

**DANILO MARCHETE DAMAS DE SOUZA**

**"CARACTERIZAÇÃO DA VIA mTOR/p70S6K/4E-BP  
EM CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS EM  
RESPOSTA À PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA E  
IMPACTO DA INSULINA NESTE CONTEXTO"**

**Campinas, 2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

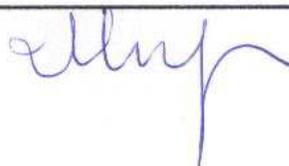
**DANILO MARCHETE DAMAS DE SOUZA**

**"CARACTERIZAÇÃO DA VIA mTOR/p70S6K/4E-BP  
EM CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS EM  
RESPOSTA À PRIVAÇÃO ANDROGÊNICA E  
IMPACTO DA INSULINA NESTE CONTEXTO"**

Este exemplar corresponde à redação final  
da Tese defendida pelo candidato

*Daniilo Marchete Damas de Souza*

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para  
obtenção do Título de Doutor em  
Biologia Celular e Estrutural, na  
área de Biologia Celular.



Orientador: Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho

Campinas, 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D18c Damas-Souza, Danilo Marchete, 1982-  
Caracterização da via mTOR/p70S6K/4E-BP em células epiteliais prostáticas em resposta à privação androgênica e impacto da insulina neste contexto / Danilo Marchete Damas de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Castração. 3. Insulina. 4. Transdução de sinal celular. I. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Characterization of the mTOR/p70S6K/4E-BP pathway in the prostatic epithelial cells in response to androgen deprivation and the impact of insulin in this context

**Palavras-chave em inglês:**

Prostate

Castration

Insulin

Cellular signal transduction

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Titulação:** Doutor em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Hernandes Faustino de Carvalho [Orientador]

Vanessa Morais Freitas

Willian Fernando Zambuzzi

Eduardo Rochete Ropelle

Leonardo Oliveira Reis

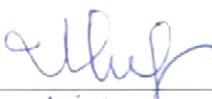
**Data de defesa:** 27-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

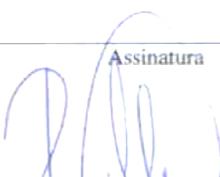
Campinas, 27 de agosto de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)

  
Assinatura

Dra. Catarina Segreti Porto

  
Assinatura

Dr. Eduardo Rochete Ropelle

  
Assinatura

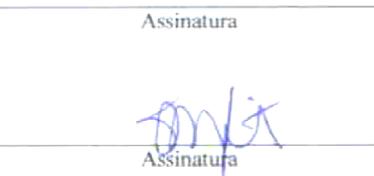
Dr. Willian Fernando Zambuzzi

  
Assinatura

Dr. Wagner Jose Favaro

  
Assinatura

Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

  
Assinatura

Dra. Vanessa Morais Freitas

  
Assinatura

Dr. Leonardo Oliveira Reis

  
Assinatura

Aos meus familiares e orientador.

Pelas oportunidades e paciência que tiveram comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Desde 16 de Janeiro de 2006, quando iniciei minhas atividades no Laboratório de Matriz Extracelular sobre orientação do Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, minha vida tem mudado. Hoje posso observar o quanto cresci e o quanto fiquei distante do que eu era, não só no aspecto físico, mas também intelectual e comportamental.

Conheci o Prof. Dr. Hernandes em 2005, quando cheguei aqui, esperava encontrar um senhor já com seus 50 e poucos anos e todo polido pelo tempo, mas encontrei um jovem com uma escova na boca em seu escritório pequeno abarrotados de livros, não tinha ideia do quanto aquele professor se transformaria em um tutor de mente e alma.

Nunca fui uma pessoa de muito diálogo com meu orientador, mas cada palavra, mesmo que não fosse a que gostasse de ouvir no momento, me fez refletir e utiliza-las para moldar o meu futuro. Como eu poderia agradecer está pessoa que me deu oportunidade, abriu as portas do seu laboratório e do mundo? Essa é uma boa pergunta, mas acho que nunca poderei retribuir ao meu mestre. Apenas posso dizer obrigado e serei grato por toda minha vida.

Aos amigos do laboratório, que compartilharam resultados ruins, bons e ótimos, que me ajudaram e me ensinaram, sou agradecido por todos em especial Alexandre, Guilherme Barbosa, Rony, Sílvia, Taize e Umar. Também não posso deixar de agradecer os professores do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Prof. Boscheiro, Profa. Cristina, Prof. Wagner, e os amigos, Juliana Godoy e Flávia.

Agradeço também o Prof. José Barreto C. Carvalheira e seus alunos, Guilherme, Gustavo, Juliana e Maria Carolina que ajudaram muito para que este trabalho se tornasse real.

Aos meus pais, Roberto e Irene, que são responsáveis por me iniciar no estudo, que ficaram tristes com minhas reprovações na escola, mas que depois de salas especiais para repetentes, supletivo, graduação e mestrado, se orgulham de ter uma tese de doutorado como resultado de grande trabalho, de uma carreira profissional que iniciou aos 13 anos como garçom e se consolida a cada dia.

Ao meu irmão, que acompanhou toda essa história.

Minha esposa, que me ensinou muito e me ensina a cada dia, a ter paciência, fé e perseverança. Não sei se teria força se ela não me ajudasse em cada momento de resultados negativos com Western Blotting.

A Deus, por me dar saúde e força e me presentear com oportunidades que me faz crescer todos os dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a Líliam.

A CNPq, Capes/DS e FAPESP.

Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra,  
no trabalho, na ação-reflexão

*Paulo Freire*

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AKT-p</b>	Proteína cinase B fosforilada, do inglês <i>phosphorylated protein kinase B</i>
<b>AMPK</b>	Proteína Cinase Ativada por AMP, do inglês <i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>AR</b>	Receptor de andrógeno, do inglês <i>androgen receptor</i>
<b>ARE</b>	Elemento responsivo a andrógeno, do inglês <i>androgen responsive element</i>
<b>BAD</b>	Antagonista da Bcl2 da morte celular, do inglês <i>Bcl2-antagonist of cell death</i>
<b>Bcl</b>	Célula $\beta$ de linfoma/leucemia, do inglês $\beta$ -cell lymphoma/leukemia
<b>BMP-4</b>	Proteína da morfogênese do osso 4, do inglês <i>bone morphogenetic protein 4</i>
<b>CAS</b>	Castração
<b>CAS+E2</b>	Castrado e tratado com 17 $\beta$ -estradiol
<b>CML</b>	Célula muscular lisa
<b>DHT</b>	Diidrotestosterona, do inglês <i>dihydrotestosterone</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>ER</b>	Receptor de estrógeno, do inglês <i>estrogen receptor</i>
<b>ERK</b>	Cinase reguladora extracelular, do inglês <i>extracellular regulated kinase</i>
<b>ERS1</b>	Receptor de estrógeno alfa, do inglês <i>estrogen receptor alfa</i>
<b>ERS2</b>	Receptor de estrógeno beta, do inglês <i>estrogen receptor beta</i>
<b>FAS-L</b>	FAS ligante, do inglês <i>FAS-ligand</i>
<b>FGF-7</b>	Fator de crescimento fibroblástico 7, do inglês <i>fibroblast growth factor 7</i>
<b>FGF-10</b>	Fator de crescimento fibroblástico 10, do inglês <i>fibroblast growth factor 10</i>
<b>FLIP</b>	proteína inibitória FLICE-like, do inglês <i>inhibitor FLICE-like protein</i>

<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês <i>gonadotropin-releasing hormone</i>
<b>HGF</b>	Fator de crescimento de hepatócito, do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>
<b>HSP90</b>	Proteína de choque térmico 90, do inglês <i>heat shock protein 90</i>
<b>HRP</b>	Peroxidase de rabano silvestre, do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina, do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
<b>IGF-1BP3</b>	Proteína de ligação com o IGF-3, do inglês <i>IGFbinding proteína-3</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IRES</b>	<i>Sítio de entrada interna do ribossomo (no mRNA), do inglês Internal ribosomal entry site</i>
<b>IRS</b>	Substrato do receptor de insulina, do inglês <i>insulin receptor substrate</i>
<b>IRS-1</b>	Substrato do receptor de insulina 1, do inglês <i>insulin receptor substrate 1</i>
<b>JNK</b>	Cinase amino terminal de jun, do inglês <i>jun amino terminal kinase</i>
<b>Jun</b>	Oncogene jun
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de matriz , do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinases de matriz 2 , do inglês <i>matrix metalloproteinases 2</i>
<b>MMP-7</b>	Metaloproteinases de matriz 7 , do inglês <i>matrix metalloproteinases 7</i>
<b>mTORC1</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos 1, do inglês <i>mammalian target of rapamycin 1</i>
<b>mTORC2</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos 2, do inglês <i>mammalian target of rapamycin 2</i>
<b>NIP</b>	Neoplasia intraepitelial
<b>NOD</b>	Não obeso diabético, do inglês <i>non obese diabetic</i>
<b>p70S6-kinase</b>	do inglês, <i>p70 ribosomal-subunit-6 kinase</i>
<b>p85</b>	Subunidade da PI3-cinase
<b>PI3-Kinase</b>	Fosfatidilinositol 3 cinase
<b>PKB/ AKT</b>	Proteína cinase B, do inglês <i>protein kinase B</i>

<b>PPAR</b>	Receptor ativador da proliferação do peroxissomo, do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>PTEN</b>	Fosfatase e homólogo da tensida, do inglês <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>PV</b>	Próstata ventral
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>Ser</b>	Serina
<b>SH2</b>	Homologia ao Src 2, do inglês <i>Src homology 2</i>
<b>SHH</b>	<i>sonic hedgehog homolog</i>
<b>SHPTP-2</b>	Proteína tirosina fosfatase 2, do inglês <i>protein tyrosine phosphatase 2</i>
<b>siRNA</b>	Ácido ribonucléico de interferência pequeno, do inglês <i>small interference ribonucleic acid</i>
<b>TBS-T</b>	Salina tamponada com Tris contendo Tween 20, do inglês <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
<b>TdT</b>	Desoxinucleotidil transferase terminal, do inglês "Terminal deoxynucleotidil transferase"
<b>TSC1</b>	Complexo da esclerose tuberosa 1, do inglês <i>tuberous sclerosis complex 1</i>
<b>TSC2</b>	Complexo da esclerose tuberosa 2, do inglês <i>tuberous sclerosis complex 2</i>
<b>TUNEL</b>	Reação de adição de dUTP-biotina mediada por TdT, do inglês TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUÇÃO .....	3
3.1. Anatomia Prostática.....	3
3.2. Desenvolvimento Prostático.....	6
3.3. Via de Sinalização do Andrógeno .....	7
3.4. A Privação Androgênica e os Bloqueadores Androgênicos na Regressão Prostática .....	8
3.5. Efeito da Insulina .....	13
4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	16
5. OBJETIVOS .....	16
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
6.1. Animais e Protocolo Experimental .....	17
6.2. Extração de Proteínas e Eletroforese .....	18
6.3. Western Blotting .....	18
6.4. Análises estatísticas .....	19
7. RESULTADOS .....	20
7.1. Alteração no peso prostático.....	20
7.2. Variação no conteúdo e grau de fosforilação da mTOR e p70S6K nos diferentes grupos experimentais .....	21
7.3. Variação no conteúdo e grau de fosforilação de eIF4B nos diferentes grupos experimentais .....	22
7.4. Variação no conteúdo da 4E-BP1 nos diferentes grupos experimentais .....	23
7.5. Variação no conteúdo da eIF4E nos diferentes grupos experimentais.....	24
7.6. Variação no conteúdo de p53 nos diferentes grupos experimentais .....	25
7.7. Análise da resposta imediata da mTOR, p70S6K à insulina .....	26
7.8. Comportamento do PPAR $\gamma$ .....	28
8. DISCUSSÃO .....	30
9. CONCLUSÃO .....	36
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
11. ANEXO .....	48

## 1. RESUMO

O crescimento e a fisiologia da próstata é dependente da expressão de receptores esteróides em alguns tipos celulares e de interações parácrinas estabelecidas após a resposta inicial a esses hormônios, em associação com hormônios somatotróficos como a insulina. O presente trabalho tem o objetivo de caracterizar componentes moleculares relacionados aos mecanismos de adaptação das células epiteliais prostáticas de rato na ausência andrógeno e/ou insulina e possíveis conexões com as vias gerais de regulação do metabolismo celular, monitorando diferentes pontos da via de sinalização integradas pelos TSC1-TSC2 e mTORC1 e mTORC2. Foram empregados 54 ratos Wistar adultos jovens com idade entre 75 e 105 dias. Os animais foram induzidos diabetes por injeções intraperitoneal de aloxana, em seguida, os ratos foram divididos em não diabético (ND), diabético (DIA) e diabético tratado com insulina (INS), somados a castração cirúrgica e sacrificados 48 e 72 horas após a castração. Utilizando a técnica de Western Blotting foram analisados os conteúdos e fosforização de mTOR, p70S6K, eIF4B, 4E-BP, eIF4E e p53. Os resultados obtidos no presente trabalho identificam uma nítida função do estímulo androgênico na regulação negativa de eIF4E (via 4E-BP1) e positiva de eIF4B. Ficou claro também que a insulina regula positivamente a fosforilação de 4E-BP1 e que a privação androgênica promove aumento de p53. Assim dois mecanismos parecem essenciais para a manutenção e seleção das células epiteliais prostáticas de ratos: (I), p53/4E-BP/eIF4E na ausência de andrógeno; (II), p70S6K/eIF4B na ausência de insulina. Apoio financeiro: CNPq, Capes / DS e FAPESP.

