

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NO
METABOLISMO DA PRÓSTATA DE RATOS UChB
(bebedor voluntário de etanol a 10%)

GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

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

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NO
METABOLISMO DA PRÓSTATA DE RATOS UChB
(bebedor voluntário de etanol a 10%)

GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

PROF. DR. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

PROF^a. DR^a. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

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

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Teixeira, Giovana Rampazzo.

Influência do exercício físico resistido no metabolismo da próstata de ratos UChB (bebedores voluntários de etanol a 10%) / Giovana Rampazzo Teixeira.
- Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Francisco Eduardo Martinez

Co-Orientadora: Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Capes: 20601000

1. Próstata. 2. Exercícios físicos. 3. Álcool.

Palavras-chave: Apoptose; Etanol; Exercício físico; Metabolismo de lipídios; Proliferação celular; Próstata ventral.

Dedicatória

PRIMEIRAMENTE A DEUS, JESUS E MARIA NOSSA MÃE...

Por conduzir os meus passos.

AOS MEUS PAIS OSMAR DE ASSIS TEIXEIRA E
MAURA I. RAMPAZZO TEIXEIRA...

*A minha eterna gratidão, por acreditar nos meus sonhos e apoiar minhas decisões.
Mesmo distante estavam presente em minha vida com incansável incentivo.*

AOS MEUS IRMÃOS JUNIOR RAMPAZZO TEIXEIRA E
MARIA ISABEL RAMPAZZO TEIXEIRA...

Pela amizade e companheirismo.

Dedico a essas pessoas maravilhosas esse trabalho

Giovana Rampazzo Teixeira

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Orientador Francisco Eduardo Martinez

Que dedicou seu tempo e grande empenho no decorrer do trabalho. Agradeço por acreditar nos meus ideais que resultou em uma bela parceria. Será sempre uma referência para minha existência profissional e pessoal.

A Co-Orientadora Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Pelo constante apoio no decorrer do trabalho.

Aos Amigos Luiz Gustavo Chuffa, João Paulo A. Amorim, Leonardo Oliveira Mendes e Beatriz Ap. Fiorucci

Foram momentos ímpares, marcados pelo resto de minha vida, desde o acadêmico até o mais descontraído. Vocês foram imprescindíveis na elaboração, execução e finalização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Wagner José Favaro

Os meus agradecimentos pelo incentivo, ensinamentos, exemplo de competência e amizade, o meu respeito incondicional.

A Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi e Prof. Dr. Sérgio Pereira

A minha gratidão e reconhecimento pela disponibilidade e dedicação.

Ao auxiliar acadêmico Gelson Rodrigues do Departamento de Anatomia IBB/UNESP pelo auxílio e amizade durante todos os momentos de rotina e processamento dos materiais.

Ao servidor público Wanderley Thiago da Silva (Biotério Central) pelos auxílios durante o desenvolvimento deste projeto.

A professora Olga Cristina de Mello Malheiro por ter contribuído diretamente na minha formação e pela amizade durante este período.

Aos membros do grupo de pesquisa Biologia da Reprodução do Departamento de Anatomia IBB/UNESP, por todas as contribuições na execução do projeto.

Aos professores, Profa. Dra. Janete Francia, Profa. Dra. Eunice Oba e Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi por toda a contribuição dada ao projeto e principalmente por ceder às instalações dos laboratórios de pesquisa onde foi processado parte do material.

A secretária do Departamento de Anatomia Cristiane Abe por todo o auxílio e contribuição.

Aos secretários da seção da Pós-Graduação por todos os serviços realizados e pela amizade durante este período.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia Paulo Sérgio da Silva e Luciano Alves da Cunha, pelo incentivo e ensinamentos nas aulas de anatomia.

Ao programa de pós-graduação Biologia Geral Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Aos professores do Programa de Biologia Geral e Aplicada pela aprendizagem e incentivo.

As amigas, Carol Barça e Ludmila Canuto, por toda a amizade, apoio e companheirismo vocês estarão sempre em minha memória.

A todos meus familiares, meus avôs Antônio Rampazzo e Izabel Rampazzo, Wanda de Assis Teixeira, pela preocupação e carinho.

Ao meu avô Osvaldo Guimarães Teixeira (em memória) que não esteve presente durante a execução deste projeto, mas os momentos que passamos juntos foram decisivos para que eu pudesse chegar até aqui, foi um exemplo de pai, e amigo, saudades...

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Sumário

Resumo	7
<i>Abstract</i>	8
I - Introdução	9
1. Alcoolismo e modelos experimentais.....	9
2. Morfofisiologia da próstata.....	12
3. Metabolismo de lipídios.....	17
4. Exercício físico e próstata.....	19
5. Justificativa e objetivo	21
6. Referências bibliográficas.....	22
II- Capítulos	29
Capítulo 1	30
Capítulo 2.....	47
Capítulo 3	69
III - Conclusão	93

Resumo

O consumo de etanol está associado a alterações metabólicas e reprodutivas, causando doenças, como o câncer de próstata. Uma das medidas que pode amenizar a manifestação do câncer, incluindo o da próstata, é o exercício físico regular. Nosso trabalho tem o objetivo de avaliar a influência do exercício físico resistido e do etanol no metabolismo da próstata ventral de ratos adultos. Vinte ratos Wistar sem a preferência ao etanol, 20 ratos UChB, consumo alto de etanol e 20 ratos UChB abstinentes foram divididos em seis grupos. Três grupos foram submetidos ao treinamento físico com uma semana de adaptação e 13 semanas de treinamento, realizando quatro séries de 10 saltos com sobrecarga crescente de 50-70% do peso corporal preso ao tórax, com 60 segundos de descanso entre cada série, três vezes por semana. Os demais grupos permaneceram sedentários. Dois dias após a última sessão de treinamento, os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação, o sangue e as regiões intermediária e distal da próstata ventral foram coletados e processados para análises imunohistoquímicas, *Western Blot*, hormonais e bioquímicas. Nossos resultados sugerem que o exercício físico altera o metabolismo prostático através das interações parácrinas prevenindo as lesões prostáticas.

Palavras-chave: etanol, exercício físico, próstata, metabolismo de lipídios, proliferação celular e apoptose.

Abstract

Ethanol consumption is associated with reproductive and metabolic changes, causing diseases such as prostate cancer. The ethanol chronic consumption of is associated with prostate cancer. One of the measures that can lessen the manifestation of cancer, including prostate, is regular exercise. Our work aims to evaluate the influence of resistive exercise and metabolism of ethanol in the ventral prostate of adult rats. Twenty rats without preference to ethanol, 20 UChB rats, ethanol high consumption and 20 UChB abstinent rats were divided into six groups. Three groups were subjected to physical training consisted of one week for adaptation and 13 weeks of physical training, performing four sets of 10 jumps with increasing overload of 50-70% body weight attached to the chest with 60 seconds rest between each series, three times per week. The other groups remained sedentary. Two days after the last training session, rats were euthanized by decapitation, blood and the intermediate and distal ventral prostate regions were collected and processed for immunohistochemical, western blot, biochemical and hormonal analysis. Our results suggest that exercise alters the metabolism of the prostate through paracrine interactions preventing prostate lesions.

Keywords: ethanol, exercise, prostate, lipid metabolism, cellular proliferation and apoptosis.

I-Introdução

1. Alcoolismo e modelos experimentais

O etanol é uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e incentivado pela sociedade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a mortalidade e limitação da condição funcional associada ao consumo de bebidas alcoólicas superam aquelas associadas ao tabagismo (OMS, 2002; Halsted, 2004). No Brasil, o alcoolismo figura como um dos mais graves problemas de saúde pública decorrente de complicações psíquo-somáticas e pela repercussão no meio social (Fortes & Cardo, 1991; Halsted, 2004). Estudos que associam o consumo de etanol com o surgimento do câncer de próstata têm se levado em conta a quantidade de etanol ingerida (doses/dia) e a qualidade das bebidas com alto valor alcóolico, permitindo diagnosticar as categorias do alcoolismo. Sendo assim, considera-se o consumo de menos de três doses por dia como moderado e mais que sete doses por dia como consumo abusivo (Rizos et al., 2010). O consumo abusivo de etanol causa em âmbito global cerca de 3% de todas as mortes ou 1,8 milhões de mortes anualmente. Estudos demonstraram que 10 a 18% dos casos de pacientes atendidos na emergência dos hospitais eram de casos relacionados com etanol (OMS, 2007). O etanol, depois de absorvido pelo trato gastro-intestinal, é transportado através da circulação portal ao fígado onde é oxidado. Apenas 2% a 10% do absorvido, é eliminado pelos rins e pulmões. No hepatócito, há três vias metabólicas com a capacidade de oxidar o etanol em aldeído acético: (1^a) o sistema da enzima etanol desidrogenase (ADH) na matriz citoplasmática, (2^a) o sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso e o da (3^a) catalase nos peroxissomos (Lieber & De Carli, 1991; Lieber, 1993; Murty, 2004).

O etanol e seus metabólitos provocam distúrbios generalizados, especialmente, nos sistemas nervoso central, genital masculino e nos órgãos hematopoiéticos. Atua também, diretamente, no fígado, no pâncreas, nos intestinos e glândulas endócrinas (Marks & Wright, 1978; Martinez et al., 1997, 2000, 2002, 2007; Cagnon et al., 2001, Fávaro & Cagnon, 2006; Cândido et al., 2007). No sistema genital, uma das principais conseqüências do etanol é o hipogonadismo que ocorre tanto no

homem como em animais de laboratório (Bannister & Lowosky, 1987). Alguns autores acreditavam que essa disfunção sexual estava relacionada à doença crônica do fígado (Van Thiel et al., 1974; Van Thiel & Lester, 1979). Posteriormente, demonstrou-se que a disfunção hepática não está associada à debilitação da função reprodutiva (Anderson et al., 1982). Entretanto, as alterações relativas ao sistema genital apresentam-se exacerbadas em indivíduos com cirrose alcoólica (Wang et al., 1991). Assim, é conhecido que o etanol atua diretamente sobre o testículo, alterando a síntese de testosterona testicular (Banister & Lowosky, 1987; Anderson et al., 1989; Saxena et al., 1990; Tadic et al., 2000) e, indiretamente, provocando efeitos deletérios sobre o eixo hipotálamo-hipófise-testículo, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig (Salomen & Huhtaniemi, 1990; Tadic et al., 2000; Fávaro & Cagnon, 2008).

O uso de roedores em estudos experimentais sobre alcoolismo, com dosagens que variam de 5% a 40%, tem elucidado aspectos biológicos e bioquímicos relacionados ao alcoolismo, durando dias (alcoolismo agudo), semanas ou meses (alcoolismo crônico) (Cícero & Badger, 1977; Banderas et al., 1992).

A influência do etanol sobre o sistema genital masculino foi demonstrada através de vários métodos (protocolos) de indução ao alcoolismo experimental. Com base na literatura especializada, as principais alterações morfológicas observadas foram: lesões das células testiculares, diminuição dos diâmetros dos túbulos seminíferos, depressão da testosterona sérica, redução do peso das glândulas sexuais acessórias, atrofia significativa das células epiteliais secretoras e hipertrofia estromal das vesículas seminais, glândula de coagulação (próstata anterior), próstatas ventral, dorsolateral e lesão das organelas envolvidas no processo secretor da próstata ventral (Martinez et al., 1997; Cagnon et al., 1998; Gomes et al., 2002; Fávaro & Cagnon, 2006). Os lobos prostáticos de roedores são suscetíveis às alterações morfológicas e inflamatórias decorrentes do alcoolismo crônico (Morón et al., 2000; Cagnon et al., 2001; Fávaro & Cagnon, 2006). Também, Fávaro & Cagnon

(2006) verificaram intenso processo inflamatório associado a diferentes lesões prostáticas em ratos alcoolistas crônicos.

O consumo excessivo de etanol leva ao desequilíbrio na taxa testosterona/estradiol, diminuindo a testosterona sérica e aumentando o estradiol circulante (Tadic et al., 2000). Fávoro & Cagnon (2008) demonstraram que o alcoolismo crônico aumentou a expressão do ER α , devido às altas concentrações séricas de estradiol, e diminuiu a imunolocalização do AR e ER β , devido à redução dos andrógenos, podendo ser considerado indutor de lesões prostáticas.

A exposição aguda e crônica de etanol em humanos também induz a hiperprolactinemia, condição comum na gestação, na lactação e no tumor de hipófise (Bernichlein et al., 2010). A hiperprolactinemia resulta em amenorréia nas mulheres, impotência nos homens e queda na libido em ambos (Molitch et al., 1997; Bernichlein et al., 2010). Estudos utilizando diferentes modelos experimentais demonstraram que altas concentrações de prolactina relacionaram-se a hiperplasia e hipertrofia prostática em roedores (Van Coppenolle et al., 2001, Kindblom et al., 2003).

O consumo crônico de etanol está associado ao aumento do retículo endoplasmático liso no fígado, local de oxidação do etanol (Gayotto & Alves, 2001). A manifestação mais frequentemente relatada no uso excessivo do etanol é o fígado gorduroso. A lipogênese aumentada pode ser considerada a forma das células desfazerem-se do excesso de íons hidrogênio. A atividade do ciclo do ácido cítrico fica alterada, pois as mitocôndrias utilizam os equivalentes de hidrogênio originados do metabolismo do etanol como fonte de energia em detrimento dos derivados do metabolismo dos ácidos graxos. A diminuição da oxidação dos ácidos graxos resulta no acúmulo hepático de lipídio (Lieber & De Carli, 1991). O consumo de etanol moderado aumenta o HDL plasmático (Hendriks et al., 1998; Van Tol et al., 1998; Van Der Gaag et al., 1999), triglicerídeos (Kato et al., 2003) e pode estar associado com a síndrome metabólica (Djousse' et al., 2004).

Desde a década de 40, pesquisadores têm investigado roedores com preferências ao consumo de etanol (Spanagel, 2000). Li et al. (1987) relataram a existência de pares de variedades de ratos de

consumo de etanol. Os ratos UChA e UChB (UCh = Universidade do Chile), os de Helsink, iniciados por Kalervo Eriksson, e os de Lumeng & Li em Indianópolis. As variedades AA (*Alko Alcohol*) e ANA (*Alko Nonalcohol*) de Helsink foram obtidas por cruzamentos alternados *inbreeding* com *outbreeding*. As variedades P (*Alcohol Preferring - 5-8g/kg/day*) e NP (*Non-Alcohol-Preferring - menos de 0,5g/kg/dia*) de Lumeng & Li têm sido obtidas por cruzamentos *outbreeding*. Além dessas variedades de ratos, existem variedades de camundongos, entre as de consumo voluntário mais elevado, está a C57BL/6 e entre as de consumo baixo, a BALB e DBA (McClearn & Rodgers, 1961). As variedades de ratos UChA e UChB constituem modelos raros para estudos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos dos efeitos do etanol, além do apetite e a tolerância, fatores do alcoolismo humano.

A variedade UChB (consumo voluntário alto de etanol) é adequada para investigações relacionadas à ingestão de etanol. Para que ocorra a manifestação da doença alcoolismo é necessário, além da predisposição genética, que o paciente tenha bebido etanol em grandes quantidades durante longo período, o que faz da variedade UChB adequado modelo experimental, pois possui predisposição genética para ingerir voluntariamente grandes quantidades de etanol a 10%. Há caminhos importantes para o enfoque dos estudos sobre o alcoolismo humano que podem ser investigados com o modelo UChB: a busca de marcadores genéticos que indiquem a predisposição ao alcoolismo, a busca de terapêuticas eficazes para o tratamento do alcoolismo e as alterações morfofuncionais provocados pela ingestão de etanol (Mardones, 1993; Martinez et al., 2000).

2. Morfologia da próstata

A próstata, glândula sexual acessória, é lugar de freqüente crescimento maligno ou benigno, constituindo foco de um dos maiores problemas de saúde pública. É glândula exócrina do tamanho de uma noz. Produz secreção que compreende a maior fração líquida no ejaculado humano (~30%) (Sampson et al., 2007), essencial para a mobilidade e fertilidade dos espermatozóides (Aumüller,

1989). O padrão da glandular prostático é comum nos mamíferos, no entanto, há detalhes que diferenciam as espécies. Nos roedores, estruturalmente, a próstata é constituída por pares de lobos (ventral, lateral e dorsal) de glândulas túbulo acinosas e estroma que circundam a uretra pélvica. A próstata anterior ou glândula de coagulação localiza-se na face côncava das vesículas seminais (Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Semelhante aos roedores, a glândula prostática em humanos apresenta lobos durante o desenvolvimento, no entanto, o tecido conjuntivo une os lobos, tornando-a sólida posteriormente. De acordo com a posição da uretra, a próstata humana pode ser dividida em zonas anterior, central, periférica e transicional (Wendell, 2000). Os lobos da próstata de ratos são formados com porções secretoras e ramificações do sistema de ductos excretores, inserido em estroma delicado. Encontra-se nos lobos ventrais e laterais ductos principais com ramificações grandes, ao passo que no lobo dorsal há ducto principal com numerosos ramos estreitos e curtos (Hayashi et al., 1991). O lobo dorsolateral é mais semelhante à zona periférica da próstata humana, local de maior incidência de carcinomas (Roy-Burman et al., 2004). Cada lobo possui características histológicas e secreção de proteínas específicas (Cunha et al., 2004). O lobo ventral é mais sensível a alterações hormonais, mas não tem homologia com a próstata humana (Burnstein, 2005, Roy-Burman et al., 2004).

Os ácinos prostáticos são revestidos de epitélio secretor com dois compartimentos morfológicamente distintos: o basal e o luminal ou secretor. Nesses compartimentos localizam três tipos células: a basal, a luminal ou secretora e a neuroendócrina (Miki, 2009). Essas células podem ser diferenciadas pela expressão ou co-expressão diferencial de citoqueratinas (CK) e antígenos de superfície (CD - *cluster* de diferenciação) (Berry et al., 2008). O estroma prostático é formado por complexo arranjo de células, musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos e pela matriz extracelular. Ressalta-se que os elementos estromais fornecem sinais biológicos e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Cunha & Matrisian, 2002; Miki, 2009).

A célula luminal prostática é o tipo mais freqüente tanto no epitélio normal quanto no hiperplásico e é responsável pela secreção do antígeno prostático específico (PSA) e da fosfatase ácida prostática (PAP) no homem (De Marzo et al., 1999) e pela prostateína e probasina no rato (Berry *et al.*, 2008). As células luminais são andrógeno-responsivas e andrógeno-dependentes (Taylor & Risbridger, 2008) e expressam o receptor de andrógeno (AR) e as citoqueratinas (CK) 8 e 18 (Wang et al., 2001), considerados biomarcadores das células luminais (De Marzo et al., 1999).

As células neuroendócrinas não são andrógeno-responsivas, sendo identificadas pela expressão da neurofisina, cromogranina A, sinaptofisina e calcitonina e pela ausência do PSA e do AR (Abrahamsson et al., 2000; Berry et al., 2008). Trata-se de tipo celular diferenciado que pode tornar-se modificado no câncer prostático onde apresenta alterações no número, na histologia e na função, sugerindo seu papel regulatório (Nelson et al., 2007; Ruscica et al., 2007).

As células basais são indiferenciadas e não apresentam atividade secretora (McNeal, 1988). Essas células não dependem de andrógenos para o seu crescimento, diferenciação, manutenção e sobrevivência, mas respondem indiretamente ao estímulo androgênico via fatores de crescimento derivados do estroma. Os fatores estromais agem sobre as células basais influenciando o repovoamento de células no compartimento celular luminal (De Marzo et al., 1999; Taylor & Risbridger, 2008). A expressão de AR em células basais é relativamente baixa comparada às células luminais (Leav et al., 1996). Por outro lado, as células basais expressam receptor de estrógeno e quando submetidas à terapia estrogênica proliferam-se (Collins & Maitland, 2006). Com relação aos biomarcadores, as células basais são normalmente identificadas pela ausência das principais proteínas secretoras da próstata (PSA e a PAP) (Epstein, 1993), da CK8 e CK18 e pela co-expressão de CK5 e CK14 (Van Leenders et al., 2000; Wang et al., 2001). A proteína p63, além de ser o biomarcador mais utilizado na identificação das células basais, é também empregada na diferenciação de células prostáticas com características benignas e neoplásicas (Yang et al., 1998; Farinola & Epstein, 2004). Apesar da literatura científica fornecer importantes informações fenotípicas da célula basal em

condições normais e experimentais, o seu exato papel funcional durante o desenvolvimento, funcionamento e carcinogênese ainda não estão claros (Berry et al., 2008; Taylor & Risbridger, 2008).

O desenvolvimento e crescimento da próstata normal dependem de processos biológicos de morfogênese, manutenção da atividade funcional, proliferação e diferenciação reguladas por andrógenos (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). Dados experimentais e clínicos apontam para o importante papel dos andrógenos na manutenção, gerenciamento e progressão de doenças como o câncer prostático. A testosterona e a diidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos que estimulam a diferenciação prostática (Hsing, 2002, Toorians et al., 2003). Importante representante do desenvolvimento e progressão do câncer de próstata é o AR. Os andrógenos exercem a maioria dos seus efeitos ao se ligarem e ativarem esses receptores (Swinnem, 2004). O AR promove o crescimento e a regulação da próstata normal e permanece presente em quase todos os tumores prostáticos, mesmo em tumores recorrentes independentes de andrógenos (Sadi et al., 1991; Van Der Kwast et al., 1991). Além dos andrógenos, outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002).

Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e alteram o eixo hipotálamo-hipófise-testículo, reduzindo a produção de andrógenos pelas células de Leydig, causando a involução do epitélio prostático e o crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002). Os efeitos estrogênicos na próstata resultam da ligação desses hormônios com seus receptores específicos α e β (ER α , ER β), expressados no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). Em estudo que utilizou tecido prostático recombinante de animais adultos *knockout* para os receptores estrogênicos α e β , Risbridger et al. (2001) demonstraram que a resposta do tecido prostático ao estrógeno requer mecanismos parácrinos, mediados tanto por receptores β do estroma como receptores α do epitélio. Experimentos observaram que os efeitos dos estrógenos sobre a

próstata resultam do balanço dinâmico entre os ER β e ER α envolvidos em mecanismos celulares (Adams et al., 2002; Weihua et al., 2002). Os ER β podem estar envolvidos no processo anti-proliferativo epitelial e também na diminuição do processo apoptótico epitelial (Imamov et al., 2004) e sua expressão é suprarregulada por andrógenos (Adams et al., 2002; Asano et al., 2003).

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção às lesões que atingem esse órgão. Dentre as lesões destacam-se a hiperplasia prostática benigna (HBP), o câncer prostático (CP), a neoplasia intraepitelial (NIP), a atrofia prostática (AP) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (Marcelli & Cunningham, 1999; Leav et al., 2001; De Marzo et al., 2003).

