

O impacto na expressão *agnors* e apoptose na próstata do hamster-*mesocricetus auratus* (HMA) submetido à aplicação de finasterida

The impact in the agnors expression and apoptosis in the prostate of hamster-mesocricetus auratus (HMA) submitted to finasteride application

DIMAS JOSÉ ARAÚJO VIDIGAL¹; ALCINO LÁZARO DA SILVA, ECBC-MG²; FELIPE EDUARDO COSTA VIDIGAL³

R E S U M O

Objetivo: Avaliar o impacto na expressão *AgNORs* e apoptose na próstata do hamster-*Mesocricetus auratus* (*hMa*) submetido à aplicação de finasterida. **Métodos:** Vinte roedores da espécie *hMa* (n=20), machos foram separados aleatoriamente em grupos de dez animais: grupo-Finasterida (n=10) e grupo-Controle (n=10). No grupo-finasterida foi administrado 7,14 ng/mL de finasterida, subcutâneo (SC), no dorso, três vezes por semana, por 90 dias. Foi avaliada a expressão *AgNORs* como marcador de proliferação celular e a apoptose como marcador de morte celular. **Resultados:** A expressão de *AgNORs* foi menor no grupo-finasterida, $2,846 \pm 0,877$ versus $3,68 \pm 1,07$ grumos argilófilos por micrômetro ao quadrado (μm^2) no grupo-controle, $p < 0,0001$. A apoptose foi mais frequente no grupo-finasterida, $53,62 \pm 1,389$ versus $14,76 \pm 2,137$ μm^2 no grupo-controle, $p = 0,0408$. **Conclusão:** Observou-se diminuição da expressão de *AgNORs* e promoção da apoptose na próstata dos roedores em estudo, que foram submetidos à aplicação de finasterida.

Descritores: Finasterida. Próstata. Mesocricetus.

INTRODUÇÃO

Trabalhos recentes têm mostrado benefícios do uso de finasterida nos processos proliferativos da próstata¹⁻³. Esses estudos estão fundamentados em pesquisas clínicas⁴. Investigações em animais com marcadores de proliferação e morte celular podem ser de interesse para comprovação desses resultados.

A anatomia, a histologia e a fisiologia da próstata do hamster-*Mesocricetus auratus* (*hMa*) foram descritas por Toma *et al.*⁵, e propiciam realizar na próstata desses animais experimentos com medicações que possam atuar nessa glândula.

Vidigal *et al.*⁶, estudaram as próstatas do *hMa*, quando tiveram a oportunidade de conhecer a anatomia e histologia dessa glândula. Associando a teoria com a prática, percebeu-se que esses roedores eram apropriados para o desenvolvimento desta pesquisa como animais de experimento.

O objetivo deste estudo, portanto, é avaliar o impacto na expressão *AgNORs* (*Argyrophilic Nuclear Organizer Regions* - Regiões Argirofílicas Organizadoras Nucleolares), marcador de proliferação celular e Apoptose,

marcador de morte celular, na próstata de *hMa* que fez uso de finasterida.

MÉTODOS

Delineamento experimental

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988) e também por ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Barbacena, Minas Gerais, Brasil. sob o nº 129/06.

Foram estudados 20 roedores da espécie *hMa*, adultos, selecionados casualmente entre os disponíveis no biotério, com idade superior a um ano, distribuídos em dois grupos: grupo-finasterida, formado por dez animais (n=10) e grupo-controle também formado por dez animais (n=10).

Os hamsteres foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais,

Estudo realizado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM-UFMG)-MG-BR.

1. Membro Titular da Sociedade Brasileira de Urologia (TISBU); 2. Professor Emérito da Faculdade de Medicina da UFMG-MG-BR; 3. Graduando em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (FCMS-SUPREMA)- MG-BR.

Brasil. O grupo-Finasterida pesava aproximadamente $145 \pm 15,27$ g e o grupo-controle pesava cerca de $129 \pm 18,82$ g.