**Palavras-chave:** próstata, castração, insulina, sinalização celular, p70S6K/eIF4B, 4E-BP/eIF4E, p53.

## 2. ABSTRACT

The growth and physiology of the prostate is dependent on steroid receptors in certain types of cells and the paracrine interactions established after the initial response to these hormones in combination with somatotrophic hormones such as insulin. The current work aims to characterize the molecular components related to the adaptation mechanisms of the epithelial cells in the prostate of rats. In addition to the absence of androgen and/or insulin and possible connections with the general pathways regulating cell metabolism, monitoring different points of the signaling pathways that integrate TSC1-TSC2 and mTORC1 and mTORC2. 54 male Wistar rats aged between 75 and 105 days were used for the current work. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of alloxan and the rats were divided into non-diabetic (ND) , diabetic (DIA) and diabetic treated with insulin (INS) groups. Every group was divided into three sub groups and the rats were sacrificed non castrated, surgically castrated 48 and 72 hours. Using Western blotting the contents and phosphorylation of mTOR , p70S6K , eIF4B , 4E- BP , eIF4E and p53 were analyzed. The results obtained in this study identify a clear function of androgenic stimulation in the negative regulation of eIF4E (by 4E-BP1) and positive regulation eIF4B and p53. It also became clear that insulin positively regulates the phosphorylation of 4E-BP1. In conclusion two mechanisms seem to be essential for the maintenance and selection of prostatic epithelial cells in rats: (I) p53/4E-BP/eIF4E in the absence of androgen., (II ) p70S6K/eIF4B in the absence of insulin. Financial support: CNPq , CAPES / DS and FAPESP .

**Key words:** prostate, castration, insulin, cellular signal transduction, p70S6K/eIF4B, 4E-BP/eIF4E, p53.

### 3. INTRODUÇÃO

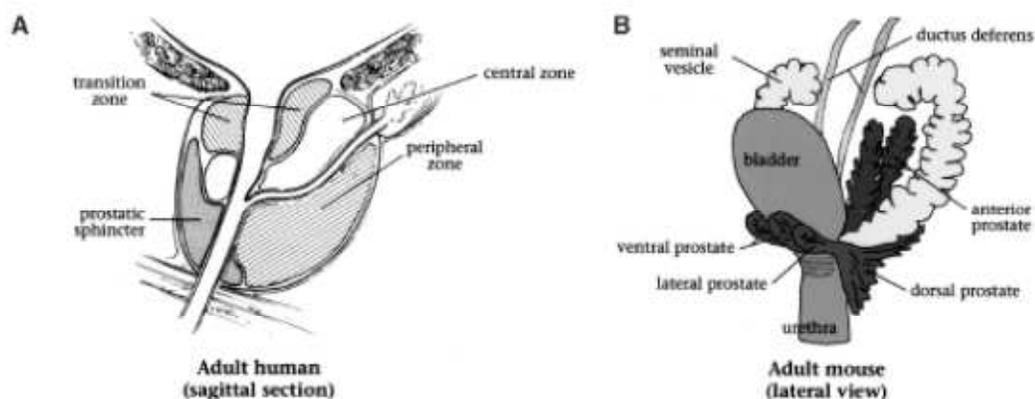
A próstata é uma glândula exócrina acessória encontrada exclusivamente no sistema reprodutor masculino de mamíferos e produz vários componentes do sêmen, tais como proteínas, lipídios, frutose, citrato e íons zinco. Em camundongos ela produz várias proteínas importantes para a formação do *plug* copulatório (Cunha et al. 1987), sendo responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático, excretado juntamente com os demais componentes do sêmen durante a ejaculação. Esse líquido contribui no aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides, assim como na neutralização da acidez da vagina, assumindo um papel importante no processo da fertilização (Guyton, 1984).

A motivação para a investigação da regulação do crescimento e fisiologia prostática dá-se pela existência de várias complicações patológicas que afetam essa glândula, tais como inflamações e alterações proliferativas malignas e benignas, que se apresentam principalmente com o envelhecimento (Pfau et al. 1980).

#### 3.1. Anatomia Prostática

A próstata é um órgão constituído por componentes glandulares e não glandulares (McNeal et al. 1988). O componente glandular é composto por um conjunto de estruturas epiteliais túbulo-alveolares, envolvidas por um estroma muscular contrátil não glandular. Em ratos e camundongos, esta estrutura compacta é dividida em lóbulos, sendo denominados em: próstata ventral (PV), próstata dorsolateral e próstata anterior (ou glândula de coagulação) (Aümuller et al. 1979) (Figura 1).

Estes lobos diferem quanto aos tipos celulares (Cunha et al. 1987), padrões de dutos (Hayashi et al. 1991), tipo de secreção (Prins et al. 1991), resposta a hormônios (Prins et al. 1991; Banerjee et al. 1995), padrão de expressão gênica (Takeda et al. 1990) e de síntese proteica (Lee et al. 1990; Prins et al. 1991; Banerjee et al. 1995).

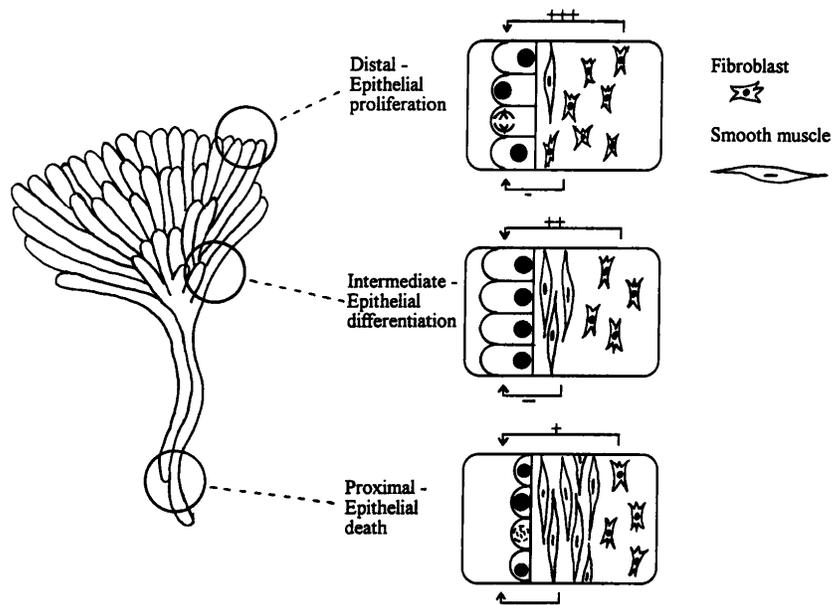


**Figura 1.** Ilustração esquemática da anatomia da próstata humana (A) (McNeal, 1969) e de camundongo (B) (Cunha et al. 1987).

Na próstata ventral de rato, cada lobo prostático consiste de oito conjuntos de dutos que se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples que se ramifica distalmente. Esse conjunto de dutos é dividido em três regiões morfológicas e funcionalmente distintas, denominadas de acordo com sua posição em relação à uretra, proximal, intermediária e distal, (Lee et al. 1990; Shabsigh et al. 1999).

A região distal apresenta tecido fibroso abundante em torno dos dutos, com uma camada de músculo liso descontínuo e esparsa e está associada com o crescimento da população das células epiteliais em função do produto dos fibroblastos. A região intermediária é rodeada por uma camada contínua de músculo liso com espessura entre 1 a 2 camadas de células, apresentando epitélio com grande atividade secretora. Na região proximal há uma menor quantidade de fibroblastos, maior quantidade de células, camadas e espessura de músculo liso e maior incidência de morte celular (Figura 2) (Nemeth e Lee, 1996).

As células epiteliais são fortemente influenciadas pelos componentes estromais, e as diferenças fenotípicas das células epiteliais encontradas ao longo dos ductos prostáticos parecem estar relacionadas com a distribuição diferenciada do tecido fibroso e muscular liso (Nemeth & Lee, 1996).



**Figura 2.** Sistema ductal da próstata ventral de ratos. A região distal possui maior quantidade de fibroblastos e poucas CMLs, apresentando crescimento da população de células epiteliais em função do produto dos fibroblastos. A região intermediária apresenta epitélio com grande atividade secretora, circundado por uma camada contínua de CMLs. A região proximal do epitélio possui menor quantidade de fibroblastos e maior quantidade de CMLs, apresentando maior incidência de morte celular. Esquema proposto por Nemeth e Lee (1996).

As células musculares lisas (CMLs) representam 22% do volume total da próstata humana (Shapiro et al. 1992), enquanto na próstata ventral de ratos, as CMLs ocupam 5% do volume total da glândula e 14% do estroma (Antonioli et al. 2004).

As CMLs têm um papel preponderante nos mecanismos de estimulação parácrina sobre o epitélio (Farnsworth, 1999), predominando ao redor dos ductos, onde se encontram em íntimo contato com a membrana basal das células epiteliais (Nemeth e Lee, 1996).

Outros tipos celulares também são encontrados no estroma da próstata, tais como mastócitos, células endoteliais e pericitos, ao lado de terminações nervosas e gânglios sensitivos, desempenhando papel importante e específico na manutenção e função secretora da próstata ventral (Prins et al. 1991; Lee et al. 1990; Sensibar et al. 1991).

## 3.2. Desenvolvimento Prostático

Durante o desenvolvimento, o tecido alvo que primeiramente responde aos andrógenos é o mesênquima urogenital, que direciona o brotamento, ramificação e diferenciação epitelial por intermédio de fatores parácrinos.

Por outro lado o epitélio em desenvolvimento induz a diferenciação e o padrão morfológico de desenvolvimento das CMLs. Portanto essa interação entre epitélio e mesênquima/estroma é bidirecional (Cunha et al. 1987). O brotamento prostático é iniciado pela ação androgênica pré-natal (Timms et al. 1994). As subseqüentes morfogênese ductal, canalização e cito-diferenciação epitelial também precisam de estimulação androgênica e estão associadas a um aumento perinatal transitório na concentração de testosterona (Donjacour et al. 1988). Nosso laboratório demonstrou que a canalização do epitélio prostático em ratos depende fortemente da morte celular de células epiteliais em associação à polarização das células epiteliais luminais (Bruni-Cardoso e Carvalho, 2007).

O desenvolvimento e o funcionamento prostático também são modulados diretamente por hormônios somatotróficos (como insulina, prolactina e hormônio do crescimento), ácido retinóico e estrógenos (Webber, 1981; Prins et al. 2001), o que torna bastante complexo o mecanismo de regulação da fisiologia prostática.

Adicionalmente, está bem estabelecido que alguns dos andrógenos circulantes são convertidos a estrógenos em vários tecidos periféricos, através da enzima aromatase (Simpson et al. 1999). Essa enzima foi identificada na próstata humana, sugerindo um local de aromatização e uma possível fonte local de estrógeno (Tsugaya et al. 1996).

A breve exposição de roedores a estrógenos durante o desenvolvimento neonatal provoca um efeito irreversível e dose dependente na morfologia, organização celular, e função prostática (Prins et al. 1992). É sabido que a breve exposição de roedores a estrógenos durante o desenvolvimento neonatal provoca um efeito irreversível e dose dependente na morfologia, organização celular e função prostática (Prins et al. 1992). Exposição a baixas doses de estrógeno durante a gestação em camundongos provoca aumento do peso da próstata no adulto, os níveis de receptor de andrógeno e também um aumento do brotamento (Nonneman et al. 1992). Se a dosagem do estrógeno na próstata é alta ocorre um “*imprint*” permanente que inclui reduzido crescimento prostático, defeitos

na diferenciação epitelial, função secretora alterada e displasia associada à idade, semelhante à neoplasia intraepitelial (NIP) (Prins, 1992; Prins et al. 2001). Acredita-se que esse “*imprint*” causado pela ação estrogênica na próstata seja devido a alterações nas concentrações de andrógeno via inativação eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ou a um efeito local na próstata (Huang et al. 2004). Estudos realizados em cultura de próstata ventral (cultura de órgão) demonstraram que altas doses de estrógenos inibem o crescimento e diferenciação celular no desenvolvimento prostático *in vitro* (Jarred et al. 2000), sugerindo que isso possa ocorrer *in vivo* em adição aos efeitos indiretos via supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Além disto, nosso laboratório tem identificado um mecanismo geral de inibição da transcrição, com alterações da organização da cromatina (Augusto et al. 2010, 2011).

### **3.3. Via de Sinalização do Andrógeno**

O receptor de andrógeno (AR) e os receptores de estrógeno (ER) são responsáveis pela mediação dos efeitos fisiológicos dos andrógenos e estrógenos, respectivamente (Gelman, et al. 2002 e Sasaki et al. 2003).

O AR atua fundamentalmente como fator de transcrição, localizado no citoplasma, a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona, promove a dissociação da proteína *heat shock protein 90* (HSP90), permitindo a dimerização com outro AR, após, é translocado para o núcleo e, em conjunto de co-ativadores e co-repressores, ativa ou inativa conjuntos de genes pela ligação aos elementos responsivos a andrógenos (AREs) (Heilein e Chang, 2004).

A testosterona é um hormônio esteroide pertencente ao grupo dos andrógenos. Nos mamíferos é o principal hormônio sexual masculino e é secretada principalmente pelos testículos e em pequena quantidade pelas glândulas suprarrenais (Brooks 1975).

Nos homens, a testosterona desempenha um papel chave no desenvolvimento de tecidos reprodutivos masculinos, tais como os testículos e a próstata, bem como a promoção de características sexuais secundárias, o aumento do músculo e o crescimento dos pelos (Brooks 1975).

Como outros hormônios esteróides, a testosterona é derivada do colesterol (Waterman e Keeney et al., 1992). As maiores quantidades de testosterona (> 95%) são produzidos pelos testículos pelas células de Leydig (Brooks 1975).