A HBP está associada ao envelhecimento, caracterizando-se por predominante proliferação estromal e, embora ocorra o aumento substancial do epitélio, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997; Krieg et al., 1993). A segunda maior causa de mortes por câncer na população ocidental masculina é o CP, considerado doença epitelial e, frequentemente, estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). O desenvolvimento do CP é de natureza endócrina e a ocorrência aumenta com a idade (Davies & Eaton, 1991). De acordo com Majumder et al. (2008), a NIP é clinicamente apontada como lesão precursora do adenocarcinoma invasivo e pode precedê-lo por até 10 anos. Estudos clínicos demonstraram que homens com NIP de alto grau possuem 17% a 35% de risco de desenvolver o CP. A AP também é considerada alteração prostática precursora do adenocarcinoma, associada com inflamação crônica (De Marzo et al., 2003). Em homens senis, áreas de atrofia epitelial são extremamente comuns na próstata (De Marzo et al., 2007). A AP é caracterizada pela redução do volume glandular preexistente e pode ser dividida em dois tipos: difusa (APD) e focal (APF) (De Marzo et al., 2003). APD resulta da diminuição dos andrógenos circulantes, comprometendo a próstata de forma relativamente uniforme. Em contraste, a APF pode não estar relacionada à diminuição das concentrações de andrógenos circulantes, comprometendo apenas parte da glândula (De Marzo et al., 2003).

A PIA é lesão do epitélio prostático que ocorre simultaneamente aos diferentes graus de inflamação intersticial adjacente. O termo PIA foi proposto por De Marzo et al. (1999) para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou de hiperplasia pós-atrótica (PAH), ocorrendo em associação à inflamação. Apesar da proliferação, a lesão não cresce em volume devido à possível perda celular que compensa a proliferação. Além disso, o epitélio em regeneração pode suprir a morte celular programada, ao menos temporariamente, para substituir as células “perdidas”, o que embasa o conceito de que a PIA é lesão regenerativa. Ainda, Putzi & De Marzo (2000) postularam que a PIA possa representar condição precursora da NIP ou do CP. Segundo De Marzo et al. (2003), todas as formas de atrofia focal da próstata são proliferativas e a ampla maioria está associada à inflamação, podendo se originar do estresse oxidativo aumentado, possivelmente, derivado das células inflamatórias adjacentes.

3. Metabolismo dos lipídios

O colesterol e outros depósitos de gordura acumulam-se em tumores sólidos (White, 1909). Desde então, estudos em seres humanos e em modelos animais têm apoiado a existência da relação entre o colesterol nos tecidos e secreções na próstata em crescimento. Estudos epidemiológicos não têm encontrado associação entre o colesterol circulante ligado ou não à dieta e o câncer (Wu et al., 1994; Veierod et al., 1997; Smith-Warner et al., 2002). As células prostáticas sintetizam colesterol endógeno através do mevalonato. No entanto, grande parte do colesterol que residem nas membranas celulares origina-se a partir da captação de lipoproteínas circulantes (Simons and Ikonen, 2000).

Os andrógenos aumentam a expressão de genes envolvidos no metabolismo dos lipídios. Fator determinante para a regulação do metabolismo dos lipídios são os SREBP (*sterol-regulatory element-binding protein*) que são sintetizados e ficam ancorados na membrana do retículo endoplasmático. O receptor de LDL (LDLR) é a glicoproteína da superfície celular que se conecta e internaliza LDL, principais transportadores de colesterol e ácidos graxos no sangue. A expressão de

LDLR é regulada pelo SREBP (Chen & Hughes-Fulford, 2001; Swinnen et al., 2004). Essa enzima apresenta-se inativa pela interação SREBP-SCAP (*SREBP-cleavage-activating protein*), permanecendo retida no retículo endoplasmático pelas proteínas de retenção INSIG (*insulin-induced gene*). O complexo SREBP-SCAP-INSIG é estabilizado pelo colesterol. Quando os esteróides são baixos, o complexo SREBP-SCAP é liberado do INSIG e migra para o complexo de Golgi, onde é proteoliticamente clivado e ativado o fragmento amino-terminal SREBP. O fragmento SREBP então é translocado para o núcleo, onde interage com sítios de transcrição de genes envolvidos na síntese de lipídios, de receptores lipídicos e no metabolismo de ácidos graxos e colesterol (Heemers et al., 2001; Swinnen et al., 2004; Sampath & Ntambi, 2006). Os receptores de andrógenos atuam principalmente no aumento da expressão de SCAP, alterando o balanço entre SCAP e sua proteína de retenção (INSIG), favorecendo a liberação do complexo SREBP-SCAP (Heemers et al., 2004). No entanto, o SREBP pode modular a atividade transcricional de AR nas células prostáticas. Suh et al. (2008) demonstraram que o SREBP suprime a transativação do AR competindo como coativadores e por ativar o recrutamento de histonas deacetilases. Portanto, a superexpressão de SREBP inibe a proliferação do câncer de próstata e o crescimento de tumores em modelos animais.

Os receptores CD36 e LIMPII são denominados de *scavenger receptors* com a função de limpeza (varrer) e por reconhecer e remover macromoléculas desnecessárias no meio celular, como a LDL (lipoproteínas de baixa densidade) modificada. A LIMPII (*Lysosomal Integral Membrane Protein II*) é identificada como membro da família *scavenger receptor* classe B como a CD36 (Fujita et al., 1992). Crombie & Silverstein (1998) relataram que o LIMPII pode ter função semelhante ao CD36, além de receptor de lipídios, pode conectar-se a trombospondina. CD36 é a glicoproteína de superfície celular presente em plaquetas, monócitos, alguns tipos de células endoteliais, epiteliais e eritrócitos (Greenwalt et al., 1990; 1992; Knowles et al., 1984). O CD36, além de receptor de lipídios, também é um dos receptores de transmembrana da trombospondina (TSP), glicoproteína que naturalmente inibi a angiogênese, essencial para o crescimento tumoral (Calvo & Vega, 1993; Vallbo

et al., 2004; Vallbo & Damber, 2005; Damber et al., 2006). O papel da TSP no desenvolvimento do câncer prostático ainda não foi elucidado, porém Vallbo et al. (2004) observaram que a TSP está expressa em próstata normal e BPH, porém sua expressão está diminuída em tecido prostático pré-maligno (PIN – neoplasia intra-epitelial) e está ausente no câncer prostático.

4. Exercício físico e próstata

Atividade física é qualquer movimento do corpo que resulta em gasto energético (Saba, 2001). A diferença entre exercício físico e atividade física é a sistematicidade do movimento, ou seja, é a atividade física organizada em início, meio e fim de modo que o praticante atinja pela sua condição corporal fins pré-determinados (Saba, 2001).

O exercício resistido tem demonstrado provocar resposta hormonal significativa de forma aguda, crítica para o crescimento de tecidos musculares e remodelação, e alterando as concentrações hormonais de forma crônica, levando ao aumento na força muscular e hipertrofia. Hormônios anabólicos, como a testosterona e a superfamília dos hormônios do crescimento (GH) têm se mostrado elevados após 15-30 minutos de exercícios resistido adequado (Kraemer et al., 2005). Protocolos de alto volume, intensidade de moderada a alta, utilizando intervalos de descanso curto e estressando grande massa muscular, tendem a produzir maiores elevações hormonais agudas em comparação com o volume baixo. Outros hormônios anabólicos, como insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1) é fundamental para o crescimento do músculo esquelético. Para a produção de força e liberação de energia durante o exercício resistido é necessário a elevação de catecolaminas (Kraemer et al., 2005).

A importância do exercício físico para manutenção da vida saudável é documentado e abrange todos os aspectos da vida, desde a simples melhora nas funções fisiológicas, como a capacidade cardiovascular respiratória e o estado metabólico, incluindo a redução de derrame e a redução da mortalidade (Blair & Morris, 2009). Outros benefícios do exercício físico são redução de riscos

cardiovasculares, controle da hipertensão, melhora do perfil lipídico, prevenção do diabetes tipo 2, benefícios no metabolismo ósseo e composição corporal (Blair & Morris, 2009).

Estudos experimentais em animais e epidemiológico em humanos sugerem a correlação entre a realização do exercício físico e a diminuição no desenvolvimento do câncer. Dados disponíveis na literatura especializada indicam que o exercício físico tem diferentes associações com diferentes tipos de cânceres (Lee, 2003). O exercício físico está associado com redução do risco de câncer de cólon e de reto, tanto em homens como em mulheres (Blair & Morris, 2009), redução de 20-30% do câncer de mama (Lee et al., 2001), parece estar relacionado com câncer de pulmão (Lee *et al.*, 2001), no entanto, não estão claros os efeitos do exercício físico no câncer de próstata. O exercício físico diminui a produção de testosterona livre, aumentando a quantidade circulante do complexo globulina ligada a hormônios esteróides (SHRG) que amarram esses hormônios esteróides e reduzem a sua habilidade de influenciar os tecidos alvos (Friedenreich & Orenstein, 2002), pois o câncer prostático está relacionado com o aumento da testosterona livre em homens.

Sugere-se que o exercício físico pode reduzir o risco de câncer prostático através de mudanças no estilo de vida, interagindo com dieta composta por pouca gordura, promovendo redução de insulina, IGF-I e testosterona livre, junto com aumento da proteína ligada ao hormônio sexual (SHBP) e IGFBP-I (Tymchuk et al., 1998; Barnard et al., 2003). Leung et al. (2004) concluíram que o exercício regular com intensidade moderada em homens idosos altera o eixo IGF *in vivo*, reduzindo o IGF-I e aumentando o IGFBP. Essas mudanças séricas afetam as células do câncer prostático da variedade LNCaP *in vitro*, aumentando a proteína p53. Os resultados sugerem o mecanismo para explicar dados epidemiológicos que relatam a redução do risco de câncer de próstata em homens que são ativos fisicamente.

O IGF-I é importante durante o crescimento e desenvolvimento, sendo controlado primariamente pelo hormônio do crescimento (Benbassat et al., 1997). Com a idade, o hormônio do crescimento declina como o IGF-I (Benbassat et al., 1997). A insulina estimula a produção pelo

fígado de IGF-I (Shimizu et al., 1991). A redução da insulina coincide com o aumento da IGFBP-I em praticantes de exercício regular (Barnard et al., 2003). Em adição, os efeitos da insulina no fígado alteram o eixo IGF-I e também suprime a produção de globulina ligada ao hormônio esteróide (SHBG) que irá aumentar a quantidade de testosterona livre disponível para interagir com as células CaP dependentes de andrógeno (Plymate et al., 1988, 1990).

Outro mecanismo onde o exercício físico moderado em longo prazo pode interferir em patologias prostáticas é reduzindo a atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). Há a hipótese que o exercício físico deva ter efeitos benéficos na BPH que é em parte mediada pela atividade do SNAS. Platz et al. (1998) sugeriram, em humanos, que a diminuição da atividade do SNAS, após o exercício físico, possui efeito benéfico sobre a incidência de sintomas no trato urinário, incluindo alterações na próstata e na uretra prostática. Segundo esses autores, várias evidências suportam o papel da atividade do SNAS sobre a sintomatologia BPH. A expressão de adrenoreceptores $\alpha 1$ no estroma prostático, comumente em células musculares lisas, está relacionada com a contratilidade da musculatura lisa dependente de norepinefina. A redução sistêmica na atividade do SNAS com atividade física regular diminui o tônus da musculatura lisa prostática, levando ao desaparecimento dos sintomas da BPH.

5. Justificativa e objetivo

Uma das causas das lesões prostáticas é o consumo excessivo de etanol. O etanol pode influenciar o metabolismo de andrógenos e aumentar os estrógenos (Thorpe & Neal, 2003). Cândido et al. (2007), utilizando ratos machos UChB, bebedores voluntários de etanol a 10%, demonstraram que o consumo de etanol em altas doses produz alterações no epitélio e no estroma prostático. O etanol interfere na homeostase epitélio-estromal, sendo efetivo agente desencadeador de doenças prostáticas, incluindo o carcinoma prostático (Cândido et al., 2007). O exercício físico resistido pode atuar como terapêutica e auxiliar no tratamento de lesões prostáticas ou até mesmo câncer. Relatos indicam que o

exercício físico muda a progressão do tumor (Westerlind et al. 2003; Bacurau et al., 2007) e aprimora o bem estar psíquico e a qualidade de vida dos pacientes com câncer (Segal et al., 2003; Courtneya, 2003). Nosso objetivo foi avaliar a influência do exercício físico resistido no metabolismo do lobo ventral da próstata de ratos UChB.

6. Referências bibliográficas

- Abrahamsson PA, Dizeyi N, Alm P, Di Sant’Agnese PA, Deftos LJ, Aumuller G. Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate*. 2000; 44:181-186.
- Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger SM. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*. 2002; 52:69-81.
- Anderson RA JR, Phillips FJ, Oswald C. Hormonal imbalance and alterations in testicular morphology induced by chronic ingestion of ethanol. *Biochem Pharmacol* 1982; 29:1409-19.
- Anderson RA Jr., Philips JF, Zaneveld LJD. Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 α -reductase in the Swiss-Webster mouse. *J Androl* 1989;10:28-36.
- Asano K, Maruyama S, Usui T, Fujimoto N. Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr. J.* 2003; 50:281-287.
- Aumüller, G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol* 1989; 179:519-31.
- Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, Moraes MR, Pontes FL Jr, Pesquero JL, Araújo RC, Bacurau RF. Effect of a high- intensity exercise on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats. *Exp Biol Med* 2007; 232:1289–1299.
- Banderas JA, Gaitan LA, Portilla J, Aguirre A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat. *Arch Bras* 1992; 37:69-72.
- Bannister P, Lowosky MS. Ethanol and hipogonadism. *Alcohol Alcohol* 1987; 22:213-7.
- Barnard RJ, Leung PS, Aronson WJ, Cohen P, Golding LA. A mechanism to explain how regular exercise might reduce the risk for clinical prostate cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 2007;16:415–421.
- Barnard RJ, Ngo TH, Leung PS, Aronson WJ, Golding LA. A low-fat diet and/or strenuous exercise alters the IGF axis in vivo and reduces prostate tumor cell growth in vitro. *Prostate* 2003;56:201–206.
- Benbassat CA, Maki KC, Unterman TG. Circulating level of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate level and anthropometric measures. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:1484–1491.
- Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. New concepts in prolactin biology. *Journal of Endocrinology* 2010; 206:1–11.
- Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2008; 288:30-37.
- Blair SN, Morris JN. Healthy hearts and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol* 2009; 19:253-6.

- Burnstein KL. Regulation of andrology receptor levels: implication of prostate cancer progression and therapy. *J Cell Biochemis* 2005; 95:657-659.
- Cagnon VH, Tomazini FM, Garcia PG, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. Structure and ultrastructure of the ventral prostate of isogenic mice (C57Bl/6J) submitted to chronic alcohol ingeston. *Tissue & Cell* 2001; 33:354-360.
- Cagnon VHA, Garcia PJ, Guazelli Filho J, Martinez FE, Mello JR.W, Martinez M. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1998; 30:77-84.
- Calvo D, Vega M.A. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.* 1993; 268:18929-18935.
- Cândido EM, Carvalho CAF, Martinez FE, Cagnon VHA. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol Int* 2007; 31:459-72.
- Chen Y, Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 2001; 91:41-5.
- Cicero TJ, Badger TM. Effects of alcohol on the hypothalamic- pituitary-gonadal axis in the male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 201:427-433.
- Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Câncer* 2006; 42:1213-1218.
- Courtneya KS. Exercise in cancer survivors: an overview of re- search. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:1846–1852.
- Crombie R, Silverstein R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem* 1998; 273:4855-63.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 2002; 70:473-485.
- Cunha GR, Matrisian LM. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation* 2002; 70:469-472.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson S, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroidal Biochemistry & Molecular Biology* 2004; 92:221-36.
- Davies P, Eaton CL. Regulation of prostate growth. *J Endocrinol.* 1991;131:5-17.
- De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* 2007; 25:398-400.
- 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.* 1999;155:1985-1992.
- Djousse´ L, Arnett D.K, Eckfeldt JH, Province MA, Singer MR, Curtis Ellison R. Alcohol Consumption and Metabolic Syndrome:Does the Type of Beverage Matter? *Obesity Research* 2004; 12:1375-85.
- Droller MJ. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol* 1997; 79:42-52.
- Farinola MA, Epstein JI. Utility of immunohistochemistry for alpha-methylacyl-CoA racemase in distinguishing atrophic prostate cancer from benign atrophy. *Human Pathol* 2004; 35:1272-1278.

- Fávaro WJ, Cagnon VHA. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. *International J of Andrology* 2008; 31:609-618.
- Fávaro WJ, Cagnon VHA. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue and Cell* 2006; 38 :311–23.
- Fortes JRA, Cardo WN. *Alcoolismo*. São Paulo, Sarvier, 1991.
- Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002; 132: 3456-3464.
- Fujita H, Takata Y, Kono A, Tanaka Y, Takahashi T, Himeno M, Kato K. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184:604–611.
- Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001; 2:674-80.
- Gomes IC, Cagnon VH, Carvalho CA, De Luca IM. Stereology and ultrastructure of the seminal vesicle of C57/BL/6J mice following chronic alcohol ingestion. *Tissue Cell* 2002; 34:177-86.
- Greenwalt DE, Watt KW, So OY, Jiwani N. PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry* 1990; 29:7054-7059.
- Halsted CHD. Nutrition and alcoholism liver disease. *Seminars in Liver Disease* 2004; 24:289-304.
- Hayashi N, Sagimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* 1991; 45:308-321.
- Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1817-28.
- Heemers H, Verrijdt G, Organe S, Claessens F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Identification of an androgen response element in intron 8 of the sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene allowing direct regulation by the androgen receptor. *J Biol Chem* 2004; 16:30880-30887.
- Hendriks H F, Veenstra A, Van Tol JE, Groener G, Schaafsma A. Moderate doses of alcoholic beverages with dinner and postprandial high density lipoprotein composition. *Alcohol Alcohol* 1998; 33:403–10.
- Horn-Ross PL, Morrow M, Ljung BM. Diet and the risk of salivary gland cancer. *Am J Epidemiol* 1997; 146:171–176.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 2002; 52:213-235.
- Imamov O, Shim GJ, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod* 2005; 73:866-71.
- Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliovaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *Br J Cancer* 2001; 85:357–361.
- Jensen OM, Paine SL, McMichael AJ, *et al.* *Alcohol*. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. *Cancer epidemiology and prevention*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1996: 290–318.

- Kato I, Kiyohara Y, Kubo M, Tanizaki Y, Arima H, Iwamoto H, SHINOHARA N, Nakayama K, Fujishima M. Insulin-mediated effects of alcohol intake on serum lipid levels in a general population: the Hisayama Study. *J Clin Epidemiol* 2003; 56:196–204.
- Kindblom J, Dillner K, Sahlin L, Robertson F, Ormandy C, Tornell J, Wennbo H. Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate specific expression of prolactin. *Endocrinology* 2003;144:2269–2278.
- Knowles DM, Tolidjian B, Marboe C, D'Agat V, Grimes M, Chess L. Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. *J Immunol* 1984; 132:2170-217.
- Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 2005; 35: 339-361.
- Krieg M, Nass R, Tunn S. Effect of aging on endogenous level of 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:375–381.
- Leav I, Lau KM, Adams JA, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. 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* 2001; 159:79-92.
- Leav I, McNeal JE, Kwan PW, Komminoth P, Merk FB. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate* 1996; 29:137-145.
- Lee IM, Cook NR, Rexrode KM, Buring JE. Lifetime physical activity and risk of breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85:962-5.
- Lee IM. Physical activity and cancer prevention: data from epidemiologic studies. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:1823-7.
- Leung PS, Aronson WJ, Ngo TH, Golding LA, Barnard RJ. Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro. *J Appl Physiol* 2004; 96:450–454.
- Lieber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Sem Liver Dis* 1993; 13:136-153.
- Lieber CS, De Carli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepathol* 1991; 12:394-401.
- Majumder PK, Grizansio C, O'Connell F. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 2008; 14:146-155.
- Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3463-8.
- Mardones J, Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strain. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology.* 1983; 5: 171-8.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal cellular and molecular control of c prostatic development. *Develop Biol* 2003; 253:165-174.
- Marks V, Wright J. Metabolic effects of alcohol. *Clin Endocrinol Metab* 1978; 7:245-466.
- Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000; 32:1751-84.
- Martinez FE, Martinez M, Quitete VHAC, Mello JRW, Padovani C.R. Alcoolismo, Reprodução e Genética. *Veterinária Notícias* 2002; 8:121-30.

- Martinez FE, Garcia PJ, Padovani CR, Cagnon VH, Martinez M. A morphometric ultrastructural study of the seminal vesicle of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997; 29:537-42.
- Martinez M, Reis GS, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Cagnon VHA, Mello Jr W, Pereira S., Padovani CR, Martinez FE. Evaluation of the ethanol intake on the *Calomys callosus* seminal vesicle structure. *Micron*. 2007;Jul 7.
- McClearn E, Rodgers DA. Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. *J Comp Physiol Psychol* 1961; 54:116-9.
- McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988; 12:619-633.
- Miki, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol* 2009; 17:139-147.
- Molitch ME, Thorner MO, Wilson C. Management of prolactinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82:996–1000.
- Murty, B.R. The biochemistry of alcohol toxicity. *Resonance* 2004:41-47.
- Nelson EC, Cambio AJ, Yang JC, Ok JH, Lara JR. PN, Evans CP. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10:6-14.
- Platz EA, Kawachi I, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E. Physical activity and benign prostatic hyperplasia. *Arch Intern Med* 1998; 158 :2349-56.
- Plymate SR, Hoop RC, Jones RE, Matej LA. Regulation of sex hormone binding globulin production by growth factors. *Metabolism* 1990; 39:967–970.
- Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone binding globulin production in the human hepatoma (HepG2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:460–464.
- Putzi, M. J. De Marzo, A. M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000; 56:828–832.
- Risbridger G, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, Gustafsson JA, Cunha GR, Wong YZ. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 2001; 231:289.
- Rizos Ch, Papassava M, Golias Ch, Charalabopoulos K. Alcohol consumption and prostate cancer: a mini review. *Exp Oncol* 2010; 32:66-70.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:225-54.
- Ruscica M, Dozio E, Motta M, Magni P. Role of neuropeptide Y and its receptors in the progression of endocrine-related cancer. *Peptides* 2007; 28:426-434.
- Saba F. Aderência: Prática do exercício físico em academias. São Paulo, Manole, 2001.
- Sadi MV, Walsh PC, Barrack ER. Immunohistochemical study androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer* 1991; 67:3057–64.
- Sampath H, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor- α : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9:84-8.

- Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P. The ageing male reproductive tract *J Pathol* 2007; 211: 206–218
- Saxena S, Meehan D, Coney P. Ethanol has direct inhibitory effects on steroidogenesis in human granulosa cells: specific inhibition of LH action. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14:522-7.
- Segal RJ, Reid RD, Courneya KS, Malone SC, Parliament MB, Scott CG, Venner PM, Quinney HA, Jones LW, D'Angelo ME, Wells GA. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:1653–1659.
- Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer*. 1991;63:963–966.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290:1721–1726.
- Smith-Warner SA, Ritz J, Hunter DJ, Albanes D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz G, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Rohan TE, Speizer FE, Virtamo J, Willett WC. Dietary fat and risk of lung cancer in a pooled analysis of prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:987–992.
- Spanagel R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health* 2000; 24:124-31.
- Suh JH, Gong EY, Kim JB, Lee IK, Choi HS, Lee K. Sterol regulatory element-binding protein-1c represses the transactivation of androgen receptor and androgen-dependent growth of prostatic cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6:314-24.
- Swinnen JV, Heemers H, Van De Sande T, De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven, G. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 92:273-9.
- Tadic SD, Elm MS, Subbotin VM, Eagon PK. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology* 2000; 31:1135-1140.
- Taylor RA, Risbridger GP. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation* 2008; 76:671-68.
- Thorpe, A, Neal D. Benign prostatic hyperplasia. *Lancet* 2003; 361: 1359–67.
- Toorians AW, Kelleher S, Gooren LJ, Jimenez M, Handelsman DJ. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5207-5211.
- Tymchuk CN, Tessler SB, Aronson WJ, Barnard RJ. Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and prostate-specific antigen. *Nutr Cancer* 1998; 31:127–131.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005; 40:121-128.
- Vallbo C, Damber JE. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncol* 2005; 44:293-8.
- Vallbo C, Wang W, Damber JE. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU Int* 2004; 93:1339-43.
- Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, Legrand G, Dewailly E, Fournier S, Cousse H, Authie D, Raynaud JP, Beauvillain JC, Dupouy JP, Prevarskaya N. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:120-129.

- Van Der Gaag MSA, Van Tol LM, Scheek RW, James R, Urgert G, Schaafsma Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a dietcontrolled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147:405–10.
- Van Der Kwast TH, Schalken J, Ruizeveld De Winter JÁ, Van Vroonhoven CC, Mulder E, Boersma W, Trapman J. Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer, *Int J Cancer* 1991; 48: 189–93.
- Van Leenders G, Dijkman H, Hulsbergen-Van DE, Kaa C, Ruiter D, Schalken, J. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab Invest* 2000; 80:1251-1258.
- Van Thiel DH, Lester R, Sherins RJ. Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterology* 1974; 67:1188-99.
- Van Thiel DH, Lester R. The effect of chronic alcohol abuse on sexual function. *Clin Endocrinol Metab* 1979; 8:499-510.
- Van Tol MAS, Van Der Gaag LM, Scheek T, Van Gent Hendriks HF. Changes in postprandial lipoproteins of low and high density caused by moderate alcohol consumption with dinner. *Atherosclerosis* 1998; 141:101–3.
- Veierod MB, Laake P, Thelle DS. Dietary fat intake and risk of lung cancer: A prospective study of 51,452 Norwegian men and women. *Eur J Cancer Prev* 1997; 6:540–549.
- Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 2001; 68:270-279.
- Wang YJ, Wu JC, Lee SD, Tsay YT, Lo KJ. Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in postnecrotic cirrotic men: a matched study with alcoholic cirrotic men. *Hepato-Gastroenterol* 1991; 38:531-534.
- Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:6330-6335.
- Wendell Smith C. Terminology of prostate and related structures. *Clin Anat.* 2000;13:207-213.
- Westerlind KC. Physical Activity And Cancer Prevention – Mechanisms. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003; 35:1834-1840.
- White RM. On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 1909; 13:3–10.
- World Health Organization (OMS). About global alcohol database. 2002.
- World Health Organization (OMS). Alcohol and injury in Emergency Departments. 2007.
- Wu Y, Zheng W, Sellers TA, Kushi LH, Bostick RM, Potter JD. Dietary cholesterol, fat, and lung cancer incidence among older women: The Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 1994; 5:395–400.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, MCKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2:305-316.

II- Capítulos

- 1- **Physical exercise and steroid hormone: molecular features on the ventral prostate** – será submetido para a *“World Journal of Urology”*, fator de impacto 2,7.

- 2- **Exercício físico resistido e a expressão dos receptores de hormônios esteroides em ratos alcoolistas: características moleculares da próstata ventral** – será submetido para a *“International Journal of Andrology”*, fator de impacto 3,7.

- 3- **Perfil lipídico da próstata ventral de ratos uchb sob treinamento físico resistido** – será submetido para a *“Journal of Applied Physiology”*, fator de impacto 3,7.

**PHYSICAL EXERCISE AND STEROID HORMONE RECEPTOR: MOLECULAR
FEATURES ON THE VENTRAL PROSTATE**

G.R. Teixeira ^{1*}, W.J. Favaro ¹, P. F. F. Pinheiro ¹, L.G.A. Chuffa ¹, L.O. Mendes¹, B.A. Fiorucci¹, J.P.A. Amorim¹, E. Obba², O.A. Martins¹, W. Mello-Junior¹, M. Martinez³, F.E. Martinez¹.

¹Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil, Postal Code: 18618-970.

²Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty Veterinary Medicine and Zootechny, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil, Postal Code: 18618-970.

³Department of Morphology and Pathology, UFSCar - Univ Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brazil, Postal Code: 13565-905.

Running title: Steroid hormone receptor is modulated by physical exercise

Financial Support: FAPESP – São Paulo Research Foundation, Grant number: 2008/00479-6.

***Corresponding author:**

Correspondence to Giovana Rampazzo Teixeira - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP - Univ Estadual Paulista, P.O. Box 510, Postal Code: 18618-000, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP – Brazil, Telephone number: +55 (14) 3811-6040, Fax: +55 (14) 3811-6361.
E-mail: giovana@ibb.unesp.br

Abstract

Studies have investigated the potential protective effect of exercise against prostate cancer risk. However, there still are doubts about the correlation of effects of physical activity and steroid hormone on the prostatic lesions risk reduction. Thus, the aim of this study was to correlate and quantify the proliferative and apoptotic balance and the steroid hormone receptors (SHRs) levels in the rat ventral prostate after training. Twenty Wistar male rats were divided into two groups: control and trained. The animals from the trained group were submitted to training for 13 weeks, and performed 4 sets of 10 jumps per set carrying a load of 50-70% body weight strapped to the thorax with 60 seconds rest between each set. Two days after the last training session, all animals were euthanized and the intermediate and distal regions of the ventral prostate were collected and processed for immunohistochemistry, western blot and hormonal analyses. The results showed that the highest serum corticosterone, DHT and testosterone levels were found in the trained group. The androgen receptor level was significantly higher in the control group. The greatest ER α and ER β protein levels occurred in trained rats. Moreover, the trained group demonstrated disturbance in the proliferation/apoptosis rate, indicating a prevalence of the apoptotic process. Thus, based on the important role of SHRs in the maintenance of prostatic tissue integrity and involvement of physical exercise in apoptotic and proliferative balance, it could be concluded that there is a direct correlation between physical activity and the glandular microenvironment dynamics prostate. The ER β showed involvement in the increase of the apoptosis while AR and ER α positively regulate the proliferative processes. Finally, the dynamic signaling of the SHRs pointed to the role of physical exercise in the regulation of paracrine interactions, preventing the occurrence of prostatic proliferative disorders.

Keywords: ventral prostate, physical exercise, steroid hormone receptors, immunohistochemistry, apoptosis, proliferative process.

Introduction

Epidemiological and molecular evidence suggest potential associations between physical activity and prostate cancer risk reduction (Friendenreich & Thune, 2001; Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli *et al.*, 2009). Physical exercise appears to lower levels of biologically available sex hormones, which could lead to decreased risk of hormone-related cancers, including prostate cancer (Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli *et al.*, 2009). Prostate cancer has been linked with increased levels of biologically available testosterone in men (Yu & Rohan, 2000; Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli *et al.*, 2009). Physical activity may affect risk of these hormone-related cancers not only by decreasing the endogenous production of androgens but also by increasing amounts of circulating sex-hormone binding globulin, which binds to these sex hormones and reduces their ability to influence target tissues (Yu & Rohan, 2000; Antonelli *et al.*, 2009). Regular physical exercise significantly lowers insulin levels, which may be associated with decreased cancer risk (Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli *et al.*, 2009). Also, exercise may also affect cancer risk through its effects on insulin-like growth factors (IGFs), because high levels of circulating IGF-1 have been associated with increased risk of prostate cancer (Yu & Rohan, 2000; Giovannucci, 2001).

However, a lack of understanding remains about the natural history of prostate cancer and hence the etiologic role of physical activity, including the biological mechanisms and relevant time periods in prostate carcinogenesis, are still unknown.

The androgen-mediated development of the prostate involves paracrine interactions between the epithelium and mesenchyme, with androgen receptors inducing morphogenesis and epithelial proliferation, in addition to modulating the expression of specific secretory proteins and epithelial androgen receptors (AR) (Marker *et al.*, 2003; Fávvaro & Cagnon, 2008). The biological actions of androgens are mediated by interaction with specific intracellular receptors which modulate gene expression by binding to nuclear chromatin (Marker *et al.*, 2003). Testosterone and dihydrotestosterone (DHT) are the main circulating androgens (Toorians *et al.*, 2003), although estrogen also contributes to prostate function. The biosynthesis of oestrogen involves hydroxylations of the androgen precursor which are mediated by an enzyme complex known as aromatase and that is expressed by the Cyp 19 gene (Risbridger *et al.*, 2003). This enzyme is critical in regulating the equilibrium between androgen and oestrogen, which contributes to the circulation and tissue levels of these hormones (Risbridger *et al.*, 2003). The effects of oestrogen in the prostate are mediated by the binding of this hormone to specific α and β oestrogen receptors (ER α , ER β) (Cunha *et al.*, 2002; Fávvaro & Cagnon, 2008). Several studies have shown that the chronic and acute responses to oestrogens are mediated specially by the α receptors (Matthews & Gustafsson, 2003; Imamov *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005).

The independent actions of androgen and oestrogen can alter the normal growth of the prostate, although neither of these hormones alone can induce organ malignancy (Risbridger *et al.*, 2003). Different authors have mentioned that the combination of androgens and oestrogens is responsible for inducing prostatic dysplasia, and pre-malignant changes in prostatic cells. Thus, the imbalance between these hormones is a crucial factor for presenting both normal prostatic function and triggering aberrant growth models resulting in malignancy (Bianco *et al.*, 2002; Risbridger *et al.*, 2003).

Thus, there still are doubts about the correlation of physical activity and prostatic lesions risk reduction. Also, the relation to physical exercise and steroid hormone receptors (SHRs) is unclear, but this knowledge could certainly contribute to structural and functional maintenance of the prostate. Then, the aim of the hereby study was to correlate and quantify the level of the SHRs, and apoptotic and proliferative balance in ventral prostate of the rats after physical exercise resistance.

Materials and methods

Experimental proceedings

Twenty Wistar male rats, aged 90 days, were divided into two groups: control (10 animals) and trained group (10 animals). During the first week, all trained animals were previously adapted to water and exercise conditions. This procedure consisted of jumped sessions (three times per week during seven days) in a reservoir containing water at $30^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, with incremental number of sets (two to four) and repetitions (five to ten) and 60 seconds rest between each set, carrying a load of 50% body weight strapped to the chest (Oliveira *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2005). After adaptation period, the animals were submitted to training for 13 weeks, and performed 4 sets of 10 jumps per set carrying a load of 50-70% body weight strapped to the thorax with 60 seconds rest between each set (Oliveira *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2005).

Two days after the last training session, the control and trained groups were euthanized by decapitation, and the intermediate and distal regions of the ventral prostate were collected and processed for immunohistochemistry, western blot and hormonal analyses. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEA/IBB/UNESP, protocol n°. 83/07 CEEA) and the experiments were done according to the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Immunodetection of AR, ER- α , ER- β and Ki-67

Samples of the ventral prostate obtained from 5 animals in each group were fixed in 10% formalin solution, embedded in paraffin and cut into 4 μm thick sections. Different protocols were

used for antigen retrieval. After, the sections were incubated in 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase and nonspecific binding was blocked by incubating the sections in blocking solution at room temperature. Primary polyclonal rabbit AR-N20 antibody for the AR (sc-816; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal rabbit clone E115 antibody (04-227; Millipore, Temecula, CA, USA) for the ER α , monoclonal rabbit clone 68-4 antibody (05-824; Millipore, Temecula, CA, USA) for the ER β and monoclonal mouse clone MM1 antibody (NCL-Ki67-MM1; Novocastra; Newcastle, United Kingdom) for Ki-67 were diluted in 1% BSA (1:150; 1:35; 1:35; 1:100) and applied to the sections overnight at 4°C. Bound antibody was detected with Novolink Polymer Detection Systems (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Secondary labeled polymer (Novolink Polymer Detection Systems) was applied for 40 min at room temperature. Peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen mixture (Novolink Polymer Detection Systems). Sections were lightly counterstained with Harris' hematoxylin and photographed with a Zeiss Axiophot (Zeiss, Hamburg, Germany) photomicroscope.

Determination of the proliferative index

Samples of the ventral prostate from 5 animals in each group, the same used for Ki-67 immunodetection, were used for determination of the proliferative index. Ten fields were taken at random and measured per animal, resulting in 50 fields per group with an X40 objective lens and the total number of Ki-67 staining positive cells was expressed as the percentage of these total cells, including luminal and basal epithelial cells.

Detection of apoptosis and determination of the apoptotic index

Samples of the ventral prostate from 5 animals in each group, the same used for immunodetection, were processed for DNA fragmentation (TUNEL) by means of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT), using the Kit FragEL™ DNA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). The apoptotic nuclei were identified using a diaminobenzidine chromogen mixture (Kit FragEL™ DNA). Ten microscopic fields were randomly taken and analyzed per sample, resulting in 50 fields per group, using a Zeiss Axiophot (Zeiss, Hamburg, Germany) photomicroscope with a X40 objective. The apoptotic index was determined by dividing the number of apoptotic nuclei by the total number of nuclei found in the microscope field.

Western blot analysis

Samples of the ventral prostate obtained from 5 animals in each group were frozen, weighed and homogenized in 50 μ l/mg of lysis buffer. The tissue homogenates were centrifuged and a sample

of each extract was used for protein quantification with Bradford's method. Aliquots containing 50-70 µg of protein were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL., USA). The membranes were blocked with TBS-T containing 1% BSA and incubated at 4°C overnight with polyclonal rabbit AR-N20 antibody for the AR (sc-816; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal rabbit clone E115 antibody (04-227; Millipore, Temecula, CA, USA) for the ER α and monoclonal rabbit clone 68-4 antibody (05-824; Millipore, Temecula, CA, USA) for the ER β (diluted 1:1,000; 1:500, 1:350; respectively in 1% BSA). The membranes were then incubated for 2h with rabbit secondary HRP-conjugated antibodies (diluted 1:2000 in 1% BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Peroxidase activity was detected by incubation with a diaminobenzidine chromogen (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The intensities of immunoreactivity bands of each protein were quantified from 5 animals in each group using Genius ColorPage HR8 (Genius; Shenzhen, China) scanner and an image analysis software (NIS-Elements, Advanced Research; Nikon, Tokyo, Japan). β -Actin was used as an endogenous control. The results were expressed as means of ratio between each band intensity compared with β -actin band intensity.

Quantification of serum corticosterone, dihydrotestosterone (DHT), testosterone and estradiol levels

Blood samples were collected from all animals in each group. Blood samples were collected from cervical vessels following decapitation.

Serum corticosterone, DHT, testosterone and estradiol concentrations were determined by radioimmunoassay using Coat-aCount total corticosterone/DHT/testosterone /estrogens kits (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), and the concentrations were expressed in ng/mL, ng/mL e pg/mL, respectively.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm standard error. The hormonal and Western Blotting analysis were statistically compared among the groups by analysis of variance followed by the t student test, with the level of significance set at 5% (Montgomery, 1991).

Results

Serum corticosterone, DHT, testosterone and estradiol levels

The serum corticosterone, testosterone and DHT levels were significantly higher in the trained group (Figure 1A, B and C). Furthermore, testosterone and corticosterone index was significantly higher in the control (Figure 1D).

There were no significant differences in the estradiol levels between control and trained groups (Figure 1E).

Immunolocalization and western blot analysis of AR, ER- α and ER- β

The highest AR protein levels were found in the control group when related to β -Actin level, showing immunoreactivity in the epithelial and stromal cells (Figures 2a, 2b and 3).

In contrast, ER- α protein level was significantly higher in the trained group, exhibiting immunoreactivity in the secretory epithelium and stroma (Figures 2c, 2d and 3).

Furthermore, ER- β protein level was significantly higher in the trained group, exhibiting immunoreactivity in the epithelial cells and absent in the stroma (Figures 2e, 2f and 3).

Proliferative and apoptotic indexes

The proliferative response was significantly greater in control (1.7%) compared to trained group (1.3%) which showed decreasing value for this variable (Figures 4a, b and e).

In contrast, apoptotic index was significantly increased in the trained (2.5%) in relation to the control group (1.2%) (Figures 4c, d and e).

Also, the index between apoptosis and proliferation was 1.9 in trained and 0.7 in control group (Figure 4e).

Discussion

Our results showed that resistive exercise increased corticosterone, testosterone, DHT and decreased the AR. Estrogen receptors α and β increased while testosterone / corticosterone rate was lower.

The efficiency of physical training depends on the intensity, volume and periodization of training, with subsequent assessment of stress tolerance (Kraemer *et al.*, 2005). High concentrations of circulating corticosterone levels accompanied by low testosterone / corticosterone indicate a preponderance of anaerobic activity in physical exercise resistance (Hakkinen, 1989). Animal models submitted to resistance exercise protocols have shown that high concentrations of corticosterone at rest reflect the stress of long-term training and adaptation to physical training program, similar to that observed in humans (Gobatto *et al.*, 2001; Voltarelli *et al.*, 2002; Kraemer *et al.*, 2005). Andersen *et*

al. (2004) hypothesized that corticosterone can cause mobilization of amino acids and lipids, making energy available for the synthesis of other components such as glucose.

The rise in corticosterone due to resistive exercise may be contrarregulada by testosterone (Boone *et al.*, 1990). Tepperman *et al.* (1975) demonstrated that the excess circulating corticosterone produced pro-androgenic effects, with resultant hepatic conversion of corticosterone on testosterone. Also, Lergelman *et al.* (1997) found elevated concentrations of testosterone and atrophy of the prostate and seminal vesicles of rats after administration of exogenous corticosterone. They concluded that high concentrations of corticosterone increase the concentrations of testosterone, producing effects antiandrogens and interfering in activation of AR or activity of the enzyme 5 α -reductase.

The balance between circulating concentrations of androgens and estrogens has been investigated in literature (Nilsson & Gustafson, 2011). The local estrogen biosynthesis may occur via aromatization of androgens. Thus, the enzyme aromatase can act as a regulator of the balance between androgens and estrogens both tissue and plasma Carruba, 2007). Still, excess intracellular DHT is rapidly metabolized in the reversible reaction to the estrogenic metabolite known as 3 α , 17 β -androstenediol requires that the aromatase enzyme for metabolism (Morani *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2010). The 3 β Adiol is finally converted irreversibly into inactive steroids water soluble by the action of 3 β Adiol hydroxylase (CYP7B1) (Morani *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2010).

Animals treated with estrogen and androgen estrogen reserve created in the prostate, leading eventually to the development of dysplasia and adenocarcinoma. Since aromatase knockout animals exposed to high doses of androgens resulted in the development of prostatic hyperplasia, although malignant changes were not detected (McPherson *et al.* 2007; Härkönen & Mäkelä, 2004). Bianco *et al.* (2002) and Risbridger *et al.* (2003) showed that both estrogen and androgens may lead to morphological and functional changes in the prostate, but alone are not capable of causing organ carcinogenesis. With respect to estrogen receptors in the prostate are mediated by binding of the hormone to specific estrogen receptors, ER- α and ER- β , expressed in the stroma and epithelium, respectively (Cunha *et al.*, 2002). The ER- β is responsible for antiproliferative effects in prostatic epithelium and is influenced by androgens or activation of estrogen receptor α (McPherson *et al.*, 2007). Studies have shown that ER- α is suprarregulado by androgens (Adams *et al.*, 2002, Asano *et al.*, 2003). 3 β Adiol high concentrations were found in amounts greater than those of estradiol in the prostate of rodents, and natural ligand of ER β (Sugima *et al.*, 2010).

Few studies have correlated the effects of estrogen in women in pre-and post-menopausal women with resistive exercise (Kraemer *et al.*, 2005). Wiik *et al.* (2005) in rodents have shown that

resistive exercise increased the expression of SHRs in striated muscle skeletal-related enzyme citrate synthase which is involved in mitochondrial bioenergetics.

We found that the resistive exercise alters the dynamics of signaling between the estrogen and androgen receptors and increases plasma concentrations of protein in SHRs, increases the conversion of DHT in prostate 3β Adiol and decreases AR. The apoptotic response of prostate cells is increased and proliferation decreased in trained animals.

Apoptosis is an active cellular mechanism that occurs during physiological processes of development and tissue remodeling (Kerr *et al.* 1972; Kerr & Searle, 1973), and control mechanism of tissue homeostasis with the balance between cell proliferation and apoptosis (1995, Strange *et al.*, 1995, Sohn *et al.*, 2003). The prostate is dependent on hormones. Testosterone depletion leads to rapid tissue involution due to apoptotic elimination of glandular cells (Kyprianou & Isaacs, 1988). In hormone-dependent tumors, such as in prostate cancer, the induction of programmed cell death by androgen depletion has been associated with tumor regression (Staack *et al.*, 2003).

We conclude that resistance exercise leads to an imbalance in proliferation / apoptosis index, indicating the predominance of the apoptotic process. Considering the role of SHR in the maintenance of tissue integrity, increase of ER β and AR were fundamental reduction in prostate antiproliferative responses. It is suggested that the increase in SHR may alter signaling pathways to balance prostatic tissue.

Acknowledgements

All authors express their grateful to Ms. Gelson Rodriguez by the excellent technical assistance. This work was also supported by FAPESP – São Paulo Research Foundation, Process n.08/00479-6 and CAPS.

Reference

- Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger SM. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*. 2002;52:69-81.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone response by male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; 37: 791-797.
- Antonelli J, Freedland SJ, Jones LW. Exercise therapy across the prostate cancer continuum. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2009; 12: 110.
- Asano K, Maruyama S, Usui T, Fujimoto N. Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocrine Journal.* 2003; 50: 281-287.

- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*. 2002; 143: 4922–4933.
- Boone JB, Lambert CP, Flynn MG, Michaud TJ, Rodriguez-Zayas JA, Andres FF. Resistance exercise effects on plasma cortisol, testosterone and creatine kinase activity in anabolic-androgenic steroid users. *Int J Sports Med*. 1990; 11: 293-297.
- Carruba G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1089: 201-217.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*. 2002; 70: 473-485.
- Cunha TS, Tanno AP, Moura MJCS, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sciences*. 2005; 77: 1030-1043.
- Fávaro WJ, Cagnon VHA. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. *Int. J. Androl*. 2008; 31: 609-618.
- Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr*. 2002; 132: 3456S-3464S.
- Friedenreich CM, Thune I. A review of physical activity and prostate cancer risk. *Cancer causes & control*. 2001;12(5): 461-475.
- Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *Journal of Nutrition*. 2001; 131(11): 3109-3120S.
- Gobatto CA, Sibuya CY, Kokubun E, Luciano E, Azevedo JRM, Mello MAR. Caracterização da Intensidade de Exercício e do Efeito do Treinamento Físico no Modelo de Natação de Ratos Wistar. *Motriz*. 2001b; 7: S57–S62.
- Hakkinen K. Neuromuscular and hormonal adaptations during strength and power training: a review. *J Sports Med Phys Fitness*. 1989; 29: 9-26.
- Härkönen PL, Mäkelä SI. Role of estrogen in development of prostate cancer. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol*. 2004; 92: 297-305.
- Imamov O, Shim GJ, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biology of Reproduction*. 2005; 73: 866-871.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-57.
- Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*. 2005; 35(4): 339-361.
- Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*. 1988; 122: 552-62.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*. 2003; 253:165-174.
- Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Molecular Interventions*. 2003; 3: 281-292.
- Mcpherson SJ, Ellen SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzscheier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*. 2007; 148: 566-574.
- Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J. Intern. Med*. 2008; 264:128-142.
- Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89(1): 44-55.
- Oliveira CAMD, Rogatto GP, Luciano E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2002; 8(6): 219-224.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mcpherson SJ. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*. 2003; 10: 187-191.
- Sohn KJ, Stempak JM, Reid S, Shirwadkar S, Mason JB, Kim YI. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 81-90.
- Staaack A, Kassis AP, Olshen A, Wang Y, Wu D, Carroll PR, Grossfeld GD, Cunha GR, Hayward SW. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue invivo. *Prostate*. 2003; 54: 212-219.
- Strange K, Jackson PS. Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int*. 1995; 48: 994-1003.
- Sugiyama N, Barros RP, Warner M, Gustafsson JA. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21: 545-52.

Taylor RA, Cowin P, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. 17 β -Estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ER α or ER β . *Endocrinology*. 2005; 13: 1-53.

Tepperman J. *Metabolic and endocrine physiology*. 3rd ed. Chicago IL: Year Book Medical Publishers, Inc: 1975.

Toorians AW, Kelleher S, Gooren LJ, Jimenez M, Handelsman DJ. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 5207-5211.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35: 1389-1394.

Wiik A, Ekman M, Morgan G, Johansson O, Jansson E, Esbjornsson M. O estrogen receptor beta is present in both muscle and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol.* 2005; 124: 161-165.

Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of National Cancer Institute.* 2000; 92: 1472-89.

Legends

Figure 1. Hormonal serum levels: corticosterone (A), testosterone/corticosterone index (B), total testosterone (C), DHT (D), estradiol (E). * $p < 0.05$: statistical significance (n =10).

Figure 2. Immunohistochemistry of the ventral prostate from the control (a, c, e) and trained (b, d, f) groups. (a) and (b) AR immunoreactivity (arrows) in the nuclei of epithelial and stromal cells. (c) and (d) ER α immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. (e) and (f) ER β immunoreactivity (arrows) in the epithelial cells and periacinar stroma. Bar=20 μ m.

Figure 3. Representative western Blot (A) and semi quantitative determination (B) for AR, ER α and ER β proteins of the ventral prostate in the two experimental groups. The protein levels were identified in the blots. β -Actin was used as the endogenous control. Data were expressed as the mean \pm standard error (n=10).

Figure 4. Immunolabelled Ki-67 and apoptotic detection in the ventral prostate from the control (a, c) and trained (b, d) groups. (a) and (c) Ki-67 immunoreactivity (arrows) in the epithelium. (b) and (d) DNA fragmentation (arrows) in the epithelial cells. Bar=20 μ m. (e) Mean and standard error of the proliferative and apoptotic indexes of the ventral prostate in the two experimental groups (n=05).

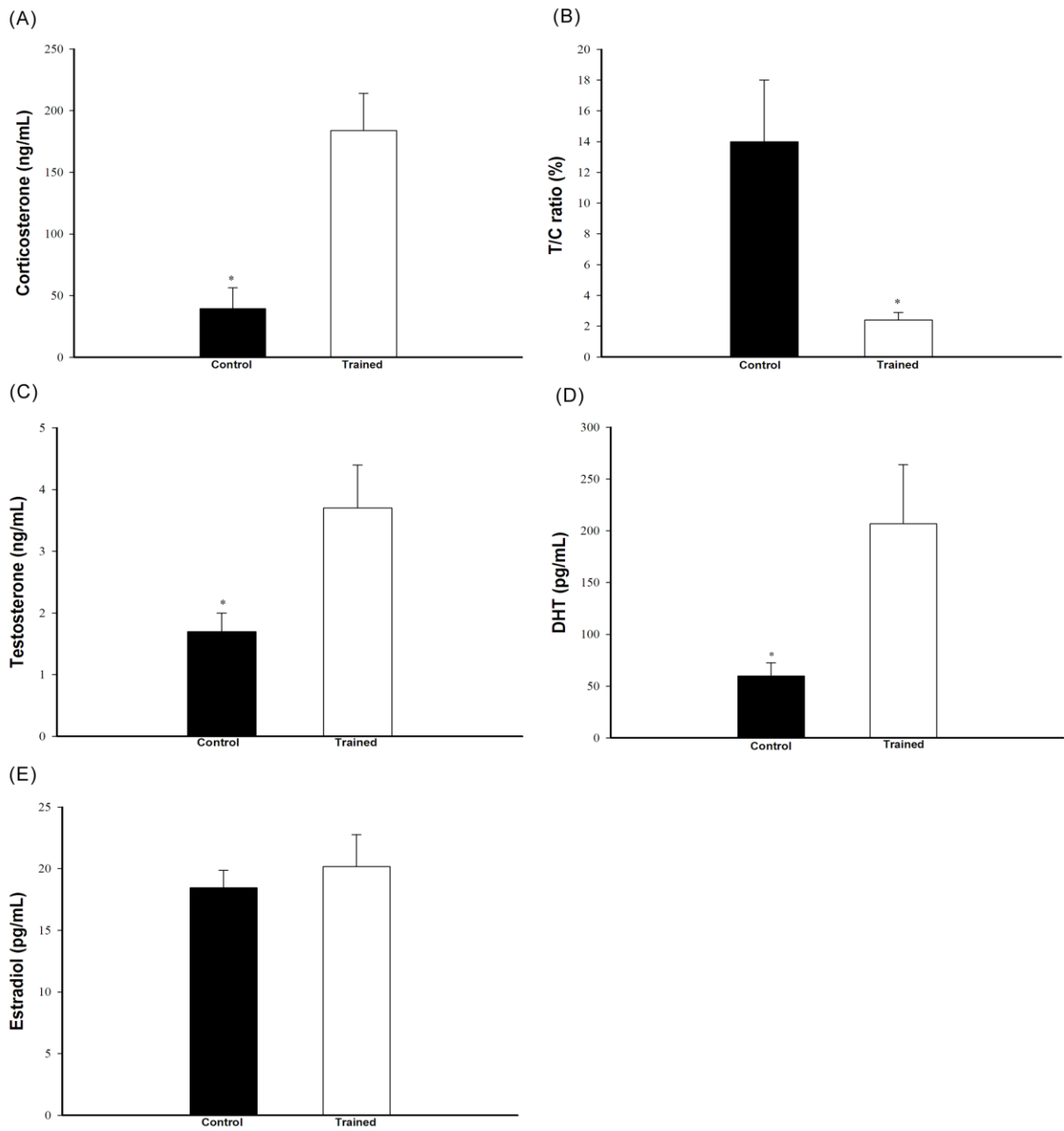


Figure 1

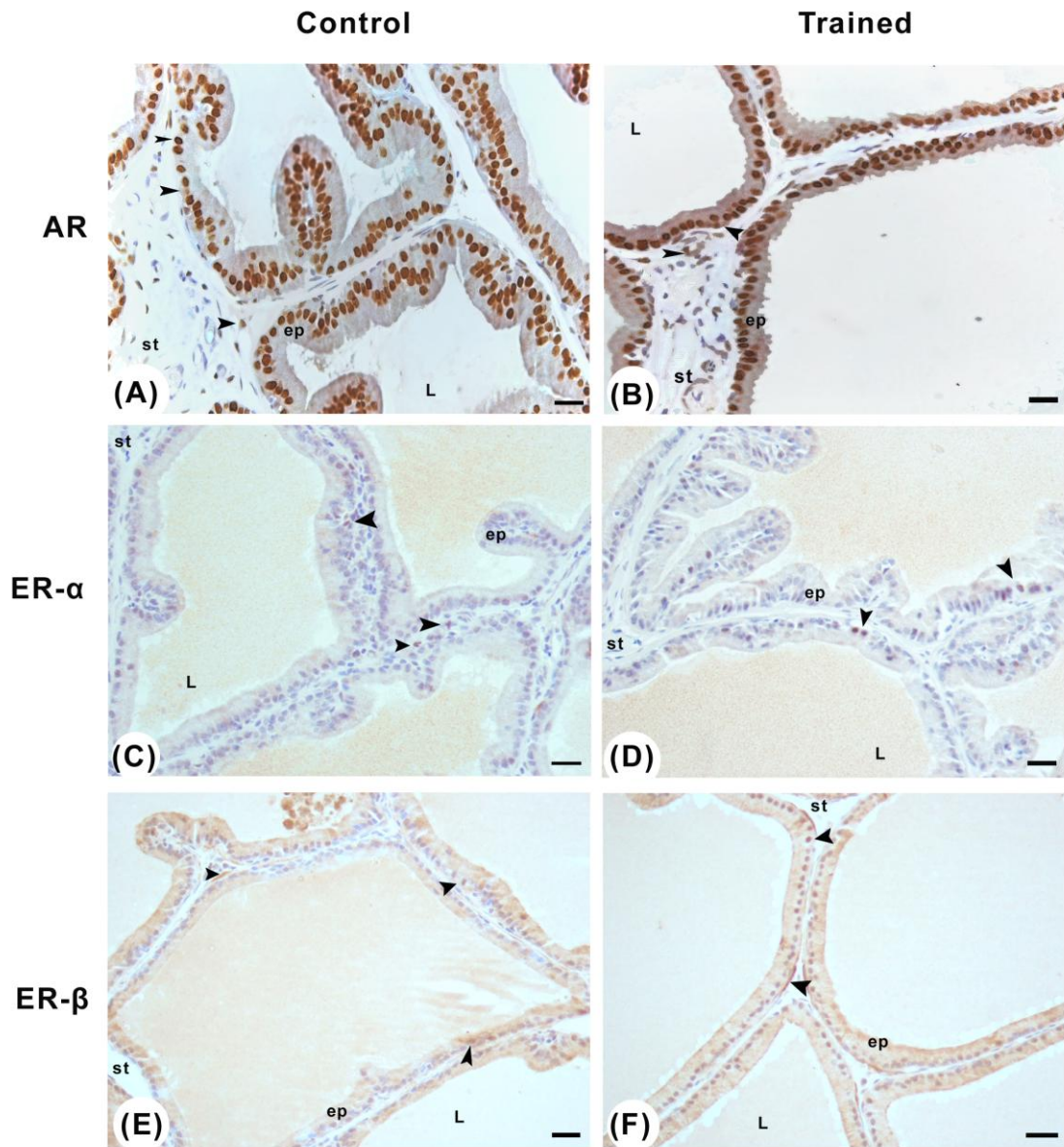


Figure 2

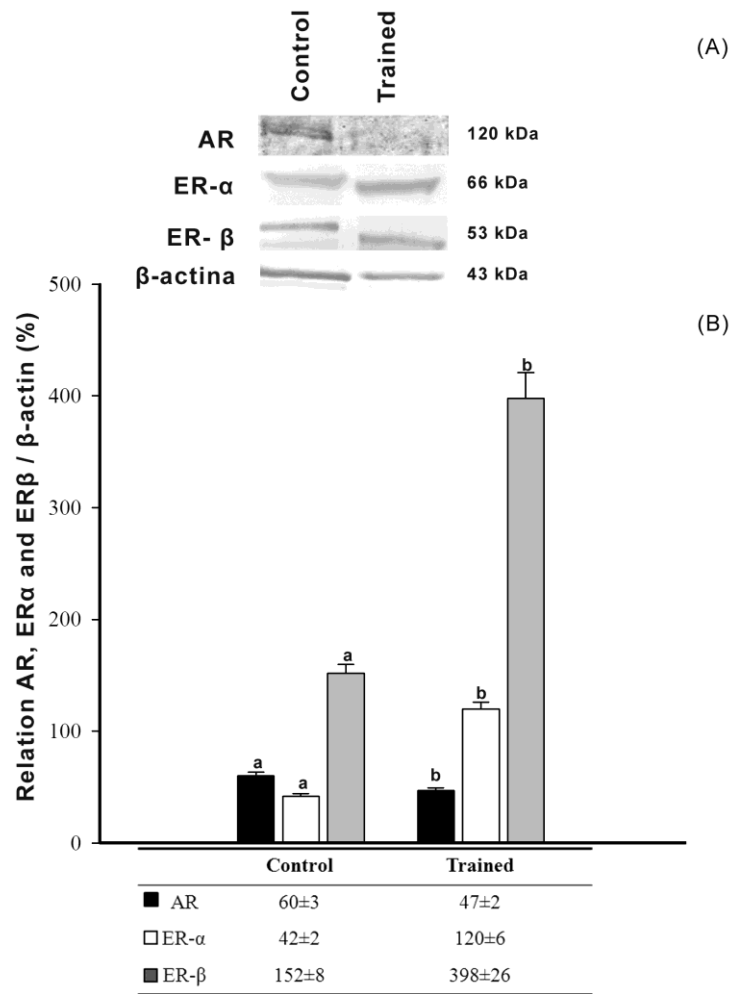


Figure 3

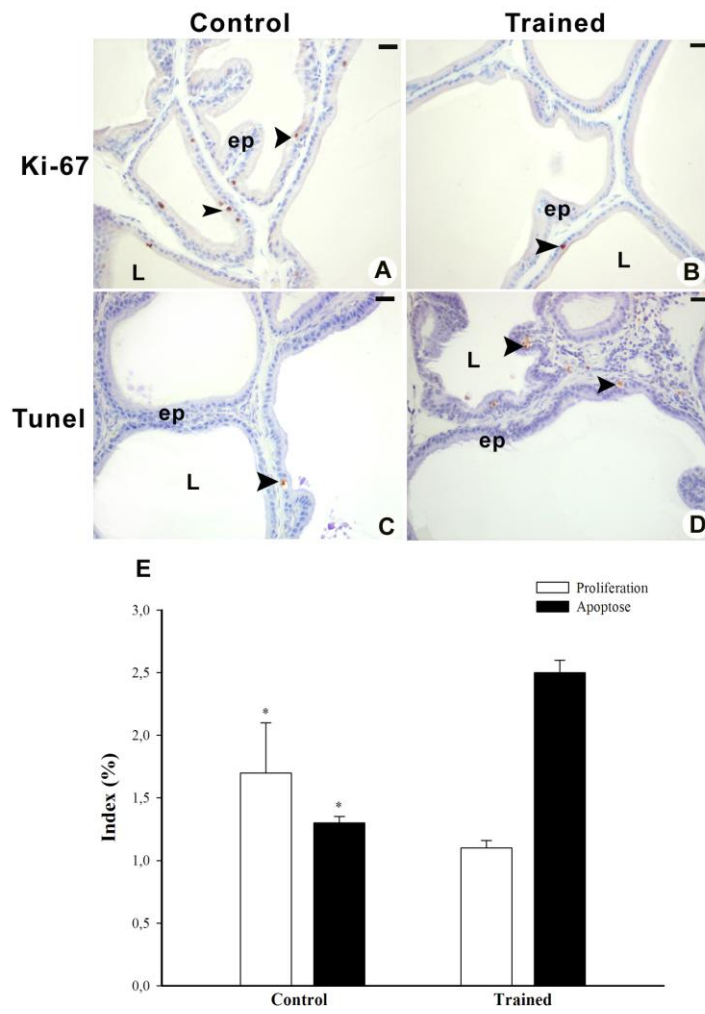


Figure 4

EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO E RECEPTORES DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS UChB

G.R. Teixeira ^{a*}, W.J. Favaro ^a, P. F. F. Pinheiro ^a, L.G.A. Chuffa ^a, J.P.A. Amorim ^a, L.O. Mendes ^a, B.A. Fiorucci ^a, O.A. Martins ^a, W. Mello-Junior ^a, M. Martinez ^b, F.E. Martinez ^a.

^a Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970, Brazil.

^b Department of Morphology and Pathology, UFSCar – Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil.

Título resumido: Receptor de hormônio esteróide é modulado pelo etanol e exercício físico

Suporte Financeiro: FAPESP – São Paulo Research Foundation, Grant number: 2008/00479-6.

***Correspondência do autor:**

Correspondence to Giovana Rampazzo Teixeira - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP - Univ Estadual Paulista, P.O. Box 510, Postal Code: 18618-000, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP – Brazil, Telephone number: +55 (14) 3811-6040, Fax: +55 (14) 3811-6361.
E-mail: giovana@ibb.unesp.br

Resumo

Os relatos sobre os efeitos do etanol na próstata são conflitantes. Os alcoólicos contam com cerca de 9% das doenças nos países desenvolvidos e estão ligados a mais de 60 doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, cirrose hepática, desordens neuropsiquiátricas, lesões, a síndrome do alcoolismo fetal e alterações do sistema genital, principalmente, na próstata que é hormônio dependente. Estudos têm investigado o potencial efeito protetor do exercício contra o risco de câncer de próstata. Nosso objetivo foi correlacionar e quantificar o equilíbrio proliferativo e apoptótico e dos hormônios esteróides e seus receptores na próstata ventral de ratos UChB após treinamento físico. Após a seleção, 40 ratos UChB machos foram divididos em quatro grupos: controle (C), treinado (T), etanol (E) e etanol+treinamento (E+T). Os animais do grupo treinado foram submetidos ao treinamento durante 13 semanas, realizando quatro séries de 10 saltos com sobrecarga de peso 50-70% amarrado ao tórax, com 60 segundos de descanso entre cada série três vezes por semana. Dois dias depois da última sessão de treinamento, os animais foram sacrificados e as regiões intermediária e distal da próstata ventral foram coletadas e processadas para análises imunohistoquímicas, Western Blotting e hormonais. Os resultados mostraram maiores concentrações da corticosterona sérica, DHT e testosterona em ratos treinados. O receptor de andrógeno foi significativamente maior nos grupos C e E em relação aos T e E+T. ER α e ER β maiores ocorreram em ratos treinados. Além disso, o grupo treinado mostrou alteração no índice proliferação/apoptose, indicando prevalência no processo apoptótico. Conclui-se que há correlação do exercício físico sobre a dinâmica microambiente glandular da próstata ventral. O ER β mostrou envolvimento no aumento da apoptose, enquanto o AR e ER α positivamente regulam os processos proliferativos. Portanto, a dinâmica da sinalização dos SHRs aponta para o papel do exercício físico na regulação da interação parácrina, prevenindo a ocorrência de desordens proliferativas da próstata de ratos alcoolistas.

Palavras chave: etanol, exercício físico, proliferação, apoptose, receptores prostáticos e próstata ventral.

Introdução

O consumo abusivo de etanol causa em âmbito global cerca de 1,8 milhões de mortes anualmente. Estudos demonstram que 10 a 18% dos casos de pacientes atendidos na emergência dos hospitais são casos relacionados com etanol (OMS, 2007). Consumir excessivamente etanol pode levar a patologias prostáticas. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram alterações no sistema genital ocasionadas pelo consumo crônico de etanol como: acúmulo de gotas lipídicas na uretra (Pinheiro et al., 2003), no testículo, atrofia do epidídimo (Martinez et al., 2000), redução do volume celular do epitélio secretor dos lobos ventrais e laterais da próstata e da glândula de coagulação (Martinez et al., 1993; Cagnon et al., 1996, 1998), queda na produção espermática e atraso no tempo de trânsito durante o epidídimo (dado não publicado), aumento da inflamação prostática (Mendes et al., 2011) e alterações histológicas no ovário (Chufa et al., 2009).

A variedade de ratos UChB é modelo raro para estudos relacionados aos fatores genéticos, bioquímicos, fisiológicos, nutricionais e farmacológicos e do apetite e da tolerância, fatores do alcoolismo humano.

Os relatos do etanol sobre a próstata são conflitantes. Estudos relatam diminuição da testosterona circulante após o consumo crônico de etanol e aumento da expressão de estrógenos. Para a próstata, a testosterona é o principal andrógeno esteróide, metabolizada em diidrotestosterona (DHT) que atua através da ligação com o receptor de andrógeno (AR). A ativação do AR induz a morfogênese e a proliferação celular e modula a expressão de proteínas secretoras específicas (Marker et al., 2003). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e alteram o eixo hipotálamo-hipófise-testículo, reduzindo a produção de andrógenos pelas células de Leydig, causando a involução do epitélio prostático e o crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002). Os efeitos estrogênicos na próstata resultam da ligação com seus receptores específicos α e β (ER α , ER β), predominantemente expressados no epitélio e no estroma, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). Utilizando-se tecido prostático recombinante de animais adultos *knockout* para os receptores estrogênicos α e β , Risbridger et al. (2001) demonstraram que a resposta prostática ao estrógeno requer mecanismos parácrinos, mediados por receptores α do estroma e β do epitélio. Os efeitos estrogênicos sobre a próstata resultam do balanço dinâmico entre os ER β e ER α envolvidos em mecanismos celulares (Adams et al., 2002; Weihua et al., 2002). Os ER β podem estar envolvidos no processo anti-proliferativo epitelial, na diminuição do processo apoptótico (Imamov et al., 2004), sendo suprarregulados pelos andrógenos (Adams et al., 2002; Asano et al., 2003).

As evidências moleculares e epidemiológicas sugerem potencial associação entre o exercício físico e o câncer de próstata (Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli et al., 2009). O exercício

físico regular diminui a insulina, podendo estar associado à diminuição do risco de cânceres (Friendenreich & Orenstein, 2002; Antonelli et al., 2009). O exercício também pode contribuir amenizando os riscos do câncer através dos efeitos do fator de crescimento ligado a insulina (IGFs) (Yu & Rohan, 2000; Giovannucci, 2001). No entanto, o papel etiológico do exercício físico, incluindo os mecanismos biológicos e períodos de tempo relevantes na carcinogênese da próstata, é ainda desconhecido. O exercício físico resistido pode alterar o meio hormonal e funcional da próstata de ratos UChB. Assim o objetivo desta pesquisa foi correlacionar e quantificar os receptores hormonais esteroidais, bem como o índice de proliferação e apoptose celular da próstata ventral de ratos UChB submetidos ao exercício físico resistido.

Material e métodos

Animais

40 ratos machos UChB provenientes do biotério do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP com 21 dias de idade, foram mantidos em caixas de polietileno de fundo sólido (40x30x15cm) forradas com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro) e temperatura (20 à 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital[®]) *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo 83/07-CEEA/IBB).

