

# **Influência da terapia hormonal com testosterona sobre a remodelação tecidual prostática em ratos adultos saudáveis: emprego da análise fractal como um método diagnóstico**

**Influence of testosterone hormone therapy on prostate tissue remodeling in healthy adult rats: use of fractal analysis as a diagnostic method**

**Influencia de la terapia hormonal con testosterona en la remodelación del tejido próstato en ratas adultas sanas: uso del análisis fractal como método diagnóstico**

Recebido: 29/04/2022 | Revisado: 19/05/2022 | Aceito: 24/05/2022 | Publicado: 29/05/2022

## **Izabela Tossato Abonizio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1558-3056>  
Universidade do Oeste Paulista, Brasil  
E-mail: [izabellaabonizio2000@gmail.com](mailto:izabellaabonizio2000@gmail.com)

## **Sarah Raquel César Dourado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8469-100X>  
Universidade do Oeste Paulista, Brasil  
E-mail: [sarahdourado1@gmail.com](mailto:sarahdourado1@gmail.com)

## **Thainá Cavalleri Sousa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0440-7065>  
Universidade do Oeste Paulista, Brasil  
E-mail: [thainacienciaanimal@gmail.com](mailto:thainacienciaanimal@gmail.com)

## **Maria Luiza Silva Ricardo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0153-7427>  
Universidade do Oeste Paulista, Brasil  
E-mail: [marialuizasilva.r@outlook.com](mailto:marialuizasilva.r@outlook.com)

## **Wilmer Ramirez-Carmona**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5574-1119>  
Universidade Estadual Paulista, Brasil

## **Leonardo de Oliveira Mendes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9761-7653>  
Universidade do Oeste Paulista, Brasil  
E-mail: [leobio85@gmail.com](mailto:leobio85@gmail.com)

## **Resumo**

A terapia com testosterona é frequentemente indicada para o tratamento de várias condições patológicas relacionadas ao envelhecimento, como osteoporose e a síndrome metabólica. Entretanto, persistem alguns questionamentos sobre a segurança do uso da terapia, por haver um aumento de susceptibilidade de doenças prostáticas. As análises histopatológicas se baseiam em metodologias subjetivas, sendo importante a validação de métodos quantitativos, como a análise fractal, que detecta mudanças morfológicas sutis e transformar a complexidade da forma em dados quantitativos analíticos. Assim, o estudo investigou os efeitos da terapia com testosterona sobre a remodelação do microambiente prostático e a validação de um método eficaz para análises teciduais. Ratos Wistar com 150 dias de idade foram divididos em dois grupos experimentais (n = 5): Grupo T: receberam injeções subcutâneas de cipionato de testosterona (5mg/kg peso corpóreo) diluído em óleo de milho em dias alternados por 4 semanas; Grupo C: receberam injeções subcutâneas de óleo de milho como veículo. Os animais foram eutanasiados aos 180 dias de idade, em câmara de CO<sub>2</sub>, seguido de decapitação. Após a eutanásia, a próstata ventral dos animais foi coletada, dissecada e realizado o processamento histológico para análise fractal, estereológica e altura epitelial. Houve redução da dimensão fractal no grupo T, acompanhado de aumento da altura epitelial. A análise estereológica revelou diminuição do compartimento estromal e aumento do compartimento epitelial. Assim, os resultados demonstram que a análise fractal foi eficaz na avaliação de alterações relacionadas à suplementação hormonal com testosterona, evidenciando as alterações morfológicas prostáticas observadas pelos outros métodos.

**Palavras-chave:** Próstata; Testosterona; Fractais; Patologia.

## **Abstract**

Testosterone therapy is often indicated for the treatment of several pathological conditions related to aging, including osteoporosis and metabolic syndrome. However, some questions persist about the safety of the use of the therapy, due

to the increased susceptibility of non-prostatic disease. The histopathological analyzes are based on subjective methodologies, being important to the validation of quantitative methods, such as fractal analysis, to detect subtle morphological changes and transform the complexity of the structures into quantitative analytical data. Therefore, the study investigated the effects of testosterone therapy on the prostatic microenvironment remodeling and the validation of an effective method for tissue analysis. Wistar rats with 150 days old were divided into two experimental groups (n = 5): Group T: received subcutaneous injections of testosterone cypionate (5mg/kg body weight) diluted in corn oil every other day for 4 weeks; Group C: received subcutaneous injections of corn oil as vehicle. The animals were euthanized at 180 days old, in a CO<sub>2</sub> chamber, followed by decapitation. After euthanasia, the ventral prostate was collected, dissected and histologically processed to perform the fractal, stereological and epithelial height analysis. There was a reduction in the fractal dimension in group T, accompanied by an increase in epithelial height. Stereological analysis revealed a decrease in the stromal compartment and an increase in the epithelial compartment. Likewise, the results demonstrate that the fractal analysis was effective in assessing alterations related to hormonal supplementation with testosterone, evidencing prostatic morphological alterations observed in the other methods.