No sangue circulante está ligado a albumina e *sex-hormone-binding globulin* (SHBG), com uma pequena fração livre dissolvida no soro. Quando a testosterona livre entra nas células da próstata, 90% é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 $\alpha$ -redutase, tornando-se um andrógeno mais ativo e com maior afinidade pelo receptor de andrógeno (AR) (Brinkmann et al., 1999).

O AR está localizado no citoplasma e apresenta 110 kDa com características comuns aos membros da família dos receptores nucleares, apresentando domínio amino-terminal de acionamento, domínio carboxi-terminal de ligação ao ligante e um domínio de *zinc finger* que faz a ligação do receptor ao DNA (Brinkmann et al., 1999).

Como outros receptores nucleares com domínio de *zinc finger*, no estado basal, o AR está ligado com proteínas de choque térmico impedindo sua ligação ao DNA. A ligação aos andrógenos, DHT ou testosterona, induz uma alteração conformacional do AR, dissociando das proteínas de choque térmico e sofrendo de fosforilação (Brinkmann et al., 1999) por proteína cinase A (Nazareth e Weigel 1996).

A mudança conformacional induzida pelos ligantes, facilita a formação de um complexo homodimérico de ARs, que permite a translocação para o núcleo da célula e ligação aos elementos responsivos à andrógenos (AREs) nas regiões promotoras de genes alvos (McKenna et al., 1999).

O complexo homodímero de ARs ligado ao DNA, recruta proteínas co-regulatórias, co-ativadoras ou co-repressoras. Como em outros receptores nucleares, a atividade induzida por ligantes ligando induzidas por andrógenos RESPOSTA, conformação ativada envolve uma mudança na posição da hélice 12 do receptor para formar uma superfície à qual o co-ativador (McKenna et al., 1999).

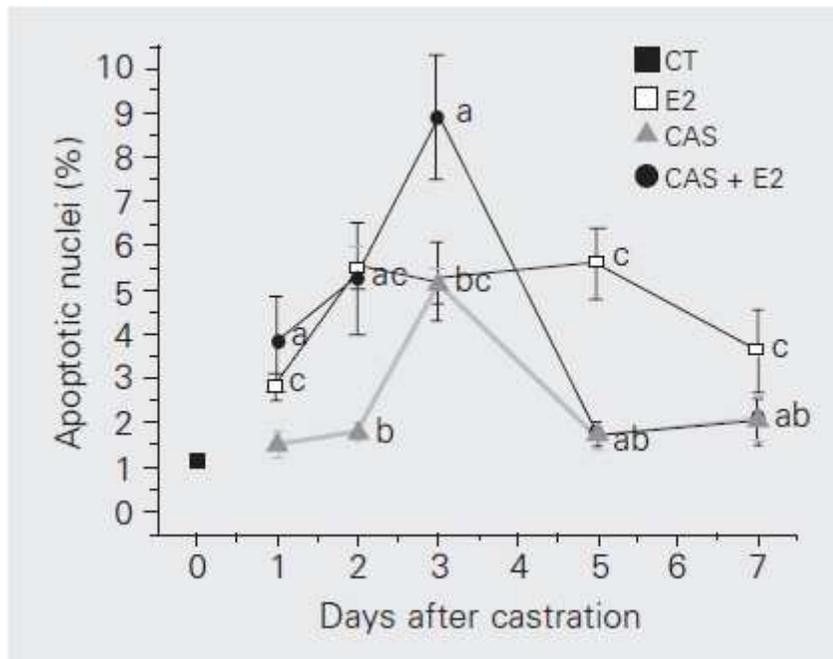
### **3.4. A Privação Androgênica e os Bloqueadores Androgênicos na Regressão Prostática**

A involução da próstata seguida à castração tem sido extensivamente utilizada como modelo para estudos da fisiologia da próstata. Esta involução é um complexo processo fisiológico caracterizado pela perda de peso prostático, apoptose das células epiteliais e uma inversão de uma estrutura predominantemente glandular para outra dominada pelo estroma. Esta involução envolve uma significativa remodelação tecidual, a qual inclui o rearranjo do estroma e a eliminação das células apoptóticas (Kryprianou e Isaacs, 1988; Powell et al. 1996; Carvalho e Line, 1996; Carvalho et al. 1997a, b; Ilio et al. 2000; Powell et al. 1999; Vilamaior et al. 2000; Augusto et al. 2008).

Foi demonstrado que a expressão de MMP-2 é regulada positivamente, de uma maneira dose-dependente por andrógenos via AR em células tumorais prostáticas LNCaP e LAPC-4 (Liao et al. 2003). Por outro lado, o tratamento de células derivadas de fibroblastos com estrógeno causa uma diminuição da expressão de MMP-2 (Moalli et al. 2002). Estudos do nosso grupo demonstraram que no desenvolvimento normal da próstata há uma maior expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9 se comparada com adultos (Bruni-Cardoso et al. 2008). Dados esses fatos, sugere-se então, que ocorra uma influência dos hormônios androgênicos e estrogênicos na expressão de MMPs e de seus inibidores no desenvolvimento prostático normal, o que é reforçado pela presença de elementos responsivos a andrógenos na região promotora do gene da MMP-2 (Li et al. 2007). Experimentos em cultura organotípica demonstraram que a inibição da MMP-2 por siRNA compromete o desenvolvimento do epitélio prostático (Bruni-Cardoso et al. 2010).

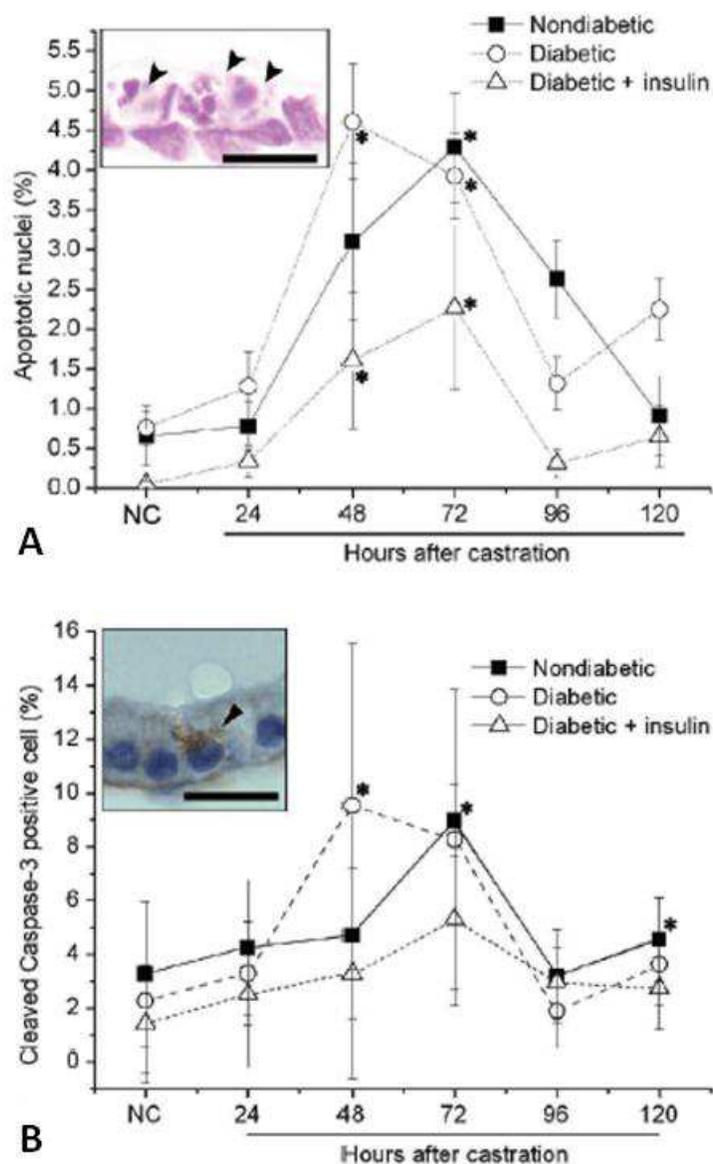
Além disso, nosso grupo tem demonstrado a existência e localização da heparanase 1 na próstata ventral de ratos normais e castrados, sendo que nestes últimos foi verificado um pico de expressão aos 7 dias após castração. Conclui-se que esta expressão aumentada aos 7 dias após castração está relacionada à remodelação tecidual (Augusto et al. 2008).

Posteriormente demonstramos que a cinética de morte celular apoptótica difere entre animais castrados, animais que receberam alta dose de 17- $\beta$  estradiol e animais castrados tratados com 17- $\beta$  estradiol, e que existem mecanismos diferentes de indução de apoptose nas células epiteliais prostáticas pela privação androgênica e pela alta dosagem de estrógenos (Garcia-Florez et al. 2005) (Figura 3), relacionados a uma forte inibição da proliferação celular (resultados não publicados).



**Figura 3.** Cinética de apoptose de células epiteliais prostáticas em resposta à castração (CAS), à administração de 17 $\beta$ -estradiol e a ambos conjuntamente (CAS+E2) (Garcia-Florez et al. 2005).

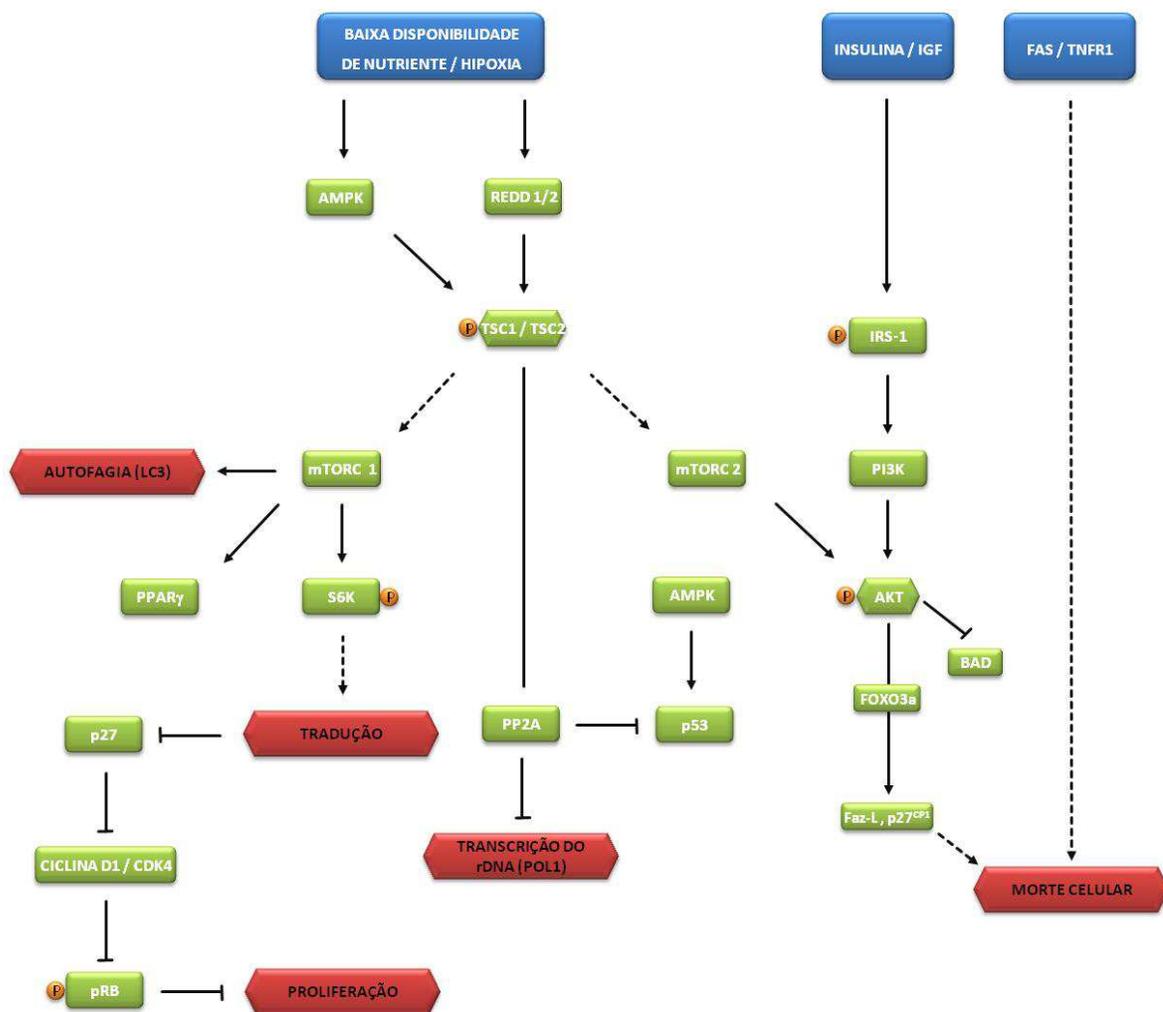
Outro trabalho que mereceu nota, realizado por Damas-Souza (et al. 2010) demonstra que a insulina tem efeito sobre a sobrevivência das células epiteliais prostáticas frente à privação androgênica, contribuindo para a defasagem entre a queda dos níveis de andrógeno (12 horas após castração) e o pico de morte celular (72 horas após castração), monitorando cinética de morte celular em animais castrados com aquela de animais diabéticos, durante cinco dias foi observado um efeito protetor da insulina adiantando o pico de morte células por apoptose e que a cinética de morte celular apoptótica induzida por castração difere entre animais diabéticos e não diabéticos, e que existem mecanismos diferentes de indução de apoptose nas células epiteliais prostáticas pela privação androgênica e pela baixa concentração de insulina (Figura 4) (Damas-Souza et al. 2010).