Os animais ficaram alojados em gaiolas de plástico medindo 40cmx60cmx20cm (dois animais por unidade) forradas com maravalhas próprias para sua acomodação. Alimentação *ad libitum*: ração preparada para hamsteres e semente de girassol, amendoim e milho. Foi oferecida aos animais, água potável em bebedouros de sucção. Esses ficaram expostos à luz indireta das 6h as 18h e à escuridão por doze horas, a uma temperatura de 21°C.

O grupo-finasterida recebeu por via subcutânea, na região dorsal, 0,5mL de solução injetável contendo 7,14ng de solução de finasterida, preparada na concentração de 14,28ng/mL pelo laboratório Citopharma Manipulação de Medicamentos Especiais Ltda®.

Decorridos 90 dias de uso de finasterida, os hamsteres em estudo foram anestesiados com cloridrato de cetamina, para uso veterinário na dosagem de 200mg/kg e diazepam na dosagem de 2,5mg/kg, pela via intraperitoneal⁶, em seringas diferentes. Após serem anestesiados, foram mortos por hipovolemia.

Por laparotomia, as próstatas (ventrais e dorsais) foram retiradas em monobloco juntamente com todo aparelho geniturinário⁶. Foram dissecadas, fixadas em solução de aldeído fórmico a 10%, em seguida, o material foi encaminhado para processamento histológico.

As próstatas, ventrais e dorsais, foram escolhidas de modo aleatório para exame e submetidas inicialmente à análise histológica em microscópio óptico de luz e posteriormente enviadas para análise morfométrica no Laboratório de Apoptose, Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG.

Parâmetros e estratégia morfométrica

De cada uma das lâminas estudadas, analisou-se a expressão das *AgNORs* como marcador de ativação e proliferação celular e a identificação *in situ* da fragmentação do genoma como marcador de apoptose, (reação de *TUNEL-Terminal Deoxinucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling*). A técnica de *TUNEL* combina princípios histoquímicos e imuno-histoquímicos para marcar o *DNA* fragmentado de células apoptóticas *in situ*. Essa técnica foi aplicada a secções de parafina em corte histológico de 4mm de espessura. Os núcleos obtidos na reação de *TUNEL* foram contados manualmente.

Foram avaliados 500 núcleos acinares por lâmina para a contagem de grumos argirófilos. Cada animal teve sua respectiva lâmina examinada e a quantidade de grumos argirófilos encontrados representou sua expressão de *AgNORs*. Em seguida, foi iniciada a análise estatística dos dados encontrados.

Tratamento estatístico

Foram construídas as distribuições de frequências e calculados os valores das médias, medianas (md), desvi-

os padrão (dp) e as proporções relativas às variáveis do estudo: *AgNORs* e apoptose exibidas pelo grupo-finasterida e grupo-controle.

Os grupos foram comparados em tabelas de contingência tipo RxC, para análise de frequências e em tabela de ANOVA, para efeito de médias.

O significado estatístico das diferenças entre as proporções foi aferido pelo teste exato de Fisher (para as duas extremidades de distribuição) e pelo teste "t" de Student, na comparação das médias.

Quando as variâncias das médias comparadas não eram semelhantes ($p < 0,05$) no teste de Bartlett, o significado das diferenças entre os grupos foi aferido pelo teste de Mann-Whitney e pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância estatística utilizado na análise foi de 5%. Testes de regressão logística foram utilizados para avaliar se a idade e peso interfeririam nos resultados.

RESULTADOS

O grupo-finasterida tinha idade entre $17,7 \pm 0,67$ meses e o grupo-controle estava na faixa $15,2 \pm 1,13$ meses. O valor de "t" na comparação das médias das idades entre os dois grupos foi de 5,98 e $p = 0,001$. À média de peso do grupo-finasterida foi de $145 \pm 15,27$ g e o grupo-controle $129 \pm 18,82$ g. A comparação das médias entre os dois grupos quanto ao peso apresentou $t = 2,08$ e $p = 0,0514$.

A figura 1 mostra a expressão de *AgNORs*. Os animais do grupo-finasterida apresentaram média de $2,846 \pm 0,87$ grumos argirófilos/ μm^2 e mediana de 3 argirófilos/ μm^2 . Os animais-controle apresentaram média de $3,68 \pm 1,07$ grumos de argirófilos/ μm^2 e mediana de 4 argirófilos/ μm^2 , a diferença entre as medianas pelo teste de Mann Whitney apresentou $p = < 0,0001$.