Aos 65 dias, iniciou-se a fase de seleção dos ratos segundo o perfil da variedade (Mardones & Segovia-Riquelme, 1983). Nesse período, os animais passaram a receber simultaneamente água filtrada, solução de etanol a 10% e ração *ad libitum*. A avaliação do consumo diário de solução de etanol a 10% foi monitorada por 15 dias. Os animais que apresentaram consumo igual ou maior que 2,0 mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para compor os grupos experimentais da variedade UChB. Após a seleção os ratos UChB foram divididos em 4 grupos: Grupo Controle (C), recebeu apenas água durante o período experimental e permaneceu sedentário; Grupo Treinado (T), recebeu apenas água e realizou o protocolo de treinamento físico com saltos em meio líquido; Grupo Etanol (E), recebeu etanol e água *ad libitum* e permaneceu sedentário durante o período experimental; e o Grupo Etanol+Treinamento (E+T), recebeu etanol e água *ad libitum* e realizou o protocolo de treinamento com saltos em meio líquido (Tabela 1).

Protocolo de treinamento físico resistido

Aos 90 dias de idade, os grupos T e E+T foram submetidos ao protocolo de treinamento físico resistido, três vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira) entre às 13:00 e 15:00h, durante 14 semanas consecutivas. As sessões de saltos foram realizadas em cilindro de PVC com

profundidade de 38 cm, contendo água a 30°C (Harri & Kuusela, 1986). Na região anterior do tórax dos animais, foi colocado o colete com sobrecarga de peso com 50% para adaptação ao exercício físico e ao meio líquido, feito isso houve aumento gradativo dos saltos e séries, e a sobrecarga foi acrescida para 60% e 70% consecutivamente. Em cada sessão do treinamento, os animais realizaram quatro séries de 10 saltos com 60 segundos de intervalo entre as séries. Os animais dos grupos C e E não foram submetidos ao treinamento físico.

Dosagens hormonais

Aos 190 dias de idade os animais foram submetidos a eutanásia por decaptação e as amostras de sangue foram coletadas (entre 9 e 11 horas). O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 15 min) e estocado a -20°C até o momento da determinação hormonal. As concentrações da corticosterona (Anti-Corticosterone, Sigma C8784), testosterona total (Coat-A-Count Total Testosterone) e testosterona livre (Coat-A-Count Free Testosterone) foram dosadas por radioimunoensaio. As amostras para estradiol (Immulite 2000 Estradiol), e DHT (Diagnostics Biochem Canada Inc.) foram dosadas por quimioluminescência e elisa respectivamente. Todas as amostras foram mensuradas em duplicatas e em diferentes diluições, quando necessário.

Imunodeteção de AR, ER- α , ER- β

Após a eutanásia as amostras da próstata ventral foram coletadas dos 10 animais de cada grupo e fixadas por imersão em solução de PBS + formol a 10% e posteriormente embebido em paraplastico (Paraplast Plus; Mc Cormick, St. Louis, MO, USA). Foram realizadas secções de 4 μ m de espessura e utilizados para as reações de imunohistoquímica.

As análises histológicas e imunohistoquímicas foram focadas nas células epiteliais secretoras da região intermediária do sistema ductal da parte ventral da próstata. Foram estudadas as proteínas AR, ER- α , ER- β . Após desparafinização, as secções foram hidratadas em série alcoólicas e, para exposição e recuperação do antígeno, foram incubadas em tampão citrato 0,01M a pH 6,0 para AR em panela de pressão por 30 minutos e para os ER- α a recuperação foi por 3 ciclos de 5 min em micro-ondas. A recuperação do ER- β foi através de 10 min com proteinase k (1:100, 2mg). A inibição da peroxidase endógena foi obtida através de solução de H₂O₂ a 3% em tampão salino Tris (TBS) por 20 minutos. Após lavagem em TBS, o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com soro fetal bovino (BSA) a 3%, diluído em tampão TBS mais Triton X-100 0,05% por uma hora. Posteriormente, a incubação com anticorpo primário AR (SC-816, Santa Cruz Biotechnology, USA), ER- α (rabbit clone E115 anti-ER α receptor); ER- β (rabbit clone 68-4 anti-ER β), diluído em solução bloqueio 1% foi realizada a 4°C durante a noite. Após lavagem em TBS-T, os anticorpos secundários biotinizados camundongo anti-coelho (Dako, Glostrup, Dinamarca), conforme o anticorpo primário,

na diluição 1:100 em solução bloqueio, foram incubados por 1h. Após lavagem com TBS-T, as secções foram incubadas com *StreptABComplex/HRP* (Dako) por 45 minutos e reveladas com diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram montadas e a análise microscópica das proteínas foram realizada usando o Sistema de Análise de Imagens Computadorizado AxioVision 4.1 (Zeiss).

Para quantificação das células AR positivas, foram analisadas 100 células epiteliais secretoras em 10 secções distintas da região intermediária do sistema ductal da próstata ventral, totalizando 1.000 células por animal, sendo cinco animais por tratamentos analisados. Após leitura, aplicará a seguinte fórmula: porcentagem de células positivas (%) = número de células positivas X 100/1000.

Determinação do índice proliferativo

A análise imunohistoquímica da expressão do antígeno de proliferação celular Ki-67 (Novocastra Laboratories Ltd[®]) restringiu-se ao compartimento epitelial prostático da região intermediária do sistema ductal do lobo ventral da próstata. Secções com 4µm de espessura foram processadas usando o método da estrepto-avidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização, as secções foram hidratadas em série alcoólicas e, para exposição e recuperação do antígeno, foram incubadas em tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em panela de pressão por 30 minutos. A inibição da peroxidase endógena foi obtida através de solução de H₂O₂ a 3% em metanol por 15 minutos. Após lavagem em TBS, o bloqueio de reações inespecíficas foi realizado BSA 3% por uma hora. Posteriormente, a incubação com anticorpo primário, diluído em PBS (diluída 1:100), foi realizada a 4°C durante a noite.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão TBS e durante 1h, à temperatura ambiente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário (*Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins - Dako[®] Cyt*) na diluição 1:100 em solução tampão PBS. Após lavar em TBS, as secções foram incubadas com *StreptABComplex/HRP (Dako[®] Cyt)* por 45 minutos e reveladas com diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram montadas com *Permount[®]*, analisadas e fotografadas em fotomicroscópio AxioPhot - 2 com câmera digital, modelo AxioCam HR, Zeiss do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP. O número de células marcadas por ki-67 foi contadas em 50 campos escolhidos randomicamente com objetiva de 40x de 5 animais por grupo (10 campos por animal), assim o número de células contadas foi expresso em porcentagem.

Determinação do índice de apoptose

As amostras da próstata ventral de 5 animais de cada grupo, o mesmo utilizado para imunodeteccção foram processados para a fragmentação do DNA (TUNEL) por meio do terminal

desoxinucleotídio transferase (TdT), usando o kit FragEL™ DNA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Os núcleos apoptóticos foram identificados usando a mistura do cromógeno diaminobenzidina (Kit FragEL™ DNA). Dez campos microscópicos foram aleatoriamente analisados para cada amostra, resultando em 50 campos por grupo, usando o fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (Zeiss, Hamburgo, Alemanha) com objetiva de 40x. O índice apoptótico foi determinado pela divisão do número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos contados no campo.

Análise de Western blot para AR, ER- α . ER- β

A próstata ventral foi rapidamente removida após a eutanásia e amostra de 50mg de tecido foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e estocado a -80°C . Todos os tecidos foram homogeneizados com tampão Ripa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), 10X (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 2.5 % ácido desoxicólico, 10 % NP-40, 10 mM EDTA, pH 7.4) e coquetel de inibidor de protease (Sigma Chemical Co.) usando homogeneizador (IKA® T10 basic Ultra, Staufen, Germany). Alíquotas contendo 1:10 (v/v) de Triton X-100 foi adicionado ao homogeneizado e as amostras foram colocadas em gelo sob agitação por 2 horas para melhorar a extração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4°C e o pellet foi descartado. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford. As proteínas totais foram dissolvidas em Laemmle e iguais quantidades de proteínas (70 μg) foram adicionadas em gradiente de gels de 4-12% de acrilamida (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). A eletroforese foi corrida com tampão Tris-glicina (60 mA durante 2 h). Depois as proteínas totais foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,2 μm com tampão Tris-glicina e metanol (200 mA por 1 h 30 min). Na sequência as membranas foram bloqueadas com solução de TBS-T contendo BSA a 3% em temperatura ambiente por 60 min. Incubado com respectivo anticorpo primário a 4°C a noite toda (AR-N20 anti-AR; rabbit clone E115 anti-ER α receptor; rabbit clone 68-4 anti-ER β diluídos em 1% BSA). Lavado com solução de TBS-T 3x de 5 minutos e incubados com os anticorpos secundários anti-coelho ou camundongo HRP (diluídos 1:500 em 1% BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA). Depois da lavagem, a membrana foi revelada com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.). As expressões de proteínas foram quantificadas por análises densitométricas das bandas normalizadas com valores da β -actina.

Análise estatística

O estudo estatístico foi realizado através de Teste T *Student* e da análise de variância (ANOVA), complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre

médias dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As conclusões estatísticas foram realizadas com 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em Banzatto & Kronka (1989). O *software* estatístico usado foi *GraphPad Instat version 4* e o *Sigma Plot version 11.0* usado para os gráficos.

Resultados

Quantificações hormonais

Níveis de corticosterona apresentaram-se diminuído no grupo T ($p < 0,05$) comparado ao grupo E+T e C (Figura 1A). A taxa T/C foi maior no grupo E comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 1B).

A média da testosterona sérica e os níveis de DHT foram significativamente menores nos grupos com exercício físico quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Houve interação entre o exercício físico e o consumo de etanol para a testosterona total e DHT reduzindo assim os valores em relação ao grupo E ($p < 0,05$) (Figura 1C-D). Os valores de estradiol foram maiores no grupo T comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 1E).

Deteção por IHC e Western Blot de AR, ER- α , ER- β

Níveis altos para a proteína AR foi encontrado nos grupos C e E quando relacionado com os níveis de β -actina ($p < 0,05$), revelando por IHC imunoreatividade nas células epiteliais luminais (Figuras 2A, 2C e 3). O grupo T e a interação entre E+T apresentou fraca intensidade de expressão da proteína AR correlacionando com os demais grupos (Figura 2B-D e 3).

Por outro lado, a proteína ER- α apresentou menor expressão no grupo E comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) exibindo imunoreatividade no epitélio e estroma prostático (Figuras 2E-H e 3). Além do mais os grupos submetidos ao treinamento, T e E+T apresentaram maior expressão da proteína ER- α comparados com os grupos C e E respectivamente ($p < 0,05$).

O receptor ER- β apresentou expressão significamente menor no grupo E relacionado com a β -actina ($p < 0,05$). Sendo assim, os grupos que realizaram exercício físico demonstraram maior expressão de ER- β . Da mesma forma foi encontrado imunoreatividade nas células epiteliais e ausentes no estroma (Figuras 2I-M e 3).

Índice proliferativo e apoptótico

A resposta proliferativa foi significativamente maior nos grupos C e E (2,4% e 3,6 % respectivamente) do que encontrado pelos grupos T e E+T (1,6% e 1,7%) o qual mostrou diminuir valores para esta variável (Figuras 4A-D e 4I).

Ao contrário, o índice de apoptose foi significativamente maior nos grupos T e E+T (1,7% e 4,1 respectivamente) em relação os grupos C e E (1,3% e 1,9%) (Figuras 4E-H e 4I).

Discussão

A eficiência do treinamento físico depende essencialmente da intensidade, volume e periodização do treinamento. O programa de treinamento requer avaliação da tolerância ao estresse. Nossos resultados demonstraram que 14 semanas de exercício físico anaeróbico influenciou significativamente a homeostase prostática de ratos com consumo alto de etanol. A intensidade do esforço físico interagiu com o consumo de etanol, aumentando significativamente as concentrações de corticosterona. Estudos têm demonstrado elevações significativas na corticosterona em ratos durante períodos agudos de exercício de resistência (Gotshalk et al., 1997; Kraemer et al., 1998, 2005; Ratamess et al., 2005). Em períodos crônicos, essa elevação tende a normalizar ou reduzir (Marks et al., 2006; McCall et al., 1999). Metabolicamente, o protocolo demandou alto volume, intensidade de moderada a alta, com períodos curtos de descanso e recuperação, gerando maior resposta da corticosterona juntamente com o consumo de etanol (E+T) em relação aos demais grupos. Ao passo que o alto volume do exercício de resistência resultou em grande demanda metabólica e significativa redução do índice T/C.

Estudos utilizando esse modelo experimental revelaram adaptação ao treinamento físico semelhante ao observado em humanos (Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002). Pesquisas relataram a interação entre as concentrações de corticosterona e testosterona circulantes (Lund et al., 2004; Rubinow et al., 2005). A exposição excessiva a corticosterona, proporcionada pelo treinamento ou etanol, pode levar a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HHA) com alteração na secreção de ACTH e corticosterona. Como mecanismo de autodefesa da elevação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) a corticosterona periférica inibi a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), conseqüentemente do hormônio luteinizante (LH) e do crescimento (GH).

A variação dos hormônios androgênicos e estrogênicos são os principais desencadeadores de alterações prostáticas. Avaliações primárias do câncer de próstata são baseadas na determinação plasmática de testosterona total, DHT e estradiol. No presente trabalho, observou-se redução nesses parâmetros no grupo T em relação ao C e no E em relação ao E+T, reflexo do treinamento resistido alcançado e da interação do etanol no organismo. O exercício físico isolado e com a interação do etanol causou supressão nos receptores testiculares de LH em resposta ao aumento induzido pelo treinamento físico no ACTH e corticosterona, influenciando diretamente a secreção da testosterona testicular. Com a redução da testosterona houve aumento do estradiol, demonstrada no grupo T em

relação aos outros grupos. Diminuição do CRH, AVP (arginina-vasopressina) e aumento nas concentrações do receptor de glicocorticóides têm sido postulado subjacente ao efeito supressor da testosterona em roedores (Lund et al., 2004).

Estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de etanol cronicamente pode levar ao câncer de próstata (Sharpe and Siemiatycki, 2001). Em contradição, estudos relataram que o consumo de etanol não possui efeitos drásticos na próstata (Crispo et al., 2004), pois homens que morrem com cirrose devido ao consumo excessivo não apresentam alterações prostáticas devido a baixa expressão hormonal (Frea et al., 1987; Platz et al., 2004). No entanto, essas observações são limitadas e requerem confirmações. Investigações têm indicado que a desregulação hormonal afeta a homeostase prostática, podendo levar a patologias como a hiperplasia prostática benigna (HPB) ou câncer (Thorpe & Neal, 2003; Marker et al., 2003). Contudo, a testosterona (DHT) e o estradiol atuam de forma conjunta. Ambos exercem seus efeitos biológicos através dos respectivos receptores. O receptor de andrógeno (AR) na próstata é acionado pela ligação da DHT, convertida a partir da testosterona pela atividade da enzima 5 α -redutase. O aumento da atividade do AR está relacionado com o polimorfismo genético para AR, podendo ser indicativo de anormalidades prostáticas. E a ação estrogênica é mediada pela ligação com seus receptores, ER- α e ER- β , expressos no estroma e epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2003, McPerson et al., 2007).

O mecanismo do AR relacionado a progressão do câncer de próstata é o aumento na sensibilidade e quantidade devido a alterações estruturais. Para conter a progressão das doenças prostáticas, as terapias buscam a regulação baixa da expressão de AR (Culig et al., 2002). No presente trabalho, o treinamento físico resistido sozinho ou a interação com o etanol reduziu a atividade dos receptores de andrógenos em relação aos grupos C e E. Essas alterações no AR prostático acompanharam a redução das concentrações plasmáticas de testosterona e DHT. Aproximadamente 80 a 90% dos cânceres de próstata são dependentes de andrógenos e em fase inicial a terapia endócrina é diretamente relacionada com a redução sérica de andrógenos e a inibição de AR (Denis & Griffiths, 2000). A regulação no eixo HHA proporcionada pelo exercício físico reduz a testosterona e o DHT circulante inibindo a expressão prostática de AR.

Nalund et al. (1988) relatou que a desregulação hormonal é o mais importante fator etiológico no desenvolvimento prostático de ratos. Pouco se sabe a respeito da adaptação aguda e crônica na síntese e secreção do estradiol em resposta ao treinamento resistido (Kraemer et al., 2005). Além disso, estudos relatam que o consumo de etanol aumenta a aromatização da testosterona para estrógeno (Chung, 1990). No entanto, foi observado aumento significativo do estradiol no grupo T. O consumo de etanol ou a interação com o treinamento físico não aumentou o estradiol. A ação do estradiol via ER- α induz a proliferação celular na mama, útero e o desenvolvimento da próstata. Já o

estradiol, via ER- β , inibi a proliferação e promove à diferenciação da próstata, glândula mamária, colón e células-tronco da medula óssea (Sugima et al., 2010). A expressão reduzida dos receptores de estradiol foi observada no grupo E comparada com os demais grupos. Os camundongos com baixa expressão de ER- β apresentaram na próstata ventral hiperplasia epitelial e focos hiperplásicos (Sugima et al., 2010). Existe o balanço entre os dois receptores, o ER- β é influenciado pelos androgênios circulantes ou ativação dos ER- α (Ilic et al. 1996). Quando há maior expressão de ER- α do que ER- β , pode ocorrer maior proliferação, menor diferenciação, maior expressão de BCL2, conseqüentemente, hiperplasia. O aumento no ER- β pode promover proteção contra o câncer de próstata. Nossos dados mostraram que o treinamento físico aumentou a expressão dos ER- α e ER- β em ambos os grupos (T e E+T). Além de aumentar a expressão de ambos receptores, o exercício foi capaz de aumentar a expressão do ER- β comparado ao ER- α .

A ação prostática do estradiol ou 3 β -Adiol é mediada pela interação com os receptores ER- α e ER- β , ambos expressos na próstata adulta de ratos e humanos, mas com clara diferença na localização (Sugimoto *et al.*, 2010). Altas concentrações de 3 β -Adiol são encontradas na próstata em valores superiores as de estradiol (Sugimoto *et al.*, 2010). Esse metabólito parece ser o ligante natural do ER- β epitelial. Possivelmente, houve aumento da expressão de ER- β decorrente da conversão de DHT para 3 β -Adiol promovido pelo exercício físico.

Como consequência da maior expressão dos SHRs, os animais treinados demonstraram menor índice de proliferação e maior de apoptose. É sabido que o etanol pode ocasionar maior expressão de ER- α e levar ao aumento da proliferação celular no câncer de mama via AMPc (Singletary *et al.*, 2001). O aumento da expressão de ER- β inibe a proliferação e migração do câncer *in vitro*, diminuindo o crescimento prostático (Sugimoto *et al.*, 2010) e atua de forma pró-apoptótica. Diminuição na progressão celular atrasa a progressão de doenças prostáticas. Outros estudos têm demonstrado o efeito anti-proliferativo do exercício físico (Praag *et al.*, 1999;). A redução na proliferação desempenhou fator importante na ação preventiva de lesões prostáticas através do exercício físico na próstata de ratos com alto consumo de etanol. O exercício físico diminuiu a expressão do AR, potencial indutor de proliferação prostática. O etanol aumentou a proliferação celular na próstata de ratos, corroborando com alta expressão de AR. Historicamente, a baixa regulação do AR tem sido associada com a diminuição do risco de câncer. Sugere-se que o exercício físico modula a função e a expressão dos receptores de hormônios esteróides na próstata, promovendo a relação positiva entre apoptose e proliferação celular minimizando os efeitos do etanol.

Portanto, o exercício físico pode alterar o balanço hormonal prostático e estimular a expressão dos receptores de hormônios esteróides. As alterações hormonais parecem ser eficientes na

manutenção do balanço glandular. A reatividade na expressão dos receptores esteroidais, promovida pelo exercício físico resistido, indica diferenças na sinalização parácrina para a dinâmica prostática e destaca os precursores estrogênicos sobre os mecanismos das alterações. Pode-se inferir que o exercício físico resistido com intensidade moderada pode reduzir os riscos clínicos de câncer prostático *in vivo* mesmo sobre ação do etanol.

Agradecimentos

Ao grupo de pesquisa em Biologia da Reprodução pelo acesso aos laboratórios e a FAPESP, Proc. 08/00479-6, pelo apoio financeiro.

Referencias Bibliográficas

Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger SM. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*. 2002;52:69-81.

Antonelli J, Freedland SJ, Jones LW. Exercise therapy across the prostate cancer continuum. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2009;12:110

Asano, K., Maruyama, S., Usui, T. & Fujimoto, N. Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocrine Journal* 2003; 50, 281–287.

Banzatto AD, Kronka SN. Experimentação agrícola. Jaboticabal: Funep, 1989; 247.

Cagnon VHA, Garcia PJ, Martinez M, Padovani CR. Ultra-Structural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to Experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate* 1996; 28, 341–346.

Cagnon VHA, Garcia PJ, Guazzelli Filho J, Martinez FE. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1998;3077–84.

Chuffa LG, Padovani CR, Martinez FE. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB adult rats in response to ethanol. *Maturitas*. 2009;62:21-29.

Chung KW. Effects of chronic ethanol intake on aromatization of androgens and concentration of estrogen and androgen receptors in rat liver. *Toxicology* 1990; 62:285–295.

Crispo A, Talamini R, Gallus S, Negri EVA, Gallo A, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Montella M. Alcohol and the Risk of Prostate Cancer *And. Urology* 2004; 64:717-722.

Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A. (). Androgen receptors in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2002; 9: 155-170.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 2002; 70:473-485.

Denis LJ, griffithsk. Endocrine treatment in prostate cancer. *Sem Surg Oncol* 2000;18:52-74.

Freia B, Annoscia S, Stanta G, Lozzi C, Carmignani G. Correlation between liver cirrhosis and benign prostatic hyperplasia: a morphological study. *Urol Res* 15: 311-314, 1987. 25.

Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002; 132: 3456-3464.

Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001;2:674-80.

Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *Journal of Nutrition* 2001; 131: 3109-3120.

Gobatto CA, Sibuya CY, Kokubun E, Luciano E, Azevedo JRM, Mello MAR. Caracterização da Intensidade de Exercício e do Efeito do Treinamento Físico no Modelo de Natação de Ratos Wistar. *Motriz* 2001; 7:57-62.

Gotshalk LA, Loebel CC, Nindl BC, Putukian M, Sebastinelli WJ, Newton RU, Häkkinen K, Kraemer WJ. Hormonal responses of multiset versus single-set heavy-resistance exercise protocols. *Canadian Journal of Applied Physiology* 1997;22: 244-255.

Harri M, Kuusela P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiologica Scandinavica* 1986; 126: 189-197.

Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5331-5335.

Ilic M, Vlajinac H, Marinkovic J. Case control study of risk factors for prostate cancer. *Br. J. Cancer* 1996; 74: 1682–1686.

Imamov O, Lopatkin NA, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 2004; 351: 2773–2774.

Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports medicine* 2005; 35: 339-61.

Kraemer WJ, Hakkinen K, Newton RU, McCormick M, Nindl BC, Volek JS, Gotshalk LA, Fleck SJ, Campbell WW, Gordon SE, Farrel PA, Evans WJ. Acute hormonal responses to heavy resistance exercise in younger and older men. *European Journal of Applied Physiology* 1998; 77: 206-211.