**Figura 4.** Cinética de apoptose na próstata ventral de ratos em resposta a castração, na ausência de insulina e na administração de insulina aos diabéticos. **(A)**, reação de Feulgen; **(B)**, imunohistoquímica para caspase-3 clivada. A castração dos animais não diabéticos resulta em pico de núcleos apoptóticos 72 horas após a castração. Em ratos diabéticos, o pico foi antecipado para 48 horas após a castração. Os grupos diabéticos que receberão insulina ocorre redução no percentual de células autópticas nos diferentes intervalos de tempo após a castração, além de restaurar o pico de apoptose para 72 horas após a castração. As variações são expressas em percentual de núcleos apoptóticos. Barras = 10  $\mu$ m. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Os (\*) indicam significância estatística com respeito ao grupo NC quando  $P < 0,05$ .

O diabetes induzido por estreptozotocina causa prejuízo ao desenvolvimento prostático, com comprometimento da diferenciação das células epiteliais e do peso da glândula (Soudamani et al. 2000) e promove redução da área epitelial quando realizado em animais adultos (Cagnon et al. 2000). Porém, não foi ainda estudado se este efeito é alcançado por um comprometimento do desenvolvimento, inibição da atividade secretora ou por indução de morte das células epiteliais prostáticas.

Pouco se sabe sobre vias de sinalização relacionadas à morte das células epiteliais prostáticas em resposta à privação androgênica. Um trabalho específico demonstrou que a ação da MMP-7 levaria à liberação de FAS-L da matriz, o que levaria à ativação da via extrínseca de morte celular (Powel et al. 1999). Entretanto, não fomos capazes de detectar em ratos Wistar o aumento detectado na expressão de MMP-7 por aquele grupo. Por outro lado, tem sido sugerido que as alterações vasculares resultantes da castração (aumento de permeabilidade vascular, restrição de suprimento sanguíneo e morte das células endoteliais) levaria a uma restrição de nutrientes e hipóxia, que resultaria num aumento das células epiteliais (Buttyn et al. 2000; Shabsigh et al. 2001). Adicionalmente, já foi demonstrado que a expressão do receptor de andrógeno não é elemento relevante na indução da morte das células epiteliais pela privação androgênica, o que levou os autores a sugerirem a existência de mecanismos parácrinos indutores da morte celular (Kurita et al. 2001). Embora tenha sido demonstrado que o inibidor de caspase-8 FLIP (proteína inibitória FLICE-*like*) seja regulado por andrógeno e possa, por esta razão, estar envolvido na morte das células epiteliais (Nastiuk & Krolewski, 2008), os processos envolvidos continuam desconhecidos. No nosso entender, parece que um mecanismo capaz de conectar variações da disponibilidade de nutriente e de oxigênio, com aqueles de regulação das vias metabólicas, principalmente as anabólicas com a regulação da proliferação ou morte celular seria um alvo adequado para realizar uma conexão entre os eventos conhecidos e a indução da morte das células epiteliais. Neste contexto, o complexo TSC1/TSC2 e as vias mTORC1/mTORC2, parecem ser alvos moleculares interessantes, por estarem posicionados no entroncamento das vias de regulação destes processos e por serem sensíveis a variações nas condições anabólicas (síntese protéica, biogênese de ribossomos e progressão do ciclo celular)(Huang & Manning, 2008; Lian et al. 2008) (Figura 5).



**Figura 5.** Papel central do complexo TSC1/TSC2 e das vias mTORC1 e mTORC2 na integração entre regulação anabólica e comportamento celular, indicando principais componentes moleculares. A ação inibitória de S6K sobre IRS-1 não está indicada na figura.

### 3.5. Efeito da Insulina

A insulina é o hormônio que controla o metabolismo, mantendo a normoglicemia e a normolipidemia (Saltiel & Kahn, 2001).

A insulina ativa o seu respectivo receptor promovendo a sua autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina (Saltiel & Kahn, 2001). O receptor da insulina é composto

por duas subunidades  $\alpha$ , localizadas no domínio extracelular, e duas subunidades  $\beta$  unidas por pontes dissulfeto, que estão localizadas no domínio transmembrana. A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  induz a autofosforilação de tirosinas na subunidade  $\beta$  e esta, subseqüentemente, fosforila seus substratos, os IRS (insulin receptor substrate), ERKs (extracellular regulated kinase) e JNKs (Jun amino terminal kinase), que regulam diferentes vias de sinalização (Saltiel & Kahn, 2001).

As proteínas IRS se ligam e ativam vários domínios homólogos a SHH incluindo a subunidade p85 regulatória da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-Kinase), a proteína tirosina fosfatase (SHPTP-2) e várias pequenas moléculas semelhantes a fatores de crescimento (White, 1997). A ativação destes domínios SH2 inicia a cascata de sinalização que regula respostas metabólicas, sobrevivência, crescimento e diferenciação celulares (Sun et al, 1991; Sun et al, 1995; Lavan et al, 1997; Lavan et al, 1997b ).

A ativação da PI3-kinase responde a uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, incluindo a insulina (Stephens et al. 1993; Kohn et al. 1995). Esta enzima promove um aumento no nível de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, quando ocorre um estímulo da célula pela insulina. Subseqüentemente, é ativada a proteína cinase B (PKB) também conhecida como AKT. Um alvo celular que a AKT/PKB pode fosforilar para proteger a célula de apoptose é a BAD (Datta et al. 1997). Esta proteína interage com membros da família da Bcl como a Bcl<sub>XL</sub>, e induz apoptose em algumas células (Datta et al. 1997). Após a BAD ser fosforilada na Ser<sub>136</sub> pela AKT/PKB esta se dissocia da Bcl<sub>XL</sub>, e a apoptose é reduzida (Zha et al. 1996). O fato é que a AKT/PKB pode segurar a via de sinalização da apoptose por fosforilação em proteínas alvo, tendo um papel na supressão da apoptose, promoção do crescimento e proliferação (Whiteman et al. 2002; Franke et al. 2003; Brazil et al. 2004).

No entanto, a insulina não possui somente estas funções. A sua ausência ou baixas concentrações séricas estão associadas a problemas reprodutivos, tanto em mulheres como em homens. Nestes últimos, ocorre uma redução na testosterona sérica devido a efeito na função das células de Leydig (Dinulovik et al. 1990) fato que é também evidenciado em ratos submetidos à indução do diabetes pela estreptozotocina (Ikeda et al. 2000).

Em ratos diabéticos ocorre uma redução da resposta da pituitária ao GnRH (Seethalakshmi et al. 1987), comprometendo o mecanismo de *feedback* no eixo

hipotálamo-hipófise, reduzindo a sensibilidade da hipófise aos esteróides (Kirchick et al. 1979; Dong et al. 1991).

Em ratos adultos submetidos à indução do diabetes pela estreptozotocina, há uma diminuição dos receptores de andrógenos (Tesone et al. 1980), na captação e na retenção de [<sup>3</sup>H]testosterona em glândulas acessórias sexuais (Oksanen et al. 1975).

A insulina é essencial para a manutenção, função e integridade da próstata (Suthagar et al. 2008), influenciando diretamente o crescimento prostático. Na verdade, não somente a próstata, mas o trato urogenital como um todo é dependente da insulina, sendo que a ausência deste hormônio pode interferir na resposta destes órgãos à testosterona e a fatores de crescimento (Yono et al. 2005).

Em animais submetidos ao diabetes induzido pela aloxana, ocorre uma grande variação morfológica da próstata, indicando que a deficiência de insulina, assim como da testosterona, influencia diretamente este órgão, contribuindo para a incidência de inflamações e possibilitando um desenvolvimento subsequente de lesões malignas e pré-malignas (Ribeiro et al. 2008).

Os efeitos da insulina na ultraestrutura das células epiteliais da próstata são caracterizados pela ocorrência de alterações nos sistemas de biomembranas e de organelas envolvidas no processo de secreção, sendo este um efeito similar ao encontrado em animais submetidos à castração, o que pode ser atribuído a um desbalanço hormonal proveniente de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Carvalho et al. 2003).

## **4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Atualmente a próstata vem sendo alvo de inúmeras pesquisas devido a sua importância na função reprodutiva e por ser um alvo causador de mortes entre homens. Assim, há um crescente interesse na compreensão dos mecanismos de regulação das vias de indução de morte das células epiteliais na próstata.

Além de haver evidências de que a insulina em baixas concentrações séricas tem sido associada com doenças reprodutivas tanto em mulheres como em homens, nós identificamos anteriormente que a insulina tem um efeito protetor contra a morte das células epiteliais prostáticas. Portanto, parece-nos necessário o aprofundamento do conhecimento dos mecanismos de regulação de adaptação das células epiteliais prostáticas a ausência de andrógeno e/ou insulina.

Por estas razões, este trabalho procurará desenvolver hipóteses de que há mecanismos distintos de regulação de adaptação das células epiteliais prostáticas pela castração e pela ausência da insulina e que o complexo TSC1-TSC2 em paralelo ao complexos mTORC1-mTORC2, conectam a regulação do metabolismo celular com a redução da proliferação celular e indução de morte celular em conjunto ou isoladamente, nos dois processos.

## **5. OBJETIVOS**

Considerando-se as hipóteses acima, os objetivos deste projeto são:

1. identificar a via de sinalização envolvida na adaptação das células epiteliais prostáticas frente à privação androgênica, com foco na inibição dos mecanismos de sobrevivência, proliferação e morte celular e
2. caracterizar componentes moleculares relacionados à distinção do processo adaptação induzida por privação androgênica e de insulina e possíveis conexões com as vias gerais de regulação do metabolismo celular, monitorando diferentes pontos da via de sinalização integradas pelos TSC1-TSC2 e mTORC1 e mTORC2.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. Animais e Protocolo Experimental

Foram empregados 54 ratos Wistar adultos jovens com idade entre 75 e 105 dias, proveniente do Centro de Bioterismo Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos na casa de manutenção de animais em experimentação do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, em caixa de polietileno, com substrato de maravalha, sendo fornecidas água e ração “*ad libitum*”.

Os ratos receberam três injeções intraperitoneal de aloxana (5,6 – Dioxyuracil monohydrate - Sigma Chemical Co. Saint Louis, MO, USA) (75mg/Kg) seguidas de duas injeções de dose maior (150mg/Kg). A droga foi diluída em tampão citrato 0,1M, pH 4,4, e aplicadas em intervalos de 7 dias. Antes das aplicações os animais permaneceram 24 horas em jejum e foram realizados dois testes, um de glicosúria e outro de glicemia. Constando o quadro de manifestação de diabetes (glicosúria, acima de 28 mmol/l e glicemia acima de 350mg/dL), após 7 dias os animais receberam mais uma dose de aloxana (dose de estabilização) e após 48 e 72 horas foram castrados cirurgicamente, via escrotal, sob anestesia com Cloridrato de Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (10mg/kg).

Os ratos foram divididos em 9 grupos diferentes:

	<b>Não Diabéticos</b>	<b>Diabéticos</b>	<b>Diabéticos + Insulina</b>
<b>Não Castrados</b>	3	3	3
<b>48 horas após Castração</b>	3	3	3
<b>72 horas após Castração</b>	3	3	3

Os ratos diabéticos tratados com insulina receberam aplicações subcutâneas de insulina (2U/100g) duas vezes ao dia, às 8 horas e às 18 horas, tratamento se prolongou até o dia do sacrifício do animal (Soudamani et al, 2005).

Para caracterizar a resposta à insulina, os animais foram anestesiados como descrito previamente, em seguida foi realizada incisão na região abdominal para a injeção 200 µL de insulina via aorta. O lóbulo direito da próstata ventral foi coletado no tempo 0 e

o lóbulo esquerdo 10 minutos após a injeção, em seguida foram pesadas e fixadas de acordo com diferentes protocolos ou congeladas em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas.

Os animais foram sacrificados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório por overdose de anestésicos e as próstatas ventrais dissecadas imediatamente.

Os experimentos foram realizados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (Protocolo número 1887-1).

## **6.2. Extração de Proteínas e Eletroforese**

As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em Polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland) em solução contendo 150mM de NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5mg EDTA/mL e 10µL/mL do coquetel inibidor de proteases (cat. P-8340 – Sigma Chemical Co.). Para os testes de níveis de fosforilação, foram adicionados inibidores de cinases/fosfatases no tampão de extração (NaF 20mM/L; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM). Após clarificação por centrifugação a 10.000xg por 10 minutos e quantificação das proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% com a aplicação de 50µg de proteínas, após fervura por 5 minutos em tampão de amostra em condição redutora.

## **6.3. Western Blotting**

Após eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Hoefer, San Francisco, CA, USA) para membranas de nitrocelulose (Amersham, Buckinghamshire, UK) sob corrente constante de 400mA por uma hora sob refrigeração. A qualidade da transferência de proteínas foi analisada pela coloração da membrana com Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%. A membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente e, em seguida incubada *overnight* a 4° C com leite desnatado 1% em TBS-T contendo os anticorpos primários com as diluições

recomendadas pelo fabricante. Após três lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG respectivo conjugados com HRP (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) ou Alexa Fluor® 546 (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil).

