

Juliany Silveira Braglia César Vieira

**Regulação da enzima que degrada a insulina e alterações celulares na
próstata ventral de ratos castrados pós tratamento com dexametasona
e testosterona.**

Recife-PE
2010

JULIANY SILVEIRA BRAGLIA CÉSAR VIEIRA

**REGULAÇÃO DA ENZIMA QUE DEGRADA A INSULINA E
ALTERAÇÕES CELULARES NA PRÓSTATA VENTRAL DE
RATOS CASTRADOS PÓS TRATAMENTO COM
DEXAMETASONA E TESTOSTERONA**

Tese apresentada ao programa de pós
graduação em Nutrição do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, para a obtenção
do título de doutor em Nutrição.

Orientadores: Prof. Dr. Daniel Pedro Udrisar

Prof Dr Raul Manhaes de Castro

Co-orientadora: Prof Dr^a Maria Inês Wanderley

Recife, PE – Brasil
2010

Vieira, Juliany Silveira Braglia César

Regulação da enzima que degrada a insulina e alterações celulares na próstata ventral de ratos castrados pós tratamento com dexametasona e testosterona / Juliany Silveira Braglia César Vieira. – Recife: O Autor, 2010.

71 folhas: il., graf. ; 30 cm

Orientador: Daniel Pedro Udrisar

Tese (tese) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Enzima que degrada a insulina. 2. Castração. 3. Próstata. 4. Testosterona. 5. Glicocorticóide. I. Udrisar, Daniel Pedro. II. Título.

616.4

CDD (20.ed.)

UFPE

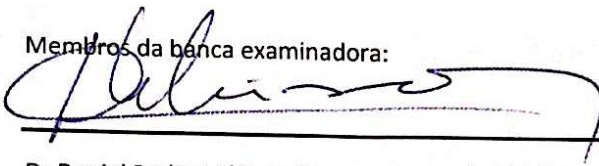
CCS2011-049

Juliany Silveira Braglia César Vieira

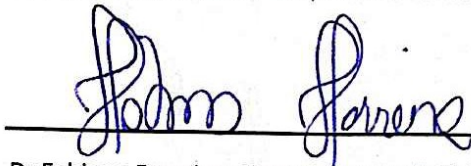
Regulação da enzima que degrada a insulina e alterações celulares na próstata ventral de ratos castrados pós tratamento com dexametasona e testosterona.

Tese Aprovada em 19/11/2010

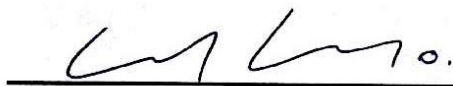
Membros da banca examinadora:



Dr Daniel Pedro Udrisar- Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE



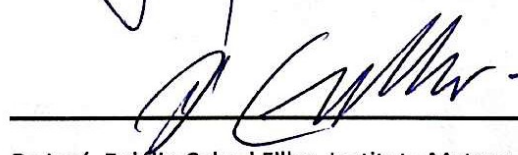
Dr Fabiano Ferreira - Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFPE



Drª Carol Virgínia Góis Leandro -Departamento de Nutrição- UFPE



Drª Cláudia Lagranha - Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV/UFPE



Dr José Eulálio Cabral Filho- Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

Recife

2010

*Dedico este trabalho à memória de minha
mãe Dóris*

*Pelo seu incentivo irrestrito, pelo seu
amor incondicional e pelos seus preciosos
ensinamentos fundamentais na construção
do meu ser*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita bondade e misericórdia, por tornar o meu fardo leve e suave.

Ao meu amado Lauro, pelo apoio, incentivo, pelo amor dedicado e por tornar possível mais essa conquista.

Ao meu pai, pela presença constante e fundamental em minha vida, pela ajuda nos momentos decisivos.

Aos meus filhos Matheus e Maria Laura, pela preciosidade de suas vidas, pela alegria infinda em cada gesto de amor e por transformar diariamente o meu viver.

Aos meus orientadores Daniel e Inês pelo convívio harmonioso e enriquecedor nesses quase 7 anos, pelos ensinamentos, pela dedicação e paciência, pelo carinho com o qual orientaram a realização deste trabalho.

À minha sogra e cunhadas Giselle e Maria Gentila pela ajuda irrestrita e pelo acolhimento diário.

Aos amigos Sérgio e Giselee por sempre acreditarem em mim, pela companhia agradável, pelas orações e incentivo nessa etapa da minha vida.

[...] claro que quando chegar ao fim do meu passeio saberei mais,
mas também é certo que saberei menos, precisamente por mais
saber,
por outras palavras, a ver se me explico,
a consciência de saber mais conduz-me à consciência de saber
pouco,
aliás, apetece perguntar, que é saber...
(José Saramago, 1989)

RESUMO

A enzima que degrada a insulina (IDE) é a principal enzima responsável pela degradação da insulina. A IDE tem múltiplas funções celulares, incluindo funções regulatórias e de ligação. Durante o desenvolvimento e crescimento de vários tecidos, particularmente os do sistema reprodutor masculino, a IDE está envolvida. Tem sido demonstrado que a IDE interage com receptores de andrógenos e glicocorticóides e aumenta a ligação desses receptores ao DNA no compartimento nuclear. A glândula prostática no adulto existe num ambiente multihormonal e tem a capacidade de responder a uma variedade de sinalizadores intracelulares, incluindo esteróides, retinóides, hormônios peptídicos e fatores de crescimento. Os andrógenos desempenham um papel chave na função da próstata, mas os glicocorticóides podem também interferir na homeostase prostática e modular a atividade celular. Esta bem estabelecido que a administração de glicocorticóides leva a um aumento da produção hepática de glicose, resistência periférica à ação da insulina e hiperinsulinemia compensatória. O câncer de próstata pode ser outro aspecto da síndrome de resistência à insulina. O uso de um modelo de diminuição da sensibilidade à insulina induzida pela administração de 6 dias de dexametasona provê um ambiente hiperinsulinêmico e pode ser útil para a elucidação dos efeitos da dexametasona (D), testosterona (T) e dexametasona mais testosterona (D+T) na regulação da IDE. Foram também investigados os efeitos desses hormônios no remodelamento da próstata ventral após a castração (C). A castração provoca uma evidente redução do peso da próstata (PW). O peso corporal (BW) foi significativamente diminuído nos animais castrados e tratados com dexametasona e o PW relativo foi: 2.6 ± 0.2 vezes maior no grupo D, 2.8 ± 0.3 vezes maior no grupo T e 6.6 ± 0.6 vezes maior no grupo D + T quando comparado aos ratos castrados. Modificações ultraestruturais na próstata ventral em resposta à privação androgênica foram observadas nesse estudo. As alterações foram restauradas após tratamento com testosterona e com testosterona mais dexametasona e parcialmente restauradas com dexametasona somente. Estes resultados indicam que a resistência à insulina induzida pela dexametasona pode alterar significativamente o peso corporal, o peso prostático e a relação peso da próstata/peso corporal. A quantidade de IDE no núcleo indica um aumento de 4.3 vezes (± 0.4) no grupo castrados tratado com D + T em comparação com o grupo castrado. Os níveis de IDE na célula como um todo aumentaram aproximadamente 1.5 vezes (± 0.1), 1.5 vezes (± 0.1) e 2.9 vezes (± 0.2) nos grupos D, T e D+T, respectivamente, quando comparados ao grupo castrado. A análise da degradação da insulina indicou um aumento na atividade de 1.4 vezes (± 0.1), 2.1 vezes (± 0.1) e 1.7 vezes (± 0.1) após 6 dias de castração nos grupos D, T e D+T, respectivamente quando comparados ao grupo castrado. Assim, a presença no plasma de dexametasona, altos níveis de insulina ou testosterona ou ainda os três combinados podem prevenir a atrofia e regressão celular e/ou restaurar a próstata ventral de ratos após a castração. A IDE nuclear pode ser importante para o remodelamento do tecido prostático após o tratamento dos ratos castrados com dexametasona e testosterona.

Palavras-chave: enzima que degrada a insulina, castração, próstata, testosterona, glicocorticóide, resistência à insulina, ultraestrutura.

ABSTRACT

Insulin-degrading enzyme (IDE) is the major enzyme responsible for insulin degradation. In addition to degradation, IDE has multiple cellular functions, including binding and regulatory functions. During development and growth of various tissues, particularly those of male reproductive system, IDE is involved. It has also been shown that IDE interacts with AR and GR and enhances the binding of these receptors with DNA in the nuclear compartment. The adult prostate gland exists in a multihormonal environment and has the capability to respond to a variety of intracellular communicators, including steroids, retinoids, peptide hormones and growth factors. Androgens play a key role in prostate function but Glucocorticoids can also interfere in prostatic homeostasis and modulate cellular activity. It is established that administration of glucocorticoids leads to increased hepatic glucose production, peripheral resistance to insulin action and compensatory hyperinsulinaemia. Prostate cancer may be another aspect of insulin-resistance syndrome. Use of a model of decreased insulin sensitivity induced by 6-day dexamethasone administration provides a hyperinsulinaemic environment and may be useful for the elucidation of the effect of dexamethasone (D), testosterone (T) and dexamethasone plus testosterone (D+T) on the regulation of IDE. It was also investigated the effects of these hormones on the remodeling of rat ventral prostate after castration (C). Castration promoted a marked reduction in prostate weight (PW). Body weight (BW) was significantly decreased in the castrated animals treated with dexamethasone and the relative PW was 2.6-fold (± 0.2) higher in the D group, 2.8-fold (± 0.3) higher in the T group and 6.6-fold (± 0.6) higher in the D+T group in comparison to the castrated rats. Ultrastructural changes in ventral prostate in response to androgen deprivation were observed in this study. The alterations were restored after testosterone and dexamethasone plus testosterone treatments and partially restored with dexamethasone alone. These results indicated that insulin resistance induced by dexamethasone can significantly alter body weight, prostate weight and the relationship PW/BW. The nuclear IDE protein level indicated a 4.3-fold (± 0.4) increase in castrated rats treated with D+T when compared to castration alone. Whole cell IDE protein levels increased approximately 1.5-fold (± 0.1), 1.5-fold (± 0.1) and 2.9-fold (± 0.2) in the D, T and D+T groups, respectively, when compared to castration alone. The insulin degradation analysis indicated a .1.4-fold (± 0.1), .2.1fold (± 0.1) and 1.7-fold (± 0.1) increase in IDE activity six days following castration in the D, T and D + T groups, respectively, in comparison to the castrated group. Thus, the presence in the plasma of either dexamethasone or high insulin levels, testosterone or all of them combined could prevent cellular atrophy and regression and/or restore rat ventral prostate after castration. Nuclear IDE could be important to tissue remodeling following the treatment of castrated rats with dexamethasone and testosterone

Keywords: insulin-degrading enzyme, castration, prostate, testosterone, glucocorticoid, insulin resistance, ultrastructure

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
I.Tradução do sinal e ação intracelular da insulina.....	13
II.Degradação celular da insulina	14
III. A IDE e suas funções biológicas	15
IV. Tradução do sinal dos glicocorticóides	17
V. A próstata como modelo experimental: influência da IDE no crescimento prostático....	21
OBJETIVOS.....	24
Objetivos específicos:	24
MÉTODOS	25
I. Animais e tratamento.....	25
II. Preparação da fração citosólica da próstata ventral de rato e estudo da degradação da ¹²⁵ I-insulina	26
III. Preparação da ¹²⁵ I-insulina monoiodada.....	27
IV. Degradação da ¹²⁵ I-insulina	28
V. Análise por microscopia eletrônica.....	28
VI. Análise por imunocitoquímica.....	28
RESULTADOS	30
Statistics	37
Srinivasan S, Nawaz Z. (2010) E3 ubiquitin protein ligase, E6-associated protein (E6-AP) regulates PI3K-Akt signaling and prostate cell growth. <i>Biochim Biophys Acta</i>. PMID: 20826237.	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
ANEXOS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

APRESENTAÇÃO

A enzima que degrada a insulina (IDE) descrita há mais de 50 anos por Mirsky e Broh-Kahn (1949), é uma metaloprotease de 110 kDa que requer cátions bivalentes (Zn^{++}) para sua atividade de protease e degrada a insulina com alto grau de especificidade (DUCKWORTH e col., 1997).

Embora a insulina apresente a maior afinidade pela enzima, vários outros peptídeos podem ser degradados pela IDE como o glucagon, o fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II), o peptídeo atrial natriurético (ANP) e TGF- α (MISBIN & ALMIRA, 1989; DUCKWORTH & KITABCHI, 1974; GEHM & ROSNER, 1991; ROTH et al., 1984; BURGHEN et al, 1976, MULLER et al, 1991, HAMEL et al, 1997). Estudos demonstram que a IDE também atua na quebra de peptídeos β -amilóides; esses peptídeos apresentam a propriedade estrutural de formar fibrilas amilóides sob certas condições, o que revela uma similaridade com os demais substratos também degradados pela enzima. O acúmulo de β -amilóides está presente na enfermidade de Alzheimer e pode ocorrer devido a alterações na atividade da IDE (KUROCHIN & GOTO, 1994).

Múltiplas funções celulares em adição à degradação são relacionadas a IDE, incluindo funções regulatórias e de ligação. Demonstrou-se, por exemplo, que a IDE interage e aumenta a ligação dos receptores de Andrógenos e de Glicocorticóides ao DNA, sugerindo que essa enzima pode ser importante para a atividade transcricional dos receptores de esteróides (KUPFER et al, 1993)

A degradação da insulina é um processo regulado e é considerado parte integral da interação do hormônio com seus tecidos-alvo (DUCKWORTH et al, 1988; UDRISAR et al., 1992). Esse evento biológico apresenta correlação significativa com várias funções celulares como crescimento e diferenciação celular (UDRISAR et al, 2005). Kuo et al (1993) observaram que a IDE está expressa e é regulada de diferentes maneiras durante o desenvolvimento e crescimento de diversos tecidos, mas principalmente no sistema reprodutor masculino.

Outra função regulatória da IDE inclui sua ligação ao proteassoma com a conseqüente regulação do mesmo. O proteassoma é uma proteinase multicatalítica importante na degradação intracelular de proteínas (DUCKWORTH et al, 1998). Essa proteinase é o alvo primário do efeito anti-catabólico da insulina (ROOYACKERS & NAIR 1997, GRIZARD et

al. 1999, GALBAN et al. 2001). A habilidade da insulina em inibir a atividade do proteossoma requer a presença da IDE (BENNETT et al, 2003)

A interação do AR e/ou GR com a IDE pode ter conseqüências importantes para a tradução do sinal mediada pela insulina e pelos esteróides (androgênios e glicocorticóides). A ligação de ambos receptores com a IDE parece relacionar-se com alguns fenômenos biológicos como resistência à insulina, metabolismo dos receptores de esteróides e especificidade de ação dos hormônios esteróides além de possivelmente ter implicações no Diabetes Mellitus e na enfermidade de Alzheimer (LEISSRING & SELKOE, 2006).

Udrisar et al (2005) evidenciaram um possível papel da IDE na regulação do crescimento da próstata e útero de ratos. Verificaram ainda que a testosterona e estradiol podem ser importantes fatores para a expressão e regulação da IDE na próstata e útero. Apesar da importância óbvia da IDE no controle do metabolismo da insulina e de outros processos, o controle metabólico da IDE não foi ainda extensivamente estudado (FAWCETT & DUCKWORTH, 2009)

A próstata, apesar de ser considerada um exemplo típico de glândula dependente de androgênio, existe num ambiente multihormonal e através da expressão de receptores tem a capacidade de responder a uma variedade de sinalizadores incluindo os esteróides, retinóicos, hormônios peptídicos e fatores de crescimento. Perturbações da rede regulatória conseqüentes à superprodução, ausência ou introdução de um ou mais componentes inevitavelmente leva a uma ruptura de padrão normal da transcrição gênica, causando aberrações na proliferação celular (DAVIES & RUSHMERE, 1990). Após a castração, a próstata ventral sofre regressão devido a indução da apoptose nas células epiteliais da glândula. Por outro lado, o tratamento com testosterona restabelece o tecido prostático (UDRISAR et al, 2005).

