

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANILO MARCHETE DAMAS DE SOUZA

**“EFEITO DA INSULINA SOBRE A CINÉTICA DE MORTE DE CÉLULAS
EPITELIAIS PROSTÁTICAS APÓS CASTRAÇÃO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

DANILO MARCHETE DAMAS DE SOUZA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So89e

Souza, Danilo Marchete Damas de
Efeito da insulina sobre a cinética de morte de células
epiteliais prostáticas após castração / Danilo Marchete
Damas de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Próstata. 2. Células epiteliais. 3. Insulina. 4.
Castração. 5. Apoptose. I. Carvalho, Hernandes
Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Insulin influences tissue changes and the kinetics of epithelial cell death in the rat ventral prostate after castration.

Palavras-chave em inglês: Prostate; Epithelial cells; Insulin; Castration; Apoptosis.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Hernandes Faustino de Carvalho, Patrícia Gama, Everardo Magalhães Carneiro.

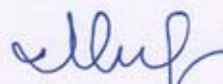
Data da defesa: 12/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 12 de março de 2009

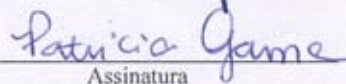
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)



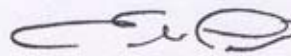
Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Gama



Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Aos meus pais, Roberto e Irene,
ao meu irmão Flávio.

Por amor e fé que vocês me depositam e fazem-me prosperar.

AGRADECIMENTOS

Durante estes dois anos que foi sucedido depois do treinamento técnico, passei por um intenso aprendizado com meus colegas de laboratório, técnicos e professores, que colaboraram para o meu crescimento profissional e pessoal. Estou deixando registrado nesta tese o meu agradecimento, um gesto pequeno para atitudes tão grande destas pessoas que estiveram ao meu lado:

Não existem palavras que expressem a minha gratidão ao Prof. Hernandes, que acreditou em meu potencial aceitando me orientar, demonstrando ser um grande professor e companheiro nos trabalhos, sempre me ajudando, desde o início com a preparação para exame de admissão no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural até agora, com os experimentos, resultados, interpretação e redação.

Aos professores do meu curso de graduação da Universidade São Francisco que, mesmo não participando diretamente desta etapa da minha vida, ajudaram-me a chegar até aqui.

Manuel e Esdras, que me ensinaram os primeiros passos na experimentação.

Alexandre e Taize que auxiliaram na castração, em novas técnicas e na amizade e união nos trabalhos e na leitura de meus manuscritos.

Rony que, apesar de conhecer há pouco tempo, parece um irmão, compartilhando todos os momentos finais desta tese, dando força e ajudando no preparo de soluções.

Elusa e Lílian Cardoso, pela ajuda nas dosagens hormonais.

Augusto e Guilherme, que tornam a convivência no laboratório mais divertida.

Professora Valéria e Vagner, por ensinar a manipular e obter os animais diabéticos.

A Professora Heidi, que sempre tem seu laboratório de portas abertas para eu utilizar o capturador de imagem.

Aos amigos do departamento de Biologia Celular e de outros departamentos que são muitos e, por isso, fica difícil listar, agradeço pelos bons momentos que passamos juntos.

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

Ao Departamento de Biologia Celular e seus funcionários.

Ao CNPq, Capes/DS e FAPESP.

Meus pais e irmão, que estiveram ao meu lado dando apoio, carinho e acreditando em cada passo dessa jornada de aprendizado e desafios. Sou apaixonado por vocês!

“A vida não promete segurança, mas assegura oportunidades.”

Provérbio chinês, século X.

“Experiência não é o que acontece a um homem, mas é o que um
homem faz com o que lhe acontece.”

Aldous Huxley (1894-1963)

Escritor inglês

RESUMO

Na próstata, o crescimento e a fisiologia epitelial dependem da expressão dos receptores de hormônios esteróides por alguns tipos celulares e das interações parácrinas que se estabelecem a partir da resposta inicial a estes hormônios, associados a uma complexa interação com hormônios somatotróficos como insulina, prolactina e hormônio de crescimento. Este estudo investigou a ação da insulina sobre a sobrevivência das células epiteliais prostáticas frente à privação androgênica, e sua possível contribuição para a defasagem entre a queda dos níveis de andrógeno (até 12 horas após castração) e o pico de morte das células epiteliais (72 horas após castração), monitorando a cinética de morte celular em animais castrados em comparação com aquelas de animais diabéticos induzidos com aloxana. A indução do diabetes causou uma redução da densidade de volume e do volume do epitélio. Esta redução foi maior com a aplicação de insulina. O mesmo foi observado para as células musculares lisas, mas não para o compartimento luminal e estromal. A castração tem um efeito tardio sobre o epitélio, com reduções tanto da densidade de volume como do volume somente 96 horas após castração. Já nos animais diabéticos o efeito é observado já às 24h após castração. Relação inversa se dá com o lúmen. Embora tenham sido observados aumentos na densidade de volume do estroma, não houve efeito significativo no volume final após 120 horas. No caso das células musculares lisas, não foi observado efeito da castração, no período analisado. Já no caso dos animais diabéticos, há uma redução significativa dentro do período analisado. A reação de Feulgen permitiu analisar a morfologia nuclear e a observar uma antecipação do pico de apoptose para 48 horas após a castração na ausência de insulina. A aplicação de insulina restaura a posição do pico para as 72h e diminui a taxa de morte celular em todos os pontos experimentais analisados, antes e após castração. Os mecanismos moleculares envolvidos nestas respostas estão relacionados à privação androgênica associada a um elemento de sobrevivência celular promovido pela insulina. Na ausência desta, ocorre uma antecipação da morte das células epiteliais. Esta hipótese é reforçada pela observação de que a insulina exógena não somente restaura o pico às 72 horas, como reduz a taxa de apoptose, inclusive nos animais não castrados.

ABSTRACT

Prostate growth and physiology depend on the expression of steroid receptors in some cell types and on paracrine interactions established after the initial response to these hormones in association with somatotrophic hormones such as insulin, prolactin and growth hormone. This study investigates the action of insulin on the survival of prostate epithelial cells in response to androgen deprivation, and its possible contribution to the lag between the drop in androgen levels (within 12 hours after castration) and the peak of the epithelial cell death (at 72 hours after castration), by monitoring the kinetic of cell death in castrated animals as compared to that in alloxan-induced diabetic animals. Diabetes induction caused a reduction in epithelial volume density and volume. This reduction was higher with the administration of insulin. The same was observed for the smooth muscle cells, but not for the luminal and stromal compartments. Castration has a later effect on the epithelium of non-diabetic animals, with reduction in the volume density and volume only 96 hours after castration. In the diabetic animals, the effect is already observed 24 hours after castration. The opposite behavior was observed for the lumen. There were increases in the volume density of the stroma, but no effect on its volume 120 hours after castration. Feulgen reaction allowed the examination of the nuclear morphology and the observation of an anticipation of the peak of apoptosis to 48 hours after castration in the absence of insulin. Insulin administration restores the peak to 72 hours and reduces the rate of cell death in all experimental points. It is suggested that an element of cell survival promoted by insulin acts in concert with the response to androgen deprivation. This idea is strengthened by the observation that insulin not only restores the apoptosis peak at 72 hours, but also reduces the percentual of apoptosis cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT-p	Proteína cinase B, do inglês <i>phosphorylated protein kinase B</i>
AR	Receptor de andrógeno, do inglês <i>androgen receptor</i>
ARE	Elemento responsivo a andrógeno, do inglês <i>androgen respond element</i>
BAD	Promotor de morte (celular) associado aos Bcl-xL/Bcl-2, do inglês Bcl-xL/Bcl2-Associated Death Promoter
BB/Wor	<i>BioBreeding/Worcester</i>
Bcl	Célula β de linfoma/leucemia, do inglês β -cell lymphoma/leukemia
BMP-4	Proteína da morfogênese do osso 4, do inglês <i>bone morphogenetic protein 4</i>
CML	Célula muscular lisa
DHT	Diidrotestosterona, do inglês <i>dihydrotestosterone</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógeno, do inglês <i>estrogen receptor</i>
ERK	Cinase reguladora extracelular, do inglês <i>extracellular regulated kinase</i>
ERα	Receptor de estrógeno alfa, do inglês <i>estrogen receptor alfa</i>
ERβ	Receptor de estrógeno beta, do inglês <i>estrogen receptor beta</i>
FGF-7	Fator de crescimento fibroblástico 7, do inglês <i>fibroblast growth factor 7</i>
FGF-10	Fator de crescimento fibroblástico 10, do inglês <i>fibroblast growth factor 10</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês <i>gonadotropin-releasing hormone</i>
HCl	Ácido clorídrico
HGF	Fator de crescimento de hepatócito, do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>
HSP	Proteína de choque térmico, do inglês <i>heat shock protein</i>
IGF-1	Fator de crescimento ligado a insulina, do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
IRS	Substrato do receptor de insulina, do inglês <i>insulin receptor substrate</i>

IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1, do inglês <i>insulin receptor substrate 1</i>
JNK	Cinase amino terminal jun, do inglês <i>jun amino terminal kinase</i>
Jun	Oncogene jun, do inglês <i>jun oncogene</i>
mTORC1	Alvo da rapamicina em mamíferos 1, do inglês <i>mammalian target of rapamycin 1</i>
mTORC2	Alvo da rapamicina em mamíferos 2, do inglês <i>mammalian target of rapamycin 2</i>
NIP	Neoplasia intra-epitelial
NOD	Não obeso diabético, do inglês <i>non-obese diabetic</i>
p85	Subunidade da PI3-quinase
PI3-Kinase	Fosfatidil-inositol 3 quinase, do inglês <i>phosphoinositol 3 kinase</i>
PKB/ AKT	Proteína quinase B, do inglês <i>protein kinase B</i>
PPAR	Receptor de ativadores da proliferação de peroxissomos, do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PV	Próstata ventral
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
Ser	Serina
SH2	Homologia ao Src 2, do inglês <i>Src homology 2</i>
SHH	<i>sonic hedgehog homolog</i>
SHPTP-2	Proteína tirosina fosfatase 2, do inglês <i>protein tyrosine phosphatase 2</i>
TdT	Transferase terminal de desoxiribonucleotídeos, do inglês Terminal deoxynucleotidyl transferase"
TSC1	Complexo da esclerose tuberosa 1, do inglês <i>tuberous sclerosis complex 1</i>
TSC2	Complexo da esclerose tuberosa 2, do inglês <i>tuberous sclerosis complex 2</i>
TUNEL	Reação de adição de dUTP-biotina mediada por TdT, do inglês TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling
Vv%	Densidade de volume

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Desenvolvimento da próstata.....	1
1.2. Anatomia e histologia prostática	2
1.3. Endocrinologia prostática.....	4
1.5. Efeito da insulina.....	8
1.6. Enfermidades prostáticas e diabetes	10
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	11
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Animais e protocolo experimental	12
4.2. Dosagem sérica de insulina, testosterona e estradiol.....	13
4.3. Análise estereológica	13
4.4. Detecção de apoptose e determinação do índice apoptótico.....	13
4.4.1. Reação de Feulgen	13
4.4.2. Reação de TUNEL	14
4.5. Análises estatísticas.....	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Peso Corporal	15
5.2. Peso Prostático	16
5.3. Condições hormonais	17
5.4. Histologia e Distribuição dos Compartimentos Teciduais	19
5.5. Variação no número de núcleos apoptóticos	24
5.6. Variação no número de núcleos com fragmentação de DNA	26
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO GERAL.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
9. ANEXOS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula exócrina do aparelho reprodutor dos mamíferos. Esta glândula contribui com uma fração do líquido seminal capacitando a sobrevivência dos espermatozóides, fornecendo íons (citrato, zinco), lipídios estruturais, várias enzimas proteolíticas e substâncias antiinflamatórias e imunossupressoras (Garcia-Florez & Carvalho, 2005). Esta secreção fica alojada nos ácinos e, no momento da ejaculação, é eliminada na uretra por contração das células musculares lisas.

Por ser sítio de complicações, esta glândula é amplamente pesquisada, visando compreender a regulação do crescimento e sua fisiologia, já que inflamações e alterações proliferativas benignas ou malignas decorrentes principalmente do envelhecimento são casos clínicos comuns entre homens (Men et al., 2001). A existência desta glândula em fêmeas amplia ainda mais o interesse pelo órgão (Santos et al., 2006; Paulino, 2007).

1.1. Desenvolvimento da próstata

Em roedores, ao final da gestação, inicia-se o desenvolvimento da glândula a partir de brotos prostáticos que emergem do seio urogenital. O seio urogenital é uma subdivisão da cloaca embrionária e é composto por uma camada epitelial derivada do endoderma que é envolvida por uma camada mesenquimal originada do mesoderma. O seio urogenital surge 13 dias após a concepção em camundongos (Marker et al., 2003), sendo semelhante entre machos e fêmeas até aproximadamente os 17,5 dias pós-coito, quando a morfogênese prostática inicia-se em resposta aos andrógenos produzidos pelos testículos fetais (Wilson et al., 1981; Marker et al., 2003).

A morfogênese prostática inicia-se com uma intensa atividade proliferativa nos cordões de células epiteliais do seio urogenital que invade o mesênquima subjacente (Aümuller, 1979; Sugimura et al., 1986). Os passos seguintes (morfogênese ductal, canalização, diferenciação das células epiteliais e estromais) são estimulados por andrógenos e ocorrem devido a um aumento transitório da concentração de testosterona no período perinatal (Corbier et al., 1995).

Apesar deste processo ser dependente de andrógenos, algumas células, como o epitélio do seio urogenital e os brotos prostáticos não expressam receptores de andrógenos funcionais em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do seio urogenital e da próstata em formação

apresentam grande quantidade destes receptores (Cunha et al., 1987). Isto sugere que a ação dos andrógenos durante a morfogênese prostática deva ser indireta, ou seja, através do mesênquima (Donjacour & Cunha, 1988).

As células epiteliais organizam-se em duas populações celulares distintas: uma camada descontínua de células epiteliais basais ao longo de uma lâmina basal, e uma população de células luminais colunares altas, além de um revestimento mesênquimal de células musculares lisas (Hayward et al., 1996).

No período pós-natal entre a primeira e a segunda semana, ocorre uma alteração do epitélio e do estroma para a formação do lúmen. Na segunda semana observa-se um pico de proliferação, evento que é evidente também na sexta semana. Após a terceira semana as células epiteliais estão polarizadas e fica evidente a região acromática supranuclear de localização do complexo de Golgi, assim como começa a ser observado o acúmulo de secreção no lúmen. Entre a quarta e a sexta semana há um período de repouso e, nesta última semana, inicia-se o aumento dos níveis de testosterona sérica. Na puberdade, a próstata inicia seu crescimento, aumento seu peso seco e o número de ramificações dos ductos (Sugimura et al., 1986) sendo finalizado o seu desenvolvimento na maturidade sexual (Vilamaior et al., 2006), à semelhança do que acontece com humanos (Hamilton et al., 1959).

1.2. Anatomia e histologia prostática

No homem, a próstata é um órgão composto constituído de vários componentes glandulares e não glandulares (McNeal et al, 1988). O componente glandular é formado por um conjunto de estruturas epiteliais túbulos-alveolares, envolvidas por um estroma muscular. Em roedores, a próstata é dividida em lobos ou também em PV, próstata dorsolateral e próstata anterior (ou glândula de coagulação) (Aümmüller et al., 1979) (Figura 1).

Os lobos prostáticos diferem quanto aos tipos celulares (Cunha et al., 1987), padrão de ductos (Hayashi et al., 1991), tipo de secreção (Prins, 1991), resposta a hormônios (Prins et al., 1992; Banerjee et al., 1995), padrão de expressão gênica (Takeda et al., 1990) e de síntese protéica (Lee et al., 1990; Prins et al., 1992; Banerjee et al., 1993). Cada lobo da próstata ventral consiste de oito conjuntos de ductos que se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples que se ramifica distalmente

Vários tipos celulares também são encontrados no estroma da próstata. Dentre eles estão os mastócitos, os fibroblastos, as células endoteliais e os pericitos, ao lado de terminações

nervosas e gânglios sensitivos. Cada célula desempenha um papel importante e específico na manutenção e função secretora na próstata ventral. Como nas demais glândulas, a atividade das células epiteliais prostáticas é fortemente influenciada 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 (Prins, 1992; Lee et al., 1990; Sensibar et al., 1991; Nemeth & Lee, 1996).

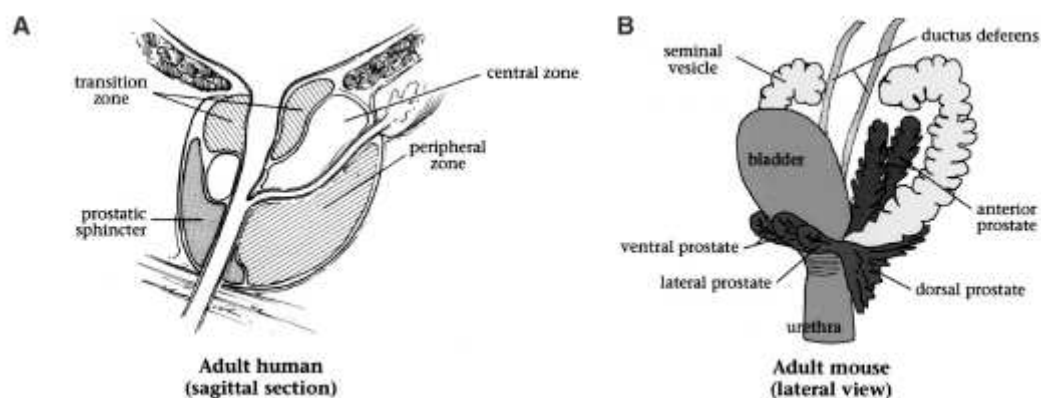


Figura 1. Ilustração esquemática da anatomia da próstata humana (A) (McNeal, 1969) e de camundongo (B) (Cunha *et al.* 1987).

As CMLs representam 22% da área total da próstata humana (Shapiro et al., 1992), predominando ao redor dos ductos, onde se encontram em íntimo contato com a membrana basal das células epiteliais. Já 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) mas provavelmente também sobre as demais células estromais.

O conjunto de dutos é dividido em três regiões morfológica e funcionalmente distintas, denominadas proximal, intermediária e distal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee et al., 1990; Shabsigh et al., 1999). Foi evidenciada uma maior quantidade de fibroblastos e poucas células musculares lisas nas porções terminais dos dutos, associadas ao crescimento da população de células epiteliais. Um epitélio com grande atividade secretora é circundado por uma camada contínua de células musculares lisas na porção intermediária. Nas porções proximais há uma menor quantidade de fibroblastos e maior quantidade de células musculares lisas, associadas a maior frequência de morte celular. Estes padrões revelam que os arranjos assumidos pelas células estromais podem estar relacionados com o fenótipo das células epiteliais (Nemeth & Lee, 1996).