Após nova série de lavagens em TBS-T, a atividade peroxidásica dos anticorpos conjugados com HRP foi revelada através de sistema ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK), expondo a membrana ao filme X-Omat da Kodak por 1 minuto, enquanto fluorescência dos anticorpo secundários conjugados com Alexa Fluor® 546 foi revelado através do sistema Typhoon 9200 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria das bandas obtidas, utilizando o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Os anticorpos utilizados foram provenientes da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA): mTOR (#2972), phospho-mTOR (Ser2448) (#2971), p70S6K (#9202), phospho-p70S6K (Thr389) (#9205), eIF4B (#3592), 4E-BP1 (#9452), eIF4E (#9742) e p53 (#9282). Também foram utilizados os anticorpos anti-actina (I-19) SC-1616 e (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-PPAR $\gamma$  (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

#### **6.4. Análises estatísticas**

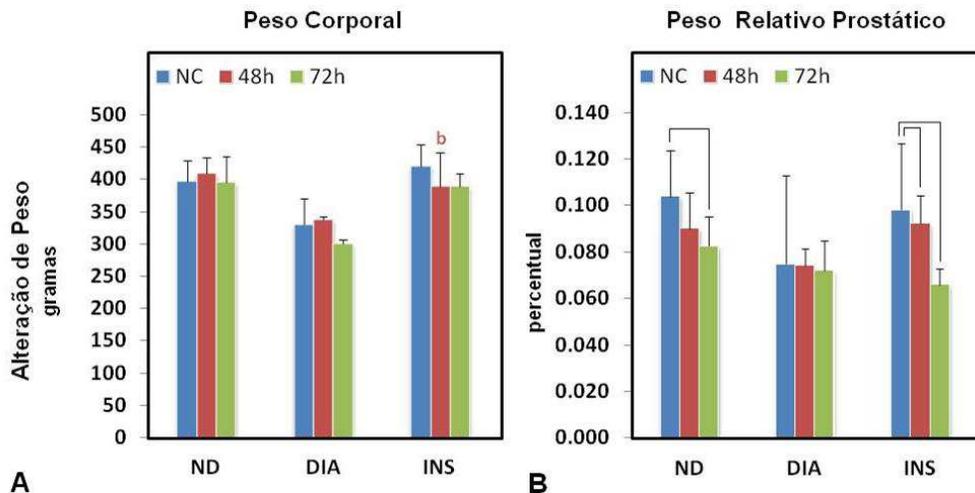
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi empregado para análises *post hoc*, quando aplicável, para comparar as medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais ou entre diferentes períodos após castração dentro do mesmo grupo. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Alteração no peso prostático

Os animais do grupo DIA castrado 48 horas apresentou tendência a diminuição no peso corpóreo quando comparada com os animais do grupo ND. Os animais do grupo INS castrado 48 horas tiveram o peso corpóreo restaurado à valores semelhantes aos do grupo ND (Figura 6A). Por outro lado, a PV dos animais do grupo DIA apresentaram tendência a redução do peso relativo da PV em cerca de 28%, com respeito aos animais do grupo ND e, similarmente à recuperação do peso corpóreo, tiveram seu peso relativo recuperado no grupo INS (Figura 6B).

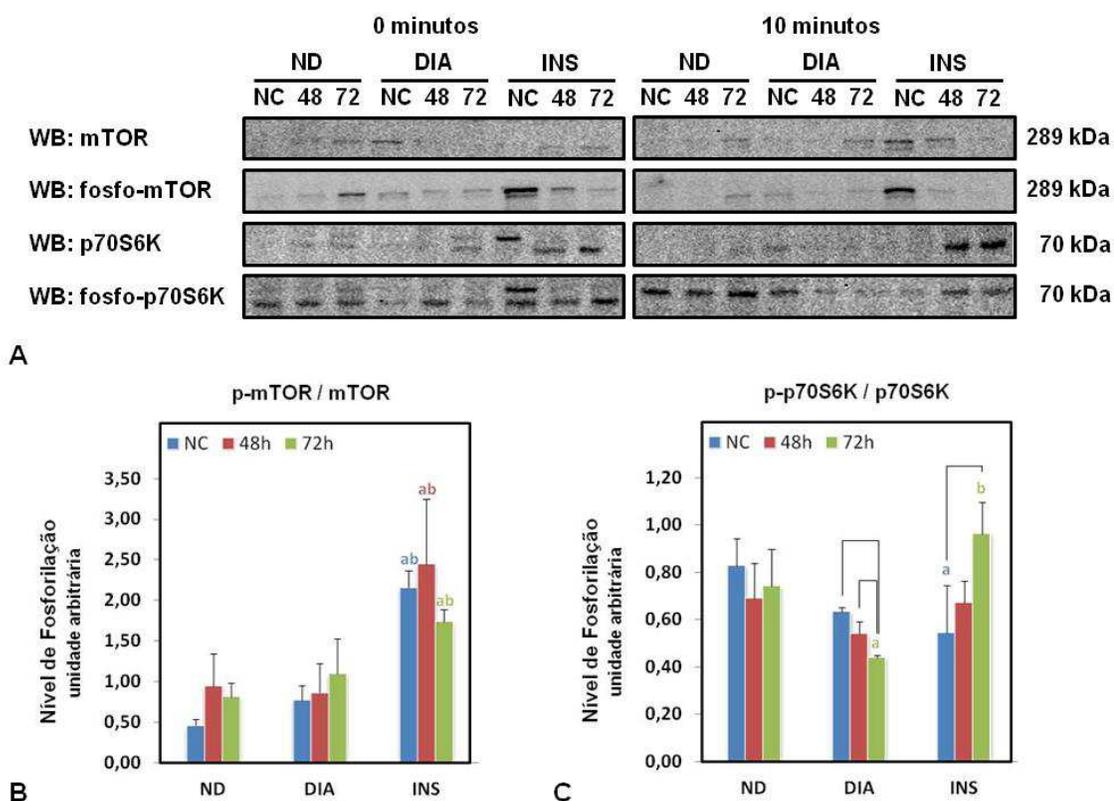
A redução do peso relativo da PV promovida pela castração dos animais do grupo ND foi de aproximadamente 21,3%. Não foi verificada variação no peso relativo da PV dos animais do grupo DIA. Após 72h, foi possível observar uma marcante queda de 45% no peso relativo da PV dos animais do grupo INS.



**Figura 6.** Variações no peso corporal e no peso relativo da PV nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica por castração por 48h e 72h. (A) Peso corporal. (B) Peso relativo da próstata ventral. ND= não diabético, NC = não castrado, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). (a) indica diferença estatística de ND nos respectivos períodos de privação androgênica e (b) indica diferença estatística de DIA nos respectivos períodos de privação androgênica. Os arcos indicam diferenças estatísticas dentro dos grupos após a castração.

## 7.2. Variação no conteúdo e grau de fosforilação da mTOR e p70S6K nos diferentes grupos experimentais

A Figura 7A apresenta dados representativos dos Western blots para as formas total e fosforilada da mTOR e p70S6K, sem estímulo e 10 min após injeção de insulina.



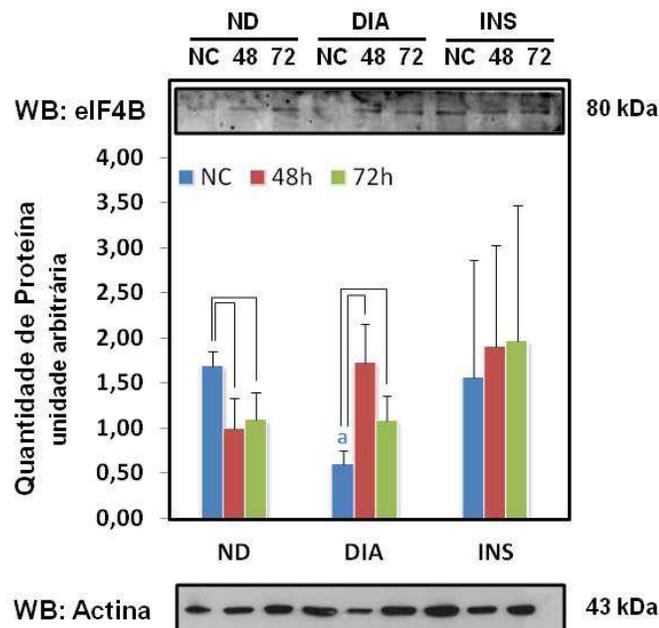
**Figura 7.** Imagens representativas e níveis de fosforilação da mTOR e p70S6K após a privação androgênica e na ausência de insulina. **(A)** Imagens representativas dos Western blots para a forma total e fosforilada da mTOR e da p70S6K nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica por 48h e 72h, sem estímulo ou 10 minutos após injeção de insulina. **(B)** Níveis de fosforilação de mTOR nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica pelos períodos de 48h e 72h após a castração. **(C)** Níveis de fosforilação da p70S6K nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica pelos períodos de 48h e 72h após a castração. ND = não diabéticos, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diab. São indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). (a) indica diferença estatística do grupo ND nas respectivas situações de privação androgênica e (b) indica diferença estatística do grupo DIA nas respectivas situações de privação androgênica. As linhas conectam grupos que apresentaram diferenças estatísticas dentro dos grupos ND, DIA e INS.

Os níveis de fosforilação da mTOR não apresentou alteração marcante entre os grupos ND e DIA, enquanto foi verificado aumento de cerca de 4 vezes nos animais do grupo INS, sem que fossem identificadas alterações em função da privação androgênica dentro de cada grupo (Figura 7B).

Foram também analisados o conteúdo e o nível de fosforilação da p70S6K. Foi observado que os animais do grupo INS apresentaram cerca do dobro da quantidade da proteína p70S6K quando comparadas aos grupos ND e DIA e que estes conteúdos não mostraram variações significativas em resposta à privação androgênica. Com respeito à fosforilação da p70S6K, foi observado que os animais não castrados pertencentes aos grupos DIA e INS apresentaram redução em 23,4% e 34,5%, respectivamente. A castração não promoveu alteração nos níveis de fosforilação da p70S6K nos animais do grupo não diabético (ND), mas mostrou resultados opostos nos grupos DIA e INS, com redução no primeiro e aumento neste último. Nos animais diabéticos houve redução de 30,6% 72h após a castração, enquanto os animais do grupo INS apresentaram aumento de 77,6% no mesmo período (Figura 7C).

### **7.3. Variação no conteúdo e grau de fosforilação de eIF4B nos diferentes grupos experimentais**

A avaliação do conteúdo da proteína eIF4B demonstrou queda de 64,6% nos animais do grupo DIA, quando comparados com aqueles do grupo ND. Este efeito foi revertido pelo tratamento com insulina (grupo INS). De forma interessante, a privação androgênica promoveu diminuição de 41,2% às 48 horas e de 35,4% às 72 horas da castração nos animais ND, enquanto este efeito apareceu invertido nos animais do grupo DIA, com aumentos significativos após a castração. O grupo INS não apresentou alterações após a privação androgênica (Figura 8).

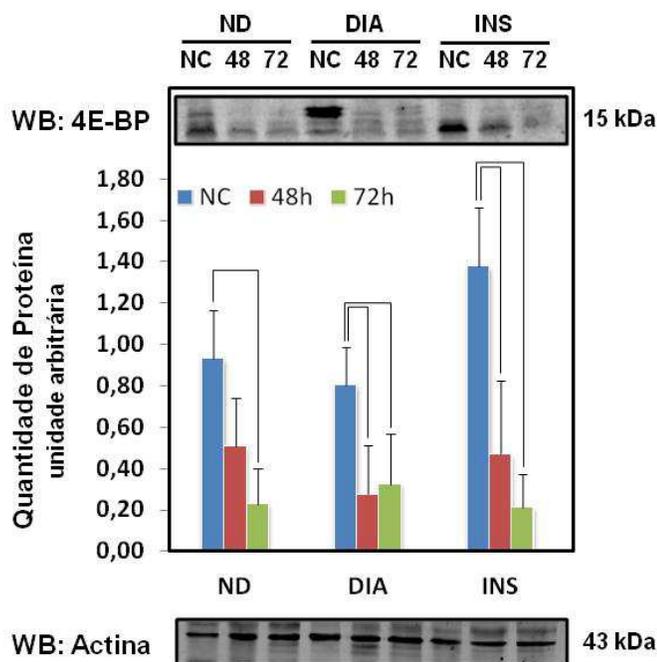


**Figura 8.** Variações no conteúdo da proteína eIF4B nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica pelos períodos de 48h e 72h após a castração. ND = não diabéticos, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). a) indica diferença estatística do grupo ND nas respectivas situações de privação androgênica e (b) indica diferença estatística do grupo DIA nas respectivas situações de privação androgênica. As linhas conectam grupos que apresentaram diferenças estatísticas dentro dos grupos ND, DIA e INS. Apresenta-se também o conteúdo de actina como controle de carregamento dos géis.

#### 7.4. Variação no conteúdo da 4E-BP1 nos diferentes grupos experimentais

O conteúdo de 4E-BP1 não apresentou variação entre os animais não castrados nos grupos experimentais ND, DIA e INS. No entanto, após a privação androgênica ocorreu nítida diminuição do conteúdo de 4E-BP1 nos grupos ND (75,4%), DIA (59,5%) e INS (84,5%), às 72 horas após castração (Figura 9). Os blottings permitiram identificar um acúmulo das formas fosforiladas (identificadas pela variação de massa molecular) nos animais do grupo DIA, quando comparados com os animais ND. As formas fosforiladas

foram praticamente eliminadas nos animais do grupo INS (Figura 9), com nítido efeito cumulativo do estímulo androgênico e pela insulina sobre a fosforilação inibitória da 4EBP1.