As interações entre o epitélio e estroma são importantes tanto para o desenvolvimento prostático como para a progressão de tumor na glândula. Na próstata, o crescimento e a fisiologia das células epiteliais dependem da expressão de receptores de hormônios esteróides e das interações parácrinas estabelecidas secundariamente à estimulação androgênica (AUGUSTO et al, 2008). Os receptores de andrógenos estão presentes nas células epiteliais secretórias, células musculares lisas e células estromais nos lobos ventral, dorsal e lateral da próstata. Apesar de se saber que os receptores de andrógenos estão primariamente sob o controle androgênico no tecido prostático, o mecanismo exato de regulação ainda permanece desconhecido (PRINS & BIRCH, 1993)

Já está bem estabelecido que a administração de glicocorticóides leva a um aumento da produção hepática de glicose, resistência à ação periférica da insulina e hiperinsulinemia

compensatória e postula-se que o câncer de próstata pode ser um outro aspecto da resistência à insulina (BARNARD et al, 2002). Os estrógenos, glicocorticóides, fatores de crescimento e agentes esteróides atuam como sinalizadores influenciando o crescimento da próstata (LOPACZYNSKI et al, 2001; UDAYAKUMAR et al, 1999; MARCELLI & CUNNINGHAMAUS 1999). Os glicocorticóides são utilizados freqüentemente em meio de cultura para promover o crescimento das células epiteliais prostáticas e também afetam a homeostase prostática em experimento *in vivo*. Demonstrou-se ainda que o cortisol reverte ou retarda os processos moleculares associados com a morte celular programada nas células prostáticas (DAVIES & RUSHMERE, 1990). Outros autores referiram ainda que o estímulo das células prostáticas com dexametasona resulta em aumento da proliferação celular e na síntese de fibronectina (Albrecht et al, 2002)

Estudos demonstram que ratos com Diabetes induzida por streptozotocina apresentam uma significativa redução no peso prostático e nos níveis séricos de testosterona enquanto que o tratamento com insulina de ratos diabéticos normaliza ambos os parâmetros (IKEDA et al., 2000). Nessas condições experimentais as alterações observadas na próstata pós tratamento com streptozotocina são semelhantes as vistas em ratos castrados (YONO et al, 2008) Segundo Carvalho et al (2003) em resposta à privação androgênica, ocorrem alterações nas glândulas sexuais acessórias. Fatores como diabetes, alcoolismo crônico (SÁTTOLO et al., 2004) e a própria castração (VILAMAIO et al., 2000) causam tranformações nesses órgãos acessórios, especialmente na próstata, em resposta às alterações testiculares. As modificações observadas na próstata incluem atrofia epitelial, desorganização das organelas envolvidas nos processos secretórios acompanhadas de destruição das biomembranas e alterações da secreção luminal (CARVALHO et al., 2003; SÁTTOLO et al., 2004) Entretanto, o tratamento com testosterona estimula o reestabelecimento do tamanho e da função prostática (CUNHA et al, 1987).

Fatores de risco para a hiperplasia prostática como insulina, fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e dislipidemia podem agir através de mecanismos independentes de androgenio (BARNARD et al., 2002). Vikram *et al.* (2010) recentemente evidenciaram uma correlação entre hiperinsulinemia e crescimento prostático, interligando hiperinulinemia com hiperplasia prostática em ratos resistentes à insulina.

Assim, o estudo proposto no presente trabalho investigou o efeito da dexametasona, testosterona e dexametasona em associação com a testosterona no remodelamento da próstata ventral de ratos após a castração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.Tradução do sinal e ação intracelular da insulina

A ação da insulina é um processo complexo, uma vez que se relaciona com múltiplos efeitos celulares como o metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas, além de controlar a expressão gênica e a atividade enzimática (DUCKWORTH et al, 1997).

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido, sendo essencial para o apropriado desenvolvimento e crescimento tecidual e para a manutenção da homeostase glicêmica. É secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans em resposta a níveis circulantes aumentados de glicose e aminoácidos no período pós-prandial (PESSIN & SALTIEL, 2000).

O primeiro passo para a atividade celular da insulina envolve sua ligação com seu receptor de membrana específico, uma glicoproteína heterotetramérica constituída de 2 subunidades α e 2 subunidades β ligadas por pontes dissulfídicas. A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação à insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela tradução do sinal. A insulina liga-se a subunidade α e estimula a fosforilação das tirosinas da subunidade β do receptor da insulina. A subunidade β é uma proteína quinase capaz de se autofosforilar (atividade tirosina quinase intrínseca) e de fosforilar outros substratos nos resíduos tirosina. A autofosforilação do receptor da insulina ocorre através de uma cascata de reações de fosforilação intramoleculares (SAAD, 1994). Uma vez ativado, o receptor da insulina fosforila vários importantes substratos proximais em seus resíduos tirosina, incluindo os membros do substrato do receptor de insulina (IRS-1/2/3/4). A fosforilação dos substratos IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas efetoras adicionais, incluindo SHP2 tirosinofosfatase e PI 3-quinase (fosfatidilinositol 3-quinase). A ativação da PI 3-quinase leva a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática (PESSIM & SALTIEL, 2000; SEOL & KIM, 2003). A SHP2 tirosinofosfatase ativa o complexo SOS-Ras, o qual se relaciona com a atividade mitogênica da insulina e de outros fatores de crescimento (DUCKWORTH et al, 1998).

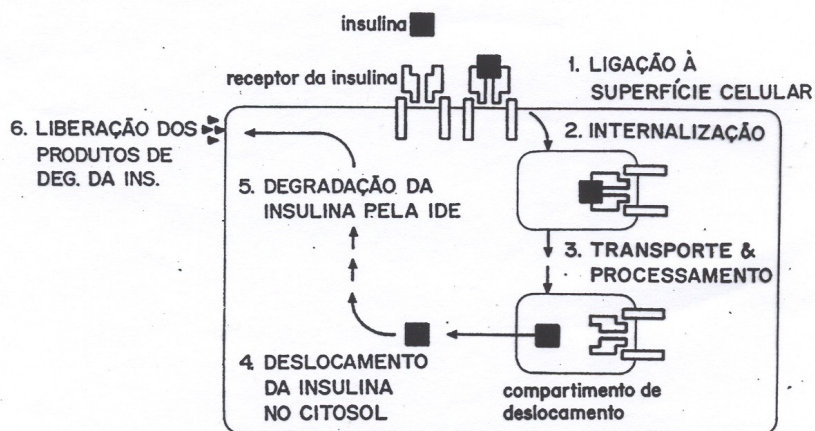
A diversidade da resposta (transportadores de glicose, síntese de proteínas, lipídeos, glicogênio, regulação da expressão gênica e crescimento celular) é controlada por

determinadas seqüências de aminoácidos em torno dos resíduos fosfotirosina individuais que determinam os tipos de proteínas acessórias que serão trazidas para o complexo sinalizador.

II. Degradação celular da insulina

A degradação da insulina é um evento subsequente à ligação da insulina ao receptor de superfície e ao metabolismo intracelular mediado pelo receptor. Esse processo auxilia no controle das respostas celulares a este hormônio, diminuindo sua biodisponibilidade, mas a sua degradação também está possivelmente implicada na mediação de alguns aspectos da atividade hormonal da insulina. A maioria dos estudos conclui que a degradação da insulina é realizada pela enzima que degrada a insulina – IDE (DUCKWORTH et al, 1998).

A resposta celular à insulina é controlada pela remoção da insulina da circulação e sua degradação (FAWCETT & DUCKWORTH, 2009). As ações da insulina serão finalizadas pela sua degradação e subsequente desfosforilação do seu receptor (DUCKWORTH et al, 1998). A interação da insulina com suas células-alvo requer os seguintes eventos (processamento da insulina): 1) ligação a receptores específicos; 2) internalização do complexo insulina-receptor e formação do endossoma; 3) transporte e processamento do complexo insulina-receptor; 4) deslocamento da insulina no citosol; 5) degradação da insulina pela IDE; 6) liberação dos produtos de metabolização da insulina (UDRISAR et al, 1984)



Nesses eventos, a insulina pode associar-se a organelas intracelulares (elementos de Golgi), mobilizar-se para o núcleo ou para um compartimento de metabolização, ou ser reciclada para a membrana (EXTON, 1991; PLAS, 1982; UDRISAR e col., 1984; GOLDFINE, 1987).

As interações intracelulares da insulina com a IDE também estão envolvidas no controle da ação da insulina sobre a metabolização das proteínas e gorduras (através da ligação ao complexo IDE-proteassoma,) (DUCKWORTH e col., 1998).

A remoção da insulina através do processo de degradação possibilita um auxílio no controle da resposta celular ao hormônio. Com a ativação da tirosina quinase (via ligação insulina-receptor), o complexo hormônio-receptor é internalizado através da invaginação da membrana plasmática e formação da vesícula endocítica. Esta sofre processo de acidificação, resultando na dissociação da insulina do seu receptor e transporte dessas proteínas a compartimentos intracelulares. Parte da insulina é reciclada para a superfície celular, sendo liberada intacta, mas a maioria da insulina é degradada intracelularmente.

Assim, a íntima e intrincada relação entre degradação da insulina e ação da insulina sugere que a degradação do hormônio é parte integral da resposta celular à insulina (DUCKWORTH, 1988)

III. A IDE e suas funções biológicas

A IDE é uma metaloprotease de 110 kDa que requer zinco, localizada principalmente no citoplasma e que degrada a insulina com certo grau de especificidade (BURGHEN et al, 1972, DUCKWORTH et al, 1997;). Embora a insulina apresente a maior afinidade, outros peptídeos podem ser degradados pela IDE como o glucagon, o fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II), o peptídeo atrial natriurético (ANP) e TGF- α (DUCKWORTH & KITABCHI, 1974; BURGHEN et al, 1976; ROTH et al, 1984; MISBIN & ALMIRA, 1989; GEHM & ROSNER, 1991; MULLER et al., 1991; HAMEL et al, 1997).

A maioria dos estudos identifica a IDE como a responsável principal pelo mecanismo enzimático primário desencadeador da metabolização e da degradação da insulina (HAMMEL et al., 2003). Essa proteína possui sua atividade de degradação máxima em homogenizados celulares. A maioria da sua atividade é encontrada no citosol (95%), com pequena, mas com

significativa atividade em outras frações subcelulares (DUCKWORTH, 1998). Apesar de estar predominantemente localizada no citoplasma, outros compartimentos subcelulares também podem conter a enzima incluindo peroxissomos, endossomos e núcleo (DUCKWORTH, 1998). Está difusamente expressada nos tecidos, porém com maior intensidade no fígado, testículos, músculo e cérebro sendo esse evento regulado durante a diferenciação e crescimento celular (BAUMEISTER et al., 1993; KUO et al., 1993).

Embora a habilidade da IDE em degradar a insulina venham sendo estudadas há mais de 50 anos, essa enzima é expressa tanto em tecido sensíveis como em tecidos insensíveis à insulina, sugerindo a existência de funções não reconhecidas para esta endopeptidase (LEISSRING et al., 2004)

As proteases são enzimas vitais que tem sido alvo para o tratamento de muitas doenças. A IDE apresenta forte ligação com diabetes e enfermidade de Alzheimer (LEISSRING & SELKOE, 2006). A IDE, além de ser peça fundamental na ação do próprio hormônio insulina, atua também na quebra de peptídeos β -amilóides; esses peptídeos apresentam a propriedade estrutural de formar fibrilas amilóides sob certas condições, o que demonstra uma similaridade com os demais substratos também degradados pela enzima. O acúmulo de β -amilóides está presente na enfermidade de Alzheimer e pode ocorrer devido a alterações na atividade da IDE (KUROCHIN & GOTO, 1994). Em um modelo de rato diabético detectou-se mutações na IDE, as quais reduzem sua habilidade de degradar tanto a insulina como peptídeos β -amilóides (LEISSRING & SELKOE, 2006). Recentemente foi criado um camundongo modificado geneticamente com ausência de gene para IDE. Este camundongo apresentou níveis elevados de insulina durante jejum, além de intolerância à glicose e níveis aumentados de proteínas β -amilóides. Esses resultados sugerem que em alguns casos de diabetes e de Alzheimer existe uma menor atividade da IDE que cronicamente elevaria os níveis de insulina, possivelmente acarretando em resistência à insulina (FARRIS et al., 2003, LEISSRING & SELKOE, 2006). Dessa forma, a diminuição da IDE em camundongos causa um acúmulo de amilóides, hiperinsulinemia e intolerância à glicose sugerindo que a hipofunção da IDE poderia mediar doenças em humanos (FARRIS et al. 2005)

Em estudo de cristalografia, desenvolvido por Shen et al (2006), a estrutura da IDE revela uma conformação que a difere da clássica ligação enzima-substrato, degradação do substrato e posterior eliminação dos produtos da degradação. Essa configuração da IDE demonstra duas metades conectadas por uma dobradiça flexível que permite a esta protease a possibilidade de transitar de um estado aberto para um fechado. A ligação de hidrogênios às

duas metades da IDE cria uma lingüeta que mantém a conformação fechada. Mutações na enzima que desestabilizem a lingüeta ligada por hidrogênios aumentam o papel de protease da enzima, aumentando a eficiência de degradação de substratos, como por exemplo, da insulina e do peptídeo β -amilóide. A IDE pode apresentar-se em duas conformações. A primeira é a conformação aberta que permite a entrada de substratos e a saída de produtos. A outra conformação é a fechada na qual o sítio ativo encontra-se de difícil acesso. A mudança da conformação fechada para a aberta favorece a entrada de substratos na cavidade catalítica. Condições, drogas ou mutações que previnam a configuração fechada aumentam a eficiência da atividade catalítica da enzima em aproximadamente 40 vezes. Considera-se então que esta estrutura da IDE quando no estado aberto permite a ação de moduladores farmacológicos da atividade da IDE (SHEN et al 2006),

Níveis de ATP podem regular a concentração intracelular de insulina dependendo do estado metabólico celular. Dessa forma, o ATP pode participar da regulação intracelular de insulina através da modulação da sua degradação (CAMBEROS et al., 2001)

São atribuídas também à IDE funções regulatórias para a atividade do proteassoma, para os receptores de esteróides, oxidação peroxissomal de ácidos graxos, crescimento e desenvolvimento (KUO et al, 1993; KUPFER et al, 1994; HAMEL et al, 2001. Udrisar et al 2005) evidenciaram um possível papel desta enzima na regulação do crescimento da próstata e útero de ratos. Verificaram ainda que a testosterona ou estradiol e/ou os fatores de crescimento semelhantes à insulina podem ser importantes fatores para a expressão e regulação da IDE na próstata e útero. Além disso, a IDE também atua na otimização da ação dos receptores de esteroides (GR e AR) ao aumentar a ligação de ambos ao DNA (KUPFER et al, 1994).

IV. Tradução do sinal dos glicocorticóides

Os glicocorticóides são hormônios esteróides produzidos e secretados pelo córtex adrenal e exercem papel importante em vários órgãos e sistemas. Agem no metabolismo intermediário da glicose, lipídios e das proteínas, participando também da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse. São fundamentais para a manutenção da homeostasia do organismo (BIOLA & PALARDI, 2000; FARIA & LONGUI, 2006).

A regulação da concentração dos hormônios glicocorticóides circulantes é realizada via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) sendo influenciada por 3 fatores: o ritmo circadiano (BRADBURY et al., 1991), o stresse (MAKINO et al., 2002) e o feedback negativo. O feedback negativo é exercido pelo próprio hormônio agindo sobre receptores de glicocorticóides presentes no hipotálamo e na hipófise (LAUGERO, 2004).

Os glicocorticóides são muito conhecidos pela sua potente atividade farmacológica antiinflamatória e imunossupressora, atuando nas células imunológicas como monócitos, macrófagos, células T, granulócitos, células endoteliais e fibroblastos (BUTTGEREIT et al., 2005). Os glicocorticóides também elevam a glicemia e desempenham importante papel na resposta ao estresse. Além disso, esse grupo de hormônios interrompe a progressão do ciclo celular em diversos sistemas (RENNER et al., 2003; AUSSERLECHNER et al., 2004).

Na clínica médica são utilizados para tratar diversas doenças, mas ao mesmo tempo o potencial dessas drogas em induzir efeitos indesejáveis tornou-se óbvio. As drogas sintéticas utilizadas em grande escala são a dexametasona e betametasona (SCHACKE et al., 2002).