**Keywords:** Prostate; Testosterone; Fractals; Pathology.

### Resumen

La terapia con testosterona está indicada para el tratamiento de afecciones patológicas relacionadas con la edad. Todavía existen algunas dudas sobre la seguridad de la terapia, debido a una susceptibilidad a las enfermedades prostáticas. Los análisis histopatológicos se basan en metodologías subjetivas, y es importante validar métodos cuantitativos, como el análisis fractal, que detecta cambios morfológicos sutiles y transforma la complejidad de la forma en datos analíticos cuantitativos. Por lo tanto, el estudio investigó los efectos de la terapia con testosterona en la remodelación del microambiente prostático y la validación del método fractal. Ratas Wistar de 150 días de edad se dividieron en dos grupos experimentales (n = 5): Grupo T: recibieron inyecciones subcutáneas de cipionato de testosterona (5 mg/kg de peso corporal) diluido en aceite de maíz en días alternos durante 4 semanas; Grupo C: recibió inyecciones subcutáneas de aceite de maíz como vehículo. Los animales fueron sacrificados a los 180 días de edad. Después de la eutanasia, se recolectó la próstata ventral de los animales, se diseccionó y se realizó el procesamiento histológico para el análisis fractal, estereológico y de altura epitelial. Hubo una reducción de la dimensión fractal en el grupo T, acompañada de un aumento de la altura epitelial. El análisis estereológico reveló una disminución del compartimento estromal y un aumento del compartimento epitelial. Así, los resultados demuestran que el análisis fractal fue efectivo en la evaluación de alteraciones relacionadas con la suplementación hormonal, evidenciando las alteraciones morfológicas prostáticas observadas por los otros métodos.

**Palabras clave:** Próstata; Testosterona; Fractales; Patología.

## 1. Introdução

A próstata é uma glândula única com função secretora presente em homens. O líquido prostático, composto por cálcio, íon citrato, enzima de coagulação, íon fosfato e pró-fibrolisina, tem pH básico, sendo importante no processo de alcalinização vaginal e conferindo o aspecto leitoso do sêmen e seu odor característico. Além disso, é possível que ela alcalinize os demais líquidos seminais masculinos, melhorando a motilidade do espermatozóide (Hall, 2011 & Silverthorn, 2010). Histologicamente, em ratos, a próstata constitui-se de glândulas túbulo-alveolares sustentada por uma matriz extracelular, sendo esta rica em fibras colágenas, proteoglicanos, fibras reticulares, fibras elásticas e glicoproteínas (Souza, 2015). Na maioria dos roedores, a glândula prostática apresenta-se como uma estrutura complexa composta de três lobos distintos, designados pela localização que cada um deles ocupa em relação à uretra. Assim, são identificados o lobo ventral, no istmo da bexiga, e os lobos dorsal e lateral, que circundam dorso-lateralmente a uretra, a base da bexiga, a vesícula seminal e as glândulas coaguladoras (Price, 1963; Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Scarano, 2002). O epitélio das unidades secretoras e seus ductos são constituídos de células geralmente cilíndricas e altas - as células epiteliais luminiais - e entre as bases destas podem estar distribuídas células menores, achatadas ou arredondadas - as células epiteliais basais, que alguns autores consideram como células progenitoras que possuem marcadores específicos. (Kurita et al., 2004; Timms et al., 2005).

A próstata, por ser uma glândula hormônio-dependente, sofre influência dos andrógenos. Estes são conhecidos por serem hormônios esteroides que exercem complexa ação em vários outros tecidos-alvo como ossos, músculos, medula óssea, sistema nervoso central e órgãos reprodutivos (revisado por Kelly & Jones, 2013). Além da sua função fisiológica, a testosterona tem se tornado um dos medicamentos mais utilizados mundialmente, principalmente associada a patologias

relacionadas ao processo de envelhecimento. Tais patologias são caracterizadas pelos baixos níveis séricos de testosterona, entre as quais podemos citar o diabetes/síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e osteoporose (Reyes-Vallejo et al., 2007; Yassin & Saad, 2013; Hermoso et al., 2020).

Apesar da dependência hormonal e as consequências severas da depleção, muitos médicos e fisiologistas continuam céticos quanto à segurança do uso da terapia com testosterona (TT), especialmente devido à possível associação com indução ou estabelecimento do câncer de próstata (Gooren et al., 2007). Na última década, pesquisadores têm ressaltado a falta de suporte científico indicando a TT como sendo capaz de induzir ou mesmo estimular o crescimento do câncer de próstata através do recrutamento de lesões malignas preexistentes (Drewa & Chlosta, 2010).

A testosterona, formada pelas células intersticiais de Leydig situadas no interstício entre os túbulos seminíferos, é metabolizada em 5 $\alpha$ - di-hidrotestosterona (DHT) e tanto a testosterona como a 5 $\alpha$ -DHT contribuem para o crescimento prostático. (Hall, 2011; Shoskes et al., 2016). Os andrógenos são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção do tecido normal e do câncer, e o receptor de andrógeno (AR) é o principal alvo terapêutico para o câncer prostático. (Marchiani et al., 2010). Este fenômeno é ainda apoiado por estudos *in vivo*, onde a administração de andrógenos cria um ambiente pró-tumorigênico em modelos de xenoenxerto murino e o efeito inverso segue com a supressão androgênica. (Ahmad et al., 2008).