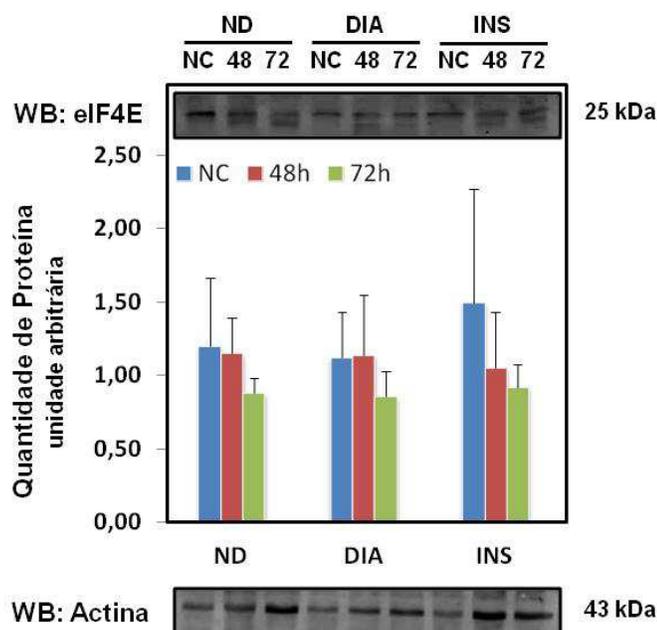


**Figura 9.** Níveis de 4E-BP1 nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica em 48h e 72h após a castração. ND = não diabéticos, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Não houve diferenças estatísticas entre as situações de privação androgênica nos diferentes grupos. As linhas conectam grupos que apresentaram diferenças estatísticas dentro dos grupos ND, DIA e INS. Apresenta-se também o conteúdo de actina como controle de carregamento dos géis.

## 7.5. Variação no conteúdo da eIF4E nos diferentes grupos experimentais

O conteúdo de eIF4E nos não apresentou alterações nos animais não castrados dos diferentes grupos experimentais ND, DIA e INS e nem após a privação androgênica, apresentando-se relativamente constante durante o período analisado (Figura 10), embora não passe despercebida uma redução não significativa às 72hs após castração.

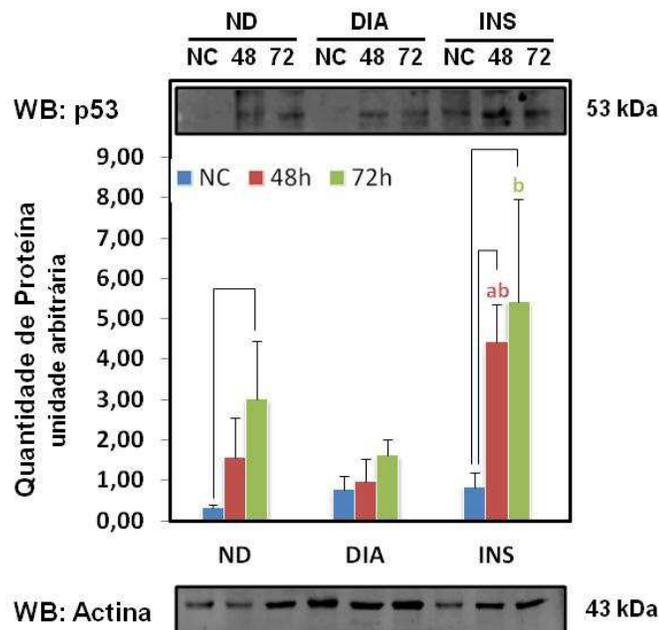
As preparações também deixaram evidente a presença de uma forma de menor massa molecular nas situações de privação androgênica.



**Figura 10.** Níveis de eIF4E nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica em 48h e 72h após a castração. ND = não diabéticos, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores obtidos na quantificação da eIF4E nas diferentes situações, embora as análises revelem nítido acúmulo da forma não fosforilada (menor massa molecular) após a privação androgênica.

## 7.6. Variação no conteúdo de p53 nos diferentes grupos experimentais

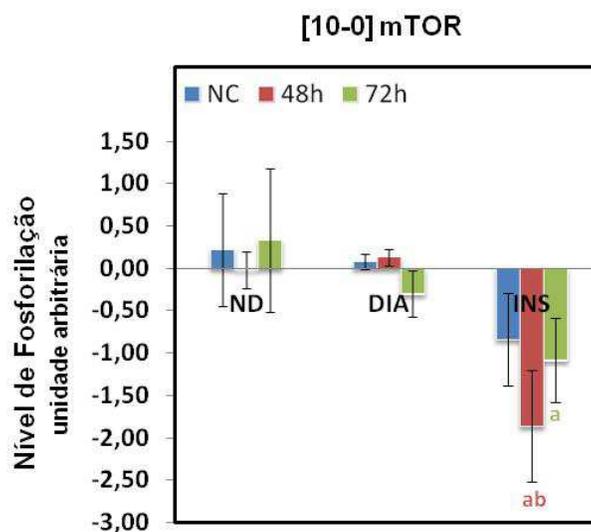
Foi observado que o conteúdo de p53 não variou entre os animais não castrados nos grupos experimentais ND, DIA e INS, mostrando igualmente reduzidos. A privação androgênica promoveu aumentos de 9 vezes no grupo ND e de 6 vezes no grupo INS às 72 hs após castração. O pequeno aumento observado no grupo DIA não mostrou-se estatisticamente significativo. As alterações foram mais marcantes no grupo DIA (Figura 11).



**Figura 11.** Níveis de p53 nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica em 48h e 72h após a castração. ND = não diabéticos, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). a) indica diferença estatística do grupo ND nas respectivas situações de privação androgênica e (b) indica diferença estatística do grupo DIA nas respectivas situações de privação androgênica. As linhas conectam grupos que apresentaram diferenças estatísticas dentro dos grupos ND, DIA e INS. Apresenta-se também o conteúdo de actina como controle de carregamento dos géis.

### 7.7. Análise da resposta imediata da mTOR, p70S6K à insulina

Neste experimento foi verificada a capacidade de resposta imediata à insulina, considerando-se que os resultados observados acima poderiam representar diferenças quanto ao tempo seguido à alimentação do animal. Os níveis de fosforilação da mTOR são normalizados para cada animal neste teste de resposta imediata.

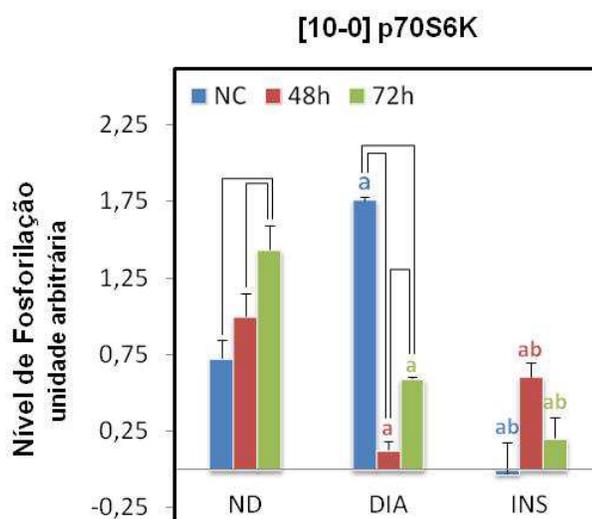


**Figura 12.** Efeito da administração de insulina nos níveis de fosforilação de mTOR. Os níveis de fosforilação do mTOR foram normalizados dez minutos após a administração de insulina. Enquanto nos grupos ND e DIA praticamente não houve variação, no grupo INS houve uma nítida redução dos níveis de fosforilação da mTOR, independente da situação de privação androgênica. ND = não diabético, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). a) indica diferença estatística do grupo ND nas respectivas situações de privação androgênica e (b) indica diferença estatística do grupo DIA nas respectivas situações de privação androgênica.

Na Figura 12 são apresentadas as diferenças entre os níveis de fosforilação da mTOR medidos nos tempos 0 e 10 min após a administração de insulina, podendo-se observar a mesma resposta (oscilando ao redor de zero) para os animais dos grupos ND e DIA. Já nos animais do grupo INS, foi observada uma nítida queda na resposta à insulina, monitorada pela fosforilação de mTOR.

A p70S6K mostrou variação mais evidente frente na resposta imediata à administração de insulina. Enquanto houve variação positiva nos animais do grupo ND e DIA, significativamente maior nestes últimos, não foi verificada variação nos animais do grupo INS. No que diz respeito à privação androgênica, houve surpreendente contraste entre a resposta observada nos animais não diabéticos e diabéticos, sendo que os animais não diabéticos apresentaram aumentos progressivos de acordo com o tempo após castração, enquanto foi verificada uma marcante redução nos animais diabéticos. A

variação observada nos animais do grupo INS foi variável, mas mais semelhante ao grupo ND (Figura 13).

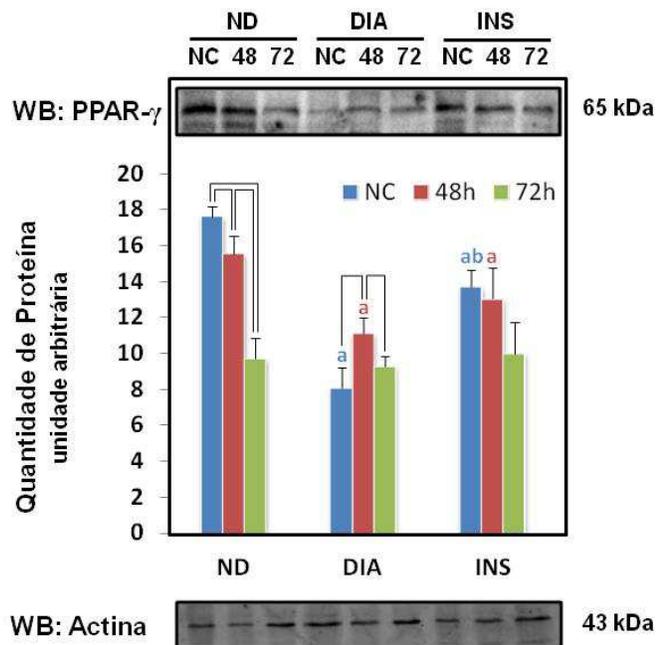


**Figura 13.** Efeito da administração de insulina sobre os níveis de fosforilação de p70S6K. Os valores mostrados correspondem à diferença entre os níveis de fosforilação nos tempos 0 e 10 min após a administração de insulina. Observa-se um aumento na resposta dos animais ND após a castração e uma inversão deste padrão nos animais do grupo DIA. A resposta foi variável nos animais do grupo INS. ND = não diabético, NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). a) indica diferença estatística do grupo ND nas respectivas situações de privação androgênica e (b) indica diferença estatística do grupo DIA nas respectivas situações de privação androgênica.

## 7.8. Comportamento do PPAR $\gamma$

A análise por Western blotting do PPAR $\gamma$  permitiu observar diminuição de 54,2% e 22,2% nos animais não castrados dos grupos DIA e INS, respectivamente, quando comparado ao grupo ND (Figura 14).

A castração promoveu redução de 45% nos grupos ND e um tendência de 27% no grupo INS, enquanto que o grupo DIA a castração promoveu aumento transitório após 48 horas da castração de 38% (Figura 14).



**Figura 14.** Níveis de PPAR $\gamma$  nos diferentes grupos experimentais e efeito da privação androgênica por castração por 48h e 72h. NC = não castrados, DIA = diabético, INS = diabético tratado com insulina. São Indicadas as médias  $\pm$  desvio padrão (n=3). (a) indica diferença estatística de ND nos respectivos períodos de privação androgênica e (b) indica diferença estatística de DIA nos respectivos períodos de privação androgênica. Os arcos indicam diferenças estatísticas dentro dos grupos após a castração.

## 8. DISCUSSÃO

Neste trabalho procuramos identificar os mecanismos responsáveis pela ação anti-apoptótica e pró-sobrevivência da insulina sobre as células epiteliais prostáticas, que foram caracterizadas anteriormente a partir de determinação da cinética de morte celular apoptótica induzida pela castração em animais diabéticos e não diabéticos (Damas-Souza et al. 2010). Procuramos explorar a hipótese de que estas ações estivessem centradas nas vias de sinalização que compreendem os complexos mTORC1 e mTORC2, que são alvos moleculares posicionados no entroncamento das vias de regulação sensíveis a variações de nutrientes e de oxigênio e das vias metabólicas, como síntese proteica, biogênese de ribossomos e progressão do ciclo celular e morte celular (Huang & Manning, 2008; Lian et al. 2008).

A castração cirúrgica (orquiectomia bilateral), assim como o bloqueio androgênico total resulta em queda da concentração de testosterona circulante para níveis abaixo daqueles que podem ser detectados por ensaios de radioimunoensaio (Damas-Souza et al. 2010). Embora exista um certo consenso na literatura de que o procedimento comprometeria cerca de 95% da testosterona circulante, sendo que os 5% restantes seriam oriundos da glândula adrenal, nossa própria quantificação não identificou este resíduo. Por outro lado, o diabetes do tipo I crônico causa alterações degenerativas do epitélio prostático que sobrepõem-se parcialmente com aqueles promovidos pela castração, incluindo perda de massa/volume da glândula de coagulação e regressão da maquinaria de síntese (Carvalho et al. 2003). A ausência do estímulo pela insulina é identificada pelas células não somente pela restrição no transporte de glicose pelas células e estabelecimento de um estado catabólico, acionados pelos sensores de estado energético como AMPK (Proteína Cinase Ativada por AMP), mas também pelo controle negativo exercido sobre as maquinarias de síntese (transcrição e tradução), promoção da autofagia, inibição proliferação e favorecimento da morte celular (Whiteman et al. 2002; Franke et al. 2003; Brazil et al. 2004; Kahn et al. 2005).

As modificações que ocorrem na próstata ventral e que contribuem para a diminuição do tamanho do órgão compreendem a eliminação dos produtos de secreção acumulados na luz dos ácinos, redução das organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi e das vesículas de secreção, todas associadas à atividade secretora

do órgão. Há uma série de alterações vasculares, que incluem aumento da permeabilidade vascular, constrição vascular e morte das células endoteliais, estas resultam em restrição de nutrientes e hipóxia, que foram implicadas por outros grupos na indução de apoptose nas células epiteliais que atingem um máximo no terceiro dia após a castração (Shabsigh et al., 1999; Buttyan et al. 2000). Este primeiro pico de apoptose é intimamente relacionado com a queda dos níveis de andrógeno, enquanto aquela que ocorre no 11º dia após a castração depende da remodelação da matriz extracelular dependente de aumento no conteúdo e ativação de heparanase (Augusto et al., 2008) e MMP's (Bruni-Cardoso et al., 2010), que promovem a anoikis das células epiteliais.