Lieber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Sem. Liver Dis.* 1993;13:136-53.

Lieber CS, De Carli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepathol.* 1991;12:394-01.

Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ 2004 Dihydrotestosterone may inhibit hypothalamo-pituitary-adrenal activity by acting through estrogen receptor in the male mouse. *Neurosci Lett* 365:43–47

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R & Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* 2003;253:165–174.

Marks LS, Mazer NA, Mostaghel E, Hess DL, Dorey FJ, Epstein JI, Veltri RW, Makarov DV, Partin AW, Bostwick DG, Macairan ML, Nelson PS. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296:2351–2361.

Martinez FE, Garcia PJ, Padovani CR, Cagnon VHA, Martinez M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate.* 1993;22:1–8.

Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2000;32:1751-84.

Marx JO, Ratamess NA, Nindl BC, *et al.* Low-volume circuit versus high-volume periodized resistance training in women. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33: 635-43.

McCall GE, Byrnes WC, Fleck SJ, *et al.* Acute and chronic hormonal responses to resistance training designed to promote muscle hypertrophy. *Can J Appl Physiol.* 1999; 24: 96-107.

Mccall GE, Byrnes WC, Fleck SJ, *et al.* Acute and chronic hormonal responses to resistance training designed to promote muscle hypertrophy. *Can J Appl Physiol* 1999; 24: 96-107

Mcperson SJ, Ellen SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzscheier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2007; 148: 566–574.

Mendes LO, Amorim JPA, Teixeira GR, Chuffa LGA, Fioruci BA, Pimentel TA, Marks LS, Mazern A, Mostaghel E, Hess DL, Dorey FJ, Epstein. Mast Cells and Ethanol Consumption: Interactions in the Prostate, Epididymis and Testis of UChB Rats. *American journal of reproductive immunology* 2011; 1989: 1-9

Murty BR. The biochemistry of alcohol toxicity. *Resonance* 2004;41-47.

Naslund MJ, Strandberg JD, Coffey DS. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental non- bacterial prostatitis. *J Urol* 1988;140:1049–1053.

Pinheiro PFF, Almeida CCD, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. Ultrastructure of the urethra of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *World Journal of Urology.* 2003;20:378-84.

Platz EA, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC. Alcohol Intake , Drinking Patterns , and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* 2004;159:444-453

Ratamess NA, Kraemer WJ, Volek JS, Maresh CM, Vanheest JL, Sharman MJ, Rubin MR, French DN, Vescovi JD, Silvestre R, Hatfield DL, Fleck SJ, Deschenes MR. Androgen receptor content following heavy resistance exercise in men. *Blood* 2005; 93:35-42.

Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mcpherson SJ. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr. Relat Cancer* 2003;10: 187– 191.

Risbridger GP, Wang H, Young P, Kurita T, Wang YZ, Lubahn D, Gustafsson JA, Cunha G. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 2001; 231: 432–442.

Rubinow DR, Roca CA, Schmidt PJ, Danaceau MA, Putnam K, Cizza G, Chrousos G, Nieman L. Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men. *Neuropsychopharmacology*, in press

Sharpe CR, Siemiatycki J. Case-control study of alcohol consumption and prostate cancer risk in Montréal, Canada. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 589–98

Sugiyama N, Barros RP, Warner M, Gustafsson JA. Erbeta: recent understanding of estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 545-552.

Thorpe A, Neal D: Benign prostatic hyperplasia. *Lancet* 2003; 361: 1359–1367.

Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35, 1389–1394.

Weihua, Z Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98, 6330–6335.

World Health Organization (OMS). Alcohol and injury in Emergency Departments. 2007.

Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of National Cancer Institute* 2000; 92: 1472-1489.

Tabelas

Tabela 1. Grupos experimentais.

Tratamentos	Grupos UChB	
	Ausência de etanol	Consumo de etanol
Sedentário	(C) - Ratos que preferem etanol (ausência de etanol - Controle)	(E) - Ratos que preferem etanol (consumo alto de etanol - Controle)
Treinado	(T) - Ratos que preferem etanol (ausência de etanol - Treinado)	(E+T) - Ratos que preferem etanol (consumo alto de etanol - Treinado)

Legendas

Figura 1 - Concentração de corticosterona (A), índice T/C (B), testosterona total (C), DHT (D) e estradiol (E).

Figura 2 - Imunohistoquímica da próstata ventral do controle (A, E, I), treinado (B, F, J) etanol (C, G, K) e etanol+treinado (D, H, L). (A-D) imunorreatividade para AR, setas nos núcleos das células epiteliais e estromais. (E-H) imunorreatividade ER- α , setas no epitélio e estroma. (I-L) imunorreatividade ER β , setas nas células epiteliais e no estroma periacinar. Barra=20 μ m.

Figura 3 - (A) Representa western blot e (B) análise semi-quantitativa dos efeitos do treinamento e do etanol nos AR, ER- α , ER- β extraídos da próstata ventral. As proteínas foram identificadas com a densidade. A β -Actina foi usada como marcador endógeno. Dados foram expressos em média \pm erro padrão (n =10).

Figura 4 – Imunomarcção do Ki-67 e detecção de apoptose na próstata ventral dos grupos controle (A, E), treinado (B, F), etanol (C, G) e etanol+treinado (D, H). (A-D) imunorreatividade do Ki-67 (setas) no epitélio. (E-H) fragmentação do DNA (setas) nas células epiteliais. Barra=20 μ m. (I) Índices de proliferação e apoptose da próstata ventral nos grupos experimentais (n = 5).

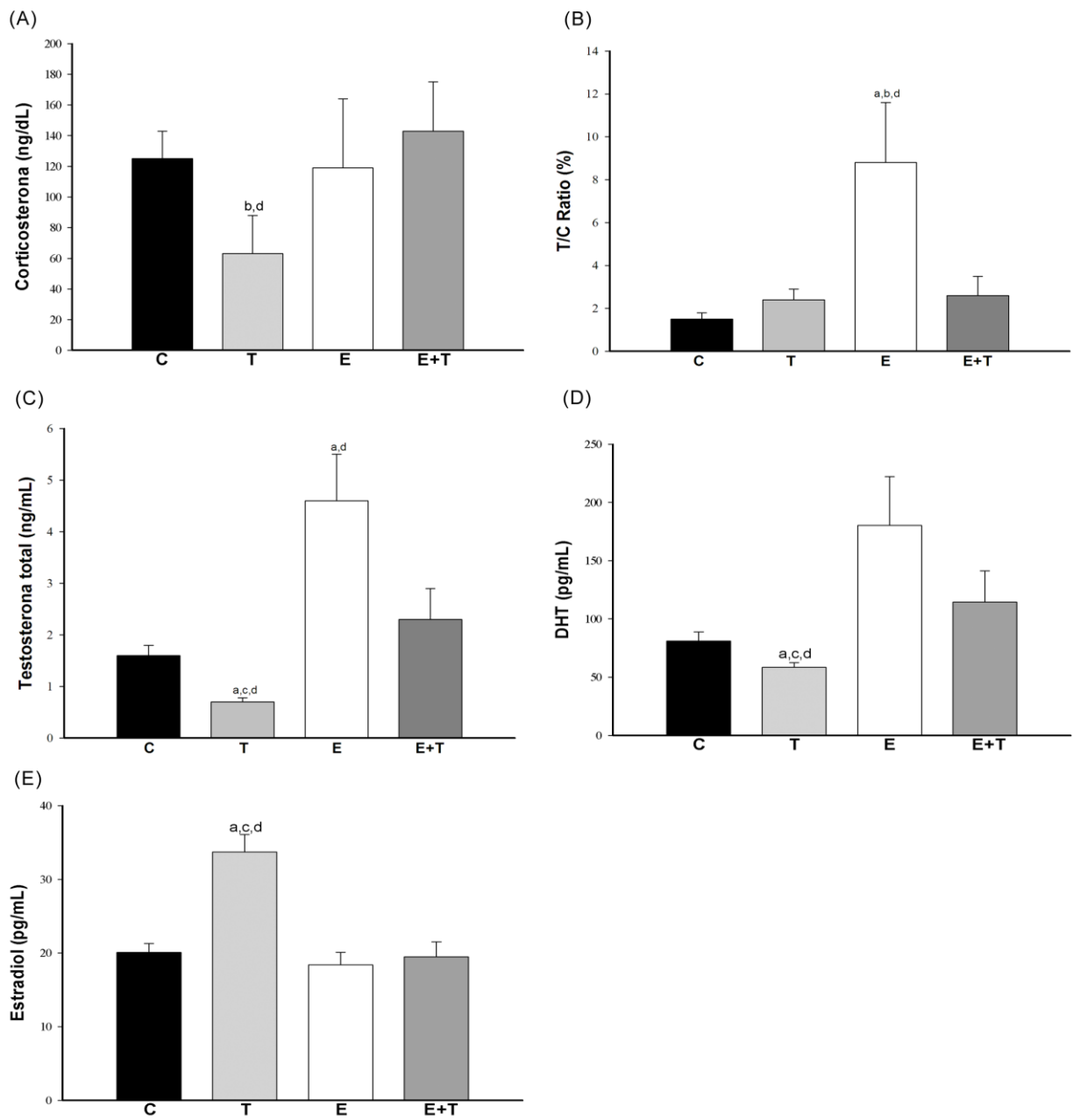


Figura 1

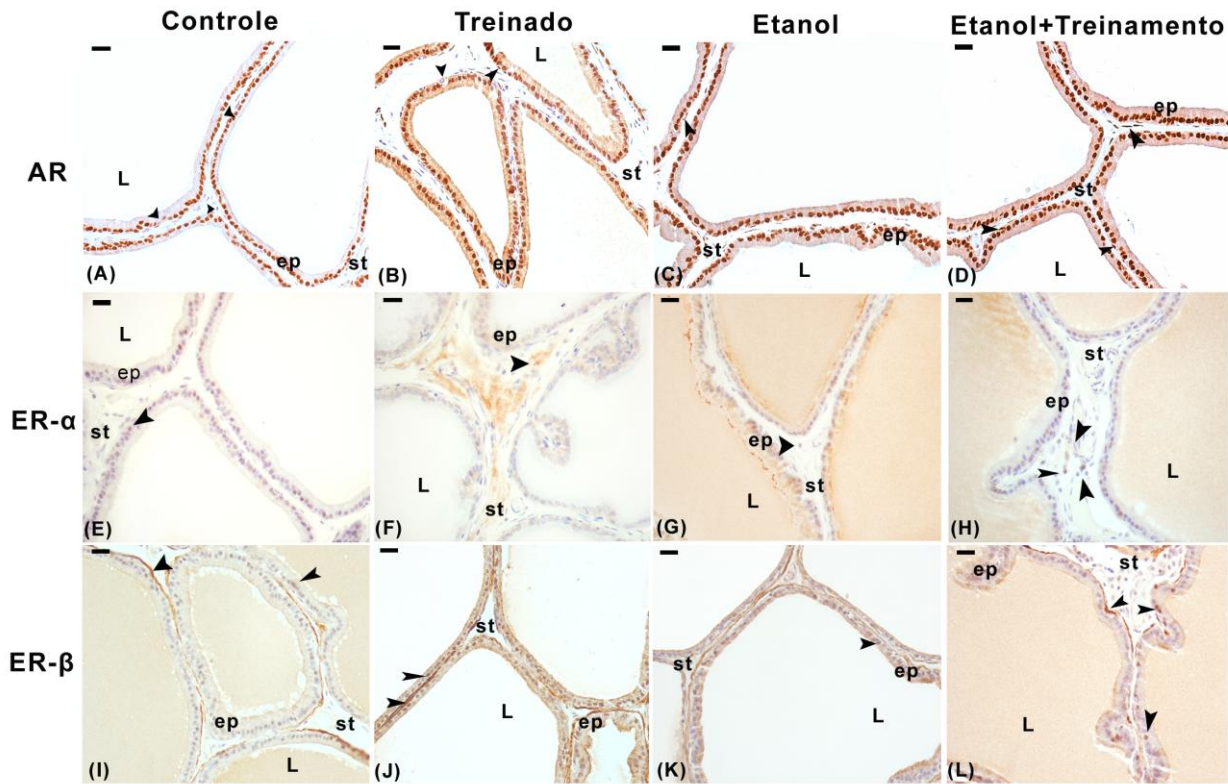


Figura 2

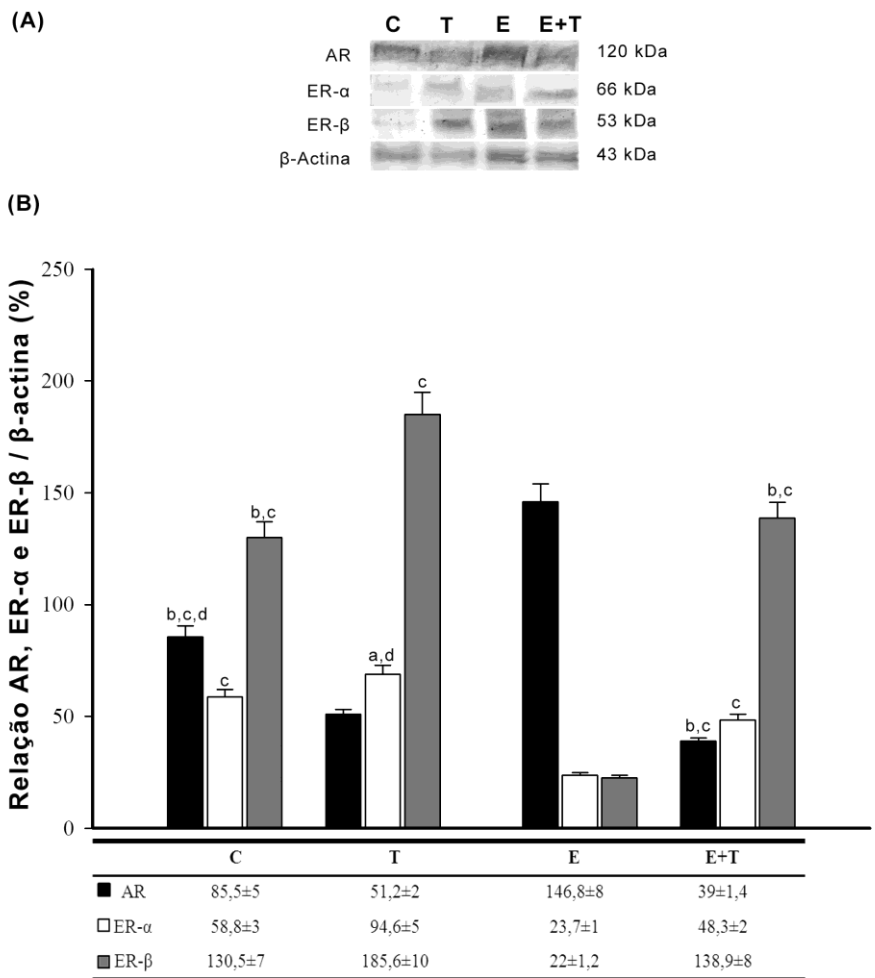


Figura 3

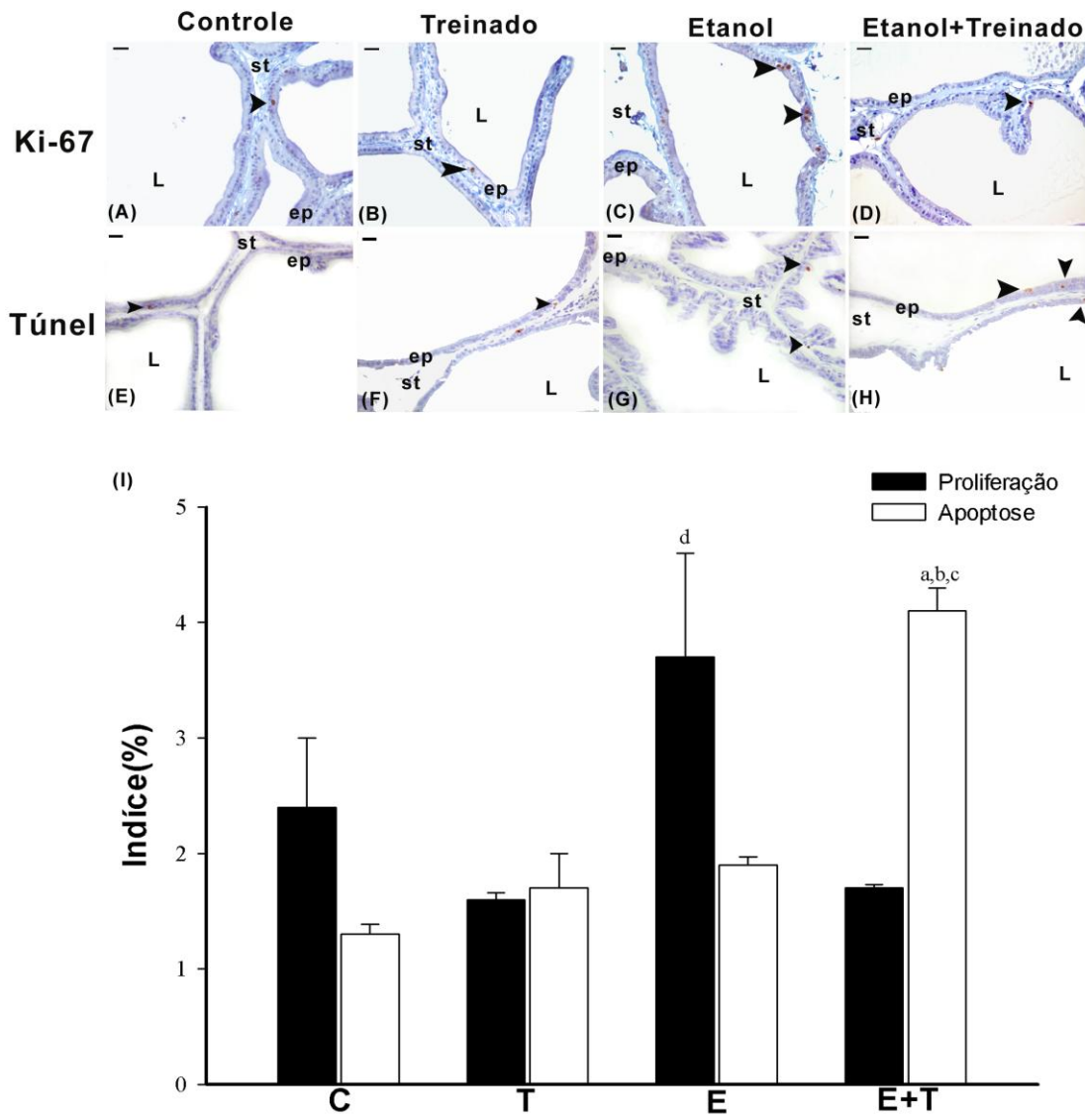


Figura 4

PERFIL ENERGÉTICO E LIPÍDICO DA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS UChB SOB TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO

G.R. Teixeira ^{a*}, W.J. Favaro ^a, P. F. F. Pinheiro ^a, L.G.A. Chuffa ^a, L.O. Mendes^a, B.A. Fiorucci^a, J.P.A. Amorim^a, O.A. Martins, W. Mello-Junior^a, M. Martinez^b, F.E. Martinez^a.

^a Department of Anatomy, Institute of Biosciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970, Brazil.

^b Department of Morphology and Pathology, UFSCar – Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil.

Título resumido: Perfil lipídico é modulado pelo exercício físico e pelo etanol

Suporte financeiro: FAPESP – São Paulo Research Foundation, Grant number: 2008/00479-6.

***Correspondência do autor:**

Correspondence to Giovana Rampazzo Teixeira - Department of Anatomy, Biosciences Institute, UNESP - Univ Estadual Paulista, P.O. Box 510, Postal Code: 18618-000, Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP – Brazil, Telephone number: +55 (14) 3811-6040, Fax: +55 (14) 3811-6361.
E-mail: giovana@ibb.unesp.br

Resumo

O câncer de próstata é grave, afetando homens em todo o mundo. Fatores estão associados à incidência do câncer de próstata, como o abuso do etanol, o estresse crônico e a dieta rica em gordura. O exercício físico aumenta a oxidação e a disponibilidade dos lipídios. A alteração do metabolismo lipídico é característica importante das células neoplásicas e os andrógenos e os fatores de crescimento são os principais agentes de regulação nas células cancerosas da próstata. Os receptores de lipídios são ferramentas importantes na compreensão do metabolismo lipídico na próstata. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar se o exercício físico resistido altera o perfil energético e lipídico da próstata de ratos UChB. Durante o protocolo de treinamento, o consumo de ração, etanol e peso dos animais foram avaliados para os efeitos energéticos. Os ratos foram eutanasiados aos 190 dias de idade, o sangue coletado para as dosagens bioquímicas e hormonais de testosterona livre e IGF-1 e a próstata ventral processada para western blot do CD36, SCAP, LIMPII, SRBP-1. O lipídio prostático e sérico, a testosterona livre plasmática, o IGF-1 e os parâmetros energéticos se correlacionaram com o exercício físico nos ratos UChB. O exercício físico resistido tem efeito protetor do perfil lipídico da próstata em ratos UChB.

Palavras-chave: metabolismo de lipídios, etanol, próstata ventral, exercício físico.

Introdução

Doenças prostáticas estão relacionadas ao estilo de vida, dieta, consumo excessivo de etanol, obesidade, tabagismo e atividade física. O fator ambiental de interesse é o uso do etanol, pois seu consumo aumenta o risco de câncer de laringe, faringe e, possivelmente, o prostático (Jensen et al., 1996). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o consumo crônico de etanol causa alterações no sistema genital, como acúmulo de gotas lipídicas na uretra (Pinheiro et al., 2007), no testículo, atrofia do epidídimo (Martinez et al., 2000), redução do volume celular do epitélio secretor dos lobos ventrais e laterais da próstata e da glândula de coagulação (Martinez et al., 1993; Cagnon et al., 1996, 1998), aumento da inflamação prostática (Mendes et al., 2011) e alterações histológicas no ovário (Chufa et al., 2009). Contudo, o etanol pode influenciar o metabolismo de andrógenos e aumentar os estrógenos (Thorpe & Neal, 2003).

A variedade de ratos UChB (consumo voluntário alto de etanol) é utilizada para investigações relacionadas à ingestão de etanol. Para que ocorra a manifestação da doença, alcoolismo, é necessário, além da predisposição genética, que o paciente tenha bebido etanol em grandes quantidades durante longo período, o que faz da variedade UChB adequado modelo experimental, pois possui predisposição genética para ingerir voluntariamente grandes quantidades de etanol a 10%. Há caminhos importantes para o enfoque dos estudos sobre o alcoolismo humano que podem ser investigados com o modelo UChB: a busca de marcadores genéticos que indiquem a predisposição ao alcoolismo, a busca de terapias eficazes para o tratamento do alcoolismo e as alterações morfofuncionais provocados pela ingestão de etanol (Mardones, 1993; Martinez et al., 2000).