Apesar dos possíveis efeitos pró-carcinogênicos descritos acima, existe na literatura a teoria da saturação androgênica, que propõe que os efeitos da testosterona na próstata são limitados pela capacidade e concentração de ARs. Portanto, a testosterona acima de um determinado limiar não afetaria o microambiente prostático (Morgentaler, 2009). Clinicamente, essa teoria foi consolidada com a descoberta de que, embora a TT aumente o nível sérico de testosterona, ele não se correlacionou com os níveis de testosterona intraprostática em amostras de biópsias de homens que realizaram este tipo de intervenção (Marks et al., 2006).

Na literatura é possível encontrar diversas aplicações e benefícios da TT. Numerosos estudos intervencionistas mostraram que esta terapia em homens com hipogonadismo e portadores de síndrome metabólica traz benefícios sobre obesidade, resistência à insulina e controle glicêmico (Kapoor et al., 2006; Salam et al., 2012). Além disso, a TT demonstrou melhorias em fatores de risco cardiovascular bem estabelecidos, diminuindo a pressão arterial elevada, os níveis de triglicérides e o colesterol (Salam et al., 2012). Seu uso também está associado a uma melhora significativa nos sintomas depressivos naqueles que receberam tratamento dentro do cenário de um estudo randomizado (Giltay et al., 2010).

A maioria dos estudos que avaliam os efeitos histopatológicos da TT no microambiente prostático foram realizados por meio de análises subjetivas e qualitativas. Para diminuir este viés, se torna necessário o uso de análises quantitativas, como por exemplo, a análise fractal. A análise fractal é um método bem estabelecido para a quantificação da complexidade geométrica em sistemas biológicos e biofísicos (Gudea & Stefan, 2013; Metze, 2013; West, 2010). É amplamente aplicada para investigar a taxa metabólica, genética populacional, organização de tecidos e crescimento tumoral, sendo utilizada na análise de diversos tecidos, como no sistema reprodutivo feminino e, também, no sistema nervoso central (Pajevic et al., 2018).

Estudos recentes mostraram que a análise computadorizada de imagens microscópicas é um método objetivo e reproduzível para fins diagnósticos e prognósticos (Bizzarri et al, 2011; Ferro et al, 2011; Gheonea et al., 2014). A análise fractal permite a detecção de mudanças morfológicas sutis, transformando a complexidade da forma em dados quantitativos analíticos, conciliando características estruturais e medidas quantitativas funcionais (Pajevic et al., 2018).

Tecnicamente, um fractal é um objeto que apresenta invariância na sua forma à medida em que a escala, sob a qual o mesmo é analisado, é alterada, mantendo-se a sua estrutura idêntica à original. As principais propriedades que caracterizam os fractais são a auto semelhança, a complexidade infinita e a sua dimensão. A auto semelhança é identificada quando uma porção, de uma figura ou de um contorno, pode ser vista como uma réplica do todo, numa escala menor (Assis et al., 2008). Desta forma, a análise dos objetos fractais baseia-se na relação entre a resolução e a escala em que o objeto é avaliado, e o

resultado pode ser quantitativamente expresso como a dimensão fractal (DF) do objeto (Karperien et al. 2008), sendo representado pela equação:  $DF = (\text{Log } Nr / \log r - 1)$ . Nessa equação, Nr é a quantidade de elementos iguais necessários para sobrepor ou preencher o objeto original, e corresponde à régua ou escala aplicada ao objeto e DF a dimensão da referida estrutura ou objeto (Pacagnelli et al., 2016).

No campo da biologia prostática, a utilização da dimensão fractal como uma ferramenta para diagnóstico patológico no câncer de próstata tem sido estabelecida por vários autores (Arruda et al., 2013; Waliszewski et al., 2015, 2016), reforçando o conceito de que o método de estimativa fractal é um índice adicional útil para a avaliação microscópica convencional. Em suma, a análise fractal pode fornecer informações quantitativas e reprodutíveis, diminuindo os erros oriundos de análises manuais e subjetivas e minimizando a variabilidade intra e interobservador (Frisch et al., 2012).

A partir do que foi exposto acima, o presente estudo tem como objetivo validar a dimensão fractal como uma ferramenta útil para o impacto da terapia hormonal com testosterona sobre a remodelação tecidual do microambiente prostático de ratos Wistar adultos saudáveis.

## 2. Metodologia

O bioterismo e a coleta do material foram realizados nas dependências do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *Campus* de Botucatu (IBB/UNESP). Os fragmentos de próstata ventral foram coletados, dissecados e confeccionados em lâminas histológicas. Os ratos Wistar, provenientes do biotério desta instituição, foram mantidos em caixas de polietileno medindo 40x30x15cm, com fundos sólidos, forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro), temperatura (20 a 25°C), sendo fornecida água filtrada e ração (Nuvital®) *ad libitum*.