A combinação de castração (ausência do estímulo androgênico) e o diabetes tipo I (ausência de insulina) promove uma antecipação do pico de apoptose das 72 horas para 48 horas após a castração. Quando os animais que se tornaram diabéticos por indução com aloxana são tratados com insulina, o pico de apoptose não somente retorna para o terceiro dia após a castração, como também apresentam redução da frequência de apoptose entre as células epiteliais prostáticas (Damas-Souza et al. 2010).

Nas condições dos presentes experimentos, não verificamos alterações significativas no peso corporal dos animais diabéticos, o que é compatível com um quadro de diabetes agudo. O diabetes entretanto promoveu uma redução no valor médio do peso relativo da próstata ventral, com valor médio menor, mas com grande variação. Quando os animais dos diferentes grupos foram castrados, os pesos relativos da próstata ventral sofreu redução significativa nos grupos ND e INS, enquanto a média do peso relativo da próstata ventral não foi alterada no grupo DIA, sugerindo que os valores médios encontrados para animais NC já eram intrinsecamente menores neste grupo. Isto foi também observado com os níveis de testosterona medidos anteriormente e entendidos como resultados da nossa opção em trabalhar com um quadro de diabetes agudo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a indução do diabetes (DIA) não causou alterações significativas na fosforilação de mTOR, fosforilação de p70S6K no conteúdo de 4EBP, e nem no conteúdo de eIF4E. A alteração marcante encontrada nos animais deste grupo foi a redução do conteúdo de eIF4B (Figura 8). Embora não tenhamos utilizado anticorpos específicos para a 4E-BP1 fosforilada, verificamos que há acúmulo de 4E-BP1 fosforilada (como indicado pela presença de maior quantidade de formas de maior massa molecular) nos animais diabéticos.

Já a castração causou proeminente redução no conteúdo de 4E-BP e de eIF4B, sem alterar os níveis de fosforilação de mTOR e de p70S6K e nem o conteúdo de eIF4E. Foi interessante notar que a castração é efetiva em promover a redução do conteúdo de 4E-BP, mesmo nos animais diabéticos e nos animais diabéticos tratado com insulina (grupos DIA e INS), mostrando uma fina regulação androgênica do conteúdo desta proteína. Ao contrario do que acontece no grupo DIA, a castração foi eficiente em diminuir a fosforilação de 4E-BP, salvaguardada a restrição acima de que esta observação foi feita sem o uso de anticorpos específicos para as formas fosforiladas da proteína.

Aparentemente isto é importante para regular a tradução de produtos de secreção, em detrimento de outros tipos de mRNA, como será explorado a seguir.

A castração também promoveu consistente aumento no conteúdo de p53 e redução nos conteúdos de eIF4E e de eIF4B.

A indução do diabetes (DIA) promoveu diminuição da eIF4B e aumento da fosforilação de 4E-BP. Após a castração e fosforilação da 4E-BP e diminuição do conteúdo de eIF4E. Aparentemente, insulina é o principal regulador de p70S6K, enquanto os andrógenos regulam mais efetivamente a 4E-BP1.

Os animais diabéticos não castrados e tratados com insulina (INS) apresentaram aumento da taxa de fosforilação da mTOR e diminuição da fosforilação da p70S6K. A castração dos animais do grupo INS promoveu aumento no conteúdo de p53, aumento da taxa de fosforilação da p70S6K e diminuição no conteúdo de 4E-BP.

Em resumo, a castração promove alterações marcantes no conteúdo de p53 e de 4E-BP, sugerindo uma situação de estresse celular, provavelmente resultado de hipóxia, enquanto no diabetes parece haver queda da fosforilação de p70S6K, o que estaria associado a um comprometimento da síntese de proteínas, compatível com um estado catabólico.

A castração resultou em aumento de 9 vezes no conteúdo de p53 no grupo ND e de 6 vezes no grupo DIA. Quando ativada a p53 é responsável por transcrever genes como PTEN, proteína de ligação com IGF-3 (IGF-1BP-3), proteína esclerose tuberosa 2 (TSC-2), e a subunidade beta da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), que regulam negativamente as vias PI3K e mTOR (Feng et al., 2007; 2010). Além de seu papel específico nos complexos de regulação do ciclo celular, estas atividades contribuem para inibir o crescimento celular, resultando em apoptose induzida por p53 e a atividade de autofagia (Feng et al., 2005).

Já foi demonstrado que a castração promove alterações na expressão de genes relacionados com apoptose e resposta imune específica na próstata ventral, sendo tanto o mRNA quanto a proteína PTEN estão aumentados nas células epiteliais luminais, sugerindo que esta fosfatase tenha papel mediador da apoptose na próstata ventral na ausência de andrógenos (Desai et al., 2004).

As 4E-BP1 e 4E-BP2 hipofosforiladas sequestram eIF4E inibindo a formação do complexo ativo eIF4F (Clemens, 2000; Mamane et al., 2007). A fosforilação da 4E-BP1 em múltiplos sítios promove a liberação do eIF4E que pode participar da estruturação do complexo. A fosforilação do 4E-BP1, em vários locais, diminui a afinidade desta proteína para eIF4E (Mamane et al., 2007). O eIF4F é composto por três subunidades: eIF4E, que é a proteína de ligação ao cap; eIF4A, que é uma helicase de RNA, e a proteína eIF4G que faz a ancoragem do complexo ao ribossomo através da interação com eIF3, que se liga diretamente ao ribossomo (Maitra et al. 1982).

A fosforilação de 4E-BP1 é influenciada por uma vasta gama de estímulos extracelulares. Em geral, as condições que promovem o crescimento celular, atuam mediando a fosforilação de 4E-BP1, aumentando a síntese de proteínas. Já condições inibidoras do crescimento e estresse fisiológico resultam em desfosforilação, regulando negativamente a síntese de proteínas (Mamane et al., 2007) e, por outro lado, favorecem a expressão de outras proteínas contendo regiões IRES (*internal ribosomal entry site*), que auxiliaria na capacidade da célula em sobreviver a mecanismos de estresse (Grover et al., 2011).

Foi demonstrado aumento de 20 vezes da proteína HIF1- $\alpha$  (Fator induzido por hipóxia 1- $\alpha$ ) na próstata 48 horas após a castração (Shabisgh et al. 2001). A resposta celular à hipóxia é mediada principalmente pela hipóxia-inducible factor-1 (HIF1), um fator de transcrição que coordena a indução da transcrição de genes induzidos por hipóxia (Lassus et al., 2002) e inibição da tradução, como consequência da fosforilação de eIF2 $\alpha$  por PERK (Koumenis et al. 2002; Blais et al. 2004) e desfosforilação da 4E-BP1, um repressor de eIF4E, como mencionado acima (Tinton et al., 1999).

Nossos resultados reforçam a ideia de que as células epiteliais prostáticas são submetidas a uma condição de hipóxia, que resultaria na desfosforilação da 4E-BP1 e aumento da p53.

Atualmente, acredita-se que a p70S6K media preferencialmente a tradução de RNA mensageiros que codificam proteínas ribossomais afetando a taxa global da síntese de proteínas (Findlay et al. 2005).

A ação da p70S6K sobre eIF4B pode aumentar a ação de helicase desta molécula e permitir a desestruturação da região 5'-UTR dos RNA mensageiros (Raught et al., 2004).

A estruturas secundárias na região 5'-UTR são importantes na regulação da tradução. Dados experimentais sugerem que estruturas secundárias moderadamente estáveis, ou seja, com energia de ativação ( $\Delta G$ ) acima -30 kcal/mol, não pára a migração da subunidade 40S dos ribossomos, mas quando a estrutura é altamente estável com  $\Delta G$  acima -50 kcal/mol, ocorre a diminuição da tradução. Os efeitos inibitórios destas estruturas pode ser superada pelo aumento do nível de eIF4A, uma subunidade do complexo eIF4F que promove a desestruturação de estruturas secundárias do mRNA na cooperação do eIF4B e eIF4G (Svitkin et al., 2001).

Muitos dos reguladores do ciclo celular e proto-oncogenes possuem a região 5'-UTR altamente estruturada (De Benedetti et al., 2004). Os achados referentes à inibição de 4E-BP1 sugere uma regulação positiva dos reguladores do ciclo celular, reforçando a formação do complexo eIF4F e a atividade de helicase dependente de ATP do eIF4A.

Nesta perspectiva, nosso trabalho demonstra que a seleção de células após a indução de diabetes e castração é proveniente da alteração da p70S6K/eIF4B por regulação do ciclo celular através da ação de helicase da eIF4A (De Benedetti et al., 2004) e condição de hipóxia através da desfosforilação da 4E-BP1 (Tinton et al., 1999).

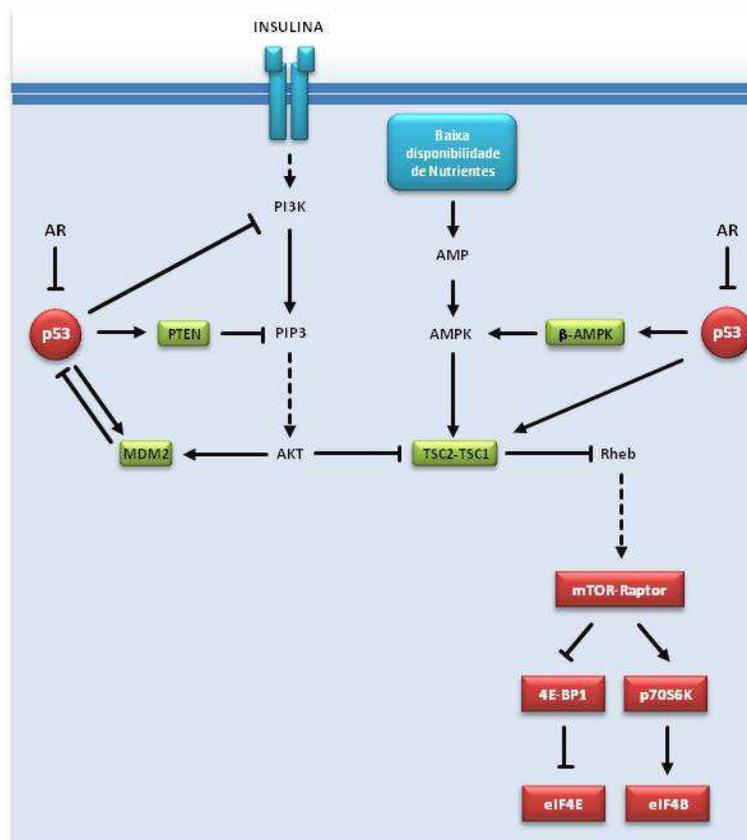
Os diabéticos tratados com insulina (INS) apresentaram aumento da taxa de fosforilação da mTOR e a castração restaurou a taxa de fosforilação da p70S6K, diminuição da fosforilação e conteúdo de 4E-BP e aumentos de p53.

A administração de insulina parece amenizar os efeitos do diabetes e aumentar a quantidade de p53 visando inibir e corrigir o aumento da taxa de fosforilação da mTOR. Este processo é corroborado pela insensibilização da via da mTOR ao estímulo imediato da insulina. Assim, a seleção de células após a castração nos diabéticos tratados com insulina é proveniente da condição de hipóxia, que promove a desfosforilação da 4E-BP1 (Tinton et al., 1999) e aumento da p53 para normalização da mTOR (Feng et al., 2007; Feng et al., 2010)..

Também foi demonstrado que o PPAR $\gamma$ , um receptor nuclear que regula a adipogênese (Virkamäki et al., 1999), apresenta-se diminuído na ausência de andrógenos e insulina, sendo que o tratamento com insulina não restaura a quantidade do PPAR $\gamma$ .

Além de controlar a tradução a 4E-BP e p70S6K controlam o metabolismo. Ativação de mTOR e, conseqüentemente, a fosforilação da 4E-BP e p70S6K promove os processos anabólicos em parte através da tradução. Assim, camundongos com deficiência para 4E-BP ou p70S6K demonstram metabolismo alterado. Camundongos sem 4EBP1 e 4E-BP2 são hipersensíveis a dieta rica em gorduras e se tornam obesos. Além disso, eles exibem um fenótipo insensibilidade à insulina e intolerância à glicose (Le Bacquer et al., 2007).

Camundongos sem p70S6K são resistentes ao envelhecimento e indução de obesidade por dieta, exibindo aumento da sensibilidade para insulina (Um et al., 2004).



**Figura 15.** Mecanismo proposto de regulação da sobrevivência e crescimento prostático

## 9. CONCLUSÃO

Os mecanismos de adaptação das células epiteliais prostáticas de rato na ausência andrógeno e/ou insulina parecem envolver alterações de regulação situado *downstream* dos complexos mTOR1-mTOR2.

Os resultados obtidos no presente trabalho identificam um nítida função do estímulo androgênico na regulação negativa de eIF4E (via 4E-BP1) e positiva de eIF4B. Ficou claro também que a insulina regula positivamente a fosforilação de 4E-BP1.

Com base nestas informações, propomos que: (I), a presença de testosterona e insulina é essencial para a manutenção do estado anabólico da próstata; (II), uma vez que o suprimento de testosterona é comprometido a insulina mantém parcialmente a atividade de tradução, como preferência para moléculas com mRNA estruturado na sua porção 5'-UTR, como aquelas encontradas em proteínas de choque térmico e reguladores do ciclo celular; (III), a combinação de privação androgênica e de insulina promove bloqueio intenso da atividade de síntese proteica; (IV), e que a administração de insulina reestabelece parte da tradução.