A expressão de vários genes envolvidos na síntese, transporte e metabolismo dos ácidos graxos livres e colesterol (Heermers et al., 2004) ou apenas ativação do fator de transcrição que modula e coordena a expressão desses genes é estimulado por andrógenos (Heermers et al., 2004; Swinnen et al., 2004). O aumento dos lipídios na próstata pode alterar a composição, concentração e função dos lipídios da membrana ou é necessário para a síntese de prostasomos (Swinnen et al., 2004).

A ativação dos genes lipogênicos não se dá diretamente pelo AR, mas são alvos transcricionais das proteínas ligadas aos elementos reguladores de esterol (SREBP - sterol-regulatory element-binding protein) que atuam como mediadores dos efeitos lipogênicos dos andrógenos (Swinnen et al., 2004). Os SREBP são sintetizados e permanecem ancorados na membrana do retículo endoplasmático e atuam como fator de transcrição para expressão do receptor de LDL, importante para ligação e internalização do LDL, principal transportador de colesterol e ácidos graxos no sangue (Chen & Hughes-Fulford, 2001; Swinnen et al., 2004).

Os receptores CD36 e LIMPII são denominados de scavenger receptors com a função de limpeza e por reconhecer e remover macromoléculas desnecessárias no meio celular, como a LDL (lipoproteínas de baixa densidade) modificada. A LIMPII (Lysosomal Integral Membrane Protein II) é identificada como membro da família scavenger receptor classe B como a CD36 (Fujita et al., 1992). Crombie & Silverstein (1998) relataram que o LIMPII pode ter função semelhante ao CD36, além de receptor de lipídios, pode conectar-se a trombospondina (TSP). CD36 é a glicoproteína de superfície celular presente em plaquetas, monócitos, alguns tipos de células endoteliais, epiteliais e eritrócitos (Greenwalt et al., 1990; 1992; Knowles et al., 1984). O CD36, além de receptor de lipídios, também é um dos receptores de transmembrana da TSP, glicoproteína que naturalmente inibi a angiogênese, essencial para o crescimento tumoral (Calvo & Vega, 1993; Vallbo et al., 2004; Vallbo & Damber, 2005; Damber et al., 2006). Vallbo et al. (2004) observaram que a TSP está expressa em próstata normal e BPH, porém está diminuída em tecido prostático pré-maligno (PIN – neoplasia intra-epitelial) e ausente no câncer prostático.

O exercício físico atualmente é realizado como estratégia para redução de sobrepeso, pois aumenta o gasto energético, reduz o perfil lipídico, o risco de doenças cardiovasculares, previne o desenvolvimento e a progressão da arteriosclerose, traz benefícios para a dislipidemia e é o melhor tratamento para diabetes mellitus tipo 2 (Grandjean et al., 2000). Seu mecanismo de ação possibilita a manutenção do peso corporal, o controle da pressão arterial, à resistência insulínica, a estabilização endotelial e a saúde vascular (Botezelli et al., 2010). Assim, estudos têm atribuído ao exercício físico à função terapêutica auxiliar no tratamento do câncer de próstata. Existem relatos que o exercício físico muda a progressão do tumor (Westerlind et al. 2003; Bacurau et al. 2007) e aprimora o bem estar psíquico e a qualidade de vida dos pacientes com câncer (Segal et al. 2003; Courtneya 2003). Contudo, nosso objetivo foi analisar o perfil energético e lipídico da próstata de ratos UChB submetidos ao exercício físico resistido.

Material e métodos

Procedimento experimental

60 ratos machos UChB do biotério do Departamento de Anatomia do IBB/UNESP e 20 ratos machos (sem preferencia de etanol) do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, com 21 dias de idade, foram mantidos em caixas de polietileno de fundo sólido (40x30x15cm) forradas com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro) e temperatura (20 à 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital[®]) ad libitum. O protocolo

experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo 83/07-CEEA/IBB).

Aos 65 dias, iniciou-se a fase de seleção dos ratos segundo o perfil da variedade (Mardones & Segovia-Riquelme, 1983). Nesse período, os animais passaram a receber simultaneamente água filtrada, solução de etanol a 10% e ração ad libitum. A avaliação do consumo diário de solução de etanol a 10% foi monitorada por 15 dias. Os animais que apresentaram consumo igual ou maior que 2,0 mL de etanol/100g de peso corpóreo/dia foram selecionados para compor os grupos experimentais da variedade UChB.

Aos 90 dias de idade, os ratos foram divididos em seis grupos: controle (C), recebeu água durante o período experimental e permaneceu sedentário, treinado (T), recebeu água e realizou o protocolo de treinamento físico, abstinente (A), ingeriu etanol por 15 dias para a seleção, em seguida, água até o final do experimento, abstinente + treinamento (A+T), etanol por 15 dias para a seleção, em seguida, água até o final do experimento e realizou o protocolo de treinamento, etanol (E), recebeu etanol e água ad libitum e permaneceu sedentário durante o período experimental e o etanol + treinamento (E+T), recebeu etanol e água ad libitum e realizou o protocolo de treinamento (Tabela 1).

Durante o período experimental, foram monitorados, semanalmente, os consumos de água, de solução de etanol a 10%, da ração e a evolução da massa corpórea. A ingestão de ração (3 kcal/g), consumo de etanol (7 kcal/g) foram usados para obter a energia ingerida, (EI kcal/100g/dia) [= média do consumo alimentar (g) por dia X 100 ÷ pelo peso do animal X 3kcal (g/100g/dia) + quantidade de etanol ingerido por dia (g) X 7 kcal para os animais que consumiram etanol]. Eficiência alimentar (FE g/ kcal = média de ganho de peso/EI) (Seiva et al., 2009).

Treinamento físico- exercício físico resistido através de saltos em meio líquido

Durante a primeira semana de treinamento, os animais dos grupos T, A+T e E+T foram previamente adaptados ao meio líquido e ao exercício físico. O procedimento consistiu de sessões de saltos (três vezes por semana durante sete dias), em reservatório contendo água (30°C± 2°C), com o número de séries crescente (2-4) e repetições (5-10) com 60 segundos de descanso entre cada série, carregando carga de 50% do peso corporal amarrado ao tórax (Oliveira et al., 2002; Cunha et al., 2005). Após o período de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento físico resistido durante 13 semanas e realizaram quatro séries de 10 saltos por dia, carregando carga de peso 50-70% com 60 segundos de descanso entre cada série (Cunha et al., 2005).

Determinações bioquímicas e quantificação sérica da testosterona livre e IGF-1

Glicose, proteína total, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e a fosfatase ácida e alcalina foram determinados no soro pelo método enzimático (Laborlab, São Paulo, SP, Brasil). A glicemia foi determinada pelo método enzimático, utilizando glicose oxidase e peroxidase. O colesterol total foi avaliado enzimaticamente por éster de colesterol/oxidase. Lipoproteína de alta densidade (HDL) foi medida após precipitação das VLDL e LDL e utilizado o método colorimétrico enzimático de polietilenoglicol. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram calculadas pela fórmula de Friedewald. Os triglicérides foram analisados enzimaticamente com glicerol quinase após hidrólise de lipoproteína lipase, seguido de oxidação para o fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio.

A dosagem de IGF-1 foi realizada pelo método imunoenzimático (IEMA) para determinação quantitativa no plasma de ratos (OCTEIA Rat/Mouse IGF-1 kit). A testosterona livre foi dosada por kit de radioensaio (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

Análise de Western blot

Amostras da próstata ventral foram obtidas de cinco animais por grupo, pesadas, congeladas e homogeneizadas em 50µl/mg de tampão de lise. O sobrenadante foi centrifugado e amostra de cada extração foi utilizada para a quantificação da proteína pelo método de Bradford. Alíquotas contendo 50-70 µg de proteína foram separadas por SDS-PAGE em gel de 10% de poliacrilamida sobre condições reduzidas. Depois da eletroforese, as proteínas totais transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL; Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL., USA). As membranas foram bloqueadas com solução de TBS-T, contendo 3% de BSA e incubadas a 4° C overnight com CD-36 (L-17), SCAP (C-20), LIMPII (C-18), SREBP-1 (H-160), produzidos em cabra (diluídos 1:500, 1:250, 1:250, 1:500 Santa Cruz Biotechnology, INC, em 1% BSA, respectivamente). As membranas foram encubadas por 2h com anticorpo secundário conjugado HRP (diluído 1:500 em 1% BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA). A intensidades da imunoreatividade das bandas de cada proteína foram quantificadas de cinco animais em cada grupo, usando scanner Genius Color Page HR8 (Genius, Shenzhen, China) e programa de análise de imagens (NIS-Elements, Advanced Research; Nikon, Tokyo, Japan). β -Actina foi usada como controle endógeno. Os resultados foram expressos em médias da relação entre a intensidade de cada banda e a da β -actina.

Análise estatística

O estudo estatístico foi realizado através de Teste T Student e da análise de variância (ANOVA), complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As

conclusões estatísticas foram realizadas com 5% de significância. Detalhes a respeito da metodologia empregada podem ser encontrados em Banzatto & Kronka (1989). O programa estatístico usado foi GraphPad InStat version 4 e o Sigma Plot version 11.0 para os gráficos.

Resultados

Após 14 semanas de treinamento físico, há diferenças significativas no ganho de peso entre os grupos. A interação do exercício físico e do consumo de etanol promoveu aumento no ganho de peso comparado com os animais que apenas receberam etanol (Tabela 2). Ao final do experimento, os animais treinados apresentaram maior ganho de peso em relação aos animais E+T e A+T ($p < 0,05$), contudo apresentou menor valor em relação ao grupo C (Tabela 2). Os grupos C e T que não tiveram contato com o etanol apresentaram maior consumo alimentar em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Além disso, os animais que receberam etanol e os abstinentes combinados com treinamento físico mostraram perda de apetite, demonstrados pela redução na ingestão alimentar comparada com ratos que apenas treinaram e os respectivos controles (Tabela 2). A eficiência alimentar foi reduzida em ratos abstinentes e tornou-se pronunciada nos ratos que receberam etanol ($p < 0,05$). No entanto, o treinamento físico aumentou a eficiência alimentar nos grupos A+T e E+T ($p < 0,05$) (Tabela 2). Além disso, há correlação negativa entre a ingestão de etanol e o período de treinamento físico durante 13 semanas ($r < -0,78$, $p < 0,001$), evidenciado pela redução do consumo de etanol com o aumento do período de treinamento (Fig. 1). O treinamento físico reduziu a ingestão de etanol, mas aumentou a ingestão total de líquidos, confirmando a maior preferência pelo consumo de água (Tabela 2).

A glicose foi reduzida em ratos tratados com etanol, exceto nos animais que realizaram exercício físico, e nos ratos abstinentes com e sem treinamento, apresentando maiores valores de glicose circulante (Tabela 3). Os valores circulantes de triglicérido (TC), colesterol total, VLDL, LDL, HDL e proteína total foram reduzidos em ratos com ingestão de etanol, diferente significativamente dos valores para os ratos abstinentes e controles. Contudo, o grupo T e o E+T comparado com o E e C, respectivamente, aumentou o TC, VLDL, LDL, HDL, colesterol total e proteína total ($p < 0,05$) (Tabela 3). Os ratos do grupo abstinente possuem valores maiores de proteína total, colesterol total, HDL e LDL comparados com controle ($p < 0,05$) (Tabela 3.).

A testosterona livre foi mais pronunciada nos animais do grupo E e menos em A comparados ao C ($p < 0,05$) (Fig. 2A). No entanto, o treinamento físico reduziu a testosterona livre em ratos com consumo de etanol, além de aumentar no grupo T em relação ao C ($p < 0,05$) (Fig. 2A). Ratos abstinentes apresentaram menores IGF-1 em relação aos demais grupos. O treinamento físico aumentou o IGF-1, exceto com a ingestão de etanol (Fig. 2B).

As CD-36, SCAP, SREBP-1 e LIMPII foram significativamente aumentadas em todos os grupos treinados comparados a β -actina (Fig. 3A-D), exceto a LIMPII do grupo T apresentou menor expressão que o controle (Fig. 3D).

Discussão

Ratos que preferem etanol e o ingeriram apresentaram diminuição no consumo alimentar e na eficiência alimentar, porém a energia ingerida foi maior que os animais que preferem etanol e não ingeriram durante o experimento etanol (abstinentes), devido ao alto valor energético do etanol. Assim a interação do exercício físico e da preferência ao etanol diminuiu a ingestão de alimento e calorias e aumentou a eficiência alimentar e o ganho de peso. Os ratos sem preferência ao etanol (NEP) com o exercício apresentaram, contrariamente, maior ingestão de alimento e energia ingerida e menor eficiência alimentar e ganho de peso, corroborando a literatura especializada (Suh et al., 2007; Yates et al., 2007).

A regulação do apetite e a ingestão de energia são fundamentais na manutenção do peso corpóreo. O etanol possui efeito anorexo (Pirola & Lieber, 1976; Lancaster, 1998; Larue-Achagiotis et al., 1990; Sforcin et al., 1997; Strbaĵk et al., 1998). O NADH produzido pela conversão do etanol a acetaldeído desempenha papel fundamental na bioenergética celular e pode modular a síntese de ácidos graxos e suprimir a β -oxidação (Lieber, 2004). Ainda, o valor calórico de etanol (calorias vazias) não contribui para o ganho de peso e a síntese de lipídios é bloqueada pela inibição da desidrogenase da glicose (Ayene et al., 2002). O aumento de peso em pessoas sedentárias contribui para o desenvolvimento da diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (Ballard-Barbash et al., 2009). Em nosso estudo, o exercício físico reduziu a eficiência alimentar, minimizando o acúmulo de calorias em ratos sem preferência ao etanol. Ao contrário, em ratos que consumiram etanol, reduziu a eficiência alimentar e o ganho de peso. O exercício físico atuou melhorando essas condições tirando os animais do quadro de desnutrição provocado pelo etanol. Strbak et al. (1998) demonstraram que, quando aumenta o consumo de etanol, o consumo de alimento é muitas vezes reduzido, dependendo da idade e da variedade. Pagano et al. (1999) sugerem que os mediadores das respostas lipolíticas, promovidas pelo exercício físico, podem estar envolvidos na redução plasmática da leptina, promovendo melhor ganho de peso e eficiência alimentar. Eficiência alimentar reduzida resultando em baixo ganho de peso promovido pelo consumo de etanol sugere ser capaz de mudar o metabolismo energético e a habilidade de estocar energia. Além disso, a glicose foi menor na presença do etanol, demonstrando seu papel como inibidor da gliconeogênese (Furuya et al., 2003, 2005). A

interação do exercício físico com o consumo de etanol resultou em melhora do metabolismo energético demonstrado pelo aumento da glicose.

O exercício físico pode promover modulações crônicas no perfil lipídico, como: diminuição na concentração de TG, LDL (Honkola et al., 1997; Thompson et al., 1997; Halle et al., 1999; Silva et al., 2002), colesterol total (Honkola et al., 1997; Silva et al., 2002), resistência à insulina (Duncan et al., 2003), massa corporal (Halle et al., 1999), índice de massa corporal com concomitante aumento do HDL, massa corporal magra e taxa metabólica basal (Thompson et al., 1997; Halle et al., 1999; Silva et al., 2002). Estas alterações podem ser observadas tanto em indivíduos sedentários quanto em fisicamente ativos ou atletas e em pacientes diabéticos (Crouse et al., 1997; Thompson et al., 1997; Ferguson et al., 1998; Halle et al., 1999; Silva et al., 2002).

Os lipídios plasmáticos, colesterol, triglicérides e fosfolipídios com compostos hidrofóbicos são transportados pelo fluxo sanguíneo por lipoproteínas solúveis em água. O consumo de etanol altera o perfil lipídico, pois gera lesões hepáticas danificando o metabolismo dos ácidos graxos. Fisher et al. (2003) encontrou aumento de triglicérides e colesterol no fígado, mas frações menores no sangue após tratamento com etanol. A regulação hormonal controla as alterações dos lipídios séricos. Mooren et al. (1994) relataram a diminuição de colesterol total, lipoproteínas e triglicérides circulantes, após suplementação com 17β -estradiol. O etanol consumido em altas quantidades e por períodos prolongados modifica o eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada, reduzindo a testosterona total e aumentando a aromatização para estradiol (Chung, 1990). No nosso estudo, alterações no metabolismo do colesterol total, lipoproteínas (LDL, VLDL), manifestada pelo decréscimo de triglicéride plasmático foram encontradas nos animais que consumiram etanol. Além disso, o treinamento físico resistido em ratos normais e que consumiram etanol aumentaram o perfil lipídico sérico. Sabe-se que os glicocorticóides estimulados pelo treinamento físico são capazes de aumentar a glicogênese hepática e promover a mobilização de ácidos graxos dos adipócitos e sua utilização para obtenção de energia (Pignatelli et al., 1998). Durante o período de exercício, o aumento do GH tem papel metabólico importante com efeitos lipolítico e anabólico, estimulando os ácidos graxos plasmáticos (Hunter et al., 1965). Em condições normais, a noraepinefrina, epinefrina e a sensibilidade a insulina altera a quantidade dos ácidos graxos livres e triglicérides no plasma (Haude & Völcker, 1991). Com o treinamento, a secreção das catecolaminas aumenta, justificando o aumento dos triglicérides durante as condições normais dos ratos treinados.

A desregulação androgênica circulante, principalmente, da testosterona livre e as concentrações de IGF-1 podem levar ao câncer prostático, promovendo a progressão do ciclo celular e inibindo a apoptose, tanto direta como indiretamente (Chan et al., 1998; Pollak et al., 1998; Wolk et al., 1998; Shi et al., 2001). Dieta com baixa gordura e exercício físico regular promove reduções na

insulina, IGF-I e testosterona livre, juntamente com aumentos da globulina ligada a hormônios esteróides (SHBG) e proteína 1 transportadora do fator de crescimento ligado a insulina (IGFBP-1). O aumento da SHBG reduz a taxa de testosterona livre que atua na próstata. No presente estudo, a testosterona livre sofreu influência do etanol com maiores valores, no entanto, houve a interação do exercício físico e do consumo de etanol reduzindo-a. Nos ratos sem a preferência ao etanol, o treinamento aumentou a testosterona livre corroborando com o aumento promovido nas frações da testosterona total (Teixeira et al., 2011, dados não publicados).

O IGF-1 é produzido em tecidos normais e em tumores, sendo de 70-80% circulante proveniente do fígado (Yakar et al., 1999; LeRoith & Roberts, 2003). O IGF-1 é primeiramente controlado pelo GH. Nosso estudo encontrou padrão diferenciado de IGF-1 entre os grupos. O etanol juntamente com o treinamento físico aumentou o IGF-1 circulante. Menores valores de IGF-1 foram encontrados no grupo abstinente. Galvão et al. (2007) realizaram exercício resistido por 20 semanas e encontraram o IGF-1, DHEA e GH aumentados e a testosterona livre suprimida. Resultados semelhantes foram encontrados em nossos estudos, pois o exercício físico aumentou o IGF-1 circulante nos grupos T e A+T comparado com C e A, respectivamente. Diversos autores têm descrito a relação entre marcadores de câncer prostático e fatores de crescimento (Marszalek et al., 2005; Lacey et al., 2001), sugerindo que o aumento de IGF-1 e GH pode não comprometer a progressão e o estado das doenças prostáticas.

A fim de fornecer um suprimento adequado de colesterol para as células, vários mecanismos de captação de lipoproteínas envolvem receptores, importantes no metabolismo lipídico, como a CD36, SRBP-1, LDLR, LIMPII, entre outros (Rigotti et al., 2003; Arenas et al., 2004). Descrevemos a expressão dos receptores de lipídios na próstata normal e em condições experimentais de alterações metabólicas. Observamos alterações na expressão dos receptores lipídicos dos ratos UChB com treinamento físico. O consumo crônico de etanol produz alteração no metabolismo dos lipídios na próstata, evidenciado pela significativa diminuição na expressão de CD-36, LIMPII e SCAP. O exercício físico resistido provocou alterações significativas no perfil lipídico da próstata, aumentando a expressão de CD-36, SCAP, SREBP-1 e LIMPII sozinho ou com a interação do consumo de etanol. Os receptores de lipídeos, receptores scavenger, regulam a seletiva obtenção de lipídios pelas células (ácidos graxos, colesterol), lipoproteína (LDL oxidada, HDL, VLDL) e outras moléculas da matriz extracelular, como colágeno e trombospondina (Calvo & Vega, 1993; Handberg et al., 2006). O aumento da lipogênese é característica importante em células neoplásicas (Kuhajda, 2000) e os andrógenos são os principais agentes em células de câncerosas na próstata (Swinnen et al., 2004).

O SREBP-1 é o fator transcricional que regula a expressão do receptor de LDL, internalizando o colesterol e os ácidos graxos transportados pelo sangue (Chen & Hughes-Fulford, 2001, Swinnen et al., 2004). O complexo SREBP-SCAP-INSIG é estabilizado pelo colesterol. Quando os esteróides são baixos, o complexo SREBP-SCAP é liberado do INSIG e migra para o complexo de Golgi, onde é proteoliticamente clivado e ativado o fragmento amino-terminal SREBP. O fragmento SREBP então é translocado para o núcleo, onde interage com sítios de transcrição de genes envolvidos na síntese de lipídios, de receptores lipídicos e no metabolismo de ácidos graxos e colesterol (Heemers et al., 2001; Swinnen et al., 2004; Sampath & Ntambi, 2006). Nossos resultados demonstraram que o exercício físico promove a redução dos receptores de andrógeno prostáticos (Teixeira et al., 2011, dados não publicados). Os receptores de andrógenos atuam principalmente no aumento da expressão de SCAP, alterando o balanço entre SCAP e sua proteína de retenção (INSIG), favorecendo a liberação do complexo SREBP-SCAP (Heemers et al., 2004). Recentemente, o SCAP tem sido considerado o alvo transcricional direto via elemento do receptor de andrógeno (ARE) no intron 8 do gene (Heemers, et al., 2004). Corroborando com o aumento do colesterol e lipoproteínas séricas, o treinamento físico aumentou o SREBP-1 e, conseqüentemente, o SCAP, pois reduziu os ARs favorecendo a liberação da proteína.

O CD36, receptor scavenger classe B, é receptor de LDL oxidada, o LDL, HDL, VLDL, trombospondina, colágeno, ácidos graxos e derivados patogênicos. Devido à sua ampla especificidade, o CD36 está envolvido em vários processos normais e patológicos (Moore & Freeman, 2006). CD36, além de ser um receptor de lipídios, é também receptor da trombospondina (TSP) transmembrana, glicoproteína que, naturalmente, inibe a angiogênese, essencial para o crescimento tumoral (Vallbo & Damber, 2005; Damber et al., 2006). A TSP é expressa na próstata normal e com BPH, mas diminui em lesões intraepiteliais neoplásicas prostáticas (PIN) e está ausente no câncer (Vallbo et al. (2004). Em nossos resultados, o etanol diminuiu a expressão dessa proteína, no entanto, o exercício reestabeleceu e aumentou sua concentração.

Da mesma forma, o LIMPII pode ter função semelhante à do CD 36, além de ser receptor de lipídios, pode se ligar a trombospondina (Crombie & Silverstein, 1998). Observamos a expressão LIMPII baixa na próstata ventral das células epiteliais secretoras de ratos UChB, no entanto, o treinamento aumentou esses valores.