No corpo humano, o principal glicocorticóide endógeno é o cortisol, sua secreção basal diária fica em torno de 6-8 mg/m² (QI & RODRIGUES, 2007). Em resposta ao estresse, a liberação de cortisol é aumentada em 10 vezes do valor basal. A liberação e síntese dos glicocorticóides endógenos são regulados pelo eixo HPA (DELBENDE et al., 1992). Após sua liberação via eixo HPA, o cortisol é convertido na sua forma inativa, a cortisona; a cortisona, por sua vez, também pode ser convertida em cortisol. Essa conversão é a responsável pelas mediações das ações tecido-específicas dos glicocorticóides (SECKL, 2001).

Os efeitos fisiológicos e farmacológicos dos glicocorticóides devem-se à sua ligação a receptores específicos (BIOLA & PALARDI, 2000). O receptor de glicocorticóide (GR) é membro da superfamília de receptores nucleares que incluem os receptores de mineralocorticóides, de progesterona, andrógenos, estrógenos, hormônios tireoidianos, vitamina D e ácido retinóico (ROBINSON-RECHAVI et al., 2001). Estes receptores são ativados por ação hormonal e se comportam como fatores de transcrição regulando positivamente ou negativamente a expressão gênica (CHANG et al., 2001).

O receptor de glicocorticóide é uma proteína de 94 Kda localizada no citosol como um complexo multiprotéico contendo proteínas de choque térmico, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56, e Hsp 40. Esses receptores interagem também com imunofilinas e várias quinases da cascata de sinalização intracelular da proteína quinase ativada por mitógeno MAPK (STAHN et al., 2007).

Os glicocorticóides passam livremente através da membrana plasmática devido a sua estrutura lipofílica. A formação do complexo hormônio/receptor resulta na dissociação das moléculas protéicas anteriormente acopladas ao receptor e esse complexo é então translocado ao núcleo. No núcleo o complexo hormônio-receptor modula a resposta transcricional ligando-se diretamente aos sítios específicos no DNA- os elementos responsivos aos glicocorticóides (GRE) ou via interação proteína-proteína (DITTMAR et al., 1997, 1998).

A ligação do complexo hormônio-receptor aos GRE positivos resulta na indução da síntese de proteínas anti-inflamatórias como também na produção de proteínas regulatórias importantes para o metabolismo. A transcrição de genes pode ser inibida pelos glicocorticóides via interação dos GRs aos GRE negativos, processo pelo qual esses hormônios podem inibir a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo as interleucinas IL-1 e IL-2 (FALKENSTEIN et al, 2000). Mecanismos moleculares evidenciam a possibilidade de ligação do complexo hormônio receptor a fatores de transcrição como as proteínas ativadoras 1 (AP1), fator nuclear-kB (NF-kB), ambos envolvidos na regulação da transcrição de genes pró-inflamatórios (BUTTGEREIT et al., 2004).

A dexametasona é um glicocorticóide sintético o qual possui uma afinidade 50 vezes maior ao receptor de glicocorticóide do que o cortisol (GOUNARIDES, 2008). Quando administrada em excesso, a dexametsona induz efeitos adversos como catabolismo muscular (PRELOVSEK et al., 2006), hiperfagia (DEBONS et al., 1986), aumento da adiposidade (ASENSIO et al, 2004; KORACH-ANDRÉ et al, 2005) e aumento da resistência à insulina. Esse hormônio sintético tem sido utilizado em roedores para produzir resistência à insulina de forma rápida. O mecanismo pelo qual a dexametasona induz resistência à insulina inclui inibição da translocação do transportador de glicose GLUT-4 (DIMITRIADIS et al., 1997), aumento da atividade da lipoproteína lípase no tecido adiposo (ONG et al, 1992) e alteração da vasodilatação endotélio-dependente (LUCHI et al., 2003). A maior vantagem do uso da dexametasona é que o estado de resistência à insulina pode ser gerado num curto período de tempo (AI et al., 2005). No músculo esquelético os glicocorticóides diminuem o transporte de glicose através de uma diminuição da translocação do GLUT-4 estimulada pela insulina (QI & RODRIGUES, 2007). O tratamento crônico com dexametasona diminui a captação de glicose estimulada pela insulina e a translocação do GLUT-4 no músculo esquelético sem haver, contudo redução no conteúdo total de GLUT-4 (HABER, 1992, DIMITRIADIS, 1997).

Os glicocorticóides atuam normalmente sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. Entretanto, quando em concentrações plasmáticas dos glicocorticóides

suprafisiológicas, podem ocorrer distúrbios metabólicos (SANTOS et al., 2007) Desta forma, quando em excesso os glicocorticóides apresentam-se como hormônios diabetogênicos, promovendo aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação periférica deste açúcar em tecidos como muscular, hepático e adiposo (SAAD,1994).

Alterações metabólicas podem ser observadas em modelos experimentais com roedores por administração de glicocorticóide *in vivo*. Perda de massa muscular associada à hipertrofia do fígado (SAVARY et al., 1998), redução do peso corpóreo em ratos (CALDEFIECHAZET et al., 2001, SAVARY et al., 2001) alteração do perfil protéico (RUZZIN et al., 2005) e do perfil lipídico (NOVELLI et al., 1999; BARBERA et al., 2001; HOLNESS et al., 2005) são características comuns após tratamento com dexametasona, além de aumento dos níveis plasmáticos de glicose e de insulina (NOVELLI et al., 1999; BARBERA et al., 2001). Os efeitos dos glicocorticóides sobre o metabolismo podem ser particularmente dependentes da dose e do tempo de administração (SANTOS et al., 2007)

Estudo recente revela que o aumento dos níveis circulantes de insulina plasmática é a primeira alteração manifestada após 24 horas de administração da dexametasona concomitante com pequena elevação das concentrações de glicose sanguínea. A elevação dos níveis de insulina pode ser explicada parcialmente como resposta adaptativa das células β pancreáticas a eventos periféricos como a resistência à insulina desenvolvida na presença de concentrações elevadas de glicocorticóides (SANTOS et al., 2007)

Os glicocorticóides também têm sido estudados por seu efeito estimulatório sobre a glândula prostática, de maneira semelhante aos efeitos metabólicos da testosterona. Esses hormônios atuam como moléculas sinalizadoras que influenciam no crescimento prostático (LOPACYNski et al., 2001) Esses hormônios são usualmente utilizados em meio de cultura para promover o crescimento das células epiteliais prostáticas e também afetam a homeostase prostática sob condições “ artificiais” *in vivo*. O Cortisol pode reverter ou retardar processos moleculares associados com morte celular programada na glândula prostática (DAVIES & RUSHEMERE, 1990).

Estudos demonstraram que fragmentos do receptor de glicocorticóide podem ligar-se a IDE e inibir a sua capacidade de degradar a insulina *in vitro* (KUPFER et al, 1994). Além disso, os hormônios glicocorticóides podem inibir a capacidade da insulina de ligar-se a IDE, um processo essencial para que a sinalização intracelular normal ocorra (HARADA, 1996).

A utilização de um modelo de diminuição da sensibilidade a insulina induzida por 5 dias de administração de dexametasona provê um ambiente hiperinsulinêmico e pode ser útil

para elucidar o efeito da insulina e IDE sobre a homeostase prostática (RIBEIRO et al., 2008, BARBOSA, 2003).

V. A próstata como modelo experimental: influência da IDE no crescimento prostático

A próstata não é um órgão homogêneo, sendo constituída por uma diversidade de tecido, tanto glandular (epitélio) como não glandular (estroma). Na próstata humana normal duas regiões anatômicas distintas podem ser identificadas, uma interna e outra externa. A próstata externa representa maior parte da glândula e clinicamente relaciona-se com o câncer prostático ao passo que na parte interna tem origem a hiperplasia prostática (BOUNDON et al, 1996, MONTI e cols., 2000;).

Estudos morfológicos sugerem que o estroma prostático tem um papel crítico sobre o crescimento e maturação do epitélio prostático através de efeitos parácrinos e autócrinos (fatores de crescimento) responsáveis pela proliferação de ambos estroma e epitélio glandular, afetando o crescimento e maturação do epitélio prostático (LOPACZYNSKI et al, 2001). As interações entre epitélio e estroma são importantes tanto para o desenvolvimento prostático como para a progressão de tumores na glândula (AUGUSTO et al, 2008). O estroma é o indutor do desenvolvimento da próstata tanto no período da embriogênese como da puberdade, mas também durante a vida adulta, estando implicado na patogênese da doença prostática (MONTI et al, 2001). O crescimento e a fisiologia epitelial dependem da expressão de receptores de hormônios esteróides de alguns tipos celulares e das interações parácrinas estabelecidas secundariamente à estimulação androgênica (AUGUSTO et al, 2008). Os hormônios androgênicos agem na próstata a fim de promover o seu desenvolvimento, diferenciação e para a manutenção do amadurecimento morfológico do órgão. No crescimento da próstata no adulto, a testosterona age através do músculo liso, fibroblastos via receptores epiteliais de andrógenos (HAYWARD et al, 1996). Os andrógenos mantêm o epitélio prostático num estado de diferenciação e crescimento permanente e a atividade da testosterona no epitélio estimula a sua função secretória (PLANTZ et al, 1999). A testosterona é metabolizada em 5 α -dihidrotestosterona (DHT), a qual forma um complexo com o receptor de andrógeno para ativar elementos de resposta hormonal específica e ligar-se ao DNA (GRIFFITHS et al, 1999). No estroma prostático a DHT media mecanismos regulatórios

induzindo a produção de vários fatores de crescimento que modulam vias de tradução do sinal de células epiteliais para promover o crescimento e diferenciação (LOPACZYNSKI et al, 2001)

Os estrógenos, glicocorticóides, hormônios peptídeos, fatores de crescimento e agentes esteróides também atuam como sinalizadores influenciando o crescimento da próstata (MARCELLI & CUNNINGHAM, 1999, UDAYAKUMAR et al, 1999, .LOPACZYNSKI et al, 2001)

Em qualquer período da vida adulta, o tecido epitelial prostático é alvo de uma gama de fatores regulatórios que agem em combinação para produzir, caracteristicamente, um programa coordenado de expressão genética, resultando no equilíbrio homeostático (CUNHA 1996; THOMSON, 2001).

A perturbação no processo de regulação conseqüente a uma superprodução, ausência ou introdução de um ou mais componentes, inevitavelmente altera o padrão normal de transcrição genética, causando aberrações na proliferação celular (PAPATSORIS & PAPAVASSILIOU, 2001). Sob condições normais, a interrupção do suprimento testicular de andrógenos (castração) dá início a um processo de morte celular programada que resulta na involução da próstata (DAVIES e RUSHEMERE, 1990)

Sabe-se que hormônios como andrógenos, estrógenos e glicocorticóides agem como fatores extrínsecos na próstata, estimulando o crescimento da mesma. Os efeitos desses hormônios parecem ser mediados por fatores intrínsecos produzidos pela glândula: EGK (fator de crescimento epidérmico), KGF (fator de crescimento queratinócito), IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1), IGF-II (fator de crescimento semelhante à insulina 2) e FGF (fator de crescimento fibroblástico). Sob influência modulatória dos hormônios esteróides, tais fatores promovem diretamente efeitos mitogênicos estimulatórios da proliferação celular (STEINER , 1993; PHEEHL et al, 1996; GNANAPRAGASAM et al, 2000).

Em condições de proliferação celular (tratamento do animal castrado com testosterona) observa-se um aumento na síntese de receptores de androgênio, de receptores de IGF-I e CK-II (caseína kinase II), assim como de outros efetores intracelulares que participam na tradução do sinal hormonal mitogênico (BARNARD et al, 2002). Por outro lado, a atrofia patológica de órgãos endócrino-dependentes após a retirada da estimulação hormonal trófica é acompanhada por maciça onda de apoptose, o que tem sido identificado em próstata após a castração (KIESS e GALLAHER, 1998). O número de sítios de ligação de andrógenos no citosol prostático diminui significativamente após 4-7 dias de orquiectomia bilateral. Em

contraste ao receptor citosólico, o controle hormonal do receptor nuclear de andrógenos é ainda pobremente conhecido (BLONDEAU et al, 1982). A rápida indução da proliferação e recapitulação da glândula a qual é observada quando a testosterona é re-administrada e a habilidade da próstata em criar múltiplos ciclos de involução em resposta a retirada e re-administração de testosterona indicam a presença de células progenitoras responsivas a andrógenos na forma de populações ou isoladas no epitélio prostático (MIROSVICH et al, 1999)

Kuo e col. (1993) observaram que a IDE está expressa e é regulada de diferentes maneiras durante o desenvolvimento e crescimento de diversos tecidos, mas principalmente no sistema reprodutivo masculino. A IDE foi identificada como um fator citoplasmático que facilita a união do receptor de andrógeno (AR) e de glicocorticóide (GR) ao DNA nuclear, o que resulta numa otimização das ações de ambos receptores (KUPFER e col., 1994). Em estudos prévios (Udrisar et al, 2005) demonstrou-se que em situações de proliferação e apoptose celular a IDE encontra-se aumentada e diminuída respectivamente na fração citosólica de próstata de ratos

Ao contrário dos já estabelecidos eventos dos andrógenos e oestrógenos nas células estromais prostáticas, raros estudos existem sobre o significado dos glicocorticóides nas síndromes prostáticas (ALBRECHT et al., 2002) Vários fatores etiológicos têm sido propostos para o desenvolvimento da hiperplasia prostática e especialmente hormônios esteróides estão associados com a patogênese da hiperplasia prostática. Entretanto, o mecanismo preciso de sua fisiopatologia está longe de ser completamente compreendido. Em estudos com ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura, Vikram et al (2010) demonstraram uma elevada proliferação na próstata de ratos adultos resistentes à insulina, fazendo o link entre hiperinsulinemia e hiperplasia prostática .Hipoinsulinemia e castração experimental causam uma diminuição no peso da próstata e a hiperinsulinemia induzida por dieta leva a um aumento na proliferação celular e no alargamento da próstata (VIKRAM et al., 2010). Demonstrou-se que a insulina atrasa o aumento da apoptose induzido pela castração na próstata de ratos diabéticos e que os efeitos antiapoptóticos da insulina nas células epiteliais da próstata ventral ocorreram tanto na presença como na ausência do estímulo androgênico (DAMAS-SOUZA et al., 2010).

Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho investigar os efeitos da dexametasona, testosterona e dexametasona mais testosterona na ultraestrutura celular da próstata ventral de ratos após a castração bem como na regulação da IDE.

OBJETIVOS

O intuito deste trabalho foi estudar os efeitos da dexametasona, e da testosterona administradas separadamente ou combinada sobre o remodelamento da próstata ventral em ratos castrados. Objetivou-se também quantificar a IDE e o receptor de andrógeno em células epiteliais de próstata ventral e a degradação da ^{125}I -insulina nas condições de morte e proliferação celular.

Objetivos específicos:

Determinar o peso da próstata e a relação peso da próstata/ peso corporal dos animais tratados com dexametasona e testosterona após a castração.

Determinar a degradação da ^{125}I -insulina na fração citosólica de um homogeneizado de próstata ventral dos animais tratados com dexametasona, testosterona e dexametasona mais testosterona após a castração.

Determinar, por ultramicroscopia as alterações celulares observadas nas próstatas dos animais submetidos aos diferentes estímulos (testosterona, dexametasona e dexametasona mais testosterona e após a castração)

Quantificar (por imunocitoquímica) a IDE e AR na célula como um todo e no núcleo de células epiteliais da glândula prostática.

MÉTODOS

I. Animais e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, com pesos entre 250 e 300g, com aproximadamente 90 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco recebendo ração Labina e água filtrada *ad libitum*.

Os animais foram mantidos sob sistemas de ventilação e iluminação natural (12 hs claro/12 hs escuro) e temperatura que varia entre 25°C e 29°C.

A castração foi realizada através de incisão escrotal sob CO₂ e anestesia.

Os ratos foram sacrificados por inalação de CO₂ seguida de decapitação e as próstatas ventrais foram retiradas rapidamente, pesadas e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido para análise.

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais na idade adulta (90 dias) foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Castrado: castrados por via trans-escrotal anestesiados com ketamina (Anasedan, Sespo Comércio e Indústria- Ltda., São Paulo, Brasil) na dose de 87mg/Kg i.m. e xelazina (Dopolen, Sespo Comércio e Indústria- Ltda., São Paulo, Brasil) na dose de 13mg/kg i.m.. Tratados com injeção subcutânea de veículo.
- Intacto: mantidos sob as mesmas condições ambientais dos demais grupos experimentais recebendo água e ração *ad libitum*.
- Castrado e tratado com dexametasona: castrados por via trans-escrotal e no primeiro dia após a castração tratados com comprimido de dexametasona (Decadron, Lab Merck Sharp & Dohme, Brasil) na dose de 1mg/ 100g de peso corporal dissolvido na água de beber durante 6 dias consecutivos.