1.3. Endocrinologia prostática

O crescimento, diferenciação e manutenção da atividade da próstata são controlados por andrógenos. Durante o desenvolvimento, o primeiro tecido alvo de 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 células musculares lisas. 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 recentemente que a canalização do epitélio prostático em ratos depende da morte de um grupo de células epiteliais em associação à polarização das células epiteliais lumbais (Bruni-Cardoso & Carvalho, 2007).

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. Entretanto, a ação dos estrógenos na morfogênese ductal e diferenciação celular prostática ainda não estão completamente esclarecida (Prins et al., 2001).

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 da 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 ser este um local de aromatização e uma possível fonte local de estrógeno (Tsugaya et al., 1996).

Exposição a baixas doses de estrógeno durante a gestação em camundongos provoca aumento do peso da próstata no adulto, dos níveis de receptor de andrógeno e também do brotamento (Nonneman et al., 1992). Se a dosagem do estrógeno for 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 intra-epitelial (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 do eixo hipotálamo-hipófise-gônada ou a um efeito direto 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-hipófise-gônada. Além disto, nosso laboratório tem identificado um mecanismo geral de inibição da transcrição e da tradução, que permite sugerir que a alta incidência de prostatites seja devida a uma escassez de moléculas antiinflamatórias e antibacterianas produzidas pela próstata (Augusto et al. em preparação).

O AR e os ERs são responsáveis pela mediação dos efeitos fisiológicos dos andrógenos e estrógenos, respectivamente (Germann, et al 2002 e Sasaki, et al 2003). O AR atua fundamentalmente como fator de transcrição. Ele localiza-se no citoplasma e, com a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona, dissocia-se de uma proteína HSP, dimeriza-se, e é translocado para o núcleo, onde, em conjunto com uma série de co-ativadores e co-repressores, ativa ou inativa diferentes conjuntos de genes pela ligação aos elementos responsivos a andrógenos (AREs) (Heilein & Chang, 2004). O AR clássico tem 110 KDa e possui várias características comuns os membros da família dos receptores nucleares, como os receptores de estrógeno, de progesterona, dos hormônios da tireóide e os PPAR (Jacobs et al., 2003).

O ER, assim como o AR, pertence à família dos receptores nucleares e apresenta dois subtipos, ER α e ER β , com papéis fisiológicos distintos (Altundag et al., 2004). Os dois receptores compartilham homologia entre si, mas são produtos de diferentes genes (Yang et al., 2003). Os dois receptores de estrógeno ER α e ER β estão presentes na próstata, sendo que no animal adulto o ER α é expresso predominantemente no estroma e o ER β expresso principalmente no epitélio (Weihua et al., 2002). Foi demonstrado que o silenciamento do ER através da metilação do seu promotor pode estar envolvido na hiperplasia prostática benigna e no desenvolvimento do câncer de próstata (Li et al., 2000).

No desenvolvimento prostático normal (proliferação e diferenciação celular e ramificação ductal), assim como em outros órgãos ramificados, há envolvimento de fatores de crescimento e fatores morfogenéticos como FGF-10 e 7, HGF, BMP-4, SHH (Huang et al, 2004)

Uma boa correlação entre as propriedades de invasão tumoral e o crescimento normal das estruturas epiteliais foi sugerida para a glândula mamária (Wiseman & Werb, 2002) e para o pulmão (Kheradmand et al. 2002), pelo menos no que se refere a um estado proliferativo aumentado do epitélio, à necessidade de degradação da matriz extracelular adjacente e a colonização de espaços anteriormente ocupados pelo estroma. Este quadro parece ser também verdadeiro na angiogênese (Feng et al. 1999), quando a membrana basal é degradada e

substituída por uma matriz provisória de fibrina, na qual as células endoteliais proliferam e a partir de onde invadem o tecido adjacente. Além disso, Cunha e colaboradores (2004) propuseram que os mecanismos envolvidos na organogênese prostática, no que diz respeito a aspectos de diferenciação celular e interações epitélio-estroma podem ter relevância na gênese e na biologia do câncer de próstata, sugerindo que o desenvolvimento tumoral prostático recapitule a ontogenia desse órgão. Desta forma, o estudo das possíveis vias de indução de morte das células epiteliais prostáticas no contexto da presença ou ausência de estímulo androgênico parece ser bastante relevante.

1.4. A 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 fisiopatológico 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 a remodelação do estroma e a eliminação das células apoptóticas (Kyprianou & Isaacs, 1988; Powell et al. 1996; Carvalho & Line, 1996; Carvalho et al., 1997a, b; Ilio et al., 2000; Powell et al., 1999 Vilamaior et al., 2000; 2005; Augusto et al., 2008).

Vários trabalhos têm mostrado que a castração de ratos promove uma significativa diminuição do tamanho e peso da glândula prostática. Este efeito é atribuído à parada na síntese e uma acelerada liberação da secreção luminal, seguida pela redução do tamanho das células epiteliais, exclusão de várias destas células pelo processo de apoptose, resultando em lóbulos menores formados por um epitélio cúbico baixo (Kerr & Searle, 1973; Brandstrom et al., 1994 Hu et al., 1998). Ainda, foi observado um declínio na síntese de DNA e de proteínas, no conteúdo e na complexidade do RNA e uma diminuição na expressão de receptores de andrógenos (Aumuller & Seltz, 1990).

A redução da próstata está intimamente relacionada à diminuição do fluxo sangüíneo para o tecido (Lekas et al., 1997). Doze horas após a castração algumas células estromais entram em apoptose, dentre elas as células endoteliais que, através de mudanças no sistema vascular da glândula promove o extravasamento não trombogênico das proteínas do plasma para a região periglandular do tecido (Shabsigh et al., 1999), em associação a uma restrição do leito do vaso (Hayek et al., 1999). Esse processo degenerativo do sistema vascular da próstata

precede o início da apoptose em células epiteliais que ocorre 72 horas após a castração (Shabsigh et al., 1998), promovendo a perda das células epiteliais e a regressão da próstata induzida pela castração (Buttayan et al., 1999; Shabsigh et al., 1998; 1999).

A apoptose nas células epiteliais está associada à expressão de alguns componentes como o ativador de plaminogênio do tipo uroquinase (Freeman et al., 1990) e a catepsina D, sendo que essa última provavelmente exerça um papel importante na formação e na fagocitose dos corpos apoptóticos (Sensibar et al., 1990; Wilson et al., 1991). Alguns trabalhos observaram a marcação para a catepsina D nas diferentes regiões da próstata ventral de ratos, demonstrando que, quatro dias após a castração, ocorre um aumento da marcação para catepsina nas células epiteliais da região distal, enquanto na região proximal ocorre uma diminuição no número dessas células, indicando uma inversão na distribuição das células epiteliais em apoptose em comparação com animais adultos não castrados. Já sete dias após a castração, as células epiteliais da região proximal, embora atrofiadas, são destituídas de marcação para catepsina D (Lee et al., 1990).

Outros trabalhos demonstraram que privação de testosterona e sua subsequente reposição promovem a proliferação das células endoteliais, normalizando o volume vascular e do fluxo sanguíneo (Häggström et al., 1998). Na próstata ventral de camundongos, a reposição androgênica, sete dias após a castração, permite o retorno do seu tamanho original com uma leve distensão dos ductos (Sugimura et al., 1986).

Ainda, durante a regressão prostática, existe um aparente aumento na área seccional ocupada pela matriz extracelular e células estromais (Kerr & Searle, 1973). Dentre estas, estão as células musculares lisas localizadas abaixo, ou seja, próximo ao pólo basal das estruturas epiteliais, que assumem um fenótipo sintético, com uma fração miofibrilar reduzida (Zhao et al., 1992; Vilamaior et al., 2000).

Antonioli et al. (2004; 2007) mostraram que as células musculares lisas tiveram seu volume total diminuído e fenótipo alterado frente à privação androgênica. A mudança fenotípica das células musculares lisas está ligada a modificações gerais do estroma e parece ser responsável por algumas delas, incluindo a reorganização das fibras de colágeno com as quais elas estão intimamente associadas após a castração (Vilamaior et al., 2000).

Na matriz extracelular, a castração promove alterações nos níveis de glicosaminoglicanos que, como o peso prostático, pode ser revertido com a reposição de andrógeno (Kofoed et al., 1990; Augusto et al., 2008).

Na próstata ventral podem ser encontrados três tipos de glicosaminoglicanos sulfatados, o dermatan sulfato, que é o mais abundante, e que após a castração é o responsável pelo

aumento na concentração de glicosaminoglicanos, o condroitim sulfato, que diminui, e o heparan sulfato, que aparece aumentado nas membranas basais (Carvalho & Line, 1996).

Já a concentração colágeno apresenta-se aumentada após a castração (Kerr & Searle, 1973), adotando um novo arranjo compatível com a redução da superfície dos ácinos (Vilamaior et al., 2000).

1.5. Efeito da insulina

A insulina é o hormônio que controla o metabolismo, mantendo a normoglicemia e a normolipidemia.