### 2.1 Protocolo experimental

Este é um estudo experimental, intervencional, prospectivo, quantitativo (Estrela, 2018). Foram selecionados 10 ratos Wistar com 150 dias de idade divididos em dois grupos experimentais ( $n = 05 / \text{grupo}$ ): grupo T recebendo injeções subcutâneas de cipionato de testosterona (Deposteron®, 5 mg / kg de peso corporal) diluído em óleo de milho, em dias alternados, durante 4 semanas, em um horário consistente todos os dias (8:00 - 8:30) (Sátolo et al., 2004; Scarano et al., 2006) e grupo C recebendo apenas injeções subcutâneas de óleo de milho como veículo.

O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (208 – CEEA).

### 2.2 Análise da estrutura prostática

Aos 180 dias de idade, os ratos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> seguido de decapitação. O uso de CO<sub>2</sub> é um método de eutanásia aceito com algumas restrições (de acordo com a recomendação da Resolução Normativa nº 37 – 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA – Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal) e foi adotado neste estudo em virtude das análises hormonais (dados previamente publicados: Mendes et al., 2018) e embasado pela literatura científica (Deckardt et al., 2007; Nazian et al., 1988).

Os animais eutanasiados foram pesados e submetidos à laparotomia abdômino-pélvica para remoção e coleta da próstata ventral. Os fragmentos do segmento intermediário da próstata ventral foram rapidamente fixados por imersão em metacarn (6 metanol: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) e mantidos em álcool 70%. Posteriormente, o material foi desidratado em

soluções crescentes de etanol, clarificado em xilol e incluído em paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA), seccionados com quatro  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo e submetidos à coloração de Hematoxilina - Eosina (HE).

### 2.3 Análise fractal

Para análise da dimensão fractal, 2 secções histológicas/animal (intervalo de 50  $\mu\text{m}$  entre cada secção – 5 animais), coradas com H&E foram fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x), seguido de padronização das imagens e binarização para leitura e a dimensão fractal estimada pelo método box-counting, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O software considerará o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a espessura do corte e a coloração da imagem.

A análise das lâminas histológicas fractais se baseou na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado foi quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é  $DF = (\log N_r / \log r - 1)$ , sendo  $N_r$  a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e  $r$  a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal foi calculada com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (Pacagnelli et al., 2016).

### 2.4 Análise morfométrica

Para análise da altura do epitélio do tecido prostático foi realiza secções histológicas coradas com HE seguindo as instruções do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram analisadas secções histológicas de 5 animais/grupo, sendo fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x) e medidas 10 áreas distintas para cada foto através da ferramenta de seleção em linha reta (line selection tools straight-line). Para realizar as medidas, é necessária uma padronização realizada pela seleção em linha reta da barra de 100 $\mu\text{m}$ , seguido da seleção da escala (ferramenta Analyze: Set Scale). Padronização: escala de 6.2700 pixels/ $\mu\text{m}$  (aplicado para a medida de todas as imagens).

### 2.5 Análise estereológica

Para análise estereológica, foram avaliadas secções histológicas de 10 lâminas coradas com HE de 5 animais/grupo, com espaço de 50 $\mu\text{m}$  entre cada lâmina, sendo fotografados 10 campos histológicos por secção no aumento de 40x e mensurado a porção de cada compartimento através da grade de Weibel. A grade de Weibel, contendo 168 pontos e 84 linhas, foi sobreposta a secção histológica e, através do software Contador, foi estimada quantitativamente a proporção ocupada entre os compartimentos da próstata (epitélio, lúmen e estroma) nos dois grupos experimentais.

### 2.6 Análise estatística

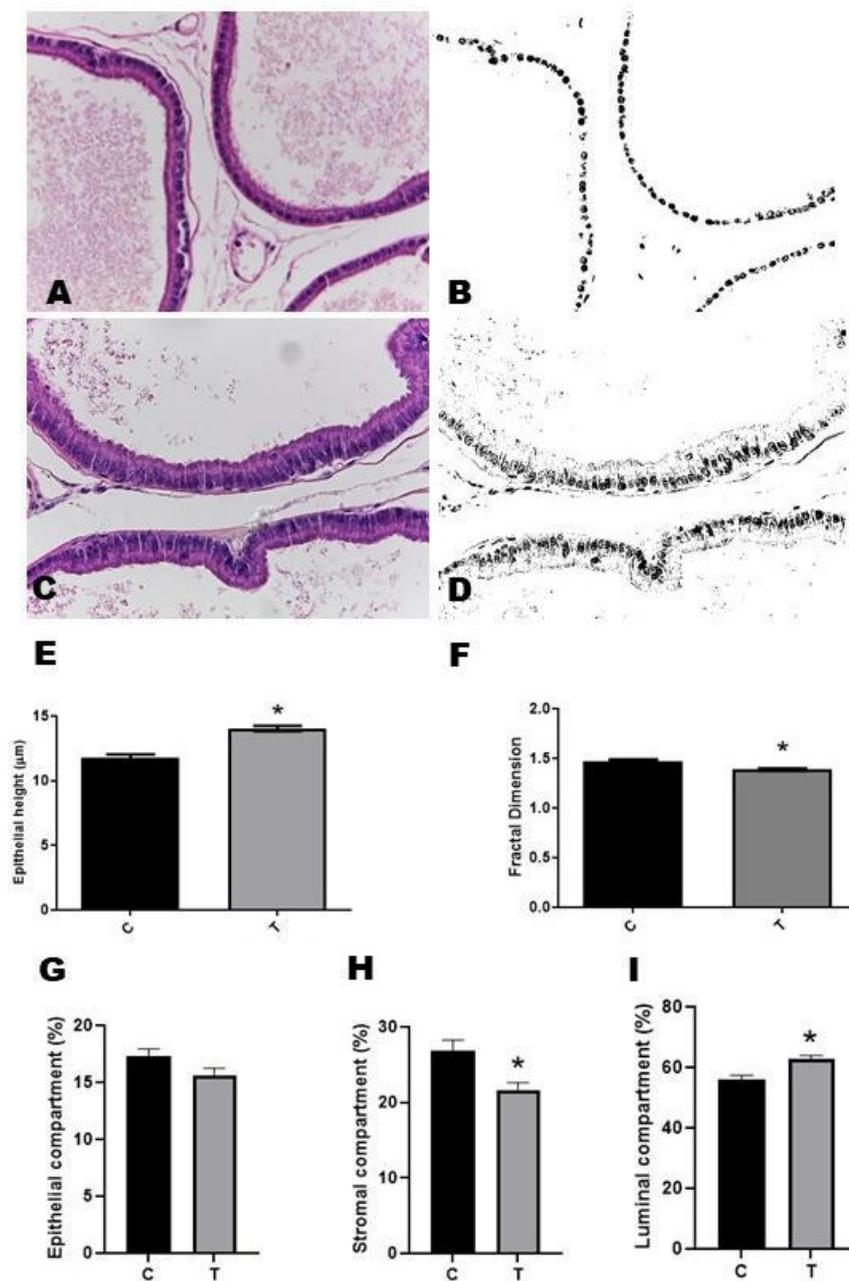
Os dados resultantes das análises foram submetidos a testes estatísticos paramétricos (Teste T-Student) para averiguação da significância entre eles através do software Prism 5.0 (GraphPad), (significância com valor de  $p < 0,05$ ). A análise estatística referida foi empregada com o objetivo de comparar os resultados obtidos entre os grupos em estudo.

## 3. Resultados

A TT foi responsável por reduzir a dimensão fractal prostática (Figura 1F). A diferença captada por essa análise refletiu nas outras análises realizadas. Em relação à altura epitelial, foi observado um aumento do epitélio no grupo submetido à administração de testosterona quando comparado ao grupo controle (Figura 1E).

Em contrapartida, quando realizada a análise estereológica, observamos diminuição da área ocupada pelo compartimento estromal no grupo submetido à TT e consequente aumento do compartimento luminal (Figura 1H). Importante ressaltar que, apesar das alterações observadas pelas análises estereo-morfométricas, não foram observadas alterações patológicas no grupo submetido à TT, como hiperplasia, neoplasia intraepitelial prostática ou qualquer outro tipo de lesão característica deste órgão.

**Figura 1.** Análise histológica, fractal e estereológica prostática em ratos Wistar adultos submetidos à terapia hormonal com testosterona. Na figura podemos observar secções histológicas coradas com HE e as respectivas imagens binarizadas no grupo C (A e B) e no grupo T (C e D). Pode-se ressaltar também a diminuição da dimensão fractal (F) e o aumento da altura epitelial (E) no grupo T. A administração de testosterona também provocou diminuição do compartimento estromal (H) e aumento do compartimento luminal (I). O símbolo asterisco (\*) demonstra a significância estatística das alterações encontradas.



Fonte: Autores (2021).

#### 4. Discussão

Em diferentes espécies de mamíferos, a próstata é identificada por diferenças anatômicas e bioquímicas (Marker et al., 2003). O processo de desenvolvimento da glândula é dependente de interações entre o epitélio e o estroma, sendo de fundamental importância para a homeostase do tecido prostático (Cunha et al., 1996). A análise fractal é capaz de detectar mudanças morfológicas sutis neste tecido e vem tomando espaço na área da medicina como uma análise quantitativa adicional, sendo útil em estudos de patologias e de terapias, além de auxiliar no prognóstico de doenças simuladas em laboratório (Pajevic et al., 2018; Rodrigues, 2016).