- Castrado e tratado com propionato de testosterona: no terceiro dia após a castração os animais foram tratados com 300 µg/Kg de peso corporal/dia de propionato de testosterona (Sigma Chemical Co., USA) em 0,1 ml de óleo de milho, por via subcutânea, durante 3 dias consecutivos.
- Castrados e tratados com dexametasona e testosterona: no primeiro dia após a castração os ratos foram tratados com dexametasona (1mg/ Kg de peso corporal) na água de beber durante 6 dias consecutivos. No terceiro dia após a castração os animais foram tratados com 300 µg/ml de peso corporal/dia de propionato de testosterona em 0,1 ml de óleo de milho, por via subcutânea, durante 3 dias consecutivos.

Após 24 horas da última injeção e 6 dias após a castração, os animais foram sacrificados através da inalação de CO₂ seguida de decapitação e a próstata ventral foi retirada, pesada e separada em amostras para a determinação da metabolização da insulina (UDRISAR et al, 2005), para análise de microscopia eletrônica e imunocitoquímica. Amostras de sangue dos ratos em jejum (12-14 horas) foram obtidas da ponta da cauda dos animais e a concentração da glicose total foi mensurada utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Advantage, Roche, Brasil)

II. Preparação da fração citosólica da próstata ventral de rato e estudo da degradação da ¹²⁵I-insulina

A fração citosólica foi obtida através da ultracentrifugação diferencial de um homogenizado. As próstatas obtidas dos ratos dos grupos experimentais já mencionados foram cortadas em pequenos pedaços e homogeneizadas em 2ml tampão (10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 15% glicerol[vol/vol], 1,5 mM de EDTA, 2mM Mercaptoetanol, 3mM MgCl₂, 3mM CaCl₂ adicionado a inibidores de proteases em um homogeneizador de 7ML de teflon-vidro (Kontes, Vineland,NJ) a 2ML por grama de próstata. O homogeneizado foi filtrado através de papel de nylon e centrifugado a 700 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos. O sobrenadante resultante foi considerado a fração

citossólica. Em seguida, foi feita a purificação da fração citossólica por precipitação, através da adição de 0,42 g de sulfato de amônia/ML de sobrenadante, 60% de saturação. Este material foi submetido novamente à centrifugação (17.000 g por 20 minutos), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em tampão (1,5 mM EDTA, 10% glicerol [vol/vol], 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) Este material foi utilizado para estudo da degradação da ¹²⁵I-insulina e recolheu-se amostra para a determinação da concentração de proteínas totais através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em todos os experimentos a degradação da ¹²⁵I-insulina foi determinada por precipitação com 5% de TCA, através de contador de radiação gama, considerando-se a radioatividade solúvel como material degradado (UDRISAR et al, 2005). O controle da ¹²⁵I-insulina (precipitação com TCA sem fração citossólica) apresentou mais de 92% de insulina intacta. Os valores foram fornecidos como porcentagens da ¹²⁵I-insulina por 60 µg/ml de proteína citossólica. As concentrações de proteínas foram determinadas baseadas em Bradford (1976) usando albumina bovina sérica como padrão. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3 de 9 determinações experimentais) de pelo menos 2 experimentos diferentes.

III. Preparação da ¹²⁵I-insulina monoiodada

O método utilizado para marcar a insulina foi o de “Iodo Beads”. Nesse procedimento foram utilizados reagentes de iodinação da *Pierce Biotechnology*. Essa técnica utiliza-se da incubação das esferas à solução tampão de ¹²⁵I e à proteína em questão (insulina). O iodo radioativo incorpora-se à proteína por oxidação química. O procedimento de separação da insulina nativa da marcada envolveu uma cromatografia em DEAE-Bio-Gel-A Agarose. A insulina assim obtida possui atividade semelhante à insulina não-iodada (UDRISAR & WANDERLEY, 1992).

IV. Degradação da ^{125}I -insulina

Em todos os experimentos a degradação da ^{125}I -insulina foi determinada por precipitação com 5% de TCA, considerando-se a radioatividade solúvel como material degradado (UDRISAR et al, 2005).

V. Análise por microscopia eletrônica

Fragmentos da próstata ventral de animais pertencentes a cada grupo experimental citados anteriormente foram processados para análise por microscopia eletrônica. Para procedimentos de rotina, os fragmentos das próstatas ventrais dos diferentes grupos experimentais foram fixados “overnight” numa solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M. Após fixação, as amostras foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e então pós-fixadas numa solução contendo 1% de tetroxido, 2mM de Cloreto de Cálcio e 0,8% de ferricianeto de Potássio em 0,1 M de tampão Cacodilato, pH 7,2, desidratado em acetona e embebido em Embed 812. A polimerização foi realizada a 60° C por 3 dias (SARAIVA et al, 2006) Cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre 300-mesh, contrastados com 5% de acetato de uranila e de acetato de chumbo e examinados no microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani. (SARAIVA et al, 2009)

VI. Análise por imunocitoquímica

Para estudo imunocitoquímico, as próstatas ventrais foram fixadas “overnight” numa solução contendo 0,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M. Após fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão, incubadas com 50mM de cloreto de amônia por 40 minutos, desidratadas em etanol e embebidas em resina LR-White. A polimerização foi realizada a 30° C por 5 dias (PEIXOTO et al, 1999)

Ultrasecções das próstatas foram então cortadas utilizando navalha de diamante e coletadas em grades de níquel. Foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente em 0,02 M PBS, pH 7,2, contendo 1% BSA e 0,01% de Tween 20 (PBS-BT). As secções foram incubadas por 1 hora com o primeiro anticorpo anti IDE ou anti-AR na diluição de 1:50. As secções foram então lavadas em PBS-BT e incubadas com o segundo anticorpo, 10 nm anti mouse IgG, marcado com ouro. Como controle do anticorpo, as secções foram incubadas somente na presença de marcador de partículas de ouro. Os cortes foram contrastados com 5% de acetato de uranila e de acetato de chumbo (PEIXOTO et al, 1999).

As análises quantitativas foram realizadas por fotomicrografia com magnitude final de 28.000X. Analisaram-se amostras retiradas de 10 diferentes, randomizadas, porções do núcleo e citoplasma através da comparação do número de partículas marcadas com ouro entre os diferentes grupos experimentais.

VII Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$ de pelo menos 9 determinações experimentais) de pelo menos 2 experimentos diferentes. Os dados foram analisados pela ANOVA (ANOVA, Dunnet Multiple Comparison Test), Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando o teste t de Students. A regressão linear foi calculada entre a IDE nuclear e o peso prostático relativo. O nível de significância foi de $P < 0.05$

RESULTADOS

Os resultados geraram a elaboração do artigo original submetido à revista *International Journal of Experimental Pathology* a seguir relacionado.

**EFFECT OF DEXAMETHASONE AND TESTOSTERONE TREATMENT ON THE
REGULATION OF INSULIN-DEGRADING ENZYME AND CELLULAR CHANGES
IN VENTRAL RAT PROSTATE AFTER CASTRATION**

Juliany S.B. César Vieira*, Karina L.A. Saraiva[§], Maria C. L. Barbosa*, Regina C. C. Porto*,
Juan C. Cresto[†], Christina A. Peixoto[§], Maria I. Wanderley*, Daniel P. Udrisar*¹

*Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Department of Physiology and Pharmacology,
Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

[†]CEDIE–Endocrinology, Htal. de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina

[§]Ultrastructure Laboratory, Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ) and
Center for Strategic Technologies of the Northeast (CETENE), Recife, Brazil

Correspondence:

¹Daniel P. Udrisar

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil. E-mail: danieludrisar@gmail.com

Abstract

Insulin-degrading enzyme (IDE) has been shown to enhance the binding of androgen and glucocorticoid receptors to DNA in the nuclear compartment. Glucocorticoids cause hyperglycemia, peripheral resistance to insulin and compensatory hyperinsulinemia. The aim of the present study was to investigate the effect of dexamethasone (D), testosterone (T) and dexamethasone plus testosterone (D+T) on the regulation of IDE and on the remodeling of rat ventral prostate after castration (C). Castration led to a marked reduction in prostate weight (PW). Body weight (BW) was significantly decreased in the castrated animals treated with dexamethasone and the relative PW was 2.6-fold (± 0.2) higher in the D group, 2.8-fold (± 0.3) higher in the T group and 6.6-fold (± 0.6) higher in the D+T group in comparison to the castrated rats. Ultrastructural alterations in the ventral prostate in response to androgen deprivation were restored after testosterone and dexamethasone plus testosterone treatments and partially restored with dexamethasone alone. The nuclear IDE protein level indicated a 4.3-fold (± 0.4) increase in castrated rats treated with D+T when compared to castration alone. Whole cell IDE protein levels increased approximately 1.5-fold (± 0.1), 1.5-fold (± 0.1) and 2.9-fold (± 0.2) in the D, T and D+T groups, respectively, when compared to castration alone. In conclusion, the present study reports that dexamethasone induced hyperinsulinemic condition plus exogenous testosterone treatment leads to synergistic effects of insulin and testosterone in the prostatic growth and in the amount of IDE in the nucleus and whole epithelial cell.

Keywords: insulin-degrading enzyme, castration, prostate, testosterone, glucocorticoid, insulin resistance, ultrastructure

Introduction

Insulin-degrading enzyme (IDE), a zinc metalloprotease with a molecular weight of ~ 110 kDa, was first discovered by Mirsky as “insulinase” (Mirsky and Broh-Kahn 1949). IDE degrades insulin, amyloid- β (A- β) peptide (Qiu *et al.* 1998), peptides that are critically important in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (DM2) and Alzheimer's disease (AD) respectively, and also insulin-like growth factors I and II transforming growth factor- α and other bioactive peptide substrates (Duckworth *et al.*, 1998, Guo *et al.*, 2010). Studies on insulin processing (Udrisar *et al.* 1984), proteasome modulation (Duckworth *et al.*, 1998), β -amyloid peptide clearance regulation (Kurochkin, 1998) and interaction with androgen receptor and glucocorticoid receptor (Kupfer *et al.* 1993) suggest that IDE is a multi-functional protein with broad and relevant roles in several basic cellular processes. The ability of IDE to interact with and enhance the DNA binding of AR and GR suggest that IDE may be important for transcriptional activity of these receptors (Kupfer *et al.* 1993). In a previous work, we showed that testosterone and estrogen regulates the expression and activity of IDE in male and female reproductive system respectively, where IDE is involved in cellular growth and differentiation (Udrisar *et al.* 2005). However, the precise mechanism of the physiological role of IDE is yet to be established. It is well known that the administration of glucocorticoids leads to an increased production of hepatic glucose, peripheral resistance to insulin action and compensatory hyperinsulinaemia as well as an increase in pancreatic islet mass (Rafacho *et al.* 2008). Many risk factors for benign prostatic hyperplasia (BPH) such as insulin, insulin like growth factors (IGFs), and dyslipidemia might acts through androgen-independent mechanism and it appears that prostate cancer may be an additional aspect of the insulin-resistance syndrome (Barnard *et al.* 2002). Vikram *et al.* (2010) have recently reported a correlation between hyperinsulinemia and prostate growth linking hyperinsulinemia with BPH in insulin resistant rats. After castration, the rat ventral prostate undergoes regression

due to the induction of apoptosis in the epithelial cells of the gland. However, treatment with testosterone stimulates the re-growth of the prostate gland (Cunha *et al.* 1987). The aim of the present study was to investigate the effect of dexamethasone, testosterone and dexamethasone plus testosterone on the regulation of IDE and the remodeling of rat ventral prostate following castration. The results reveal that the level of IDE increased in the nucleus as well as the whole cell during prostatic re-growth promoted by dexamethasone plus testosterone after rats castration. Therefore, the increased expression of insulin degrading enzyme could be important to tissue remodelling after dexamethasone and testosterone treatment in castrated rats.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats weighing 250 to 300 g, bred in our animal facilities, were housed under a controlled conditions (temperature: 25° to 29° C; light from 6 am to 6 pm) with free access to standard laboratory chow and tap water. Castration was performed via a scrotal incision under CO₂ followed by ether anesthesia. After one day, two groups of animals began to drink water containing dexamethasone (Decadron, Lab. Merck Sharp & Dohme, Brazil) at doses calculated based on the water intake of each rat to represent approximately 1 mg/Kg dexamethasone (D) per rat per day (Saad *et al.* 1993). Oral D administration was continued until the rats were sacrificed. Three days after castration, two groups [Castrated + Testosterone (T) and Castrated + D + T] received 300 µg/100 g body weight of testosterone propionate (Sigma Chemical Co., USA) in corn oil injected subcutaneously daily for three days (Udrisar *et al.* 2005). The other group (castrated alone) received a vehicle instead of testosterone propionate. This yielded four experimental groups: castrated (C), castrated plus dexamethasone (D), castrated plus testosterone (T) and castrated plus dexamethasone plus

testosterone (D + T). Rats were sacrificed 24 hrs after the final injection and six days after castration by exposure to CO₂ followed by decapitation. The ventral prostate was immediately removed, weighed and placed in the corresponding buffers for ultrastructural and immunocytochemical studies or stored in liquid nitrogen for the insulin degradation study. The relative weight is given as percentage of ventral prostate weight divided by whole body weight; the value obtained for intact rat was taken as 100% (de Carvalho *et al.* 1997). Blood from fasted (12-14 hr) rats was obtained from the tail tip and whole-blood glucose concentrations were measured using a glucometer (Accu-Chek Advantage, Roche, Brazil). The local ethics committee for animal experimentation at the institution approved all treatments.

Preparation of Cytosolic Fractions from Rat Ventral Prostate and Degradation Assay

The preparation of the cytosolic fraction and ¹²⁵I-insulin degradation were performed in separate groups, as described in detail elsewhere (Udrisar *et al.* 2005). ¹²⁵I-insulin control (precipitation with TCA without the cytosolic fraction) contained more than 92% intact insulin; hence, the experimental results were corrected for this value. Values are given as percentage of ¹²⁵I-insulin degradation per 60 µg/ml of cytosolic protein. Protein concentrations were determined based on Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

Electron transmission microscopy

For routine procedures, fragments of the ventral prostate from the rats of the different groups (intact, C, D, T and D+T) were fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1M cacodylate buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer, post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone, and embedded in Embed 812. Polymerization was carried out at 60° C

for three days (Saraiva *et al.* 2006, 2009). Ultrathin sections were collected on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate and examined with a FEI Morgani 268D transmission electron microscope. For the immunocytochemical study, the samples from the castrated, dexamethasone, testosterone and dexamethasone plus testosterone groups were fixed overnight in a solution containing 0.1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. After fixation, the samples were washed three times in the same buffer, incubated with 50 mM ammonium chloride for 40 min, dehydrated in ethanol and embedded in LR-White resin. Polymerization was carried out at 30° C for five days. This procedure was carried out as described by Peixoto *et al.* (1999).

Immunocytochemistry

Ultrathin sections of ventral prostate from the castrated, dexamethasone, testosterone and dexamethasone plus testosterone groups were cut with a diamond knife, collected on nickel grids and incubated for 30 min at room temperature in 0.02 M PBS, pH 7.2, containing 1% BSA and 0.01% Tween 20 (PBS-BT). The sections were then incubated for one hour with primary antibodies against IDE (mouse monoclonal antibody, MMS-282R, Covance Research Products, USA) or against AR (mouse monoclonal antibody AR441:SC-7305, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) at a dilution of 1:50 in PBS-BT. The sections were then washed in PBS-BT and incubated with a secondary antibody – 10 nm colloidal gold-labeled goat anti-mouse IgG. As the antibody control, sections were incubated only in the presence of the gold-labeled marker. Following the immunostaining procedures, the sections were counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate (Peixoto *et al.* 1999). Quantitative analysis was performed on photomicrographs at a final magnification of 28.000X taken from 10 different, randomly chosen, portions of nucleus and cytoplasm for the comparison of the numbers of gold-labeled particles among the different groups using the Student's *t* test. Since the samples were processed in an identical manner, no correction of tissue shrinkage was performed.

Statistics

Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n = 3$ to 9 experimental determinations) of at least two different experiments. The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA, Dunnett Multiple Comparison Test). Statistical comparisons between groups were performed using the Student's *t*-test. Linear regression was calculated between the nuclear IDE and the relative prostate weight. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Body weight (BW) was significantly decreased (Fig 1A) and glucose increased (Fig 1B) in animals treated with dexamethasone. Castration led to a marked reduction in absolute and relative prostate weight (Fig 2A and B). Five days after dexamethasone treatment, three days after the administration of testosterone or both dexamethasone plus testosterone to castrated rats, the regression of absolute and relative prostate weight (PW) was significantly inhibited in castrated plus D group and significantly restored in castrated plus T and castrated plus D plus T groups (Fig 2A and B). The relative PW was 2.6-fold (± 0.2) higher in the D group, 2.8-fold (± 0.3) higher in the T group and 6.6-fold (± 0.6) higher in the D+T group in comparison to the castrated rats (Fig 2B). In intact rats, the ultrastructure of the acinar epithelium of the ventral prostate was characterized by columnar cells with a basal nucleus at the periphery, rough endoplasmic reticulum (RER) intensively arranged in the perinuclear surface, Golgi complex scattered throughout the cytoplasm and mitochondria well distributed in the cell; secretory vacuoles were mainly in the apical region and homogenous secretion was observed in the lumen of prostate acini (Figure 3: A and B). In castrated rats, the acinar epithelium of ventral prostate was characterized by marked atrophy of the organelles; the RER was scarce and disintegrated; residual bodies were encountered in the cytoplasm; and a heterogeneous electron-dense secretion was observed in the lumen of prostate acini (Figure 3:

C and D). In castrated rats treated with dexamethasone, the epithelial cells exhibited dilated organelles, including RER, Golgi and mitochondria, and the luminal space exhibited homogenous secretion (Figure 3: E and F). The castrated rats treated with testosterone (Figure 3: G and H) and dexamethasone plus testosterone (Figure 3: I and J) had similar characteristics to those of the control group (intact rats); abundant RER, Golgi complexes, mitochondria scattered throughout the cytoplasm and homogenous secretion in the lumen of prostate acini were observed. Ultrastructural changes in the ventral prostate occurred in response to androgen deprivation. The alterations were restored following treatment with testosterone and dexamethasone plus testosterone and partially restored with dexamethasone alone. To study the effect of dexamethasone, testosterone and dexamethasone plus testosterone on the activity and amount of the IDE in rat ventral prostate after castration, the degradation of ^{125}I -insulin in cytosolic fraction was measured (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of prostate homogenate at 100,000 g for 60 mins for supernatant), along with the immunodetection of IDE by immunocytochemistry. Figure 4 illustrates the effect of castration and castration following by administration of dexamethasone, testosterone or both treatments on cytosolic IDE activity. The insulin degradation analysis indicated a 1.4-fold (± 0.1), 2.1-fold (± 0.1) and 1.7-fold (± 0.1) increase in IDE activity six days following castration in the D, T and D + T groups, respectively, in comparison to the castrated group. Mouse monoclonal antibody against IDE was used to detect the presence of IDE in the nucleus and whole epithelial cell in all experimental groups (Fig. 5). The immunocytochemistry analysis revealed the presence of gold-labeled particles corresponding to the IDE protein in all groups and in both the nucleus (A) and whole cells (B) (Fig. 6). The estimation of nuclear IDE protein level after immunocytochemistry indicated a 4.3-fold (± 0.4) increase in IDE protein levels six days after castration in the rats treated with dexamethasone plus testosterone in comparison to castrated rats. Whole cell IDE protein levels increased approximately 1.5-fold (± 0.1); 1.5-fold (± 0.1)

and 2.9-fold (± 0.2) in the D, T and D + T groups, respectively, in comparison to the castrated rats. Figure 7 A and B displays the results of the immunocytochemistry analysis when the antibody against AR was used. Nuclear AR (A) protein level indicated a 4.6-fold (± 0.4), 10.5-fold (± 2.2) and 3.6-fold (± 0.6) increase in the D, T and D + T groups, respectively, in comparison to the castrated rats. Following the same pattern, the whole AR (B) protein level indicated a 3.1-fold (± 0.3), 5.1-fold (± 0.7) and 3.0-fold (± 0.3) increase in the D, T and D + T groups, respectively, in comparison to the castrated rats. Figure 8 shows that nuclear IDE plotted against the relative prostate weight in all four groups (data derived from Figs. 6A and 2B) results in a linear correlation ($r^2 = 0.944$), suggesting that the altered relative prostate weight observed in all four groups is related to the nuclear IDE level.

Discussion

Following castration, the rat ventral prostate undergoes regression due to the induction of apoptosis in the epithelial cells of the gland. However, treatment with testosterone stimulates the re-growth of the prostate gland (Cunha *et al.* 1987). It is established that administration of dexamethasone leads to an increased production of hepatic glucose, peripheral resistance to insulin and compensatory hyperinsulinaemia (Saad *et al.* 1993). Experimental hypoinsulinemia and castration causes decrease in the weight of prostate and diet-induced hyperinsulinemia causes increase in the cellular proliferation and the enlargement of the prostate gland (Vikram *et al.* 2010). It was showed that insulin delays castration associated increased apoptosis in the prostate of diabetic rats and that the survival and antiapoptotic effect of insulin on ventral prostate epithelial cells was in both the presence and absence of androgen stimulation (Damas-Souza *et al.* 2010). Thus, chronic change in the systemic insulin level affect the growth of the prostate gland. It has been shown that IDE is regulated during development and is differentially expressed in various rat tissues, supporting the possibility

that IDE plays a physiological role in the regulation of cell growth and development (Kuo *et al.* 1993; Udrisar *et al.* 2005). In the present study, the effect of dexamethasone-induced hyperinsulinemia, testosterone and dexamethasone plus testosterone on the activity and quantity of IDE in ventral prostate after castration was investigated, along with the remodeling of rat ventral prostate. The prostate was used as a suitable model of castration-induced apoptosis and testosterone-induced cell proliferation (re-growth of the prostate gland after castration) with the addition of dexamethasone-induced hyperinsulinemia in both experimental conditions. Castration, as expected, produced a marked reduction in absolute prostate weight (PW). The regression of PW was significantly inhibited in castrated plus D group and significantly restored in castrated plus T and castrated plus D plus T groups. These results are magnified when expressed as relative PW because body weight was significantly decreased in animals treated with dexamethasone. The reduced regression in castrated plus D group and the re-growth of prostate gland after dexamethasone plus testosterone treatment in castrated rats can be attributed to high dose of dexamethasone-induced hyperinsulinemia. Yono *et al.* (2008) addressed that the higher prostatic weight in genetically diabetic rats as compared to STZ-treated hypoinsulinemic rats was due to difference in the level of insulin. In addition, the survival and antiapoptotic effect of insulin on ventral prostate epithelial cells was recently reported by Damas-Souza *et al.* (2010). In contrast, it was showed that dexamethasone treatment in intact rats resulted in atrophy and decreased proliferative activity of prostatic epithelial cells (Ribeiro *et al.* 2008). Under the condition of castration plus D, plus T and plus D+T, there was an increase in IDE activity in the cytosolic fraction of the prostate homogenate as well as the amount of IDE in the whole cell when compared to castration alone. The androgen receptor (AR) level also increased in the proliferative state in the nucleus and whole cell, but to a lower degree when in the presence of dexamethasone. The increase in the amount of IDE in the nucleus and whole cell in the D + T group suggests an additive

effect of hyperinsulinic state induced by dexamethasone and testosterone treatment. The same additive effect between insulin-testosterone was also found in the prostate weight and in the relative prostate weight. Thus, the present study demonstrates a positive correlation between nuclear IDE and the relative PW. Recently, it was reported the synergistic action of insulin and testosterone in the prostatic growth (Fan *et al.* 2007). The importance of hyperinsulinemia and testosterone in the activity and amount of IDE was also previously reported by us (Udrisar *et al.* 1984, 2005). Further, literature also supports molecular basis for the interaction between insulin and androgen signaling (Fan *et al.* 2007; Srinivasan and Nawaz, 2010). Ultrastructural changes occurred in the acinar epithelium of ventral prostate in response to androgen deprivation. These alterations were restored following treatment with testosterone and dexamethasone plus testosterone and were partially restored with dexamethasone alone. The development, growth and function of the prostate are known to be androgen dependent (Cunha *et al.* 1987) and AR levels are regulated by androgens (autoregulation). While androgen stabilizes AR levels, glucocorticoids block this effect and predominate, as demonstrated by Burnstein *et al.* (1995) and the present study. Androgen action is mainly indirect, occurring through the prostatic production of certain growth factors (Steiner 1993, Lopaczynski *et al.* 2001, Cunha 1996). These locally produced growth factors are considered autocrine and/or paracrine mediators of the stromal-epithelial interaction (Culig 1996). A number of studies have indicated that insulin-like growth factors (IGFs), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor, TGF- α , and basic fibroblastic growth factor are mitogenic in prostate tumor cells and normal prostate cells (Steiner 1993, Culig *et al.* 1996, Cohen *et al.* 1991, Byrne *et al.* 1996). A link between hyperinsulinemia and benign prostate hyperplasia has recently been demonstrated in insulin-resistant rats (Vikram *et al.* 2010). Some of these growth factors are IDE substrates, such as insulin, IGFs and TGF- α , or bind to IDE, such as EGF (Gehm 1991, Misbin 1989). Moreover, there is evidence that IDE and the

receptors for insulin and IGFs share a common anatomic distribution (Bondy *et al.* 1994). As IDE is a protease that degrades insulin and growth factors, it is feasible to presume that the increase in growth factors that occurs in the prostate in situations of cell proliferation may lead to an increase in the growth factor receptors and, consequently, to an increase in IDE in order to terminate the growth signal. On the other hand, a reduction in the expression and/or bioavailability of these growth factors may lead to apoptosis. Castration is known to significantly reduce the local expression and concentration or bioavailability of certain prostate-derived growth factors that affect prostate cell proliferation (Nishi *et al.* 1996, Nickerson *et al.* 1998). This reduction in the expression and/or bioavailability of growth factors leading to apoptosis must consequently lead to a reduction in IDE. A previous study demonstrated a reduction in both the level and activity of IDE in the prostate gland of castrated animals and revealed IDE in the nuclear fraction of the ventral prostate with no degradation activity, thereby suggesting that proteolytic activity is not the sole physiological function of this enzyme (Udrisar *et al.* 2005). Furthermore, the presence of IDE in the nucleus and its lack of degradation activity may suggest an interaction between IDE and AR, as has been reported previously (Kupfer *et al.* 1993, Kupfer *et al.* 1994, Udrisar *et al.* 2005). The inhibition of IDE activity has been shown to be necessary for the accumulation of insulin or insulin-cytosolic protein complexes in nuclei (Cresto *et al.* 1984, Harada *et al.* 1999). It has been demonstrated that IDE activity is inhibited by a phosphorylation reaction (Udrisar, Wanderley 1992) and that ATP induces conformational changes in IDE and inhibits insulin degradation *in vitro* (Camberos *et al.* 2001). Furthermore, recent studies (Pivovarova *et al.* 2009, Fawcett, Duckworth 2009) suggest that the increase in intracellular ATP under conditions of high glucose may result in the inhibition of IDE activity. It was recently demonstrated in rats fed a high-fat diet that hyperinsulinemia *per se* can result in enhanced mitogenic signaling in the prostate gland and consequent cell proliferation and prostate

hyperplasia (Vikram *et al.* 2010). The regulatory protein function of IDE has also been observed in different subcellular fractions, with different intracellular effectors related to intracellular insulin action (Kupfer *et al.* 1994, Duckworth *et al.* 1997, Harada *et al.* 1999). It has also been demonstrated that estradiol upregulates IDE in the rat uterus (Udrisar *et al.* 2005). Insulin-degrading enzyme degrades insulin and amyloid β -protein (A β) and alterations in the metabolism of these substrates are critically important in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease, respectively (Fawcett, Duckworth 2009, Perez *et al.* 2000, Farris *et al.* 2003). It has been suggested that testosterone and 17 β -estradiol reduce the neuronal secretion of β -amyloid peptides in Alzheimer's disease (Gouras *et al.* 2000, Xu *et al.* 1998). It has also been demonstrated that ovariectomy and 17 β -estradiol modulate the levels of A β peptides in the brain (Petanceska *et al.* 2000). A decrease in prostate weight has been described as a consequence of hypoinsulinemia induced by STZ or alloxan and a greater prostate weight has been reported in genetically diabetic rats (Yono *et al.* 2008). These findings, together with those of the present study, demonstrate the important role of insulin in the development and differentiation of the prostate gland. Thus, physiological conditions or compounds that upregulate or disinhibit IDE would be expected to lower hyperinsulinism or A β levels *in vivo*. The data presented here suggest that IDE may participate in prostatic growth and that insulin plus testosterone may be an important factor for the expression and regulation of IDE in this tissue. The possibility of a protein-protein interaction (IDE-insulin, IDE-AR, IDE-GR) for IDE regulation exists (Kupfer S *et al.*, 1993, 1994; Udrisar *et al.*, 2005), and may be important for various biological phenomena, such as insulin resistance, Alzheimer's disease and benign prostate hyperplasia.

References

- Barnard R.J., Aronson W.J., Tymchuk C.N., Ngo T.H. (2002) Prostate cancer: another aspect of the insulin-resistance syndrome? *Obes Rev.***3**(4),303-8.
- Bondy C.A., Zhou J., Chin E., Reinhardt R.R., Roth R.A. (1994) Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression: comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. *J Clin Invest* **93**, 966–973.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Burghen G.A., Kitabchi A.E., Brush J.S. (1972) Characterization of a rat liver protease with specificity for insulin. *Endocrinology* **91**, 633–642.
- Burnstein K.L., Maiorino C.A., Dai J.L., Cameron D.J. (1995) Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Mol Cell Endocrinol.* **29**;115(2),177-86.
- Byrne R.L., Leung H., Neal D.E. (1996) Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. *Br J Urol* **77**, 627–633.
- Camberos M.C., Perez A.A., Udrisar D.P., Wanderley M.I., Cresto J.C. (2001) ATP inhibits insulin-degrading enzyme activity. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 334–341.
- Cohen P., Peehl D.M., Lamson G., Rosenfeld R.G. (1991) Insulin-like growth factors IGFs, IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 401–407.
- Cresto J.C., Udrisar D.P., Camberos M.C., Justel E., Zúccolo A., Basabe J.C. (1984) Liver cells binding with high insulin doses at 37 C. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.***34**(4), 355-66.
- Cross M, Dexter TM. (1991) Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* **64**, 271–280.
- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M.V., Radmayr C., Hittmair A., Zhang J., Thurnher M., Bartsch G., Klocke H. (1996) Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* **28**, 392–405.
- Cunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S., Mee S., Bigsby R.M., Higgins S.J., Sugimura Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* **8**, 338–362.
- Cunha G.R. (1996) Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate* **6**, 22–25.
- Damas-Souza D.M., Oliveira C.A., de Carvalho H.F. (2010) Insulin affects tissue organization and the kinetics of epithelial cell death in the rat ventral prostate after castration. *J. Androl.* **31**,631-640.

de Carvalho H.F., Vilamaior P.S., Taboga S.R.(1997) Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *The Prostate* **32**, 27-34.

Duckworth W.C. (1988) Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev.* **9**(3), 319-45.

Duckworth W.C., Bennett R.G., Hamel F.G. (1997) The significance of intracellular insulin to insulin action. *J Invest Med* **45**, 20–27.

Duckworth W.C., Bennett R.G., Hamel F.G. (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* **19**, 608–624.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H.(2007) Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor .*J Biol Chem* **282**,7329-38.

Farris W., Mansourian S., Chang Y., Lindsley L., Eckman E.A., Frosch M.P., Eckman C.B., Tanzi R.E., Selkoe D.J., Guenette S. (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**7, 4162–4167.

Fawcett J., Duckworth W.C. (2009) Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia* **52**(8), 1457-60.

Garcia J.V., Gehm B.D., Rosner M.R. (1989) An evolutionarily conserved enzyme degrades transforming growth factor- α as well as insulin. *J Cell Biol* **109**, 1301–1307.

Gehm B.D., Rosner M.R. (1991) Regulation of insulin, epidermal growth factor, and transforming growth factor- α levels by growth factor degrading enzymes. *Endocrinology* **128**, 1603–1609.

Gouras G.K., Xu H., Gross R.S., Greenfield J.P., Hai B., Wang R., Greengard P. (2000) Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's β -amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1202–1205.

Guo Q., Manolopoulou M., Bian Y., Schilling A.B., Tang W.J. (2010) Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF- α , and amylin by human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol.* **15**;395(2):430-43.

Harada S., Smith R.M, Jarett L. (1999) Mechanisms of nuclear translocation of insulin. *Cell Biochem Biophys* **313**, 307–219.

- Kuo W.L., Montag A.G., Rosner M.R. (1993) Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rats tissues. *Endocrinology* **132**, 604–611.
- Kupfer S., Marschke K., Wilson E.M., French F.S. (1993) Receptor accessory factor enhances specific DNA binding of androgen and glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* **268**, 17519–17527.
- Kupfer S., Wilson E.M., French F.S. (1994) Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* **269**, 20622–20628.
- Lopaczynski W., Hruszkewycz A.M., Lieberman R. (2001) Preprostatectomy: a clinical model to study stromal-epithelial interactions. *Urology* **57**(Suppl 4A), 194–199.
- Mirsky I.A., Broh-Kahn R.H. (1949) The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem.* **20**(1), 1-9.
- Misbin R.I., Almira E.C., Duckworth W.C., Mehl T.D. (1983) Inhibition of insulin degradation by insulin-like growth factors. *Endocrinology* **113**, 1525–1527.
- Misbin R.I., Almira E.C. (1989) Degradation of insulin and insulin-like growth factors by enzyme purified from human erythrocytes. Comparison of degradation products observed with A14- and B26-[¹²⁵I]moniodoinsulin. *Diabetes* **38**, 152–157.
- Nickerson T., Pollak M., Huynh H. (1998) Castration-induced apoptosis in the rat ventral prostate is associated with increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding proteins 2, 3, 4 and 5. *Endocrinology* **139**, 807–810.
- Nishi N., Oya H., Matsumoto K., Nakamura T., Miyanka H., Wada F. (1996) Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and androgen-induced regrowth of rat prostate. *Prostate* **28**, 139–152.
- Peixoto C.A., Norões J., Rocha A., Dreyer G. (1999) Immunocytochemical localization and distribution of human albumin in *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123**, 173-177.
- Perez A., Morelli L., Cresto J.C., Castano E.M. (2000) Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1–40, 1–42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res* **252**, 247–255.
- Petanceska S.S., Nagy V., Frail D., Gandy S. (2000) Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Neurology* **5412**, 2212–2217.
- Pivovarova O., Gögebakan O., Pfeiffer A.F., Rudovich N. (2009) Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* **52**(8), 1656-64.

Qiu W.Q., Walsh D.M., Ye Z., Vekrellis K., Zhang J., Podlisny M.B., Rosner M.R., Safavi A., Hersh L.B., Selkoe D.J. (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273:32730–32738.

Rafacho A., Ribeiro D.L., Boschero A.C., Taboga S.R., Bosqueiro J.R. (2008) Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. *Int J Exp Pathol.* **89**(4), 264-75.

Ribeiro D.L., Rafacho A., Bosqueiro J.R., Taboga S.R., Góes R.M. (2008) Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell Tissue Res.* **332**, 499-508.

Saad M.J., Folli F., Kahn J.A., Kahn C.R. (1993) Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest.* 92(4), 2065-72.

Saraiva K.L.A., Silva A.K.S.E., Wanderley M.I., Alemida de Araújo A., Souza J.R.B., Peixoto C.A. (2009) Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *Int J. Exp Path.* **90**, 454-462.

Saraiva K.L.A., Silva Junior V.A., Dias E.S.F., Peixoto C.A. (2006) Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod. Toxicol.* **22**, 754-759.

Srinivasan S, Nawaz Z. (2010) E3 ubiquitin protein ligase, E6-associated protein (E6-AP) regulates PI3K-Akt signaling and prostate cell growth. *Biochim Biophys Acta*. PMID: 20826237.

Steiner M.S. (1993) Role of peptide growth factors in the prostate: a review. *Urology* **42**, 99–110.

Udrisar D.P., Camberos M.C., Basabe J.C., Cresto J.C. (1984) Insulin processing. Its correlation with glucose conversion to CO₂. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.* **34**(4), 427-40.

Udrisar D.P., Wanderley M.I., Porto R.C., Cardoso C.L., Barbosa M.C., Camberos M.C., Cresto J.C. (2005) Androgen- and estrogen-dependent regulation of insulin-degrading enzyme in subcellular fractions of rat prostate and uterus. *Exp Biol Med (Maywood)*. **230**(7), 479-86.

Udrisar D.P., Wanderley M.I. (1992) Fluoride and phosphatidylserine-induced inhibition of cytosolic insulin-degrading activity. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **42**, 183–193.

Vikram A., Jena G.B., Ramarao P.(2010) Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. *Prostate*. **1**;70(1),79-89.

Xu H., Gouras G.K., Greenfield J.P., Vincent B., Naslund J., Mazzei L., Fried G., Jovanovic J.N., Seeger M., Relkin N.R., Liao .F, Checler F., Buxbaum J.D., Chait B.T., Thinakaran G., Sisodia S.S., Wang R., Greengard P., Gandy S. (1998) Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nat Med* **44**, 447–451.

Yono M., Mane S.M., Lin A., Weiss R.M., Latifpour J. (2008) Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sci*. **1**;83(5-6), 192-7.

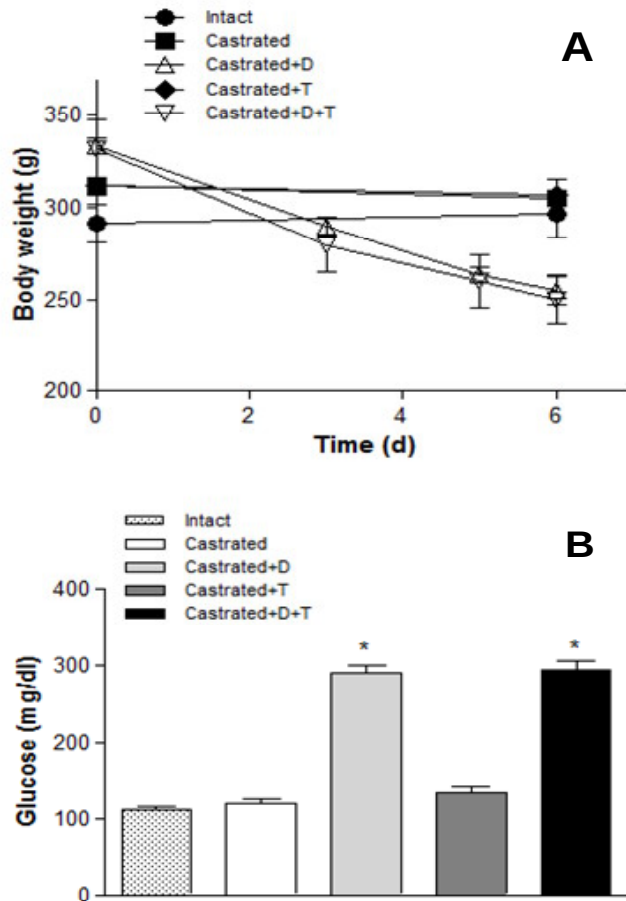


Figure 1. Body weight changes (panel A) and basal glycemia (panel B) in intact rats, castrated (C) rats, castrated rats treated with dexamethasone (D), castrated rats treated with testosterone (T) and castrated rats treated with dexamethasone plus testosterone (D + T); data are expressed as mean $\pm$ SEM; $n = 3$; * $P < 0.001$ vs. intact (one-way analysis of variance ANOVA, Dunnett Multiple Comparison Test); for conditions, see Materials and Methods.

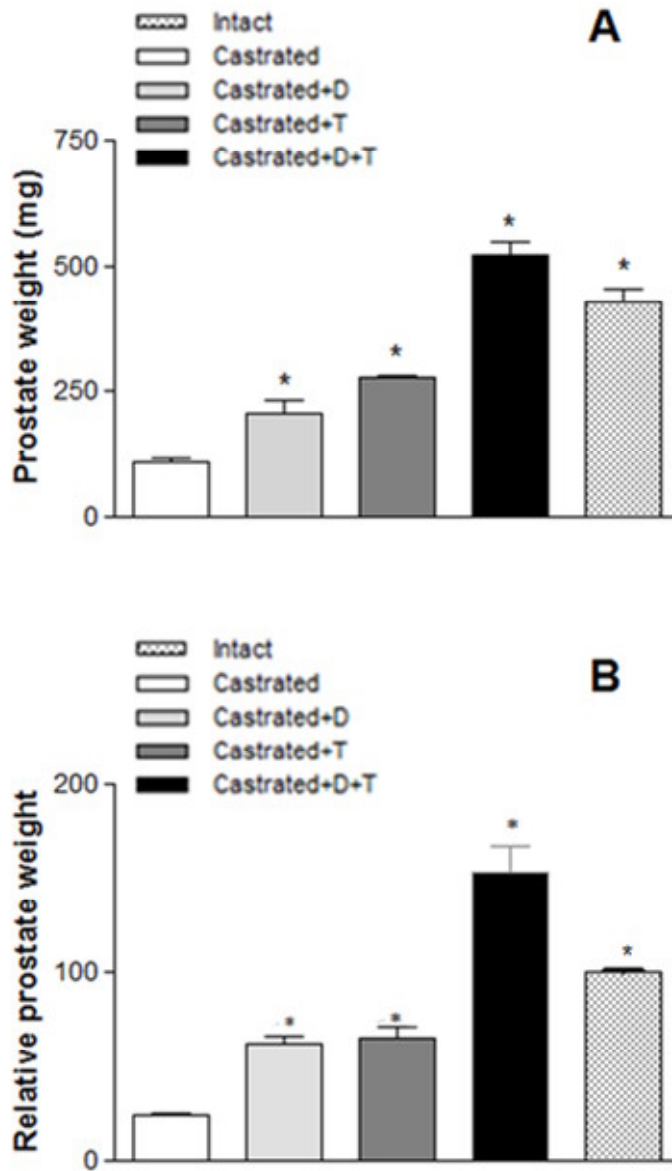


Figure 2. Absolute and relative prostate weight (A and B) in castrated rats after five days, castrated rats treated with dexamethasone (1mg/Kg per day for 5 days), castrated rats after 3 days plus 3 days of testosterone administration and castrated rats treated with dexamethasone plus testosterone; data were obtained 6 days after castration; columns represent mean $\pm$ SEM of four to eight rats; *P < 0.01 vs castrated group, (one-way analysis of variance ANOVA, Dunnett Multiple Comparison Test); for conditions, see Materials and Methods.

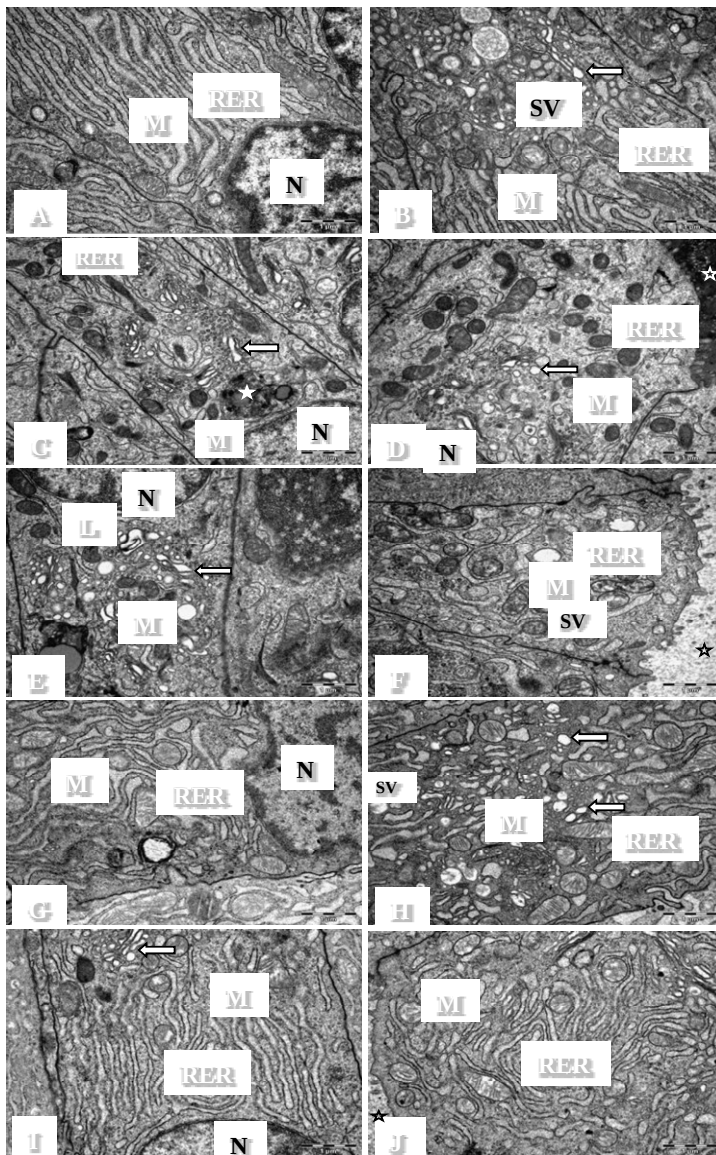


Figure 3. Ultrastructural analysis of epithelium of ventral lobe prostate; (A and B) control columnar cells with basal nucleus (N), rough endoplasmic reticulum, mitochondria, well-developed Golgi complex (arrow) and secretory vacuoles; (C and D) cells from castrated rats with atrophied rough endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi complex (arrows) and residual body (full star); luminal surface with heterogeneous electron-dense secretion (empty star); (E and F) cells from castrated rats treated with dexamethasone presenting dilated rough endoplasmic reticulum, mitochondria and Golgi (arrow); secretory vacuoles in apical region

and luminal space with homogenous secretion (empty star); (G and H) cells from castrated rats treated with testosterone showing abundant rough endoplasmic reticulum, Golgi complex (arrows), mitochondria and presence of secretory vacuoles; (I and J) cells from castrated rats treated with dexamethasone plus testosterone presenting well-distributed rough endoplasmic reticulum, Golgi complex (arrow) and mitochondria; RER = rough endoplasmic reticulum; M = mitochondria; SV = secretory vacuoles; L = lipid droplet; Bar = 1 μm .

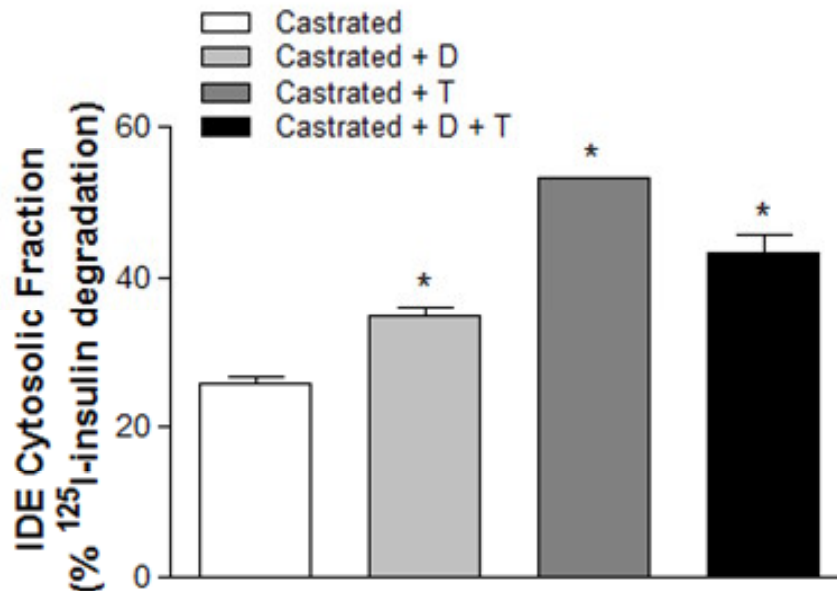


Figure 4. Cytosolic ^{125}I -insulin degradation in ventral prostates six days after castration in castrated rats, castrated rats treated with dexamethasone (1 mg/Kg per day for 6 days), castrated rats after 3 days plus 3 days of testosterone administration and castrated rats treated with dexamethasone plus testosterone; Cytosolic proteins (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of prostate homogenate at 100,000 g for 60 mins for supernatant) were incubated with ^{125}I -insulin (20,000 cpm) in 500 μl of 20 mM Tris-HCl, with 10 mM MgCl_2 , pH 7.4, for 15 mins at 32° C. The reaction was terminated by the addition of 0.4 vol TCA (50% v/v) and 0.6 vol bovine albumin (1% w/v) at 4° C. After centrifugation, the pellet and supernatant were separated; the pellet was washed and radioactivity was measured (radioactivity total = cpm pellet + cpm supernatant). The radioactivity in the supernatant was considered degraded ^{125}I -insulin. The degradation was linear in relation to incubation time and cytosolic protein concentration. Values are expressed as percentage of degraded ^{125}I -insulin (see Materials and Methods) per 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of cytosolic protein. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of three determinations; * $P < 0.001$ vs. castrated group, unpaired Student's t -test.

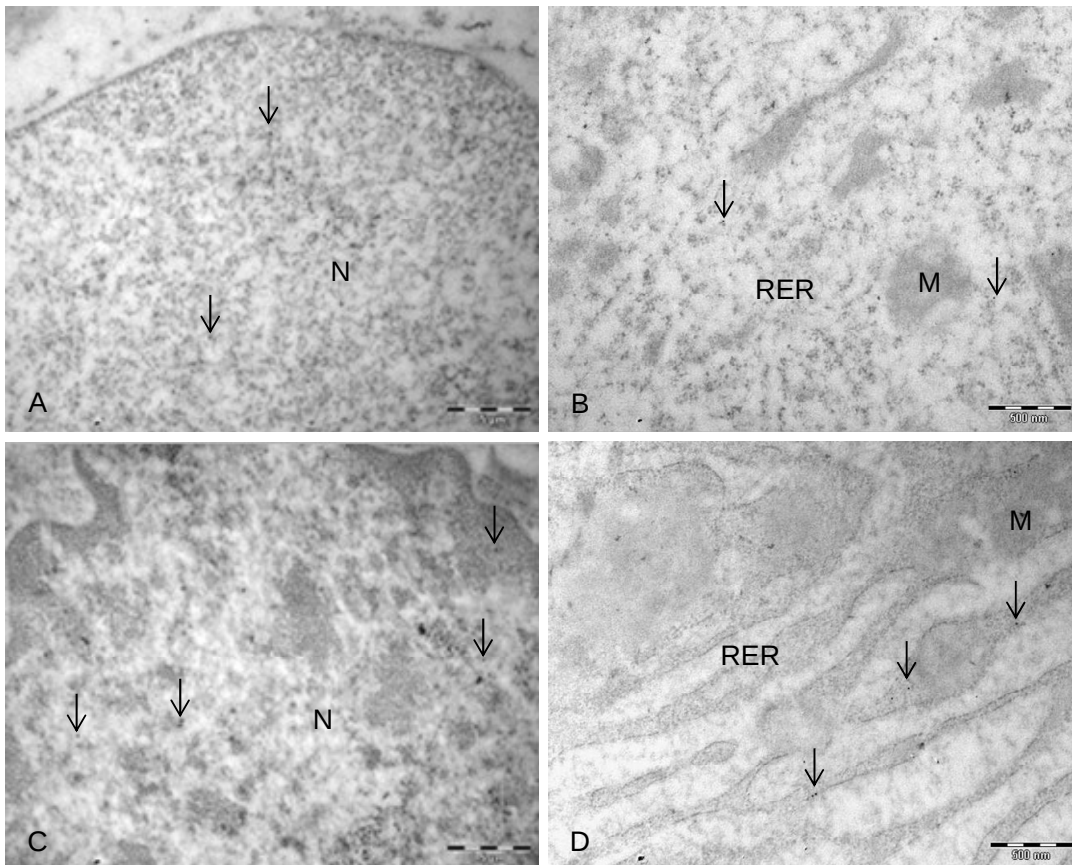


Figure 5. IDE immunocytochemistry. A and B - Few labeling was observed in castrated samples for IDE in nucleus (A) and cytoplasm portion (B) (arrows). C and D - An increased labeling to IDE in nucleus (B) and cytoplasm (D) was detected in cells from castrated rats treated with dexamethasone plus testosterone (arrows). M, mitochondria; N, nucleus; RER, rough endoplasmic reticulum. Bars, 500nm.

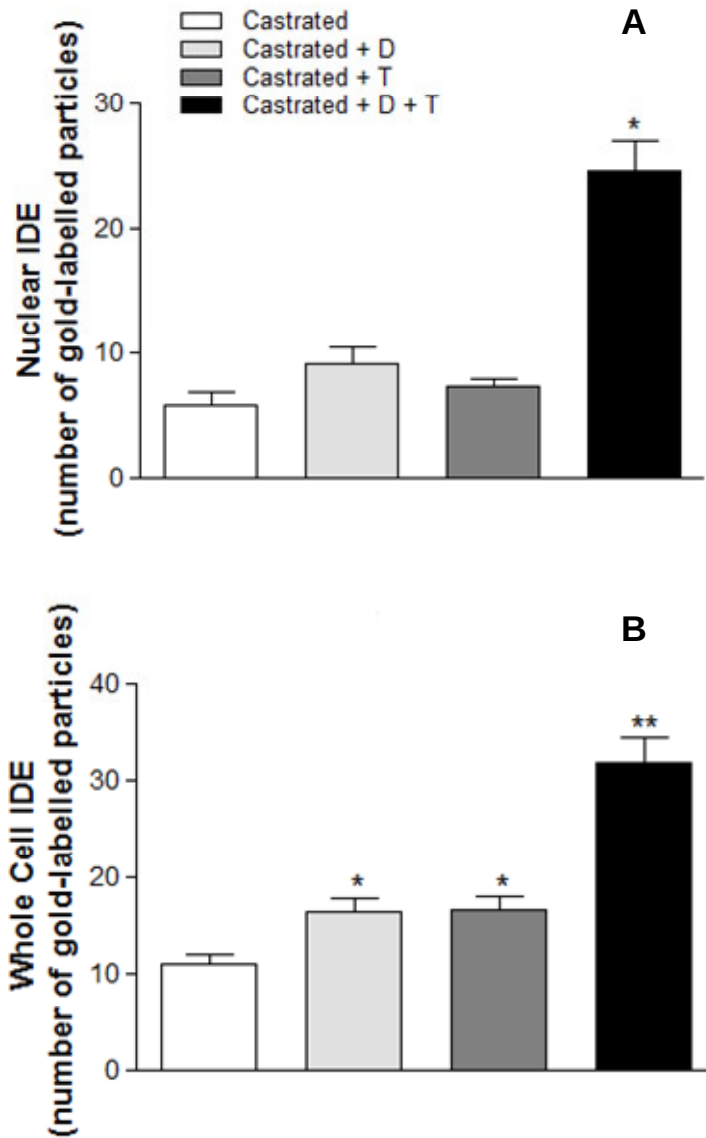


Figure 6. Quantitative analysis of gold-labeled particle distribution (anti-IDE as first antibody) in nucleus (panel A) and whole cell (panel B) of the epithelium of the ventral prostate lobe in C, D, T and D + T groups; * $p < 0.0001$ vs. castrated group, unpaired Student's *t*-test; for conditions, see Materials and Methods.

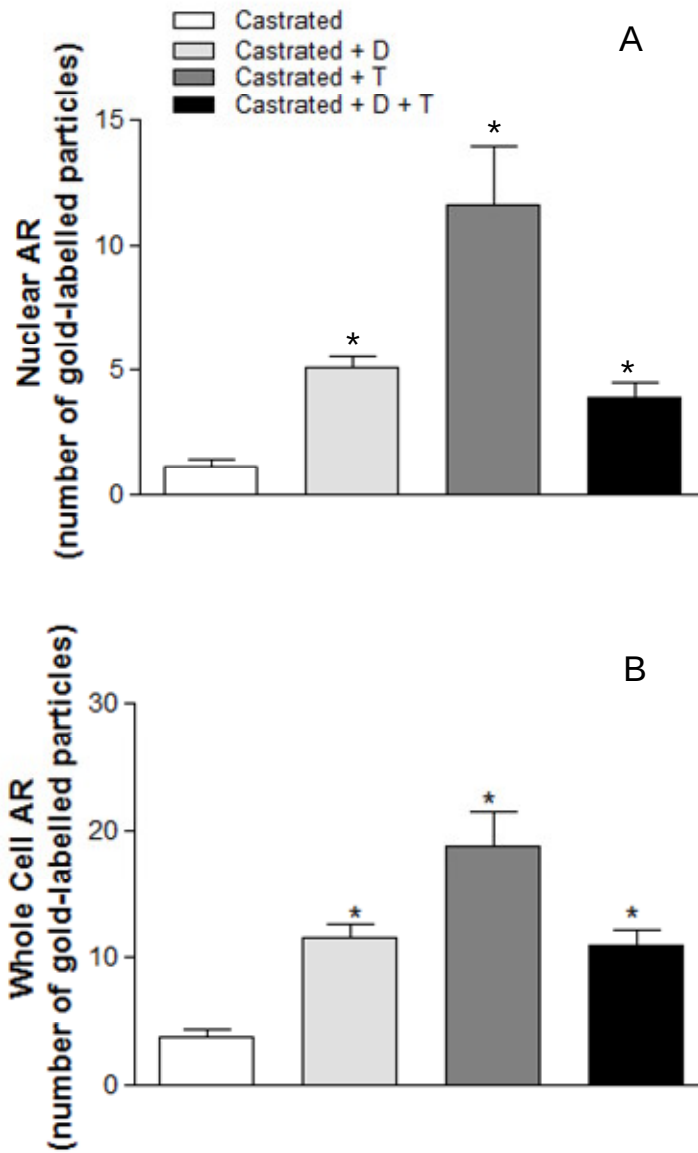


Figure 7. Quantitative analysis of gold-labeled particle distribution (anti-AR as first antibody) in nucleus (panel A) and whole cell (panel B) of the epithelium of the ventral prostate lobe in C, D, T and D + T groups; * $p < 0.0001$, unpaired Student's *t*-test ; for conditions, see Materials and Methods.

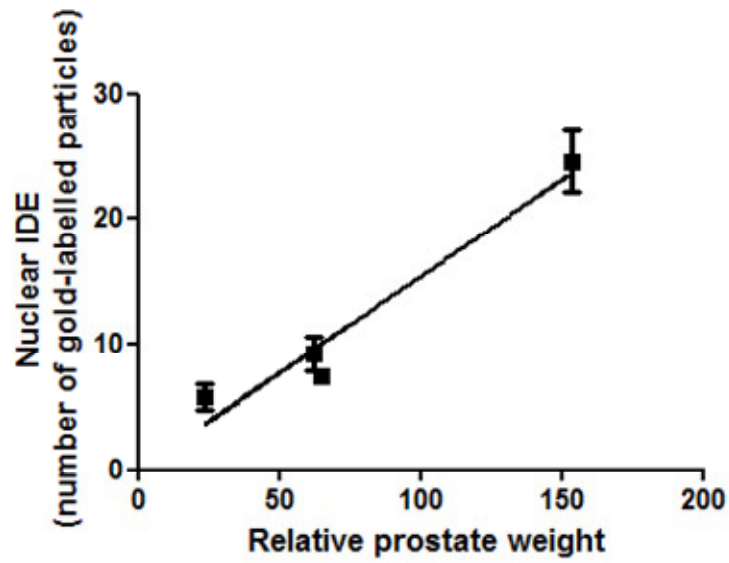


Figure 8. Correlation between nuclear IDE (gold-labeled particle; panel A of Figure 6) and relative ventral prostate weight (panel B of Figure 2); Y-intercept when $x = 0.0$: 0.116 ± 2.36 , X-intercept when $Y = 0.0$: -0.7585 , $r^2 = 0.944$; Pearson r : 0.972 ; total number of values: 40.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento estrutural e funcional da próstata é um fenômeno muito complexo e é sensível ao ambiente endócrino global. O desenvolvimento desta glândula é primariamente governado pelos andrógenos, estrógenos e interações epiteliais-mesenquimais. Nesse estudo, observaram-se modificações na ultraestrutura do epitélio da próstata ventral em resposta à castração com evidente atrofia das principais organelas. A análise por microscopia eletrônica dos efeitos do tratamento com dexametasona isoladamente ou em associação com a testosterona permite concluir-se que os glicocorticóides quando administrados em ratos castrados tendem a reestabelecer parcialmente as características das células epiteliais prostáticas de ratos castrados e que em combinação com a testosterona retornam o ambiente celular prostático à condição pré-castração, prevenindo desta forma a atrofia celular.

A IDE desempenha um papel fisiológico na regulação do crescimento e desenvolvimento celular. No presente estudo evidenciou-se o aumento da atividade dessa enzima na fração citosólica e da sua quantidade na fração nuclear e no epitélio da próstata de ratos quando em condições de proliferação celular induzida pelos hormônios glicocorticóides e testosterona. Assim, sugere-se que a IDE participa do crescimento prostático e que o estado de hiperinsulinemia, evidenciado quando no tratamento com dexametasona e testosterona, é um importante fator para a expressão e regulação da IDE na próstata. A correlação linear positiva existente entre a IDE imunodetectada e a relação peso da próstata/peso corporal existente em todos os grupos experimentais demonstra que a IDE pode ser importante para o remodelamento do tecido prostático.

O presente estudo ainda demonstrou que o estado de resistência à insulina induzido pela dexametasona pode alterar significativamente o peso corporal, o peso prostático e a relação peso da próstata/peso corporal. Conclui-se que a presença no plasma de altos níveis de dexametasona, insulina e testosterona ou dos três hormônios pode prevenir a atrofia e regressão celular e restaurar as características da próstata ventral após a castração.

A hiperplasia prostática, condição altamente prevalente na próstata de homens idosos, caracterizada por proliferação celular, apresenta etiologia multifatorial, sendo afetada por

fatores genéticos, nutricionais e hormonais. Obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hiperinsulinemia são fatores de risco para o desenvolvimento desta condição. Dessa forma, demonstra-se a importância da insulina no desenvolvimento e diferenciação da glândula prostática o que relaciona também a IDE com a regressão ou progressão da proliferação celular no tecido prostático. Devido as múltiplas funções celulares relacionadas com a IDE, incluindo os dados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que compostos ou condições fisiológicas que estimulem ou inibam a IDE podem ter repercussões sobre a mecanismos celulares implicados na fisiopatologia de condições como diabetes tipo 2, mal de Alzheimer e hiperplasia prostática.

ANEXOS

ANEXO A- Documento comprobatório da submissão de artigo original ao periódico



EFFECT OF DEXAMETHASONE AND TESTOSTERONE TREATMENT ON THE REGULATION OF INSULIN-DEGRADING ENZYME AND CELLULAR CHANGES IN VENTRAL RAT PROSTATE AFTER CASTRATION

Journal:	<i>International Journal of Experimental Pathology</i>
Manuscript ID:	IJEP-2010-05-1073
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	07-May-2010
Complete List of Authors:	César Vieira, Juliany; Federal University of Pernambuco, Physiology and Pharmacology Saraiva, Karina; Ultrastructure Laboratory, Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Center for Strategic Technologies of the Northeast (CETENE) Barbosa, Maria; Federal University of Pernambuco, Physiology and Pharmacology Porto, Regina; Federal University of Pernambuco, Physiology and Pharmacology Cresto, Juan; CEDIE-Endocrinology, Htal. de Niños "R. Gutiérrez" Peixoto, Christina; Ultrastructure Laboratory, Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/FIOCRUZ), Center for Strategic Technologies of the Northeast (CETENE) Wanderley, Maria; Federal University of Pernambuco, Physiology and Pharmacology Udrisar, Daniel; Federal University of Pernambuco, Physiology and Pharmacology
Keywords:	insulin-degrading enzyme, castration, prostate, testosterone, glucocorticoid, insulin resistance, ultrastructure

ANEXO B- Documento comprobatório da submissão de artigo de revisão ao periódico



REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAB ABSTRACT - EMBASE
FSTA - POPLINE - POP LINE - NISC - SCOPUS - WEB SCIENCE
BASES NACIONAIS: LILACS - SciELO - PERI -
QUALIS (CAPES) A-NACIONAL
ISSN 1415-5273

Campinas, 14 de outubro de 2010

CA/NE/RN nº 1421/2010

Ilustríssimo Senhor

Venho pelo presente agradecer o envio do manuscrito "**A enzima que degrada a insulina...**" para publicação na Revista de Nutrição. Para toda a correspondência futura relativa a este trabalho, por favor, refira-se ao protocolo número **2319**.

O Conselho Editorial procederá à tramitação regular do processo de aprovação do manuscrito, entendendo que o mesmo não foi publicado anteriormente e que não será submetido a outro periódico durante o período de revisão.

Tão logo quanto possível, V.Sa será notificado(a) a respeito do processo para consideração de eventuais sugestões dos revisores ou sobre a aprovação do trabalho.

APROVEITAMOS PARA INFORMÁ-LO(A) QUE CASO O ARTIGO SEJA CONSIDERADO COM MÉRITO PARA PUBLICAÇÃO, SERÁ ACEITO SOMENTE APENAS MAIS UMA RESUBMISSÃO DO MESMO POR V.SA (APÓS O PROCESSO DE REVISÃO POR PARES).

Novamente grata por seu interesse na Revista de Nutrição, expresso nossas saudações.

Atenciosamente

Maria Cristina Matoso

Revista de Nutrição
Editora Gerente

Ilustríssimo Senhor
Daniel Pedro Udrisar

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adock IM, Lane SJ. Corticosteoroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol.* 2003;178:347-55.

Ai J, Wang N, Yang M, Du ZM, Zhang YC, Yang BF. Development of Wistar rat model of insulin resistance. *Yang World J Gastroenterol* 2005; 11: 3675-3679.

Albrecht M, Janssen M, Konrad L, Renemberg H, Aumuller G. Effects of dexamethasone on proliferation of and fibronectin synthesis by human primary prostatic stromal cells *in vitro*. *Andrologia.* 2002; 34: 11-21.

Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor 2002; 71:9-15.

Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F. Role of glucocorticoid in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 45-52.

Augusto TM, Felisbino, SL. Remodeling of rat ventral prostate after castration involves heparanase-1. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 307-315.

Ausserlechner MJ, Obexer P, Bock G, Geley S, Klofer R. Cyclin D3 and c-myc control glucocorticoid-induced cell cycle arrest, glucocorticoid resistance but not apoptosis in lymphoblastic leukemia. *Cell Death Differ* 2004;11:165-174.

Barbera, M.; Fierabracci, V.; Novelli, M.; Bombara, M.; Masiello, P.; Bergamini, E.; De Tata, V. Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptive response in ageing rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145 (6): 799-806.

Barbosa MCL. Efeito da castração e do tratamento com dexametasona e testosterona sobre a quantidade e a atividade da enzima que degrada a insulina IDE em fração citosólica de próstata de ratos 2003 (tese de mestrado)

Barnard RJ, Aronson WJ, Tymchuk CN, Ngo TH. Prostate cancer another aspect of insulin-resistance syndrome. *Obes Rev* 2002; 3:303-308.

Baumeister H, Muller D, Rehbein M, Richter D. The rat insulin-degrading enzyme. Molecular cloning and characterization of tissue-specific transcripts. *FEBS Lett* 1993; 317:250-4.

Biola A, Pallardy M. Mode d'action des glucocorticoides. *Press Med*. 2000; 29:215-221.

Borissova, A.M., Tankova, T., Kamenova, P., Dakovska, L., Kovacheva, R., Kirilov, G., Genov, N., Milcheva, B. & Koev, D. Effect of hormone replacement therapy on insulin secretion and insulin sensitivity in postmenopausal diabetic women. *Gynecological Endocrinology* 2002; **16**: 67-74.

Blondeau, JP, Baulieu, EE, Robel, P. Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptor in the rat ventral prostate. *Endocrinology*. 1982; 110: 1926-1932.

Boundon C, Rodier G, Rechvallier E, Mottet N, Barenton B, Sultan CH. Secretion of insulin-like growth factors and their binding proteins by human normal and hyperplastic cells in primary cultures. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1996; 81: 612-617.

Bradbury MJ, Akana SF, Cascio CS, Levin N, Jacobson L, Dallman M F. Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I (MR) and type II (GR) receptors in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40(3): 133-42.

Burghen GA, Kitabchi AE, Brush JS. Characterization of a rat liver protease with specificity for insulin. *Endocrinology* 1972; 91: 633-642.

Burghen GA, Duckworth WC, Kitabchi AE, Solomon SS, Poffenbarger PL. Inhibition of insulin degradation by nonsuppressible insulin-like activity. *J Clin Invest* 1976; 57: 1089-1093.

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Bunnester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3408-3417.

Caldefie-chezet, F.; Moinard, C.; Minet-quinard, R.; Gachon, F.; Cynober, L.; Vasson, M. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. *Metabolism* 2002; 50 (9):1054-1058.

Camberos MC, Pérez AA, Udrisar DP, Wanderley, MI, Cresto, JC. ATP inhibits Insulin-Degrading- Enzyme Activity. *Exp Biol Med* 2001; 226(4): 334-341.

Carvalho CA, Camargo AM, Cagnon VH, Padovani CR. Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 270:129–136.

Chang CY, Walther PJ, McDonnell DP. Glucocorticoids manifest androgenic activity in a cell line derived from a metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61:8712-8717.

Cunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S., Mee S., Bigsby R.M., Higgins S.J., Sugimura Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8, 338–362.

Cunha GR. Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* 1996; 6: 22-25.

Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* 2004;67(5):417-34. Review.

Damas-Souza D.M., Oliveira C.A., de Carvalho H.F. (2010) Insulin affects tissue organization and the kinetics of epithelial cell death in the rat ventral prostate after castration. *J. Androl.* **31**,631-640.

Davies P, Rushmere NK. Association of glucocorticoid receptors with prostate nuclear sites for androgen receptor and with androgen response elements. *J Mol Endocrinol* 1990; 5:117-127.

Debons AF, Zurek LD, Tse CS, Abrahamsens S. Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids. *Endocrinology* 1986;18:1678-1681

Delbende C, Delarue C, Lefebvre H, Brunel DT, Szafarczyk A, Mocaer E, Kamoun A, Jegou S, Vaundry H, Glucocorticoids, transmitters and stress. *Br J Psychiatry Suppl* 1992; 15: 24-35.

Dimitriadis G, Leighton B, Parry-Billings M, Sasson S, Young M, Krause U, Bevan S, Piva T, Wegener G, Newsholme EA. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin rat skeletal muscle. *Biochem J* 1997; 321: 707-712.

Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, Pratt WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor. hsp90 heterocomplexes formed by. hsp90.p60.hsp70. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(34), 21213-21220.

Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. The role of Dna J-like protein in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 1998; 271(13), 7358-7366.

Duckworth WC, Kitabchi AE. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes* 1974; 23: 536-543.

Duckworth WC. Insulin degradation: mechanisms, products and significance. *Endocr Rev* 1988; 9: 319-345. Review

Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. The significance of intracellular insulin to insulin action. *J Invest Med* 1997; 45: 20-27.

Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading-enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 244:390-394.

Exton JH. Some thoughts on the mechanism of action of insulin. *Diabetes* 1991; 40: 521-526.

Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85: 2072-2075.

Faria CDC, Longui CA. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50: 983-993.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100:4162–4167,

Farris W, Leissring MA, Hemming AY, Selkoe DJ. Alternative Splicing of Human Insulin-Degrading Enzyme Yields a Novel Isoform with a Decreased Ability To Degrade Insulin and Amyloid β -Protein. *Biochemistry* 2005; 44: 6513-6525.

Fawcett J, Duckworth WC. Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia* 2009; 52: 1457-1460.

Gehm BD, Rosner MR. Regulation of insulin, epidermal growth factor, and transforming growth factor- α levels by growth factor degrading enzyme. *Endocrinology* 1991; 128: 1603-1609.

Gnanapragasam VJ, Mccahy PJ, Neal DE, Robson CN. Insulin -like growth factor II and androgen receptor expression in the prostate. *BJU Int* 2000; 86:731-735.

Goldfine ID. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. *Endocr Rev* 1987; 8: 235-255.

Gounarides, JS, Korach-André M, Killary K, Argentiery G, Turner O, Laurent D. Effect of dexamethasone on glucose tolerance and fat metabolism in a diet-induced obesity mouse model. *Endocrinology* 2008; 149(2):758–766.

Griffiths K, Morton MS, Denis L: Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. *Eur Urol.* 1999; 35: 443-455.

Haber RS, Weinstein SP (1992) Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone. *Diabetes* 41:728–735.

Hamel FG, Gehm BD, Rosner RG, Duckworth WC. Identification of the cleavage sites of transforming growth factor- α by insulin degrading enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1338: 207-214

Hamel FG, Benett RG, Upward JL, Duckworth WC. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* 2001, 142: 2702-2706.

Hamel FG, Upward JL, Benett RG. In vitro inhibition of insulin –degrading enzyme by long-term fatty acids and their coenzyme A thioesters. *Endocrinology* 2003, 144: 2404-2408.

Harada S, Smith RM, Hu DQ et al. Dexamethasone inhibits insulin binding to insulin-degrading enzyme and cytosolic insulin-binding protein p82. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 154-58.

Hayward SW, Cunha GR, Dahiya R: Normal development and carcinogenesis of the prostate: a unifying hypothesis. *Ann NY Acad Sci* 1996; 784: 50-62.

Holmang, A., Larsson, B.M., Brzezinska, Z. & Bjorntorp, P. The effects of short term testosterone exposure on insulin sensitivity in female rats. *American Journal of Physiology* 1992; **262**: E851–E855.

Holness, M. J.; Smith, M. D.; Greenwood, G. K.; Sugden, M. C. Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor α activation and glucocorticoids on pancreatic beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. *Diabetologia*. 2005; 48 (10): 2062-2068.

Ikeda K, Wada Y, Foster Jr HE, Wang Z, Weiss RM, Latifpour J. Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor- β . *Journal of Urology*. 2000; 164:180-185.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998; 138:482-491.

Korach-André M, Gao J, Gounarides J, Deacon R, Islam A, Laurent D. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two models of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 106-116.

Kuo WL, Montag AG, Rosner MR. Insulin-degrading enzyme is differently expressed and developmentally regulated in various rats tissues. *Endocrinology* 1993; 132: 604-611.

Kupfer SR, Wilson EM, French FS. Androgen and glucocorticoid receptors interacts with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 20622-20628.

Kurochin IV, Goto S. Alzheimer's β -amiloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 1994; 345: 33-37.

Laugero KD. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback implications to behavioral and metabolic disease. *Vitam Horm* 2004; 69: 1-29.

Leissring MA, Farris W et al. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J.* 2004; 383: 439-446.

Leissring MA, Selkoe DJ. Enzyme target to latch on to. *Nature* 2006; 443: 761-762.

Lepor H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol* 2004; 453: 335-344.

Lopaczynski W, Hruskewycz AM, Lieberman R. Preprostatectomia: a clinical model to study stromal-epithelial interaction. *Urology* 2001; 57:194-199.

Luchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicitis vascular endothelial dysfunction 2003; 92: 81-87.

Makino S, Hashimoto K, Gold PW. Multiple feedback mechanisms activating corticotrophin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73(1): 147-58.

Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prosstatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin endocrinol metabol* 1999; 84: 3463-3468.

Mirosevich J, Bentel JM, Zeps, N, Redmond SL, D'Antuono MFD. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *Journal of Endocrinology.* 1999; 162: 341-350.

Misbin RI, Almira EC. Degradation of insulin and insulin-like-growth factors by enzyme purified from human erythrocytes. Comparison of degradative products observed with a B26-[125I] monoiodoinsulin. *Diabetes* 1989; 38: 152-157.

Monti S, Silv rio F, Lanzara S, Varasano P, Martini C, Tosti-Croci C, Sciarra F. Insulin like growth factor-I and II in human benign prostatic hyperplasia: relationship with binding protein 2 and 3 and androgen. *Steroids* 1998; 63:362-366.

Muller D, Baumeister H, Buck F, Richter D. Atrial natriuretic peptide (ANP) is a high-affinity substrate for rat insulin-degrading enzyme. *Eur J Biochem* 1991; 202: 285-292.

Novelli, M.; De Tata, V.; Bombara, M.; Lorenzini, A.; Masini, M.; Pollera, M.; Bergamini, E.; Masiello, P. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. *J. Endocrinol* 1999; 162 (3):425-432.

Olefsky JM. Diabetes mellitus (type II): etiology and pathogenesis. In: Nesser M, Burger HG, Jamerson JL, Loriaux DL et al. *Endocrinology*. 2ed. Leslie J. Degroot 1995; 2: 1436-1459.

Ong M, Simsolo RB, Saffari B, Kem PA. The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 1992; 130: 2310-2316.

Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Molecular "palpation" of BPH: a tale of MAPK signaling? *Trends Mol Med* 2001; 7: 288-92.

Peehl DM, Cohen P, Rosenfeld RG. The role of insulin -like growth factors in prostate biology. *J Androl* 1996; 17:2-4.

Peixoto, CA, Nor es J, Rocha A, Dreyer G. Immunocytochemical localization and distribution of human albumin in *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1999; 123: 173-177.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 165-169.

Plantz, B, Kirley, SD, Wang Q et al: Characterization of a stromal cell model of the human benign and malignant prostate from explant culture. *J Urol.* 1999; 161:1329-1336.

Prelovsek O, Mars T, Jevsek M, Podbregar M, Grubic Z. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF- α and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: 1651-1656

Qi D, Rodrigueus B. Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *Am J Endocrinol Metab* 2007; 292: 654-667.

Renner K, Ausserlechner MJ, Kofler R. A conceptual view on glucocorticoid-induced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia. *Curr. Mol. Med* 2003;3:707-717.

Rhodes CJ, White MF. Molecular insights into insulin action and secretion. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32: 3-13.

Ribeiro DL, Rafacho A, Bosqueiro JR. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 499-508.

Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 2001; 17 (10): 5540-556.

Roth RA, Mesirow ML, Yokono K, Baba S. Degradation of insulin-like growth factors I and II by a human insulin degrading enzyme. *Endocr Res* 1984; 10: 101-112.

Saad MJA. Molecular mechanism of insulin resistance. *Brazilian J Med Biol Res* 1994; 27: 941-957.

Santos, CL, Rafacho A, Bosqueiro, JR. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment. *Biosci. J.* 2007;23 (3):.101-110.

Saraiva KLA, Silva Junior VA, Dias ESF, Peixoto CA. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod. Toxicol.* 2006; 22: 754-759.

Saraiva KLA, Silva AKSE, Wanderley, MI, Alemida de Araújo, A, Souza, JRB, Peixoto CA. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *Int J. Exp Path.* 2009; 90: 454-462.

- Sáttolo S, Carvalho CA, Cagnon VH. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell* 2004; 36:417–430.
- Seol KC, Kim SJ. Nuclear matrix association of insulin receptor and IRS-1 by insulin in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306: 898-904.
- Savary, I.; Debras, E.; Dardevet, D.; Sornet, C.; Capitan, P.; Prugnaud, P.; Patureau Mirand, P.; Grizard, J. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *Br. J. Nutr.*1998; 79 (3): p. 297–304.
- Savary, I.; Debras, E.; Dardevet, D.; Rambourdin, F.; Vasson, M. P.; Obled, C.; Grizard, J. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to Dexamethasone in aging rats. *Mech.Ageing Dev.*2001; 122 (1): p. 105–120.
- Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, Tang W. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* 2006; 443: 823-826.
- Steiner MS. The role of peptide growth factors in the prostate: a review. *Urology* 1993; 42: 99-110.
- Thomson AA. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reprod Fertil* 2001; 121: 187-195.
- Udayakumar TS, Jeyaraj DA, Rajalakshmi M, Sharma RS. Culture of prostate epithelial cells on the rhesus monkey on extracellular matrix substrate: influence of steroid and insulin-like growth factors. *J Endocrinol* 1999; 162: 443-450.
- Udrisar DP, Camberos MC, Basabe JC, Cresto JC. Insulin processing . Its correlation with glucose conversion to CO₂. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam* 1984; 34: 427-440.
- Udrisar DP, Wanderley MI. Fluoride and phosphatidylserine induced inhibition of cytosolic insulin-degrading activity. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam* 1992;42(3):183-96.

Udrisar DP, Wanderley MI, Porto RCC, Cardoso CLP, Barbosa MCL, Camberos MC, Cresto JC. Androgen-and estrogen-dependent regulation of insulin-degrading enzyme in subcellular fractions of rat prostate and uterus. *Exp Biol Med* 2005; 230: 479-487.

Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*. 2000; 45:253–258.

Vikram A, Jena GB, Ramarao P. Prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. *The prostate* 2010; 70:79-89.

Yono M, Mane SM, Lin A, Weiss RM, Latifpour J. Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sciences* 2008; 83: 192-197.