A insulina ativa o seu respectivo receptor promovendo a sua autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. O receptor da insulina é composto por duas subunidades α , localizadas no domínio extracelular, e duas subunidades β unidas por pontes dissulfeto, que estão localizadas no domínio transmembrana. A ligação da insulina à α -subunidade induz a autofosforilação de tirosinas na subunidade β e esta, subseqüentemente, fosforila seus substratos, os IRS, ERKs e JNKs, 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 PI3-Kinase, a 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 PKB também conhecida como AKT. Um alvo celular que a PKB pode fosforilar para proteger a célula de apoptose é a BAD (Datta et al. 1997). Esta proteína, na forma desfosforilada, interage com membros da família da Bcl como a Bcl_{XL}, e induz apoptose em algumas células. Após a BAD ser fosforilada na Ser₁₃₆ pela PKB esta se desassocia da Bcl_{XL}, e a apoptose é reduzida (Zha et al. 1996). O fato é que a 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), num mecanismo de *feedback* para o eixo hipotálamo-hipófise, reduzindo a sensibilidade da hipófise ao transporte de esteróides para dentro das células efectoras (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 testosterona-tritiada 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 interação destes órgãos com a testosterona, fatores de crescimento e receptores específicos (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 ultra-estrutura 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).

1.6. Enfermidades prostáticas e diabetes

Diabetes mellitus é o décimo quinto causador de morte nos Estados Unidos (Jemal et al., 2005) e, aproximadamente, um sexto dos homens acima dos sessenta anos têm o diagnóstico de diabetes (Cowie et al., 2005).

Alguns trabalhos vêm atribuindo a existência de lesões na próstata ventral de roedores a baixas concentrações séricas de insulina (Ribeiro et al., 2008) e afirmando que o efeito do diabetes tanto experimental quanto espontâneo sobre a próstata é semelhante ao encontrado na castração (Goes et al., 2007). No entanto, ainda é muito controverso o impacto do diabetes sobre a próstata (Cagnon et al., 2000).

Apesar de todos estes efeitos, os estudos sobre as alterações fisiopatológicas promovidas pelo diabetes tipo I tanto em humanos quanto em roedores são escassos, tornando importante a compreensão do comportamento prostático nesta afecção. Ao contrário, trabalhos associando diabetes tipo II, que é caracterizado pela ineficiência da ação da insulina no tecido alvo (Robbins, 1989), são mais frequentes.

Na maioria dos casos, o diabetes não é o grande vilão, pois a obesidade é o fator desencadeador do quadro de diabetes tipo II (Smith et al., 2008). A hiperplasia prostática benigna caracteriza-se pelo crescimento da área transicional e periuretral, resultado da proliferação estromal e dos elementos glandulares (Berry, 1984). Esta patologia é raramente encontrada em indivíduos com idade inferior a 40 anos, mas tem incidência aumentada em indivíduos acima de 50 anos (Ziada, 1999), coerente com a sugestão de que a prevalência de diabetes e de hiperplasia prostática benigna aumenta com a idade (Boon et al., 2001). Neste contexto, é relevante mencionar que o diabético não dependente de insulina tem um crescimento médio da próstata superior aos de indivíduos com diabetes dependente de insulina (Boon et al., 2001; Hammarsten et al., 2001). O mecanismo responsável por esta associação ainda não é claro, porém já foi sugerido que danos vasculares induzidos pelo diabetes tipo II podem contribuir para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (Berger et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Há crescente interesse na compreensão dos mecanismos de regulação hormonal em vários processos fisiológicos normais e na invasão tumoral, principalmente quando são sobrepostos a distúrbios metabólicos gerais.

Além disto, sabe-se da importância da glândula prostática não somente na função reprodutiva masculina, mas como alvo de grande incidência de afecções, dentre elas a hiperplasia prostática benigna e os carcinomas. Parece então necessário o aprofundamento do conhecimento dos mecanismos de regulação da proliferação, diferenciação e morte das células prostáticas, considerando-se outros reguladores além dos andrógenos, haja vista a ressurgência de tumores independentes de andrógeno, seguida à castração química e/ou cirúrgica, que é um dos maiores problemas relacionados à terapêutica dos tumores prostáticos (Feldman & Feldman, 2001). A hipótese desenvolvida neste trabalho é que a insulina tem um efeito trófico sobre o epitélio prostático e contribui para a sobrevivência das células epiteliais num ambiente de privação androgênica.

3. OBJETIVOS

Determinar se a insulina tem efeito sobre a sobrevivência das células epiteliais prostáticas durante a 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 ratos Wistar tratados com aloxana até cinco dias após castração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e protocolo experimental

Foram empregados 72 ratos Wistar adultos jovens com 75 dias de idade, proveniente do Centro 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 Celular, em caixa de polietileno, com substrato de maravalha, sendo fornecidas água e ração *ad libitum*.

Os ratos receberam três injeções, via 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 testes de glicosúria e de glicemia. Constatado o quadro de manifestação de diabetes (glicosúria, acima de 28mmol/L e glicemia acima de 350mg/dL), os animais receberam mais uma dose de aloxana após 7 dias (dose de estabilização) e, após 48 horas, foram castrados cirurgicamente, via escrotal, sob anestesia com cloridrato de cetamina (80mg/Kg) e xilazina (10mg/kg).

Os ratos foram divididos em 3 grupos diferentes: ratos não diabéticos, ratos diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina. O grupo de animais diabéticos tratados com insulina recebeu aplicações subcutâneas de insulina (2U/100g) duas vezes ao dia, uma às 8 horas e outra às 18 horas, com início 24 horas após a dose de estabilização. O tratamento prolongou-se até o dia do sacrifício do animal (Soudamani, 2005).

Animais de cada grupo foram sacrificados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a cirurgia. Todos os ratos foram anestesiados como acima e posteriormente sacrificados por aprofundamento de anestesia e pesados. Após coleta de amostras de sangue por punção cardíaca, as próstatas ventrais foram dissecadas e processadas para inclusão em historesina de forma rotineira (Leica Nussloch, Heidelberg, Germany).

Os experimentos foram realizados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (Protocolo número 1489-1).

4.2. Dosagem sérica de insulina, testosterona e estradiol

Os níveis séricos de insulina foram determinados por radioimunoensaio usando insulina de rato como padrão, ¹²⁵I-marcada bovina como o traçador radioativo e anticorpo de porco anti-insulina (Scott et al. 1981). As variações intra-ensaio e inter-ensaio deste método são de 8 % e 14 %, respectivamente. O processo detecta a insulina sérica de rato entre 0,039 a 5,0 ng/ml.

Os níveis plasmáticos de testosterona foram estimados por radioimunoensaio. As amostras do sangue foram obtidas através de punção cardíaca imediatamente após o sacrifício dos animais. O plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C para posteriores ensaios hormonais. A concentração de testosterona foi medida em amostras de plasma usando Coat-A-Count kit (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). As variações intra-ensaio e inter-ensaio deste método são de 2,33% e 4,05%, para testosterona e E2, respectivamente. A sensibilidade do teste para a detecção de testosterona e E2 foi de 1,08 ng/dL e 1,75 pg/mL, respectivamente.

4.3. Análise estereológica

Secções em historesina com dois micrômetros foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. As secções foram fotografadas e a estereologia realizada com o uso do sistema de Weibel, com uma grade de 140 pontos, como descrito para a próstata de ratos por Huttunen et. al. (1981). As Vv% do epitélio, do lúmen, do músculo liso, e do estroma não muscular foram determinadas a partir de 6 campos microscópicos por animal (n=4). Como parte de uma análise exploratória, o volume de cada compartimento foi determinado baseado no peso prostático médio para cada grupo (Garcia-Florez et al. 2005), considerando a gravidade específica de 1g/mL (DeKlerk & Coffey, 1978).

4.4. Detecção de apoptose e determinação do índice apoptótico

4.4.1. Reação de Feulgen

Secções em historesina foram submetidas à reação de Feulgen. As secções foram hidrolisadas com HCl 4 N por 92 minutos e a seguir tratadas com reativo de Schiff por 45 minutos. Após a lavagem extensiva, as secções foram desidratadas e montadas com Entelan. Seis campos microscópicos tomados ao acaso das próstatas ventrais de 4 ratos por grupo foram analisados e o índice apoptótico foi determinado dividindo o número de núcleos apoptóticos pelo número total dos núcleos encontrados no campo do microscópio, usando objetiva de 100X. Os núcleos apoptóticos foram identificados pela picnose característica e pela fragmentação nuclear, como relatado por Kerr e Searle (1973). Somente o epitélio foi considerado para estas contagens (Garcia-Florez et al., 2005).

4.4.2. Reação de TUNEL

A fragmentação do DNA foi detectada usando o kit de detecção de fragmentação de DNA (Promega, Promega, Madison, WI, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os núcleos apoptóticos foram identificados usando um microscópio Zeiss Axioskop (Jena, Germany) e as micrografias foram obtidas com filme Kodak 400 Kodacolor. A quantificação foi realizada como no item 6.4.1.

4.5. 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 *pos 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 $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Peso Corporal

O peso corporal médio de ratos Wistar não diabéticos aos 90 dias de idade foi de 206 g.

A castração nos ratos Wistar não diabéticos promove uma elevação progressiva do peso corporal até 58%, atingindo o peso máximo (~326 g) nas 48 horas após a castração. Já nos animais diabéticos há uma queda transitória de cerca de 21% após a castração, com restauração do peso original às 96 horas (Figura 2). A aplicação de insulina aos animais diabéticos impediu a queda transitória do peso corporal que ocorreu com a castração dos animais diabéticos (Figura 2) porém não restaurou o peso do animal.