Com os resultados apresentados, foi observado que as modificações presentes na altura epitelial e na proporção ocupada pelos compartimentos prostáticos nos animais submetidos à TT foram evidenciadas também pela análise fractal. As alterações observadas corroboram com o fato de que o microambiente prostático é responsivo à andrógenos, incluindo a testosterona, que possuem ação nos órgãos reprodutores masculinos devido ao seu papel indutor na maturação e diferenciação destes órgãos (Mendes et al., 2018). Assim como no homem, a próstata de roedores é responsiva à testosterona, o que os torna um importante modelo nas pesquisas envolvendo a influência de andrógenos sobre o microambiente prostático. (Scarano et al., 2006). Apesar disso, há evidências indicando que os hormônios sexuais não estão relacionados com o desenvolvimento de câncer na glândula prostática, sendo necessária a ação de outros hormônios, como o estrogênio (Nicholson e Ricke, 2011). Tal fato foi endossado recentemente por Lenfant et al. (2020), em um estudo de revisão sistemática onde mostrou que, em pacientes sem câncer de próstata previamente estabelecido, as evidências suficientemente mostram que a terapia androgênica não aumenta o risco subsequente de desenvolvimento de tumores prostáticos.

Scarano et al. (2006) observaram aumento da altura das células epiteliais em roedores com baixos níveis androgênicos submetidos à terapia com testosterona (Scarano et al., 2006), fato este atribuído ao provável aumento da atividade secretora destas células. (Gross e Didio, 1987), como observado no presente estudo.

Além das alterações epiteliais, os hormônios andrógenos podem também provocar diversas alterações no estroma prostático devido à presença de receptores para este hormônio neste compartimento. A matriz extracelular e as células estromais caracterizam um microambiente que influencia no crescimento e na diferenciação funcional de células adjacentes, desempenhando importante papel na função e na forma do tecido (Narbaiz, 1975; Labat-Robert et al., 1990; Tuxhorn et al., 2001). É de conhecimento que o estroma controla a homeostasia epitelial através da regulação androgênica e sabe-se que, durante o processo de carcinogênese, as interações epitélio-estroma são perturbadas, ocorrendo diminuição ou ruptura desta interação, o que pode resultar em um crescimento anormal e em alterações malignas do epitélio (Souza, 2015).

Com relação ao tecido prostático, diversos autores apontam a análise fractal como uma ferramenta útil e um método alternativo para diagnóstico do câncer de próstata (Waliszewski et al., 2015; Waliszewski, 2016), porém sem estabelecer um consenso entre as análises histológica e fractal. Enquanto Arruda et al. (2013) estabelecem maior dimensão fractal a medida que aumenta a agressividade do tumor e, conseqüentemente a desorganização tecidual, Pu et al. (2012) relatam valores maiores para este parâmetro em tecidos não tumorais.

Os resultados mostram uma redução nos valores de dimensão fractal frente à administração de testosterona. Visto que o tecido prostático dos animais submetidos à TT não apresentou lesões, como neoplasia intraepitelial ou focos inflamatórios, os resultados obtidos neste estudo corroboram com o estabelecido por Arruda et al. (2013) que verificaram menor dimensão fractal nos tecidos não neoplásicos.

#### 5. Conclusão

Por meio das análises realizadas no presente estudo, pode-se concluir que a análise fractal é um método eficaz na avaliação das alterações causadas pela suplementação hormonal com testosterona. Novos estudos são necessários para validar

esta técnica em outras condições patológicas, como nas alterações neoplásicas, contribuindo no diagnóstico clínico laboratorial.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo: 2009/54606-1, 2011/05936-9, 2012/00917-9)

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse

## Referências

- Ahmad, I., Sansom, O. J., & Leung, H. Y. (2008) Advances in mouse models of prostate cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(16). doi: <http://doi.org/10.1017/S1462399408000689>.
- Assis, T. A., Miranda, J. G. V., Mota, F. B., Andrade, R. F. S., & Castilho, C. M. C. (2008) Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 30(2)2304.1-2304.10. doi: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172008000200005>.
- Bizzarri, M., Giuliani, A., Cucina, A., Anselmi F. D., Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (2011) Fractal analysis in a systems biology approach to cancer. *Semin Cancer Biol*, 21(3), 175-182, doi: 10.1016/j.semcancer.2011.04.002.
- Cunha, G. R., Hayward, S. W., Dahiya, R., & Foster, B. A. (1996). Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta anatomica*, 155(1), 63–72. doi: <https://doi.org/10.1159/000147791>.
- de Arruda, P. F., Gatti, M., Facio, F. N. Jr., de Arruda, J. G., Moreira, R. D., Murta, L. O. Jr., de Arruda, L. F., & de Godoy, M. F. (2013). Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in histological diagnosis of prostate cancer. *BMC clinical pathology*, 13(6). Doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6890-13-6>.
- Deckardt, K., Weber, I., Kaspers, U., Hellwig, J., Tennekes, H., & van Ravenzwaay, B. (2007). The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(9), 1709–1718. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.005>.
- Drewa, T., & Chlosta, P. (2010). Testosterone supplementation and prostate cancer, controversis still exist. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(5),543-546. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20873424/>.
- Ferro, D. P., Falconi, M. A., Adam, R. L., Ortega, M. M., Lima, C. P., de Souza, C. A., Lorand-Metze, I., & Metze, K. (2011) Fractal characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained chromatin are independent prognostic factors for survival in multiple myeloma. *PLoS One*, 6(6),e20706. doi: 10.1371/journal.pone.0020706.
- Frisch, K. E., Duenwald-Kuehl, S. E., Lakes, R. S., & Vanderby, R. Jr. (2012). Quantification of collagen organization using fractal dimensions and Fourier transforms. *Acta Histochemica*, 114(2)140-144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.03.010>
- Gheonea, D. I., Streba, C. T., Vere, C. C., Șerbănescu, M., Pirici, D., Comănescu, M., Streba, L. A., Ciurea, M. E., Mogoantă, S., & Rogoveanu, I. (2014). Diagnosis system for hepatocellular carcinoma based on fractal dimension of morphometric elements integrated in an artificial neural network. *BioMed research international*, 2014, 239706. <https://doi.org/10.1155/2014/239706>.
- Giltay, E. J., Tishova, Y. A., Mskhalaya, G. J., Gooren, L. J., Saad, F., & Kalinchenko, S. Y. (2010). Effects of testosterone supplementation on depressive symptoms and sexual dysfunction in hypogonadal men with the metabolic syndrome. *The journal of sexual medicine*, 7(7),2572–2582. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01859.x>.
- Gooren, L. J., Behre, H. M., Saad, F., Frank, A., & Schwerdt, S. (2007). Diagnosing and treating testosterone deficiency in different parts of the world. Results from global market research. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, 10(4),173–181. doi: <https://doi.org/10.1080/13685530701600885>.
- Gross, S. A., & Didio, L. J. (1987). Comparative morphology of the prostate in adult male and female *Pracomys* (*Mastomys*) *Natalensis* studied with electron microscopy. *Journal of submicroscopic cytology*, 19(1),77–84. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3560297/>
- Gudea, A. I., & Stefan, A. C. (2013). Histomorphometric, fractal and lacunarity comparative analysis of sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) compact bone samples. *Folia morphologica*, 72(3), 239–248. doi: <https://doi.org/10.5603/fm.2013.0039>
- Hall, J. E. (2011). Guyton & Hall: *Tratado de Fisiologia Médica*. (12 ed.) Filadélfia: Elsevier.
- Hermoso, D. A. M. Bizerra, P. F. V., Constantin, R. P., Ishi-Iwamoto, E. L., Gilgioni, E. H. (2020). Association between metabolic syndrome, steatosis, and testosterone deficiency: evidences from studies with men and rodents. *Aging Male*, 23(5), 1296-1315. doi: 10.1080/13685538.2020.1764927.
- Jesik, C. J., Holland, J. M., & Lee, C. (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate*, 3(1)81-97. doi: 10.1002/pros.2990030111.

- Kapoor, D., Goodwin, E., Channer, K. S., & Jones, T. H. (2006). Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *European journal of endocrinology*, 154(6), 899–906. doi: <https://doi.org/10.1530/eje.1.02166>.
- Karperien, A., Jelinek, H. F., Leandro, J. J., Soares, J. V., Cesar, R. M., Jr, & Luckie, A. (2008). Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 2(1), 109–122. doi: <https://doi.org/10.2147/oph.s1579>.
- Kelly, D. M., & Jones, T. H. (2013). Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *The Journal of endocrinology*, 217(3), R25–R45. doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0455>.
- Kurita, T., Medina, R. T., Mills, A. A., & Cunha, G. R. (2004). Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development (Cambridge, England)*, 131(20), 4955–4964. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.01384>.
- Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M., & Robert, L. (1990). Extracellular matrix. *FEBS letters*, 268(2), 386–393. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81291-u](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81291-u).
- Lenfant, L., Leon, P., Cancel-Tassin, G., Audouin, M., Staerman, F., Roupêt, M., Cussenot, O. (2020). Testosterone replacement therapy (TRT) and prostate cancer: An update systematic review with a focus on previous or active localized prostate cancer. *Urol Oncol* 38(8), 661–670. doi: [10.1016/j.urolonc.2020.04.008](https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.04.008).
- Marchiani, S., Tamburrino, L., Nesi, G., Paglierani, M., Gelmini, S., Orlando, C., Maggi, M., Forti, G., & Baldi, E. (2010). Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation. *International journal of andrology*, 33(6), 784–793. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01030.x>.
- Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., & Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental biology*, 253(2), 165–174. doi: [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00031-3](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00031-3).
- Marks, L. S., Mazer, N. A., Mostaghel, E., Hess, D. L., Dorey, F. J., Epstein, J. I., Veltri, R. W., Makarov, D. V., Partin, A. W., Bostwick, D. G., Macairan, M. L., & Nelson, P. S. (2006). Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA*, 296(19), 2351–2361. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.296.19.2351>.
- Mendes, L. O., Castilho, A., Pinho, C. F., Gonçalves, B. F., Razza, E. M., Chuffa, L., Anselmo-Franci, J. A., Scarano, W. R., & Martinez, F. E. (2018). Modulation of inflammatory and hormonal parameters in response to testosterone therapy: Effects on the ventral prostate of adult rats. *Cell biology international*, 42(9), 1200–1211. doi: <https://doi.org/10.1002/cbin.10990>.
- Metze K. (2013). Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(7), 719–735. doi: <https://doi.org/10.1586/14737159.2013.828889>.
- Morgentaler A. (2009). Testosterone therapy in men with prostate cancer: scientific and ethical considerations. *The Journal of urology*, 181(3), 972–979. doi: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.11.031>.
- Narbaitz R. (1975). Embryology, anatomy and histology of the male sex accessory glands. In: D. Brandes (Ed.). *Male sex accessory organs* (p. 3-15). New York: Academic Press.
- Nazian, S. J. (1988). Serum concentrations of reproductive hormones after administration of various anesthetics to immature and young adult male rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 187(4), 482–487. doi: <https://doi.org/10.3181/00379727-187-42692>.
- Nicholson, T. M., & Ricke, W. A. (2011). Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation; research in biological diversity*, 82(4-5), 184–199. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.04.006>.
- Pacagnelli, F. L., Sabela, A. K. D. A., Mariano, T. B., Ozaki, G. A. T., Castoldi, R. C., Carmo, E. M., Carvalho, R. F., Tomasi, L. C., Okoshi, K., & Vanderlei, C. M. (2016). Fractal Dimension in Quantifying Experimental-Pulmonary-Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 107(1)33-39. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160083>.
- Pajević, M., Aleksić, M., Golić, I., Markelić, M., Otasević, V., Janković, A., Stanić, A., Korac, B., & Korac, A. (2018). Fractal and stereological analyses of insulin-induced rat exocrine pancreas remodelling. *Folia morphologica*, 77(3), 478–484. doi: <https://doi.org/10.5603/FM.a2017.0106>.
- Price, D. (1963). Comparative aspects of development and structure in the prostate. *National Cancer Institute monograph*, 12, 1–27. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14072991/>.
- Pu, Y., Wang, W., Al-Rubaiee, M., Gayen, S. K., & Xu, M. (2012). Determination of optical coefficients and fractal dimensional parameters of cancerous and normal prostate tissues. *Applied spectroscopy*, 66(7), 828–834. doi: <https://doi.org/10.1366/11-06471>.
- Reyes-Vallejo, L., Lazarou, S., & Morgentaler, A. (2007). Subjective sexual response to testosterone replacement therapy based on initial serum levels of total testosterone. *The journal of sexual medicine*, 4(6), 1757–1762. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00381.x>.
- Rodrigues, R. M. C. (2016). *A análise fractal como ferramenta de prognóstico para o sucesso implantar – uma revisão do estado da arte*. Portugal: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.
- Salam, R., Kshetrimayum, A. S., & Keisam, R. (2012). Testosterone and metabolic syndrome: The link. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16 Suppl 1(Suppl1), S12–S19. doi: <https://doi.org/10.4103/2230-8210.94248>.
- Sátolo, S., Carvalho, C. A., & Cagnon, V. H. (2004). Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue & cell*, 36(6), 417–430. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2004.07.004>.
- Scarano, W. R., Vilamaior, P. S., & Taboga, S. R. (2006). Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 288(11), 1190–1200. doi: <https://doi.org/10.1002/ar.a.20391>.

Scarano, W. R. (2002). *Efeito do estradiol sobre a próstata da cobaia *Cavia porcellus* em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia - UNICAMP. Campinas – SP.

Shoskes, J. J., Wilson, M. K., & Spinner, M. L. (2016). Pharmacology of testosterone replacement therapy preparations. *Translational andrology and urology*, 5(6),834–843. doi: <https://doi.org/10.21037/tau.2016.07.10>.

Silverthorn, D. U. (2010). *Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada*. (5-ed.). Brasil: ARTMED.

Souza, G. R. (2015). *Estudo do potencial migratório de células tumorais prostáticas expostas à fibronectina*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Botucatu, SP.

Sugimura, Y., Cunha, G. R., & Donjacour, A. A. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biology of reproduction*, 34(5),961–971. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.961>.

Timms, B. G., Howdeshell, K. L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C. A., & vom Saal, F. S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19),7014–7019. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502544102>.

Tuxhorn, J. A., Ayala, G. E., & Rowley, D. R. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of urology*, 166(6),2472–2483. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11696814/>.

Waliszewski P. (2016). The Quantitative Criteria Based on the Fractal Dimensions, Entropy, and Lacunarity for the Spatial Distribution of Cancer Cell Nuclei Enable Identification of Low or High Aggressive Prostate Carcinomas. *Frontiers in physiology*, 7, 34. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00034>.

Waliszewski, P., Wagenlehner, F., Gattenlöhner, S., & Weidner, W. (2015). On the relationship between tumor structure and complexity of the spatial distribution of cancer cell nuclei: a fractal geometrical model of prostate carcinoma. *The Prostate*, 75(4),399–414. doi: <https://doi.org/10.1002/pros.22926>.

West B. J. (2010). Fractal physiology and the fractional calculus: a perspective. *Frontiers in physiology*, 1, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00012>.

World Health Organization. (2009). *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*. Geneva, Suíça.

Yassin, A. A., & Saad, F. (2013). Testosterone and obesity: generic aspects and specific experience. *The Journal of Men's Health and Gender*, 4(3)372-373.