A figura 2 mostra o resultado da apoptose entre o grupo-finasterida e o grupo-controle. O grupo-finasterida apresentou média de apoptose (número de células marcadas no teste de *TUNEL* de $53,62 \pm 1,389$ e mediana de 54,34, $p = 0,0408$). O grupo-controle apresentou média de apoptose de $14,76 \pm 2,137$, mediana de 12,50. A apoptose foi mais evidente nos animais que fizeram uso de finasterida.

DISCUSSÃO

A comparação entre os dois grupos, quanto a peso e idade, mostrou serem eles diferentes quanto à idade e que a diferença entre o peso esteve no limite do nível de significância. Testes foram efetuados para determinar a influência desses dois fatores nos efeitos da finasterida no resultado das variáveis estudadas e mostraram que a diferença entre a idade e o peso dos animais não comprometeu a comparabilidade dos dois grupos quanto aos efeitos da finasterida no resultado do estudo da *AgNORs* e apoptose.

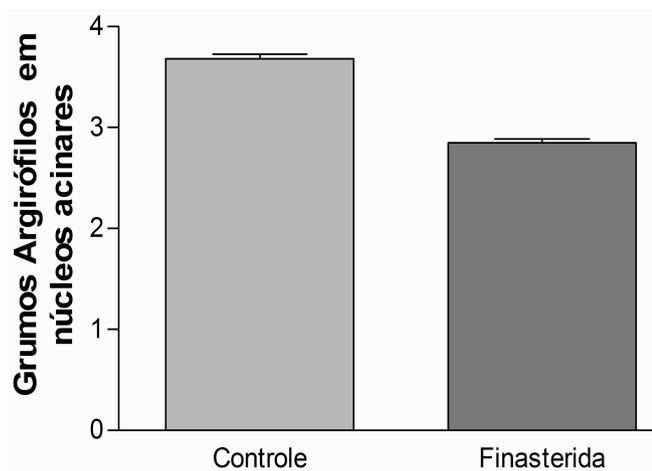


Figura 1 - Valores da expressão de AgNORs, grupo-controle versus grupo-finasterida.

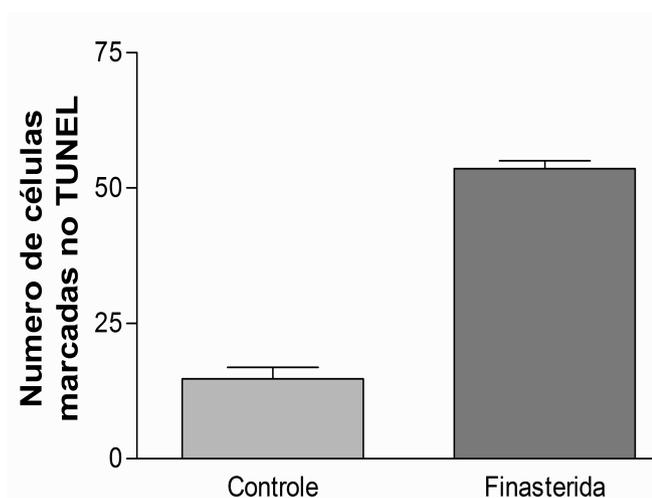


Figura 2 - Resultado da apoptose do grupo-controle versus grupo-finasterida.

O grupo-controle não foi submetido a qualquer tratamento, nem mesmo à administração de placebo, evitando-se assim o efeito do estresse quanto à manipulação, tendo por objetivo fornecer informações que poderiam servir de parâmetro com os resultados obtidos no grupo-finasterida.

Como o medicamento em clínica é usado de forma contínua para o tratamento da hiperplasia benigna da próstata (HBP), com base no que se deduziu, não haveria necessidade de se acrescentar novos grupos, porque o objetivo era saber se no animal, a exemplo do homem, a finasterida teria ação medicamentosa.

Foi usada nos animais, que fizeram uso de finasterida neste estudo, uma dose mil vezes menor do que a indicada para o tratamento da HBP em um homem adulto de 70Kg, em intervalos de três vezes por semana, mostrando impacto na próstata desses animais. Por dificul-

dades técnicas, não foi possível aplicar a finasterida todos os dias nos animais. Optou-se pelo uso da medicação três vezes por semana.

O mecanismo celular da finasterida na próstata ainda não é bem compreendido⁷. Já foi comprovada a ação deste medicamento em receptores androgênicos para alfa-5-reductase tipo 2 na próstata de homens⁸. O presente estudo sugere que os receptores androgênicos da próstata do hMa são também do tipo 2.

Em trabalho experimental⁹, usando o gerbil, *Meriones unguiculatus* administrou-se a esses animais, finasterida na dosagem de 10mg/Kg ao dia, associada ao letrozole (um inibidor da aromatase) 1mg/Kg ao dia por um prazo de 21 dias. No final do tratamento, foram observadas importantes alterações nas células prostáticas, sugestivas de apoptose.

Estudos feitos em ratos, com dose elevada de finasterida, mostraram atrofia da glândula prostática desses animais¹⁰⁻¹², e há evidências que a atrofia glandular prostática com uso de finasterida é secundária à apoptose promovida pelo bloqueio da 5 α R¹². Esses achados e os apresentados neste estudo mostram que o bloqueio da formação da diidrotestosterona (DHT) intracelular acarreta a atrofia da próstata por apoptose.

Disfunções nos mecanismos apoptóticos estão envolvidas no desenvolvimento e progressão nos processos proliferativos da próstata¹³. Tem-se também demonstrado que a finasterida leva à indução da apoptose e efeito antiangiogênese na próstata¹⁴. No homem alterações da homeostase entre GF (Growth Factor) e apoptose estão envolvidos na gênese da HBP¹⁵.

Verificou-se também neste estudo diminuição das AgNORs nos animais tratados com a finasterida em relação ao grupo-controle. As AgNORs são importantes marcadores de proliferação celular¹⁶.

Os achados em literatura¹⁷⁻¹⁹ e também aqui, evidenciam que a finasterida protege a próstata de eventos proliferativos, colocando-a como um medicamento promissor no tratamento e prevenção dessas doenças.

Neste estudo a finasterida mostrou-se um fármaco com ação benéfica nos ácinos da próstata do hMa, embora não se possa ainda afirmar que os achados aqui apresentados tenham o mesmo efeito na próstata humana, devido às peculiaridades genéticas entre o *Homo sapiens* e o *Mesocricetus auratus*, mas seguramente passou-se a ter um referencial com fundamento científico.

Concluimos neste estudo que a finasterida diminui a expressão de AgNORs e promove a apoptose nos ácinos da próstata do hMa a ela submetido.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor Doutor Anilton César Vasconcelos, Titular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG) e responsável pelo Laboratório de Apoptose da mesma Instituição; à Mestranda em Veterinária Bárbara Lanice Araújo Verçosa da Facul-

dade de Veterinária da UFMG (FV-UFMG), a Graduada em Veterinária Nathália Gonçalves de Santana, (FV-UFMG),

pela ajuda na feitura da análise morfométrica do presente estudo.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the impact on the AgNORs expression and apoptosis in the prostate of the hamster-Mesocricetus auratus (HMA) submitted to the application of finasteride. **Methods:** Twenty male rodents of the species HMA (n = 20) were randomly assigned to groups of ten animals: Finasteride group (n = 10) and the Control group (n = 10). In the finasteride group 7.14 ng/mL finasteride was subcutaneously (SC) administered on the back of the animals three times a week for 90 days. AgNOR expression was evaluated as a marker of cell proliferation and apoptosis as a marker of cell death. **Results:** The expression of AgNORs was lower in the finasteride group, 2.846 ± 0.877 vs. 3.68 ± 1.07 argyrophilic regions per square micrometer (μm^2) in the control group, $p < 0.0001$. Apoptosis was more frequent in the finasteride group, 53.62 ± 1.389 versus 14.76 ± 2.13 per μm^2 in the control group, $p = 0.0408$. **Conclusion:** We observed decreased expression of AgNORs and promotion of apoptosis in the prostate of rodents treated with finasteride.

Key words: Finasteride. Prostate. Mesocricetus.

REFERÊNCIAS

1. Reed AB, Parekh DJ. The utility of 5-alpha reductase inhibitors in the prevention and diagnosis of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2009; 19(3):238-42.
2. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(3): 215-24.
3. Kramer BS, Hagerty KL, Justman S, Somerfiled MR, Albertsen PC, Blot WJ, et al. Use of 5-alpha-reductase inhibitors for prostate cancer chemoprevention: American Society of Clinical Oncology/American Urological Association 2008 Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2009; 27(9):1502-16. Erratum in: *J Clin Oncol* 2009; 27(16):2742.
4. Li NC, Wu SL, Jin J, Qiu SP, Kong CZ, Song YS, et al. Comparison of different drugs on the treatment of benign prostate hyperplasia. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2007; 45(14): 947-50.
5. Toma JG, Buzell GR. Fine structure of the ventral and dorsal lobes of the prostate in the young adult Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. *Am J Anat* 1988; 181(2):132-40.
6. Vidigal DJA, Silva AL, Fonseca LMA, Rezende DF. Técnica para obtenção do aparelho geniturinário e dosagem do PSA (Prostate Specific Antigen) no hamster sírio, *Mesocricetus auratus*. *Acta cir bras* 2004; 19(6):603-8.
7. Coffey DS, Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North AM* 1990; 17(3):461-75.
8. Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 2001; 58(6 Suppl 1):17-24; discussion 24.
9. Corradi LS, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. Increased androgen receptor and remodeling in the prostatic stroma after the inhibition of 5-alpha reductase and aromatase in gerbil ventral prostate. *Microsc Res Tech* 2009; 72(12):939-50.
10. Prahallada SR, Keenan KP, Hertzog PR, Gordon LR, Peter CP, Soper KA, et al. Qualitative and quantitative evaluation of prostatic histomorphology in rats following chronic treatment with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Urology* 1994; 43(5): 680-5.
11. Huynh H. Induction of apoptosis in rat ventral prostate by finasteride is associated with alteration in MAP kinase pathways and Bcl-2 related family of proteins. *Int J Oncol* 2002; 20(6):1297-303.
12. Rittmaster RS, Manning AP, Wright AS, Thomas LN, Whitefield S, Norman RW, et al. Evidence for atrophy and apoptosis in the ventral prostate of rats given the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride. *Endocrinology* 1995; 136(2):741-8.
13. Bruckheimer EM, Kyprianou N. Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and therapeutic target. *Cell Tissue Res* 2000; 301(1):153-62.
14. Donohue JF, Hayne D, Karnik U, Thomas DR, Foster MC. Randomized, placebo-controlled trial showing that finasteride reduces prostatic vascularity rapidly within 2 weeks. *BJU Int* 2005; 96(9):1319-22.
15. Steiner MS. Review of peptide growth factors in benign prostatic hyperplasia and urological malignancy. *J Urol* 1995; 153(4):1085-6.
16. Derenzini M, Trerè D. AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralbl Pathol* 1994; 140(1):7-10.
17. Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Too CK, Rittmaster RS, Tindall DJ. Type 1 and type 2 5alpha-reductase expression in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol* 2008; 53(2):244-52.
18. Vickers AJ, Savage CJ, Lilja H. Finasteride to prevent prostate cancer: should all men or only a high-risk subgroup be treated? *J Clin Oncol* 2010; 28(7):1112-6.
19. Zhu YS, Imperato-McGinley JL. 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155:43-56.

Recebido em 20/11/2010

Aceito para publicação em 22/01/2011

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Vidigal DJA, Silva AL, Vidigal FEC. O impacto da expressão AgNORs e apoptose na próstata do hamster-Mesocricetus auratus (hMa) submetido à aplicação de finasterida. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2011; 38(5). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Dr. Dimas José Araújo Vidigal

E-mail: dimas@barbacena.com.br