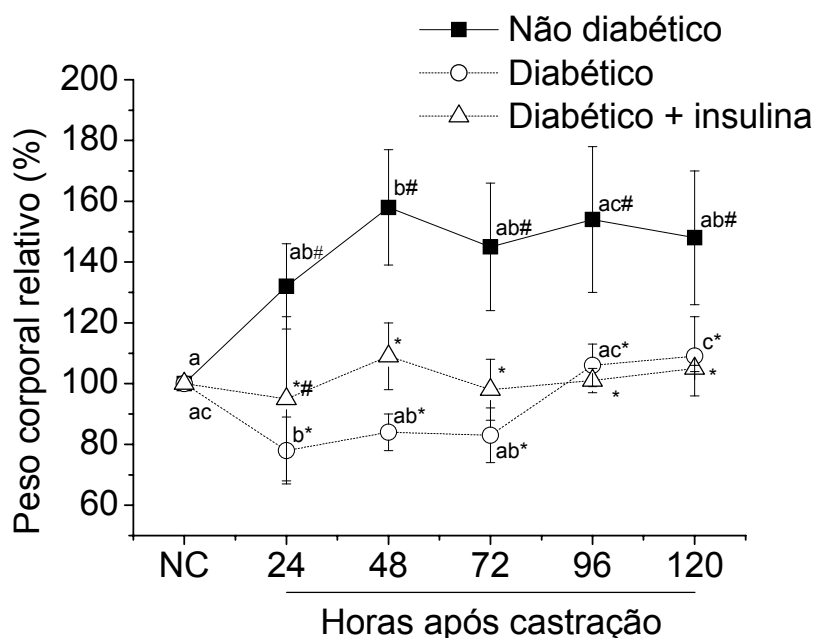


Figura 2. Variação do peso corporal relativo após a castração. **NC** = não castrados.

São indicadas as médias percentual $\pm$ desvio padrão percentual (n=3). Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos numa mesma situação experimental. Símbolos diferentes indicam diferenças entre os pesos dos animais entre os grupos experimentais (não castrados ou em diferentes períodos após castração).

5.2. Peso Prostático

O peso médio da próstata ventral de ratos Wistar não diabético foi de 206 mg, o que corresponde a 0.1% do peso do animal. O peso prostático não se alterou com a indução do diabetes pela aloxana, nem com a aplicação de insulina aos animais diabéticos (Figura 3).

Cinco dias após a cirurgia os animais não diabéticos e castrados apresentaram uma diminuição de cerca de 57% no peso da glândula. Nos animais diabéticos, a castração resultou em uma redução progressiva do peso prostático chegando a 51% do peso dos animais diabéticos não castrados. Já nos animais diabéticos, castrados e que receberam insulina houve rápida perda de peso até 48 horas após a castração (~58% no peso relativo da próstata), sem mostrar redução adicional até o período de 120 horas (Figura 3).

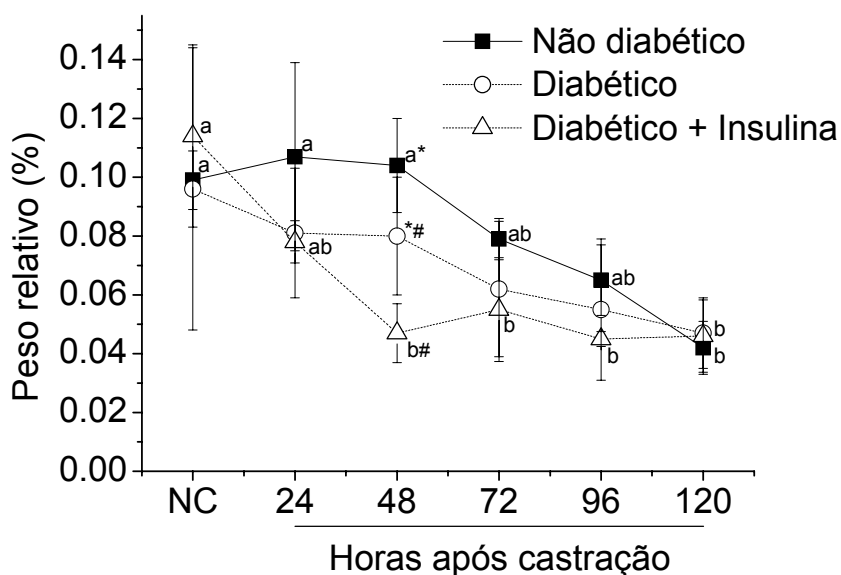


Figura 3. Variação do peso relativo (expresso como percentual do peso corpóreo) da próstata ventral de ratos após a castração nas três situações experimentais (não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina). São Indicados as médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença entre os grupos numa mesma situação experimental. Símbolos diferentes indicam diferenças entre os pesos dos animais entre os grupos experimentais (não castrados ou em diferentes períodos após castração. **NC** = não castrados.

5.3. Condições hormonais

Os níveis séricos de insulina nos ratos Wistar adultos diabéticos induzidos pela aloxana resultou em uma queda na concentração de insulina abaixo do nível comum para animais saudáveis em jejum (0,3 ng/mL), portanto, não atingindo o nível para animais saudáveis e alimentados (1,6 ng/mL). No entanto, os animais diabéticos que receberam insulina apresentaram valores superiores ou próximos a 1,6 ng/mL.

O nível sérico médio de testosterona em ratos Wistar não diabético foi de 334,6 ng/dL. A indução do diabetes causou redução de cerca de 50% nestes valores, embora nas presentes condições experimentais e de tamanho da amostra o resultado não tenha sido significativo (Tabela 1). Após o tratamento com insulina amenizou a queda do nível sérico de testosterona, que subiu para 217,7 ng/dL.

Com relação à castração, pode-se observar uma queda de aproximadamente 99% do nível de testosterona nos três grupos experimentais, já às 24 horas após a cirurgia.

O nível sérico de estradiol em ratos Wistar machos adultos não diabético é de 36,4 pg/mL. Com a indução do diabetes este valor diminuiu cerca de 57% (15,56 pg/mL) e após a aplicação de insulina o nível sérico de estradiol se mantém à valores encontrados em ratos Wistar adultos não castrados (Tabela 1).

O nível sérico de estrógeno diminuiu cerca de 51% após castração. Nos animais diabéticos, o nível sérico de insulina apresenta-se baixa e não sofreu alteração após a castração, porém, nos animais diabéticos tratados com insulina, não houve alteração dos níveis séricos de estradiol.

Tabela 1 – Níveis séricos de testosterona e 17- β -estradiol em em ratos Wistar adultos, castrados e não castrados após o tratamento com aloxana. Os valores representam a média desvio $\pm$ padrão.

Horas após castração	Testosterone (ng/dL)			E2* (pg/mL)		
	Não Diabético	Diabético	Diabético + Insulina	Não Diabético	Diabético	Diabético + Insulina
Não castrado	334,56 $\pm$ 204,22	159,98 $\pm$ 52,27	217,70 $\pm$ 110,03	36,44 $\pm$ 2,03*	15,56 $\pm$ 10,99 ⁺	32,89 $\pm$ 5,05**
24	<1,08	<1,08	N.D.	30,16 $\pm$ 5,33*	15,90 $\pm$ 4,56 ⁺	N.D.
48	<1,08	<1,08	<1,08	12,42 $\pm$ 3,06*	14,92 $\pm$ 10,56*	33,32 $\pm$ 0,05 ⁺
72	<1,08	<1,08	<1,08	24,25 $\pm$ 2,95	18,98 $\pm$ 9,03	30,74 $\pm$ 6,01
96	N.D.	2,14 $\pm$ 0,61	N.D.	N.D.	6,52 $\pm$ 8,01	N.D.
120	<1,08	<1,08	N.D.	17,96 $\pm$ 5,67	10,54 $\pm$ 2,23	N.D.

Os símbolos diferentes sobre os dados indicam valores estatísticos diferentes para $< 0,05$.

N.D. = não determinado

5.4. Histologia e Distribuição dos Compartimentos Teciduais

A Figura 4 mostra os aspectos histológicos da próstata ventral de ratos Wistar não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina não castrados e 120 horas após a castração. A próstata de ratos adultos apresenta uma organização lobular, com um epitélio cilíndrico simples na sua região intermediária, com estroma esparso. As células epiteliais são polarizadas, com núcleo basal. O interior do lúmen acumula secreção de natureza protéica. Ao redor do epitélio são encontradas células musculares lisas que formam uma camada única. Além delas são observados vasos sangüíneos e outros tipos celulares (Fig. 4A). A castração leva a uma redução da altura da célula epitelial. A estrutura dos ácinos demonstra uma organização pregueada. O estroma se torna denso, com muitos tipos celulares. Há também um acúmulo de células musculares lisas em camadas múltiplas (Fig. 4B). O diabetes promoveu uma redução da altura das células epiteliais. Não foram notadas alterações estruturais marcantes no estroma, considerado o tempo de indução do diabetes (Fig. 4C). A castração dos animais diabéticos levou a uma redução ainda mais proeminente da altura das células epiteliais. O estroma pareceu menos denso do que nos castrados não diabéticos e as células musculares lisas foram menos evidentes (Fig. 4D). A aplicação de insulina aos animais diabéticos amenizou a queda da altura do epitélio (Fig. 4E). A aplicação de insulina aos animais diabéticos castrados resultou em células epiteliais baixas, com aparente redução do estroma. Entretanto, não foi observada a mesma abundância de células musculares lisas no estroma.

O epitélio é o compartimento predominante da próstata ventral, correspondendo a cerca de 47% do volume da glândula e a um volume médio de 0,153 mL (Figuras 5A e E).