Os lipídios séricos são diminuídos pelo consumo de etanol e aumentados em ratos com treinamento físico. Podemos supor que os efeitos observados na próstata não são apenas ação do etanol ou do exercício físico diretamente sobre o órgão, mas também das alterações no metabolismo lipídico sistêmico. A alteração de lipídios no sangue, devido ao estilo de vida sedentário ou ao consumo de etanol tem sido relatado como fator de risco de câncer de próstata em estudos

epidemiológicos (Bidoli et al., 2005). O treinamento atua sobre o organismo de ratos que consomem etanol, melhorando a eficiência alimentar, reduzindo o consumo de etanol, aumentando o ganho de peso, regulando o perfil lipídico sérico, concentrações da testosterona livre e ativação de AR, alterando a expressão de lipídio na próstata após consumo de etanol. O treinamento físico pode ser utilizado como terapia na redução dos riscos das lesões prostáticas em alcoolistas.

Agradecimentos

Ao grupo de pesquisa em Biologia da Reprodução pelas condições de infra-estrutura e a FAPESP (Proc. 2008/00479-6) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

Arenas MI, Lobo MVT, Caso E, Huerta L, Paniagua R, Martin-Hidalgo MA. Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1/SR-BI and CD36. *Hum Pathol* 2004; 35:34-42.

Ayene IS, Stamato TD, Mauldin SK, Biaglow JE, Tuttle SW, Jenkins SF, Koch CJ. Mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene leads to inactivation of ku DNA end binding during oxidative stress. *J Biol Chem* 2002;277:9929–9935.

Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, Moraes MR, Pontes FL Jr, Pesquero JL, Araújo RC, Bacurau RF. Effect of a high- intensity exercise on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats. *Exp Biol Med* 2007;232:1289–1299.

Ballard-Barbash, R., Hunsberger, S., Alciati, M. H., Blair, S. N., Goodwin, P. J., McTiernan, A., Wing R, Schatzkin A. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101: 630-643.

Bidoli E, Talamini R, Bosetti C, Negri E, Maruzzi D, Montella M, Franceschi S, La Vecchia C. Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk. *Ann Oncol.* 2005; 16(1):152-7.

Botezelli JD, Mora RF, Dalia RA, Moura LP, Cambri LT, Ghezzi AC, Voltarelli FA, Mello MA. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed a fructose-rich diet. *Lipids Health Dis* 2010; 14:9-16.

Cagnon VHA, Garcia PJ, Guazzelli Filho J, Martinez FE. Ultrastructural study of the lateral lobe of the prostate of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1998;30:77–84.

Cagnon VHA, Garcia PJ, Martinez M, Padovani CR. Ultra-Structural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to Experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate* 1996; 28, 341–346.

- Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.* 1993; 268:18929-18935
- Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998; 279:563–566.
- Chen Y, Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer.* 2001;91:41-45.
- Chuffa LG, Padovani CR, Martinez FE. Ovarian structure and hormonal status of the UChA and UChB adult rats in response to ethanol. *Maturitas* 2009; 62:21-29.
- Chung KW. Effects of chronic ethanol intake on aromatization of androgens and concentration estrogen and androgen receptors in rat liver. *Toxicology* 1990; 62: 285-295.
- Courtney KS. Exercise in cancer survivors: an overview of re- search. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1846–1852.
- Crombie R, Silverstein R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem* 1998;273:4855-63.
- Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, Lowe RC, Rohack JJ, Green JS. Effects of training and a single session of exercise on lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic men. *J Appl Physiol* 1997;83:2019–2028.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 2002; 70:473–485.
- Damber JE, Vallbo C, Albertsson P, Lennernas B, Norrby K. The anti-tumour effect of low-dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 58:354-360.
- Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise Training, Without Weight Loss, Increases Insulin Sensitivity and Postheparin Plasma Lipase Activity in Previously Sedentary Adults. *Diabetes Care* 2003; 26:557-562.
- Ferguson MA, Alderson NL, Trost SG, Essig, DA, Burke, JR, Durstine JL. Effects of four different single exercise sessions on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase. *J Appl Physiol* 1998; 85:1169-1174.
- Furuya DT, Binsack R, Machado UF. Low ethanol consumption increases insulin sensitivity in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36:125-130.
- Furuya DT, Binsack R, Onishi ME, Seraphim PM, Machado UF. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. *Life Sciences* 2005; 77:1813-1824,.

Galvao DA, Nosaka K, Taaffe DR, Peake J, Spry N, Suzuki K, Yamaya K, McGuigan MR, JKristjanson L, Newton RU. Endocrine and immune responses to resistance training in prostate cancer patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2007; 1–6.

Grandjaean PW, Crouse SF, Rohack JJ. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2000; 89:472-480.

Greenwalt DE, Watt KWK, Hasler T, Howard RJ, Patel S. Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J Biol Chem* 1990; 265:16296-9.

Halle M, Berg A, Garwers U, Baumstark MW, Knisel W, Grathwohl D, *et al.* Influence of 4 Weeks' Intervention by Exercise and Diet on Low-Density Lipoprotein Subfractions in Obese Men With Type 2 Diabetes. *Metabolism* 1999;48:641-644.

Handberg A, Levin K, Hojlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation*. 2006; 12;114:1169-76.

Haude W, Völcker CE. Hormonal effects on triacylglycerol secretion of rat liver Nahrung. 1991; 35:1061-6.

Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1817-28

Heemers H, Verrijdt G, Organe S, Claessens F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Identification of an androgen response element in intron 8 of the sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene allowing direct regulation by the androgen receptor. *J Biol Chem*. 2004;16:30880-7.

Honkola A, Forsén T, Eriksson J. Resistance training improves the metabolic profile in individuals with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 1997;34:245-248.

Hunter WM, Fonseca CC, Passmore R. Growth hormone: importante role in muscular exercise in adults. *Science*. 1965; 150:1051-53.

Knowles DM, Tolidjian B, Marboe C, Agati VD, Grimes M, Chass L. Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. *J Immunoll* 1984;132:2170–2173.

Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000; 16:202-8.

Lacey Jr JV, Hsing AW, Fillmore CM, Hoffman S, Helzlsouer KJ, Comstock GW. Null association between insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer in a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:1101–1102.

- Lancaster FE. Sex differences in voluntary drinking by Long Evans rats following early stress. *Alcohol. Clin Exp Res* 1998; 22:830–837.
- Larue-Achagiotis C, Poussard AM, Louis-Sylvestre J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiol Behav.* 1990; 47:545–548.
- LeRoith D, Roberts Jr CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003; 195:127–137.
- Lieber CS, De Carli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepathol.* 1991;12:394-01.
- Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34:9–19.
- Mardones J. Es la predisposición genética al alcoholismo una perturbación del mecanismo de la saciedad de alcohol? *El Pensamiento de los Premios Nacionales de Ciencia.* 1993:19-34.
- Marszalek M, Wachter J, Ponholzer A, Leitha T, Rauchenwald M, Madersbacher S. Insulin-like growth factor1, chromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate câncer patients and controls. *Eur Urol* 2005; 48:34–39.
- Martinez FE, Garcia PJ, Padovani CR, Cagnon VHA, Martinez M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronical coholism. *Prostate.* 1993; 22:1–8.
- Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2000; 32:1751-84.
- Mendes LO, Amorim JPA, Teixeira GR, Chuffa LGA, Fioruci BA, Pimentel TA, Marks LS, Mazern A, Mostaghel E, Hess DL, Dorey FJ, Epstein. Mast Cells and Ethanol Consumption: Interactions in the Prostate, Epididymis and Testis of UChB Rats. *American journal of reproductive immunology* 2011; 1989: 1-9
- Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1702-11.
- Oliveira CAM, Luciano E, Marcondes MCCG, Mello MAR. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of diabetes and its complications* 2007; 21: 258-64.
- Pagano C, Marzolo M, Granzotto M, Ricquier D, Federspil G, Vettor R. Acute effects of exercise on circulating leptin in lean and genetically obese fa/fa rats. *Biochemical and biophysical research communications* 1999; 255: 698-702.
- Pignatelli, D., Magalhaes, M.M., Magalhaes, M.C., 1998. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res.* 30, 464–474.
- Pinheiro PFF, Almeida CCD, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. Ultrastructure of the urethra of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *World Journal of Urology.* 2003; 20:378-84.

Pirola RC, Lieber CS. Hypothesis: energy wastage in alcoholism and drug abuse: possible role of hepatic microsomal enzymes'. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1976;90-93.

Pollak M, Beamer W, Zhang JC. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:383-90.

Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev* 2003; 24:357-87.

Roberts WM. Blood phosphatase and van den Bergh reaction indifferention of several types of jaundice. *Brit. M.J.* 1933;1:734-738.

Sampath H, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006;9:84-8.

Segal RJ, Reid RD, Courneya KS, Malone SC, Parliament MB, Scott CG, Venner PM, Quinney HA, Jones LW, D'Angelo ME, Wells GA. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:1653-1659.

Seiva FR, Amauchi JF, Rocha KK, Ebaid GX, Souza G, Fernandes AA, Cataneo AC, Novelli EL. Alcoholism and alcohol abstinence : N-acetylcysteine to improve energy expenditure , myocardial oxidative stress , and energy metabolism in alcoholic heart disease. *Enzyme* 2009; 43:649-656.

Sforcin JM, Monteiro CMR, Lopes CEF, Sapatera AC, Ferreira WJN. Perfil bioquímico e análise morfológica do ovário de ratas submetidas a consumo prolongado de etanol. *Rev. Ciênc. Bioméd.* 1997;18:69-81.

Shetty S, Eckhardt ERM, Post SR, van der Westhuyzen DR. Phosphatidylinositol-3-kinase regulates scavenger receptor class B type I subcellular localization and selective lipid uptake in hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2125-31.

Shi R, Berkel HJ, Yu H. Insulin-like growth factor-I and prostate cancer: a meta-analysis. *J. Cancer*. 2001;85:991-6

Silva CA, Lima WC. Efeito Benéfico do Exercício Físico no Controle Metabólico do Diabetes Mellitus Tipo 2 à Curto Prazo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46:550-556.

Strbák V, Benický J, Macho L, Jezova D, Nikoděmova M. Four-week ethanol food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats. *Metabolism*. 1998;47:1269-1273.

Swinnen JV, Heemers H, Van De Sande T, De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens, lipogenesis and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;92:273-9.

Thompson PD, Yurgalevitch SM, Flynn MM, Zmuda JM, Martin DS, Saritelli A. Effect of Prolonged Exercise Training Without Weight Loss on High- Density Lipoprotein Metabolism in Overweight Men. *Metabolism* 1997;46:217-223.

Thorpe A, Neal D: Benign prostatic hyperplasia. *Lancet* 2003; 361: 1359-1367.

Vallbo C, Damber JE. Thrombospondins, metallo proteases and thrombospondin receptors messenger RNA and protein expression in different tumour sublines of the Dunning prostate cancer model. *Acta Oncol.* 2005; 44:293-8

Vallbo C, Wang W, Damber JE. The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU Int.* 2004; 93:1339-43.

Westerlind KC. Physical Activity And Cancer Prevention – Mechanisms. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2003;35:1834-1840.

Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergström R, Signorello LB, Laggiou P, Adami H, Trichopoulos D. Insulin-Like growth factor1 and prostate cancer risk: a population based, case control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90:911–5.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:7324–7329.

Tabelas**Tabela 1.** Grupos experimentais.

Tratamentos	Grupos		
	Etanol	Abstinente	Sem preferencia
Sedentário	(E) - Ratos que preferem etanol (> 2,0mL de etanol/100g peso corporal/dia)	(A) - Ratos que preferem etanol (sem consumo de etanol)	(C) - Ratos sem preferência ao etanol (sem consumo de etanol)
Treinado	(E+T) - Ratos que preferem etanol (> 2,0mL de etanol/100g peso corporal/dia)	(A+T) - Ratos que preferem etanol (sem consumo de etanol)	(T) - Ratos sem preferência ao etanol (sem consumo de etanol)

Tabela 2. Parâmetros nutricionais.

	E+T	A+T	T	E	A	C
Ganho de peso (g)	57,8±7,6	62,8±7,1	97,0±9,5 ^b	34,4±5,0	61,1±10,8 ^d	118,0±17,3 ^e
Consumo alimentar (g)	19,4±0,6	21,0±0,2 ^a	27,0±0,4 ^b	23,0±0,2 ^e	25,8±0,5 ^d	26,5±0,4
Líquidos totais (mL)	10,0±0,3	9,1±0,2 ^a	8,47±0,2	11,2±0,2	10,7±0,3	8,6±0,2 ^e
Energia ingerida (kcal)	64,6±1,8	61,7±0,9	79,2±1,1 ^b	72,3±0,7	71,9±1,6	77,1±1,1 ^e
Eficiência alimentar (g/Kcal/100)	60.8±8.8	61.8±8.1	94.0±10.1 ^b	28.0±2.1	56.7±6.6	111.0±12.4 ^e

As letras minúsculas a-f correspondem as colunas do corpo da tabela, respectivamente, com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Teste *One-way* Anova complementado com Tukey entre grupos com a mesma condição experimental. Teste *T Student* entre grupos com condição experimental diferente.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos.

Bioquímica	E+T	A+T	T	E	A	C
Glicose	126,65±7,12 ^b	151,06±5,63 ^c	123,49±3,15	107,70±7,98 ^{ct}	138,49±4,57 ^t	123,16±7,5
Triglicerídeo	94,13±9,34	89,96±8,81 ^c	137,86±12,45	62,65±6,13	60,52±5,96 ^f	101,94±9,01
Proteína Total	9,01±0,58 ^b	7,69±0,35	7,93±0,31	6,89±0,33 ^e	8,58±0,48 ^f	6,76 ±0,36
Colesterol Total	79,77±3,91 ^b	68,63±3,94 ^c	83,57±7,22	55,46±3,27 ^e	79,20±8,68	70,31±5,23
HDL	24,78±2,91	25,99±2,33	21,34±8,98	20,69±2,59	21,45±2,71	18,17±3,45
LDL	36,15±3,36 ^b	24,75±5,67	34,65±7,49	22,23±2,75 ^e	45,64±8,25	31,75±3,92
VLDL	18,82±1,86	17,99±1,76	27,57±2,49 ^b	12,53±1,22	12,10±1,19	20,38±1,80 ^e

As letras minúsculas a-f correspondem as colunas do corpo da tabela, respectivamente, com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Teste *One-way* Anova complementado com Tukey entre grupos com a mesma condição experimental. Teste *T Student* entre grupos com condição experimental diferente.

Figuras

Figura 1. (A) Consumo de etanol em mL/dia dos grupos experimentais. Valores apresentados em média±EPM. As letras a, b, c, e d correspondem as colunas do eixo das abscissas, respectivamente. ^bp<0,05 grupos UChBT. Teste *One-way* Anova com a *posteriori* de Tukey entre grupos com mesma condição experimental. Teste *T Student* entre grupos com condição experimental diferente. (B) Correlação entre o efeito do exercício físico sobre o consumo de etanol ao longo de 70 dias ($r<-0,78$; $p<0,001$).

Figura 2. (A) Valores de testosterona livre. (B) IGF-1 dos grupos experimentais. Valores apresentados em média±EPM. As letras a-f correspondem as colunas do eixo das abscissas, respectivamente ($p<0,05$). Teste *One-way* Anova, complementado com Tukey entre grupos com a mesma condição experimental.

Figura 3. (A) Valores da proteína CD-36. (B) Valores da proteína SCAP. (C) Valores da proteína SREBP-1. (D) Valores da proteína LIMPII. Relações com o valor da expressão de β -actina. (E) Expressão das proteínas CD-36, SCAP, SREBP-1 e LIMPII.

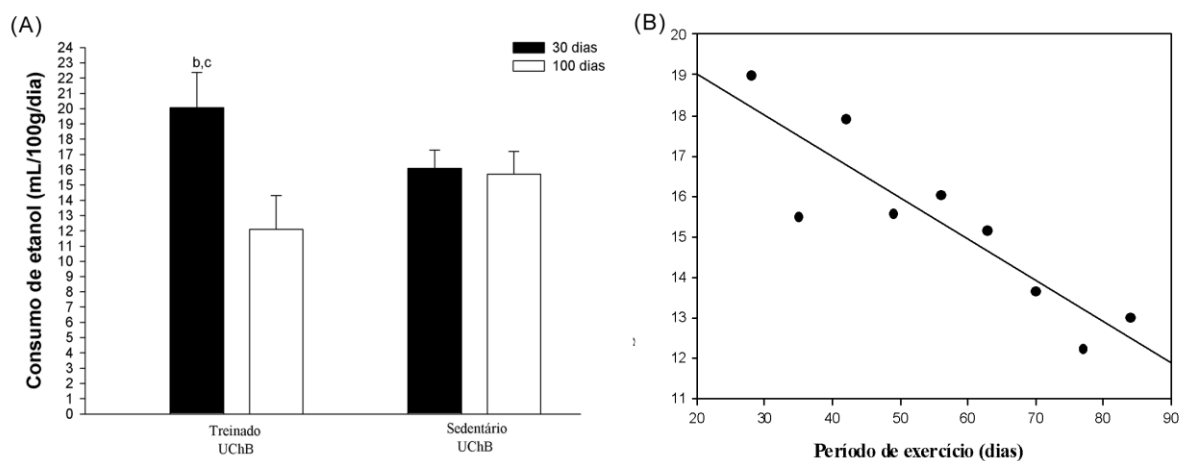


Figura 1

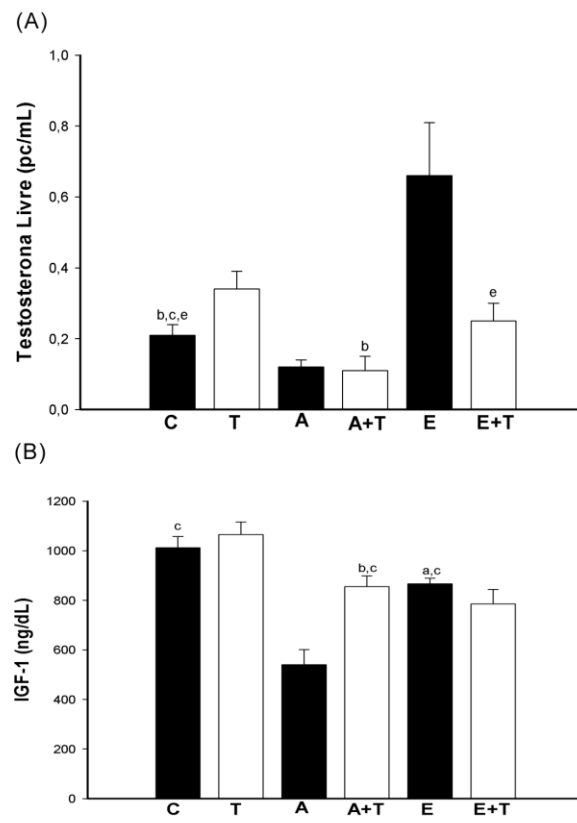


Figura 2

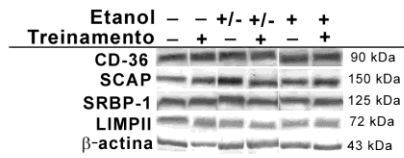
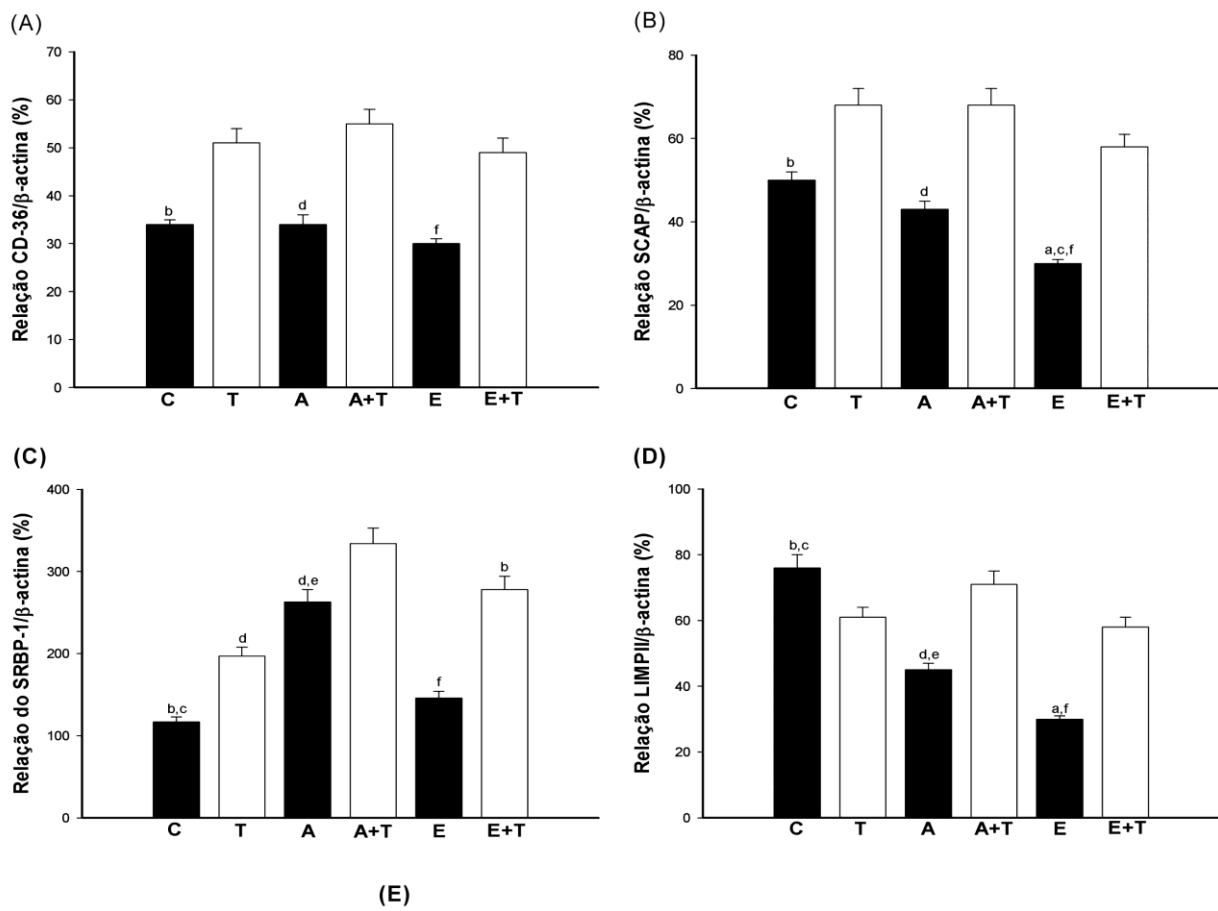


Figura 3

III - Conclusão

O exercício físico resistido altera o balanço hormonal, modificando os receptores esteróides e os lipídios da próstata ventral de ratos. Reduz a proliferação celular e aumenta a apoptose. Portanto, sugere-se que o exercício físico resistido pode ser utilizado como terapia para prevenir as lesões malignas na próstata decorrentes do etanol.