Assim dois mecanismos parecem essenciais para a manutenção e seleção das células epiteliais prostáticas de ratos: (I), p53/4E-BP/eIF4E na ausência de andrógeno; (II), p70S6K/eIF4B na ausência de insulina.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF (2004) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 25: 50-56.
- Augusto TM, Felisbino SL, Carvalho HF (2008) Remodeling of rat ventral prostate after castration involves heparanase-1. *Cell Tiss Res* 332: 307-315.
- Augusto TM, Rosa-Ribeiro R, Carvalho HF (2011) Neonatal exposure to high doses of 17 $\beta$ -estradiol results in inhibition of heparanase-1 expression in the adult prostate. *Histochem Cell Biol.* 136 (5): 609-615.
- Augusto TM, Bruni-Cardoso A, Damas-Souza DM, Zambuzzi WF, Kühne F, Lourenço LB, Ferreira CV, Carvalho HF (2010) Oestrogen imprinting causes nuclear changes in epithelial cells and overall inhibition of gene transcription and protein synthesis in rat ventral prostate. *Int J Androl.* 33 (5):675-685.
- Aümuller G (1979) Prostate gland and seminal vesicles. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Edited by A. Okche and L. Vollrath. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, vol. VII/6.p.1.
- Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR (1995) Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology* 136: 4368-76.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. (1984) The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 132: 474–479.
- Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC. (2004) Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7469–7482.
- Berger AP, Deibl M, Halpern EJ, Lechleitner M, Bektic J, Horninger W, Fritsche G, Steiner H, Pelzer A, Bartsch G, Frauscher F.(2005) Vascular damage induced by type 2 diabetes mellitus as a risk factor for benign prostatic hyperplasia. *Diabetologia* 48:784–789.

- Boon TA, Van Venrooji GE, Eckhardt MD (2001) Effect of diabetes mellitus on lower urinary tract symptoms and dysfunction in patients with benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep* 2: 297–301.
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004) *Trends Biochem Sci* 29: 233–242.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J (1999) Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6):307-313
- Brooks RV (1975) Androgens. *Clin Endocrinol Metab.* 4(3):503-20.
- Bruni-Cardoso A, Carvalho HF (2007) Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. *Anat Rec (Hoboken)* 290: 1223-1232.
- Bruni-Cardoso A, Augusto TM, Pravatta H, Damas-Souza DM, Carvalho HF (2010) Stromal remodelling is required for progressive involution of the rat ventral prostate after castration: Identification of a matrix metalloproteinase-dependent apoptotic wave. *Int J Androl.* 33: 686-695.
- Bruni-Cardoso A, Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF (2008) Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. *Histochem Cell Biol.* 129: 805-815.
- Buttayan R, Ghafar MA, Shabsigh A (2000) The effects of androgen deprivation on the prostate gland: cell death mediated by vascular regression. *Curr Opin Urol.* 10: 415-420.
- Cagnon VH, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani R, Padovani CR, Martinez FE (2000) Ultrastructura study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue Cell* 32: 275-283.
- Carvalho HF, Line SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20: 809-819
- Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PSL (1997a) Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. *Tissue Cell* 29: 163-170

- Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR (1997b) The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. *Prostate* 32: 27-34.
- Carvalho CA, Camargo AM, Cagnon VH, Padovani CR (2003) 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* 270:129-36.
- Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ (2000) Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 7, 603–615.
- Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Eberhardt MS, Flegal KM, Engelgau MM, Saydah SH, Williams DE, Geiss LS, Gregg EW (2006) Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* 29: 1263-1268.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinol Rev* 8: 338-362.
- Damas-Souza, D. M., Carvalho, H. F., & Oliveira, C. A (2010) Insulin Affects Tissue Organization and the Kinetics of Epithelial Cell Death in the Rat Ventral Prostate After Castration. *Journal of Andrology*, 31(6), 631-640.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
- De Benedetti A, Graff JR (2004) eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23:3189-3199.
- Desai KV, Michalowska AM, Kondaiah P, Ward JM, Shih JH, Green JE (2004) Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 18: 2895-2907.

- Dinulovic D, Radonjic G. Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl* 25: 277–293.
- Donjacour AA, Cunha GR (1988) The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* 128: 1-14.
- Dong Q, Lazarus RM, Wong LS, Vellios M, Hamndlesman DJ (1991) Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 131: 49-55.
- Farnsworth WE. (1999) Prostate stroma: physiology. *Prostate*. 38:60-72.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8204-8209.
- Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67, 3043-3053.
- Feng, Z., Spring, C., Perspect, H., Spring, C., Perspectives, H., & Spring, C (2010) p53 Regulation of the IGF-1/AKT/mTOR Pathways and the Endosomal Compartment. *Spring*. doi: 10.1101/cshperspect.a001057.
- Findlay GM, Harrington LS, Lamb RF(2005) TSC1-2 tumour suppressor and regulation of mTOR signalling: linking cell growth and proliferation? *Curr Opin Genet Dev.* 15(1):69-76.
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) *Oncogene* 22: 8983–8998.
- García-Flórez M, Oliveira CA, Carvalho HF (2005) Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res.*38:487-497.
- Gelmann E (2002) *Molecular Biology of the Androgen Receptor.* *Biol Neoplasia* 20: 3001-3015.

- Goes RM, Zanetoni C, Tomiosso TC, Ribeiro DL, Taboga SR (2007) Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron* 38: 231–236.
- Grover R, Sharathchandra A, Pnnuswamy A, Khan D, Das S (2011) Effect of mutations on the p53 IRES RNA structure. Implications for de-regulation of the synthesis of p53 isoforms. *RNA Biol* 8: 132-142.
- Guyton AC (1984) *Tratado de Fisiologia Medica*. 6ed. Interamericana. Rio de Janeiro.
- Hammarsten J, Hogstedt B (2001) Hyperinsulinemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 39:151–158.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR (1991) Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol. Reprod.* 45: 308-321.
- Heinlein CA, Chang C (2004) Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews* 25: 276-308.
- Huang J, Manning B (2008) The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412: 179-190.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS (2004) Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *Journal of Androl* 25: 330-337.
- Ikedo, K., Wada, Y., Foster Jr., H.E., Wang, Z., Weiss, R.M., Latifpour, J., 2000. Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor- $\beta$ . *J Urol* 164: 180–185.
- Ilio KY, Nemeth JA, Sensibar JA, Lang S, Lee C (2000) Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. *Prostate* 43: 3-10.
- Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridge GP (2000). Evidence That Estrogens Directly Alter Androgen-Regulated Prostate Development. *Endocrinology* 141: 3471-3478.

- Kirchick HJ, Keyes PL, Frye BE (1979) An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare's serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 105: 1343-1349.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1:15-25.
- Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA (1995) Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J* 14: 4288-4295.
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG. (2002) Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* 22, 7405–7416.
- Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, Isaacs JT, Dahiya R, Cunha GR (2001) Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ.* 8:192-200.
- Kyprianou N, Isaacs JT (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinol* 122: 552-562.
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997a) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 11439-11443.
- Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997b) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 21403-21407.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao S (1990). Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 43: 1079-1086.

- Li BY, Liao XB, Fujito A, Thrasher JB, Shen FY, Xu PY (2007) Dual androgen-response elements mediate androgen regulation of MMP-2 expression in prostate cancer cells. *Asian J Androl* 9:41-50.
- Lian J, Yan X-H, Peng J, Jiang S-W (2008) The mammalian target of rapamycin pathway and its role in molecular nutrition regulation. *Mol Nutr Food Res* 52: 393-399.
- Liao X, Thrasher B, Pelling J, Holzbeirlein J, Xiang Q, Sang A, Benyli (2003) Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. *Endocrinology* 144:1656-1663.
- Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK, Sonenberg N (2007) Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE* 2, 242.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1993) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 20(3):321-44.
- McNeal JE, Stamey TA, Hodge KK (1988) The prostate gland: morphology, pathology, ultrasound anatomy. *Monogr Urol* 9:36-54.
- Nastiuk KL, Krolewski JJ (2008) FLIP-ping out: death receptor signaling in the prostate. *Cancer Biol Ther* 7: Epub ahead of print.
- Nazareth LV, Weigel NL (1996) Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem.* 271(33):19900-19907.
- Nemeth HA, Lee C (1996) Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *Prostate* 28: 124-128.
- Nonneman DJ, Ganjam VK, Welshons WV, Vom Saal FS (1992) Intrauterine position effects on steroid metabolism and steroid receptors of reproductive organs in male mice. *Biol Reprod* 47:723-729.
- Oksanen A, Tuohimaa P (1975) Impaired 3H-testosterone uptake and metabolism in the accessory sex glands of diabetic castrated male rats. *Horm Res* 6: 157-168.

- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 9.: 1441–1447.
- Pfau A, Caine M (1980) In: Spring-Mills E, Hafez ESSE (eds) *Male Accessory Sex Glands*. Elsevier-North-Holland, New York, 357.
- Powell WC, Domann Jr. FE, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden T (1996) Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 29: 159-168 22.
- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*. 9: 1441-1447.
- Prins GS, Birch L, Greene GL (1992) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129: 3187-3199.
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Christopher T, Oliver P, Bieberich C (2001) Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev* 13: 241-252.
- Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J*. 23:1761-1769.
- Ribeiro DL, Marques SF, Alberti S, Spadella CT, Manzato AJ, Taboga SR, Dizeyi N, Abrahamsson PA, Góes RM (2008) Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol* 89: 276-283.
- Robbins S.L. (1989) *Doenças Sistêmicas*. In: *Diabetes Mellitus. Patologia Estrutural e Funcional*, pp. 238–250 (editor S.L. Robbins), Canadá: W.B. Saunders Company.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.

- Sasaki M , Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R (2003) Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Molec and Cell Endocr* 202: 201-/207.
- Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D (1987) The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 138: 190-194.
- Sensibar JA, Liu XX, Patai B, Alger B, Lee C (1991) Characterization of castration-induced cell death in the rats prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. *Prostate* 16: 263-276.
- Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R (1999) Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 256: 403-411.
- Shabsigh A, Ghafar MA, de la Taille A, Burchardt M, Kaplan SA, Anastasiadis AG, Buttyan R. (2001) Biomarker analysis demonstrates a hypoxic environment in the castrated rat ventral prostate gland. *J Cell Biochem.* 81: 437-444.
- Shapiro E, Hartanto V, Lepor H (1992) The response to alpha blockade in benign prostatic hyperplasia is related to the percent area density of prostate smooth muscle. *Prostate* 21: 297-307.
- Smith MR, Bae K, Efstathiou JA, Hanks GE, Pilepich MV, Sandler HM, Shipley WU (2008) Diabetes and mortality in men with locally advanced prostate cancer: RTOG 92-02. *J Clin Oncol.*26: 4333-4339.
- Soudamani S, Yuvaraj S, Malini T (2000) Balasubramanian K. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue Cell* 32: 275- 283.
- Soudamani, S., Yuvaraj, S., Malini, T., & Balasubramanian, K (2005) Experimental Diabetes Has Adverse Effects on the Differentiation of Ventral Prostate During Sexual Maturation of Rats. *Diabetes*, 1289(May), 1281-1289.

- Stephens L, Jackson T, Hawkins PT (1993) Synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in permeabilized neutrophils regulated by receptors and G-proteins. *J Biol Chem* 268:17162-17172.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77.
- Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377: 173-177.
- Suthagar E, Soudamani S, Yuvaraj S, Ismail Khan A, Aruldas MM, Balasubramanian K (2009) Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomed Pharmacother*. *Biomed Pharmacother* 63: 43-50.
- Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N (2001) The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* 7:382-394.
- Takeda H, Suematsu N, Mizuno T (1990) Transcription of prostatic steroid binding protein (PSBP) gene is induced by epithelia-mesenchymal interaction. *Development* 110: 273-281.
- Tesone M, Oliveira-Filho RM, Valle LB, Calvo JC, Baranao JL, Foglia VG, Charreau EH (1980) Androgen receptors in the diabetic rat. *Diabetologia* 18: 385-390.
- Timms TL, Truong LD, Merz VW, Krebs T, Kadmon D, Flanders KC, Park SH, Thompson TC (1994) Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- $\beta$  expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology* 134: 1039-1045.
- Tinton SA, & Buc-Calderon PM (1999) Hypoxia increases the association of 4E-binding protein 1 with the initiation factor 4E in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 446, 55–59.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.

- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 45, 253–258.
- Virkamäki A, Ueki, K., & Kahn RC (1999) Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 103: 931-943.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619-628.
- Ziada A, Rosenblum M, Crawford ED (1999) Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology* 53:1–6
- Waterman MR, Keeney DS (1992) Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype. *Horm Res*. 38(5-6):217-21.
- Webber MM (1981) Polypeptide hormones and the prostate. *Prog Clin Biol Res* 75B: 63-88
- Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002) *Trends Endocrinol. Metab* 13: 444–451
- Yono M, Pouresmail M, Takahashi W, Flanagan JF, Weiss RM, Latifpour J (2005) Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes Springer-Verlag.

## 11. ANEXO

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada “Caracterização das vias de sinalização responsáveis pela morte de células epiteliais prostáticas em resposta à privação androgênica e pelo efeito protetor causado pela insulina”:

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

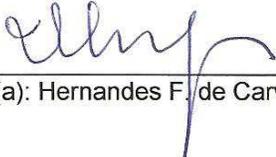
( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

( x ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 1887-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia – Departamento de Biologia Estrutural e Funcional.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

  
Aluno(a): Danilo Marchete Damas de Souza

  
Orientador(a): Hernandes F. de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura