate ventral lobe of pubertal and adult rats chronically treated with supraphysiological doses of AAS, using morphometric methods.

MATERIAL AND METHODS

We studied 39 male Wistar rats weighing between 400g and 550 g. The rats were divided into four groups: (A) control rats, with 105 days of age (C105) (n = 7); (B) control rats with 65 days of age (C 65) (n = 9) injected only with the vehicle (peanut oil); (C) treated rats, with 105 days of age (T105) (n = 10) and (D) treated rats with 65 days of age (T 65) (n = 13).

The treated rats were injected with nandrolone decanoate at a dose of 10 mg.Kg⁻¹ body weight (8). The steroid hormone and the vehicle were administered by intramuscular injection once a week for eight weeks (8). The rats were killed at 161 days of age (C105 and T105) and 121 days of age (C 65 and T 65), and the ventral lobe of the prostate was dissected and its weight and volume were estimated (9). After the measurements each prostate was processed for histology.

The prostate was carefully removed and fixed in 10% buffered formalin. The prostate was routinely processed for paraffin embedding, and 5µm thick sections were obtained at 200µm intervals. Sections were stained with haematoxylin-eosin (HE) to assess the integrity of the tissue and with Picrosirius Red to identify different collagen types.

All selected fields were photographed and the images were captured with an Olympus BX51 microscope and Olympus DP70 camera. For the analysis of sections stained with HE, version 1.43 of the ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA) was used. The height of the acinar epithelium was measured in micrometers in photomicrographs of 400x magnification (Figure 1A). The surface densities of the lumen, epithelium and stroma were estimated by the point intercepts method, with a grid of 100 points superimposed on magnified images (Figure 1B) (10).

Means were statistically compared using the unpaired T-test ($p < 0.05$) with the Graph Pad Prism software (11).

RESULTS

The weight ($p<0.0001$) and volume ($p=0.0004$) of the prostate ventral lobe showed differences between groups C65 and T65 and between C105 and T105 (Figure 2).

The epithelium height of the prostate ventral lobe showed no difference between groups C65 and T65 ($p=0.8509$), but the T105 group showed a 32% increase compared to C105 ($p=0.0089$) (Figure 3).

Concerning lumen surface density of the prostate ventral lobe, there was no difference between C65 and T65 ($p=0.9031$) and T105 presented a decrease of 19% compared to C105 ($p=0.0061$). The epithelium surface density presented no difference between C65 and T65 ($p=0.7375$), but was 51% higher ($p=0.0065$) in T105 in comparison to C105. Regarding to stroma surface density, there were no differences between C65 and T65 and between C105 and T105 (Figure 4)

The collagen pattern was qualitatively analyzed by Picro-sirius Red staining. There was no difference between C105 and T105, but T65 showed a predominance of collagen fibers compared to C65 (Figure 5).

DISCUSSION

Anabolic-androgenic steroids are synthetic derivatives of testosterone and are important pharmacologically for their use in the treatment of various medical conditions such as growth deficiency, some blood disorders and osteoporosis. Androgens play a crucial role in the development of male reproductive organs such as the epididymis, vas deferens, seminal vesicle, prostate and penis (6). The use of anabolic-androgenic steroids can lead to various body changes, including the male genital system (12-14).

Many studies have been published reporting structural changes of testes after AAS use (3-5). High doses of nandrolone decanoate reduce the testis volume and length of seminiferous tubules in rats (4). It is also clearly established that follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone from the pituitary gland have growth-promoting effects on testis development and that administration of exogenous androgens suppresses the serum luteinizing hormone and FSH level in humans and rats (3).

The prostate is influenced by the serum levels of testosterone, and the use of AAS can also cause morphological changes in prostate tissue (6). These findings suggest that AAS can provoke functional changes and diseases of the prostate as well as lowered fertility.

Androgens are needed for puberty, male fertility and male sexual function. High levels of intratesticular testosterone, secreted by the leydig cells, are necessary for spermatogenesis (15). Testosterone is a critical hormone for prostate development, growth and maintenance. The enzyme 5-alpha-reductase seems to play an important role by converting androgens into dihydrotestosterone, which acts in the cell nucleus of target organs, such as male accessory

glands, skin and prostate. Prostatic morphogenesis is determined not genetically, but by exposure to androgens produced by the testes in the fetus (16).

At the age of sexual maturity, the secretory activity of the epithelium and the differentiation of smooth muscles are also maintained by androgens. In the prostate, luminal and basal epithelium as well as stroma and smooth muscle cells express ARs at sexual development and hence are capable of mediating androgen's actions (15-18). Thus, in response to androgens, prostate cells interact in an autocrine-paracrine way, influencing various aspects of the growth of this gland in normal and diseased states (16-18).

Several studies have shown that the prostate undergoes more marked alterations in epithelial and stromal compartments after hormonal and surgical ablation. These procedures lead to a decrease in glandular function, with consequent declines in epithelium thickness and stromal volume (2,16).

The rodent prostate has a complex structure, consisting of a ventral prostate (VP), lateral prostate (LP) and anterior prostate or coagulating gland (19). The ventral lobe is one of the main targets of the action of androgens in the prostate of, the reason it is widely used in experiments regarding hormones (16). Besides this, the ventral prostate has only a small quantity of epithelial folds, unlike the other prostate lobes in rats (20). For this reason, we decided to evaluate the morphology of the ventral lobe instead of the others.

A recent study investigated the structural alterations of the rat prostate after treatment with AAS for 14 weeks in animals weighing between 250 and 300 g (5). The authors concluded that nandrolone decanoate causes atrophic changes in the components of the rat prostate. In our study we observed that the use of AAS causes changes in the prostate morphology after briefer

treatment (8 weeks), and that the changes are less severe in pubertal animals and more severe in adult.

Although we used a similar method, our results were quite different from those of Karbalay-Dust (5). The height of the epithelium increased 32% in the groups of 105-day-old animals, a parameter not altered in the previous study. That study also found that the use of AAS diminished the density of the lumen, epithelium and stroma. In contrast, we analyzed the surface density and found that the lumen diminishes, the epithelium enlarges and the stroma do not change after treatment with AAS.

Therefore, the use of anabolic-androgenic steroids in rats promotes structural changes in the prostate. We observed changes in weight, volume and epithelium height of the ventral lobe and a predominance of collagen fibers. These alterations seem to be more severe in adult animals.

REFERENCES

- 1) Lucia A, Chicharro JL, Perez M, Serratosa L, Bandres F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol* 1996; 81: 2627–36.
- 2) Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effects of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav* 1997; 62: 23- 30.
- 3) Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Ardekani FM. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. *APMIS*. 2005; 113: 122- 125.
- 4) Shokri S, Aiteken RJ, Abdolvahhabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, Ejtemaeimher S, Ahmadian S, Minaei B, Naraghi MA, Barabarestani M. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone decanoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & Clinic Pharm & Toxic*. 2009; 106: 324- 330.
- 5) Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the rat prostate. *Micron*. 2006; 37: 617- 623.
- 6) Justulin LA, Ureshino RP, Zandoni M, et al. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biol Int*. 2006; 30: 354- 364.
- 7) Wemyss-Holden SA, Hamdy FC, Hastie KJ. Steroid abuse in athletes, prostatic enlargement and bladder outflow obstruction is there a relationship? *Br J Urol*. 1994; 74(4): 476- 8.
- 8) Fortunato RS, Marassi MP, Chaves EA, Nascimento JHM, Rosenthal D, Carvalho DP. Chronic administration anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *Med Sci Sports Exerc*. 2006; 38: 256- 261.

- 9) Sherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970; 26: 57- 60.
- 10) Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMI*. 1988; 196: 379- 394.
- 11) Sokol RR, Rohlf FJ: In: Biometry, 3rd ed. New York: Freeman WH, 1995.
- 12) Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic fibers. *Cell Biol Int*. 1996; 20(1): 15- 27.
- 13) Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE. Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart*. 2004; 90: 473- 475.
- 14) Pereira-Junior PP, Chaves EA, Costa-e-Souza RH, Masuda MO, Carvalho ACC, Nascimento JHM. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Euro J Physiol*. 2006; 96: 487- 494.
- 15) Shahidi TN. Review of chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther*. 2001; 23: 1355- 1390.
- 16) Bruchovsky N, Lesser B, et al. Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam Horm*. 1975; 33: 61- 102.
- 17) Bronson FH, Matherine CM. Exposure to anabolic-androgenic steroids shortens life span of male mice. *Med Sci Sports Exerc*. 1997; 29:615- 619.
- 18) Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroids on the sexual behavior of intact male rat. *Horm Behav*. 1997; 31: 35- 46.
- 19) Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod*. 1991; 45(2): 308- 21.

20) Roy-Burman P, Wu H, et al. "Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development." *Endocr Relat Cancer*. 2004; 11(2): 225- 54.

FIGURES

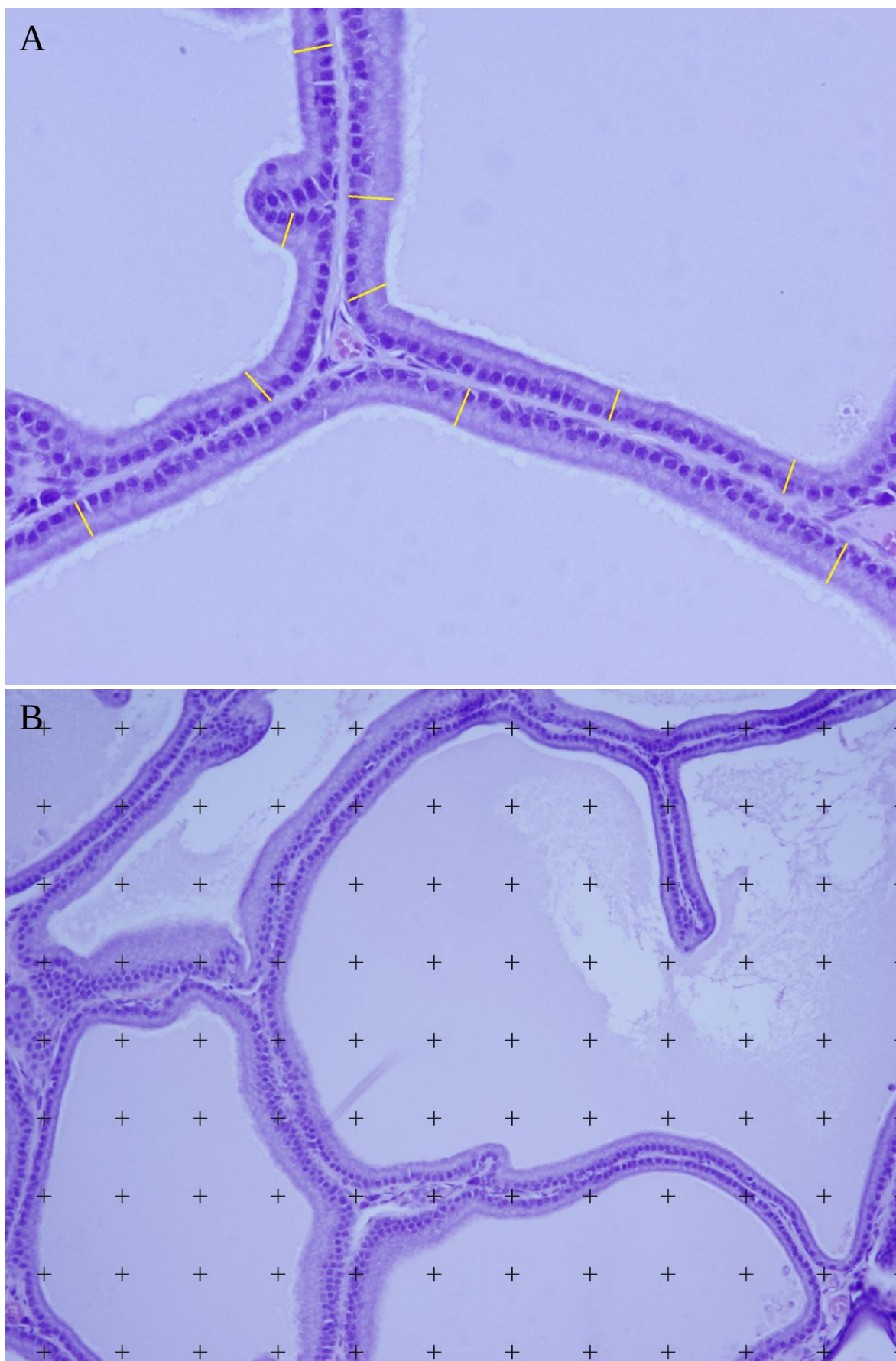


Figure 1: Photomicrographs of the rat prostate ventral lobe showing the morphometric features. A) The height of the acinar epithelium (yellow) was measured in micrometers in photomicrographs of 400x magnification using the Image J software. HE X 400. B) The surface density of ventral lobe prostate lumen, epithelium and stroma were estimated by the point intercepts method, with a grid of 100 points superimposed on magnified images using the Image J software. HE X 400.

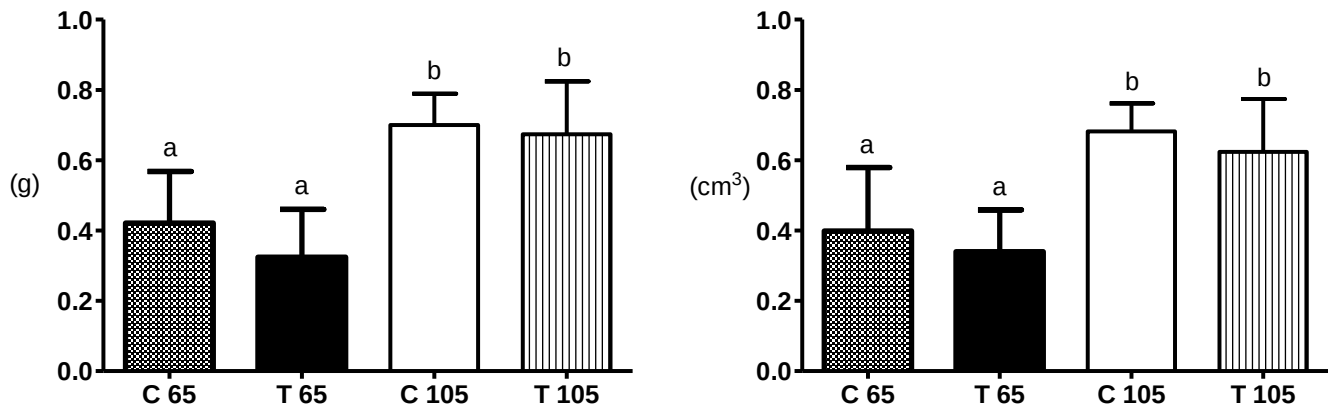


Figure 2 – Comparative graphs between prostate ventral lobe weight (g) and volume (cm³) of treated and control rats. Data expressed as mean and SD. $p < 0.05$. The analysis showed difference between C65 and T65 groups, as well as between C105 and T105 groups. Weight: $p < 0.001$ and volume: $p = 0.0004$.

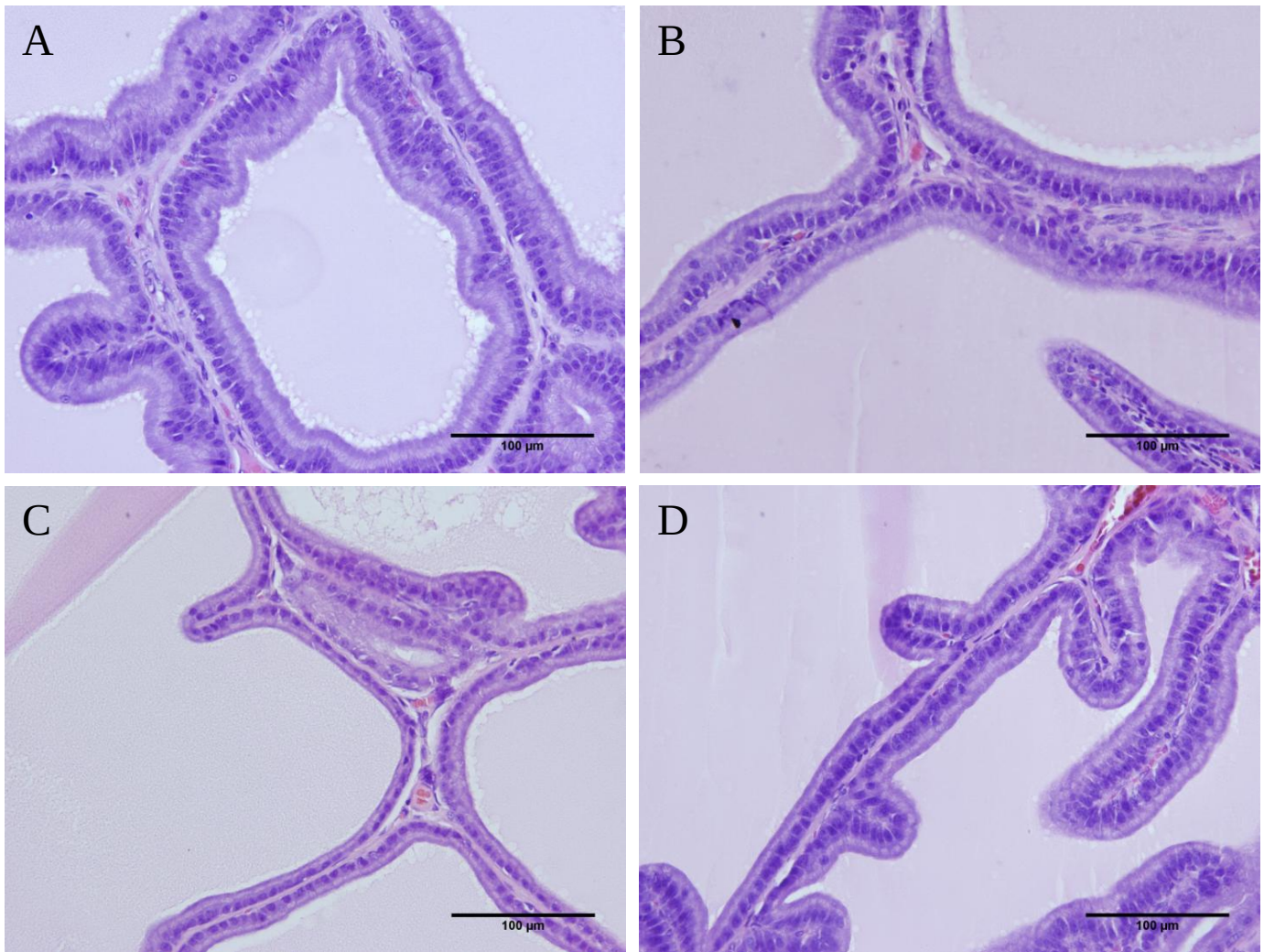


Figure 3 – Photomicrographs of the rat prostate ventral lobe group showing the epithelium height. The epithelium height showed no difference between groups C65 and T65, but the T105 group showed an increased of 32% compared to C105. A) Rat prostate ventral lobe of group C65. HE 400X. B) Rat prostate ventral lobe of group T65 HE 400X. C) Rat prostate ventral lobe of group C105 HE 400X. D) Rat prostate ventral lobe of group T105 HE 400X.

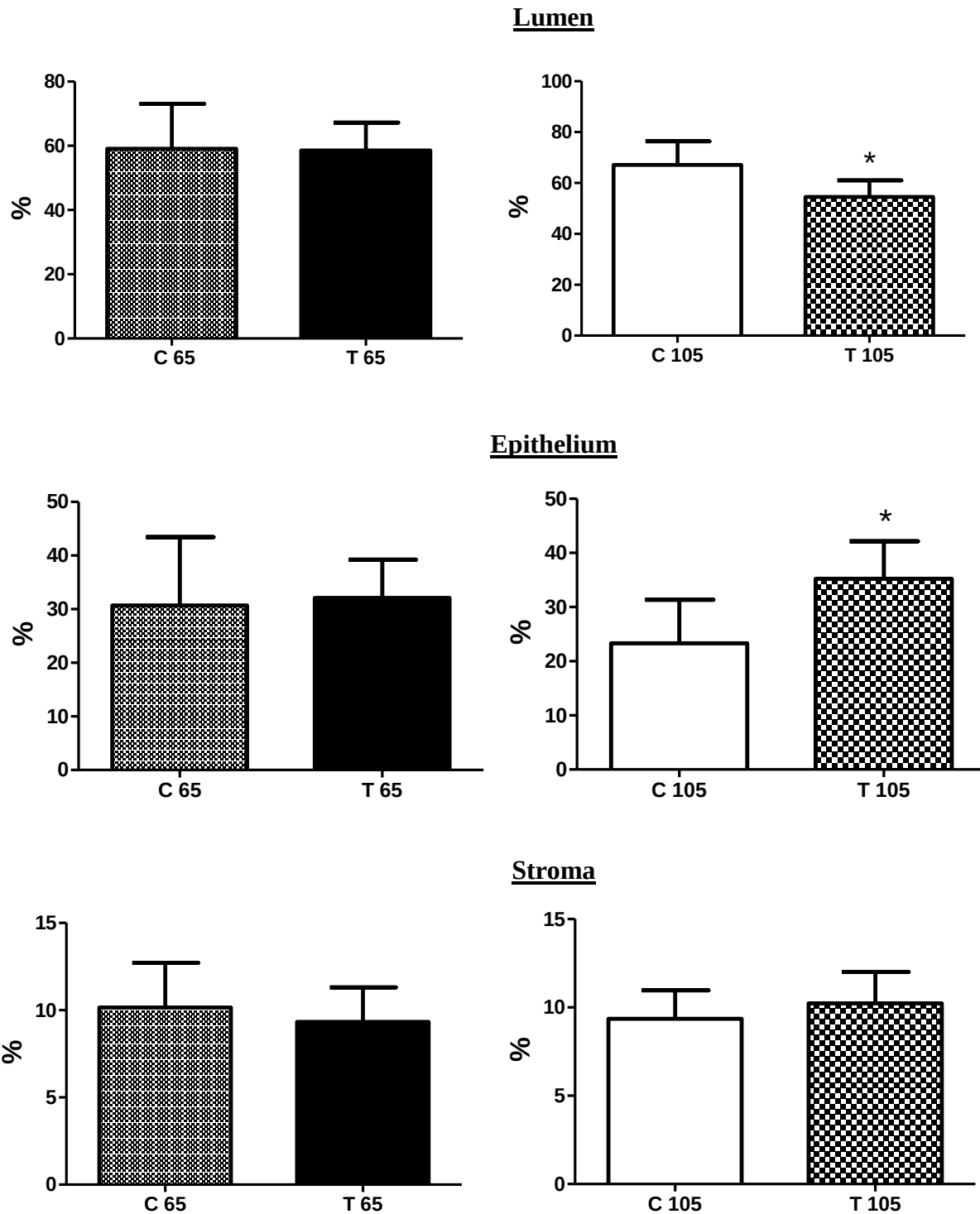


Figure 4 – Comparative graphs between surface densities of the lumen, epithelium and stroma of control and treated rats. Data expressed as mean and SD. * $p < 0.05$. The lumen surface density presented no difference between C65 and T65 ($p = 0.9031$) and for T105 presented a decreased of 19% compared to C105 ($p = 0.0061$). The epithelium surface density presented no difference between C65 and T65 ($p = 0.7375$), but increased by 51% ($p = 0.0065$) in T105 in relation to C105.

There were no differences in stroma surface density between C65 and T65 as well as between C105 and T105.

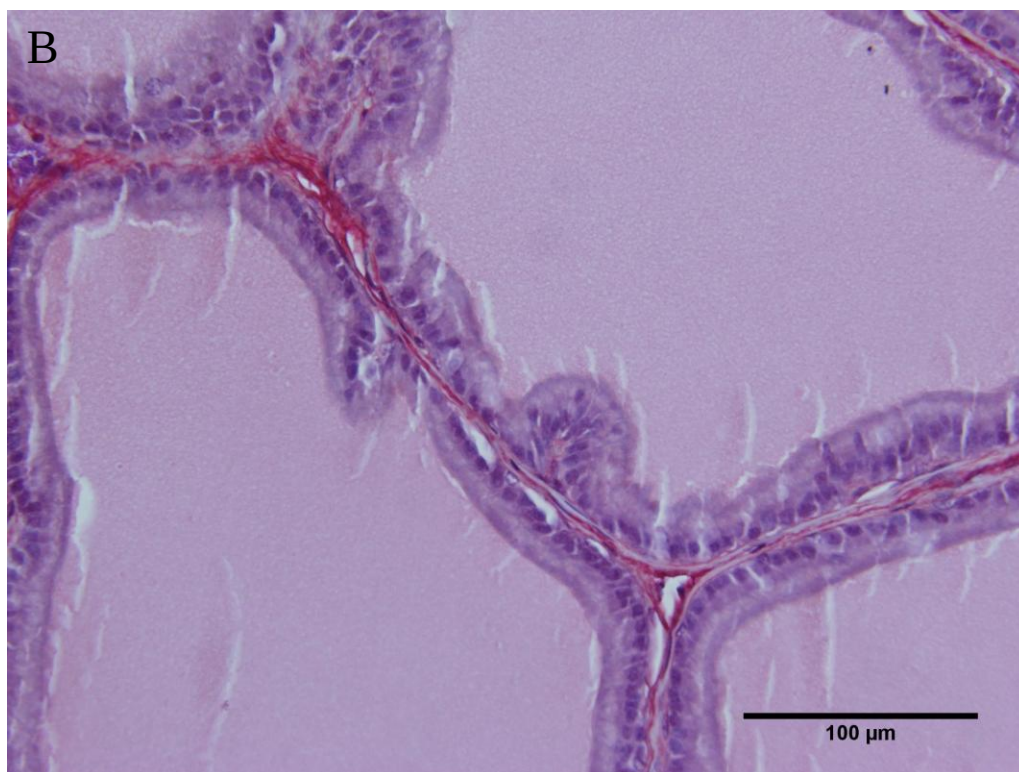


Figure 5 – Photomicrographs showing prostate collagen of rat groups. A) Ventral prostate lobe of group T65. The photomicrograph shows predominance of collagen (red). Picrosirius Red 400X. B) Ventral lobe of group C65. Decreased presence can be observed of collagen (red). Picrosirius Red 400X.

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo científico

The screenshot shows a web browser window displaying the 'Andrology' journal submission confirmation page. The page header includes the journal title 'ANDROLOGY' and the ScholarOne Manuscripts logo. A navigation bar shows 'Main Menu' and 'Author Dashboard'. The main content area is titled 'Submission Confirmation' and includes a thank-you message. A box contains the following information:

Manuscript ID:	ANDR-2012-0294
Title:	THE PROSTATE AFTER ANABOLIC ANDROGENIC STEROIDS. A MORPHOMETRICAL STUDY IN RATS.
Authors:	vargas, Rafael favorito, luciano costa, waldemar benchmir, elio oliveira, leonardo sampaio, francisco frankfield, stephan
Date Submitted:	30-Dec-2012

Below the box are links for 'Print' and 'Return to Dashboard'. At the bottom, there is a footer with copyright information for ScholarOne Manuscripts v4.10.0, a Twitter link, and a link to the Terms and Conditions of Use.

ANEXO B



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/036/2012 sobre "**ANÁLISE DA PRÓSTATA DE RATOS SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ESTEROIDE ANABÓLICO ANDROGÊNICO**", sob a responsabilidade de **Waldemar da Silva Costa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **18/05/2012**. Este certificado expira em **18/05/2016**.

Rio de Janeiro, 18 de Maio de 2012.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Alex C. Manhães
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO C

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL PROTOCOLO PARA PROCESSAMENTO DE MATERIAL

DATA:/...../.....

Técnico/Pesquisador.....

Numero de protocolo.....

Tipo de material :.....

Fixador.....

01-Desidratação:

Álcool 70% (30')..... a

Álcool 80% (30')..... a

Álcool 90% (30')..... a

Álcool 95% (30')..... a

Álcool 100% (45')..... a

Álcool 100% (1h)..... a

02-Diafanização:

Xilol I (45')..... a

Xilol II (1h)..... a

03-Impregnação:

Parafina I (45')..... a

Parafina II (1h)..... a

04-Inclusão:

Observações:

.....

Responsável:

ANEXO D

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL
PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO COM H&E

Hematoxilina e Eosina – HE

Procedimentos:

- Desparafinar em duas mudas de xilol (10 minutos cada);
- Hidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Hidratar em álcool 90%, 80% e 70% (1 minuto cada);
- Lavar em água destilada;
- Corar em Hematoxilina de Delafield (2 a 5 minutos);
- Lavar em água corrente (3 a 5 minutos);
- Desidratar em álcool 70%, 80% e 90% (1 minuto cada);
- Desidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada);
- Montar com Bálsamo do Canadá ou Entellan.

Resultados:

Núcleo: Azul

Citoplasma: Rosa

ANEXO E

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO LABORATÓRIO DE PESQUISA UROGENITAL PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO COM “PICO SIRIUS RED”

Picro Sirius Red

Procedimentos:

- Desparafinar em duas mudas de xilol (10 minutos cada);
- Hidratar em álcool absoluto, 90%, 70% e água destilada (3 minutos cada);
- Corar em Solução de Sirius Red 0,1% (1 hora);
- Passar em duas mudas de HCl 0,01N (1 minuto cada);
- Lavar em água destilada;
- Corar em Hematoxilina de Harris (6 minutos);
- Lavar em água corrente;
- Desidratar em álcool 70% e 90% (2 minutos cada) e duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada);
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada);
- Montar com Bálsamo do Canadá ou Entellan.

Resultados:

Fibras e Fibrilas colágenas: vermelho

Núcleo: roxo

Com polarização: - Fibras de colágeno tipo I: amarelo ou vermelho.

- Fibras de colágeno II: Variável
- Fibras de colágeno tipo III: verde