A indução do diabetes causa uma redução na fração volumétrica (densidade de volume e no volume ocupado pelo epitélio). A aplicação de insulina não recupera esta diminuição dentro do tempo de aplicação empregado neste estudo. (Figuras 5A e E). Contrabalanceando a diminuição da densidade de volume do epitélio, ocorreu um aumento deste parâmetro para o compartimento luminal, o que é reforçado pela aplicação de insulina (Figura 5B). Estas variações não foram suficientes para promover aumento significativo do volume do lúmen (Figura 4F). Já a densidade de volume e o volume do estroma não foram afetados pela indução do diabetes e nem pela aplicação de insulina (Figuras 5C e G) dentro do período analisado considerado o curto tempo de exposição ao diabetes e de reposição de insulina.

À semelhança do que aconteceu com o epitélio, a densidade de volume e o volume ocupados pelas células musculares lisas (Figuras. 5D e H) foram menores nos animais diabéticos e ainda menores nos animais diabéticos tratados com insulina.

A densidade de volume e o volume ocupado pelo epitélio mostra redução significativa somente 96 horas após a castração, chegando a cerca de 35% dos valores obtidos para os animais não diabéticos. Já nos animais diabéticos, a redução da densidade de volume do epitélio é mais rápida, enquanto houve pouca variação nos valores obtidos para os animais diabéticos que receberam insulina, que já apresentavam uma redução deste parâmetro antes mesmo da castração (Figura 5A). O volume epitelial médio diminuiu progressivamente em resposta à castração, tanto em animais não diabéticos, quanto em diabéticos e em diabéticos que receberam insulina (Figura 5D). A redução, entretanto, é mais suave nos animais não diabéticos do que nos animais diabéticos e nos diabéticos que receberam insulina. Apesar apresentarem cinéticas diferentes, foi notada uma redução máxima de 65% no volume ocupado pelo epitélio nos três grupos experimentais, às 120 horas após castração (Figura 5E).

A castração tem pouco efeito na densidade de volume e no volume ocupado pelo lúmen e pelo estroma ao longo do período analisado (Figuras 5B-C e F-G).

A castração de animais não diabéticos não resulta em queda da densidade de volume e do volume ocupado pelas células musculares lisas dentro do período analisado. Entretanto, ela reforça a redução da densidade de volume e do volume ocupado por estas células causado pelo diabetes e pela aplicação de insulina exógena (Figuras 5D e H).

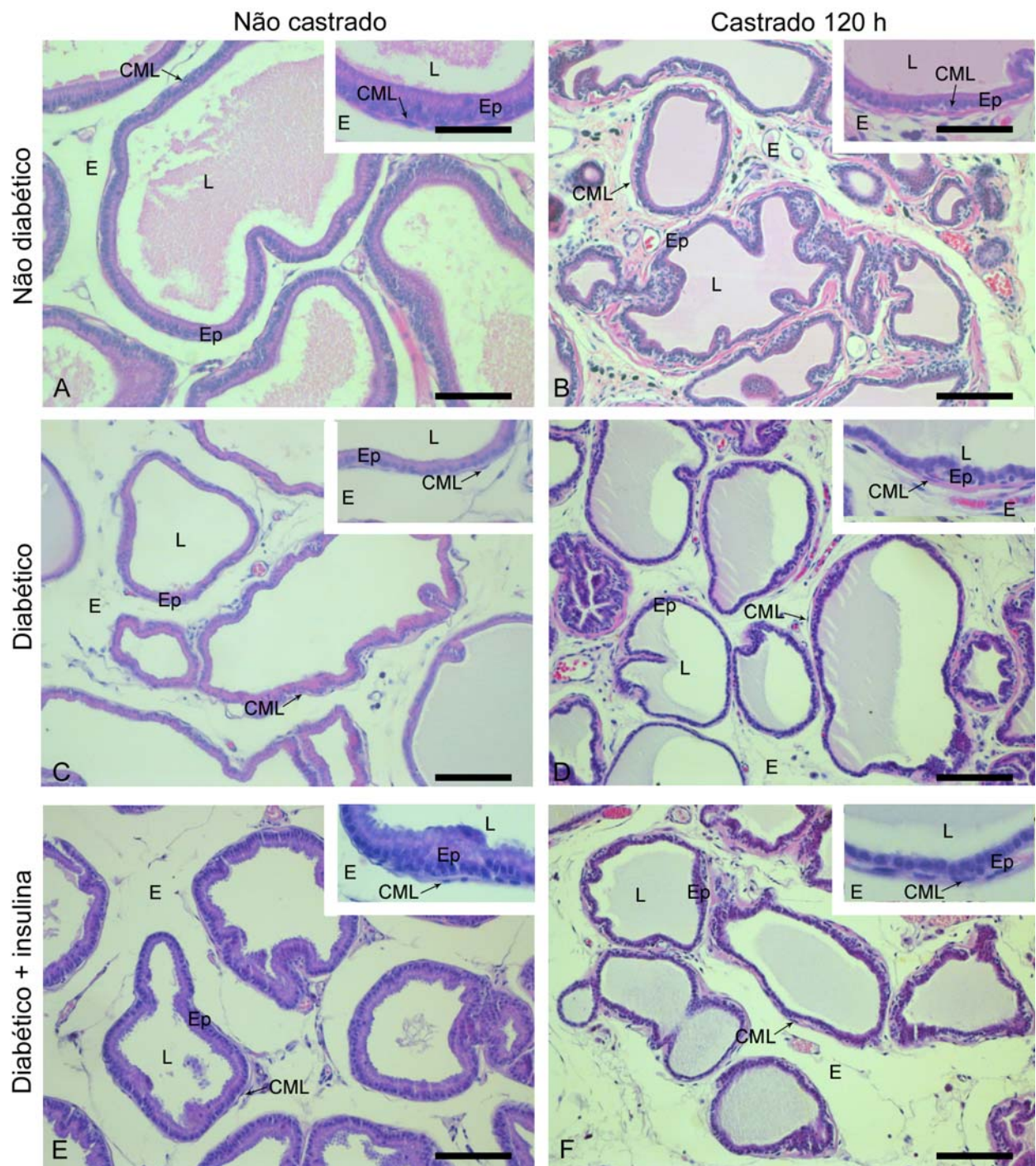


Figura 4. Aspectos histológicos da PV de ratos nas diferentes condições experimentais. **A.** Aspectos histológicos da PV de animais não diabéticos. Observa-se o epitélio cilíndrico simples com células polarizadas e núcleo basal, delimitando um lúmen amplo repleto de secreção protéica. O estroma é esparso, com poucas células e poucos elementos fibrilares. **B.** A castração causa redução da altura do epitélio, diminuição da luz, aumento da densidade de células musculares lisas e adensamento do estroma tanto com respeito ao número de células quanto na quantidade de elementos fibrilares da matriz

extracelular. **C.** O diabetes leva a uma diminuição da altura do epitélio e alterações menores no estroma, como ligeiro aumento dos elementos fibrilares da matriz extracelular. **D.** A castração dos animais diabéticos reforçou a regressão epitelial, mas pareceu atrasar as alterações do estroma. **E.** A aplicação de insulina restaurou parcialmente a arquitetura tecidual da PV em animais não diabéticos, mas pareceu acelerar as alterações do epitélio. Os detalhes mostram aspectos das células epiteliais e da associação das células musculares lisas com a base do epitélio. Barras de aumento: **A-F** = 100 μm e os “inset” = 50 μm .

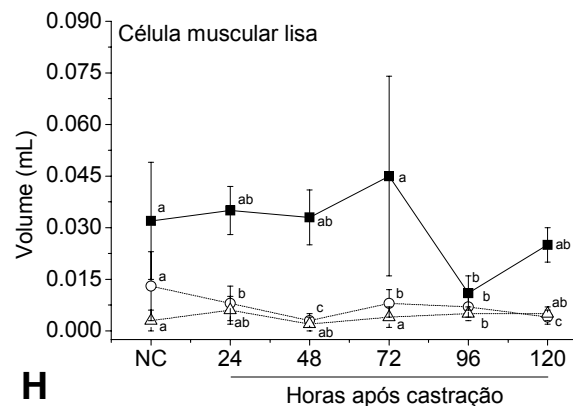
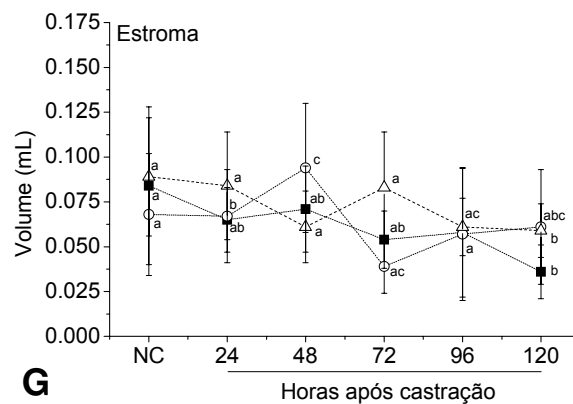
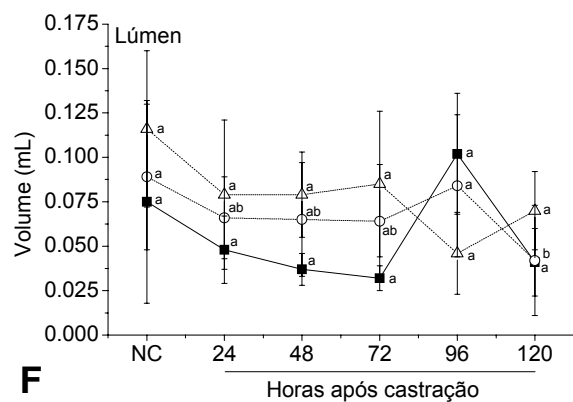
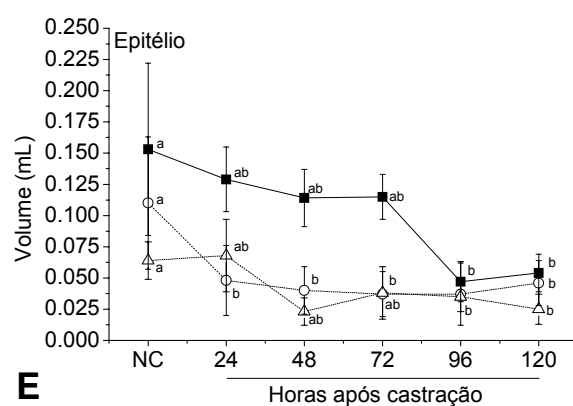
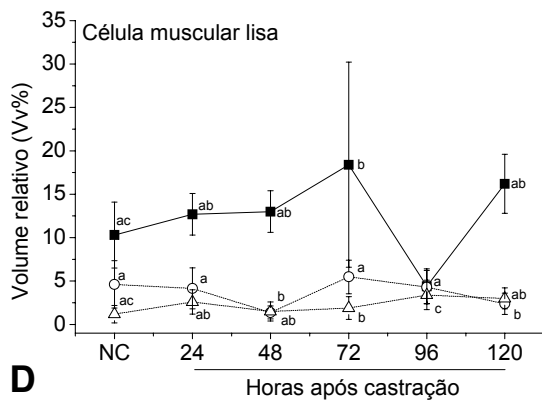
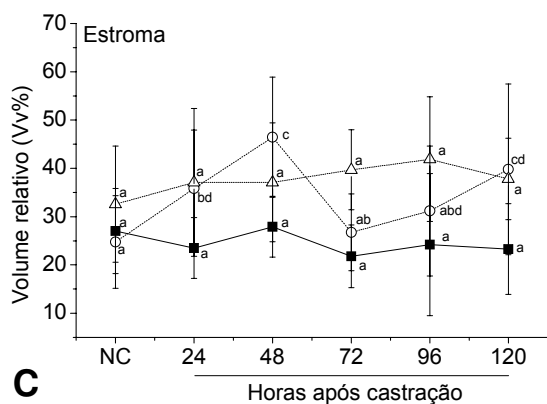
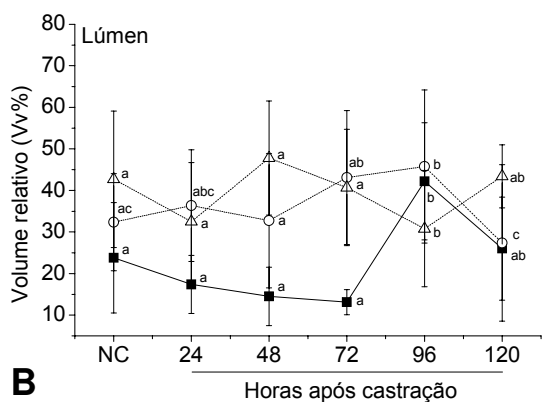
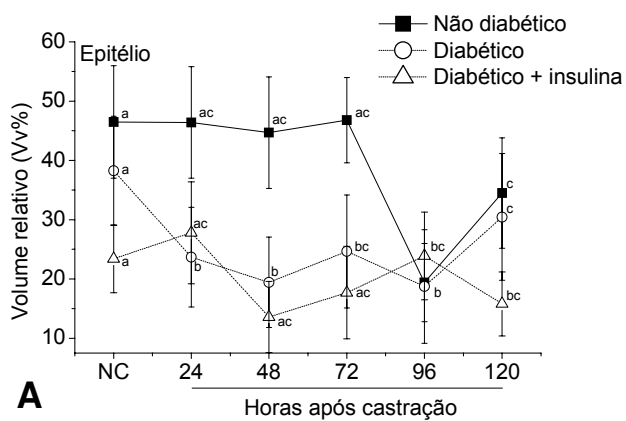


Figura 5. Análise estereológica dos compartimentos teciduais da próstata ventral de ratos. **A-D** correspondem ao Vv% e **E-H** correspondem ao volume (mL) de cada compartimento. **NC** = não castrados. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. As letras diferentes sobre as médias indicam diferença estatística entre os grupos quando $p < 0.05$.

5.5. Variação no número de núcleos apoptóticos

Os núcleos apoptóticos foram identificados pela picnose característica e pela fragmentação nuclear, como relatado por Kerr e Searle (1973) (Figura 6). Somente o epitélio foi considerado para estas contagens (Garcia-Florez et al., 2005).

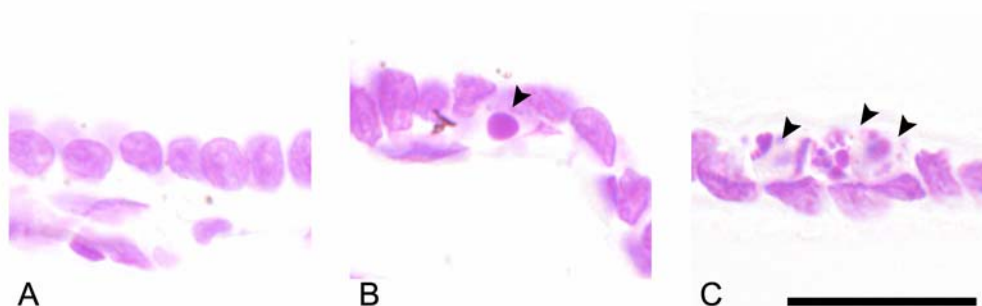


Figura 6. Aspectos morfológicos dos núcleos de células epiteliais prostáticas da PV de ratos. **A.** Aspectos morfológico dos núcleos das células epiteliais prostáticas de rato não castrado. Observa-se o núcleo esférico e com coloração entre as células adjacentes. **B.** A castração promove uma alteração na coloração do núcleo indicado pela seta demonstrando-se mais intensa, sugerindo a compactação da cromatina, etapa característica de núcleos de células epiteliais em processo de apoptose que é denominada como picnose. **C.** A castração ainda promove alterações marcantes nos núcleos indicado pela seta que apresenta-se fragmentados apresentando com coloração intensa comparado com as células adjacentes, sugerindo a fragmentação da cromatina etapa também característica de núcleos de células epiteliais em processo de apoptose. Barras de aumento = 10 μ m.

O percentual de núcleos apoptóticos identificados pela reação de Feulgen em células epiteliais da próstata ventral de ratos não submetidos a intervenções experimentais foi 0,7 %. Após a indução do diabetes pela aloxana não ocorreu alteração significativa neste índice.

Porém, a aplicação de insulina aos animais diabéticos induzidos pela aloxana propiciou uma redução de cerca de 92% dos núcleos apoptóticos (Figura 7).

Os animais submetidos à castração apresentaram um pico de núcleos apoptóticos 72 horas após a remoção dos testículos, correspondendo a um aumento de seis vezes. Às 96 horas este número sofreu uma queda de 32%, retornando aos níveis dos animais não diabéticos 120 horas após a castração (Figura 7).

Nos animais diabéticos ocorreu um adiantamento do pico de células apoptóticas para 48 horas após castração, retornando aos níveis basais 96 horas após a castração (Figura 7).

A aplicação de insulina aos animais diabéticos promoveu uma restauração da posição do pico de apoptose nos animais diabéticos para as 72 horas após castração. Além disto, houve também uma redução da taxa de apoptose tanto nos animais não castrados quanto nos castrados nos diferentes períodos após castração (Figura 7).

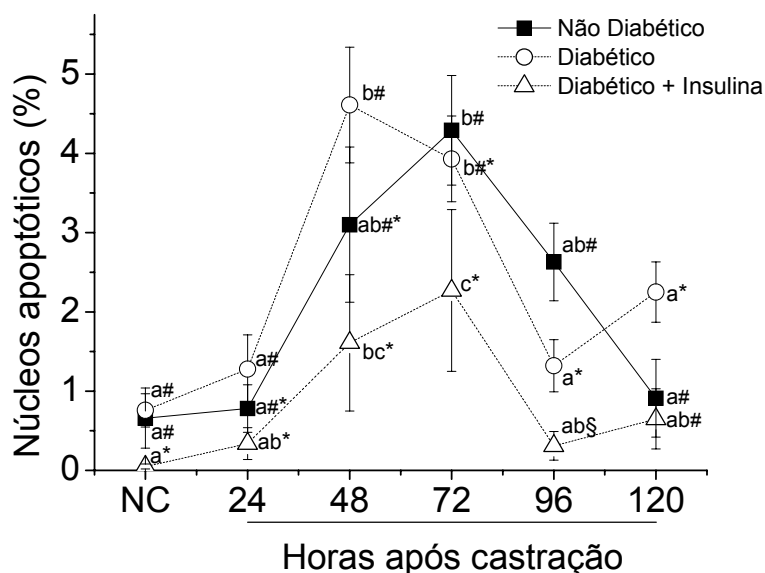


Figura 7. Variação no percentual de núcleos apoptóticos de células epiteliais prostáticas de ratos adultos não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina após castração. A castração de animais não diabéticos resulta em um pico no número de núcleos apoptóticos às 72 horas. Nos animais diabéticos este pico é antecipado para 48 horas após castração. A aplicação de insulina retorna o pico para as 72 horas após a castração diminui o percentual de núcleos apoptóticos tanto nos animais não castrados quanto ao longo dos cinco dias após a castração. **NC** = não castrados. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença entre os grupos numa mesma

situação experimental. Os símbolos diferentes indicam diferenças entre os pesos dos animais entre os grupos experimentais (não castrados ou em diferentes períodos após castração).

5.6. Variação no número de núcleos com fragmentação de DNA

A quantificação dos núcleos que apresentaram fragmentação de DNA revelou resultados semelhantes aos encontrados com a contagem do número de núcleos com morfologia apoptótica, após reação de Feulgen.

O percentual médio de núcleos com fragmentação de DNA nas células epiteliais da próstata ventral de ratos não diabéticos, revelados pela reação de Tunel, foi de 1,23%. Com a indução do diabetes pela aloxana foi possível observar uma redução no índice de morte celular. Além disto, a aplicação de insulina aos animais diabéticos resultou em uma redução de 81,3% no número de núcleos com fragmentação de DNA, com respeito aos animais controle (Figura 8).

A castração de animais não diabéticos leva a um aumento do número de núcleos com fragmentação de DNA às 72 horas após cirurgia. Nos diabéticos, há um aumento no valor médio de núcleos com fragmentação de DNA às 48 horas. A aplicação de insulina aos animais diabéticos, diminui o número de células com fragmentação de DNA tanto às 48 como às 72 horas (Figura 9), mas reconstitui a maior frequência para este último período (Figura 8).

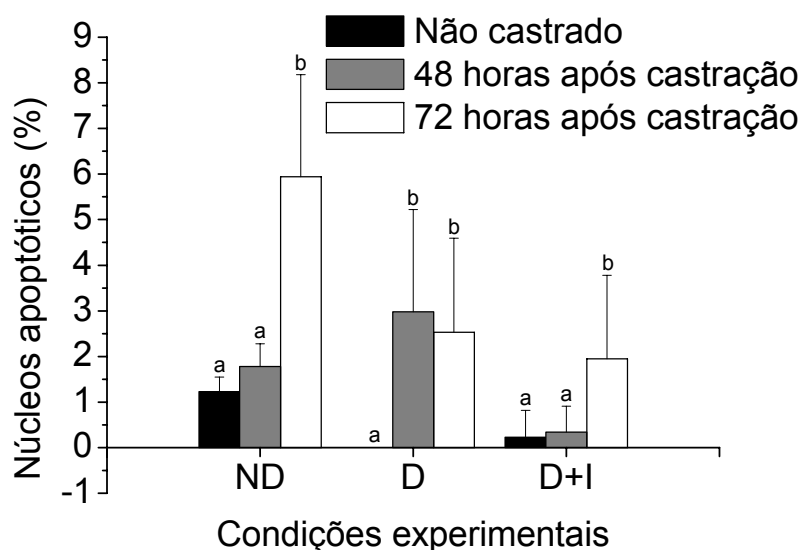


Figura 8. Variação do número de núcleos com fragmentação de DNA em núcleos células epiteliais prostáticas de ratos adultos não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, identificados pela reação de TUNEL. A castração de animais não diabéticos resulta em um aumento do número de núcleos com fragmentação de DNA às 72 horas. Nos animais diabéticos há um aumento no valor médio de núcleos com fragmentação de DNA às 48 horas, com tendência a redução da sua quantidade às 72 horas. A aplicação de insulina diminui a ocorrência de fragmentação de DNA, mas a maior frequência é observada às 72 horas. **ND** = não diabético, **D** = diabético e **D+I** = diabético tratado com insulina. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os não castrados e em diferentes períodos após castração, considerando $p < 0.05$.

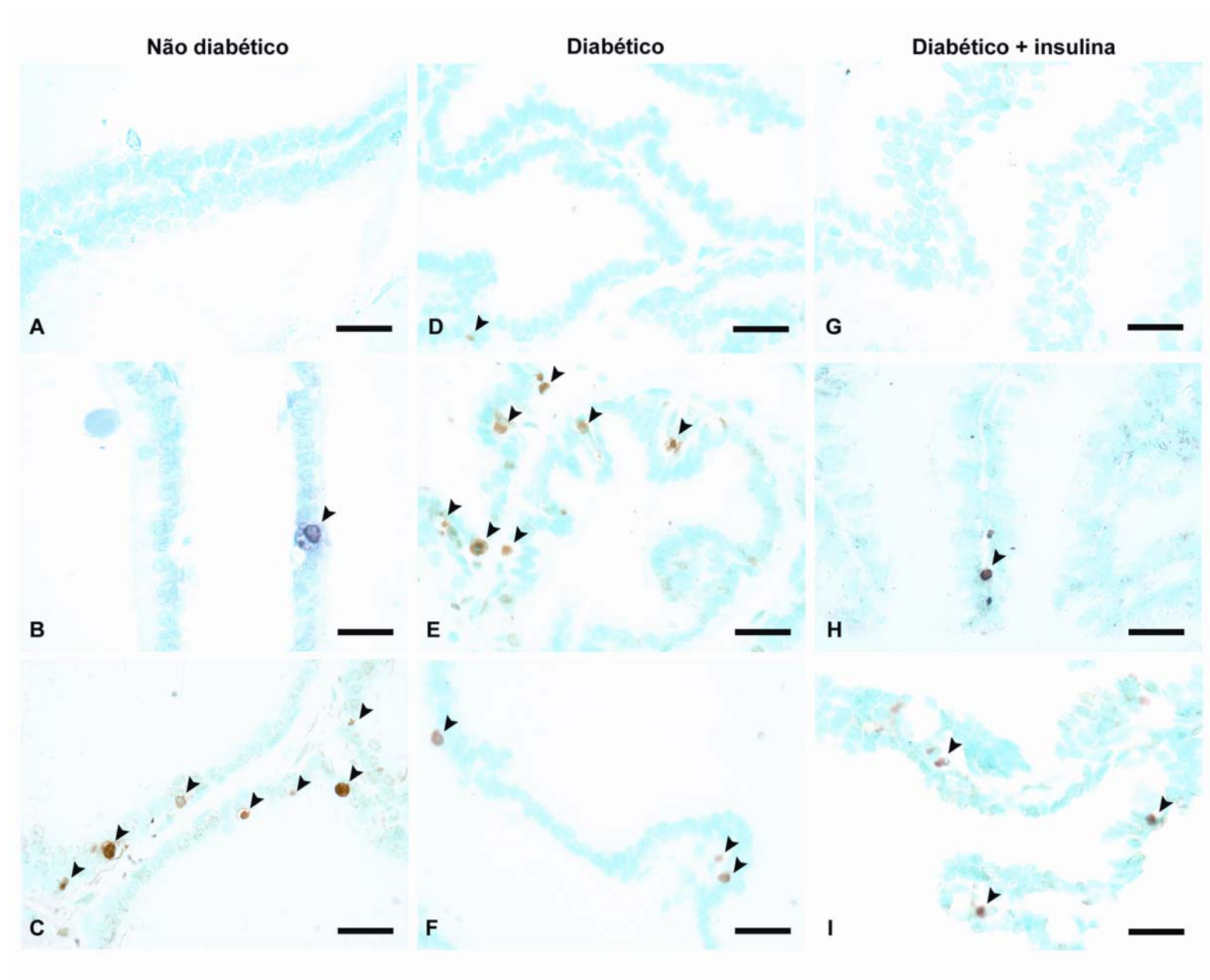


Figura 9. Variação do número de núcleos com fragmentação de DNA em núcleos células epiteliais prostáticas de ratos adultos não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, identificados pela reação de TUNEL. **A-C**, correspondem a ratos Wistar adultos não diabéticos, **A**. próstata ventral de rato Wistar não castrado, **B**. próstata ventral de rato Wistar após 48 horas de castração, **C**. próstata ventral de rato Wistar após 72 horas de castração. **D-F**, correspondem a ratos Wistar adultos diabéticos, **D**. próstata ventral de rato Wistar não castrado, **E**. próstata ventral de rato Wistar após 48 horas de castração, **F**. próstata ventral de rato Wistar após 72 horas de castração. **G-I**, correspondem a ratos Wistar adultos diabéticos tratados com insulina, **G**. próstata ventral de rato Wistar não castrado, **H**. próstata ventral de rato Wistar após 48 horas de castração, **I**. próstata ventral de rato Wistar após 72 horas de castração. A castração de animais não diabéticos resulta em um aumento do número de núcleos com fragmentação de DNA às 72 horas. Nos animais diabéticos há um aumento no valor médio de núcleos com fragmentação de DNA às 48 horas, com tendência a redução da sua quantidade às 72 horas. A aplicação de insulina diminui a ocorrência de fragmentação de DNA, mas a maior frequência é observada às 72 horas. As setas indicam os núcleos apoptóticos. Barras de aumento = 100 μ m

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e a atividade da próstata são influenciados pela insulina. Este hormônio regula o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, reduzindo a produção de testosterona pelos testículos (Kirchick et al., 1979). Alguns trabalhos identificaram a presença de receptores de insulina (Saucier et al., 1981) e de IGF-1 na próstata, indicando que ambos podem contribuir para o crescimento prostático (Stattin et al., 2001; Ohlson et al. 2006).

Alguns trabalhos demonstraram que o diabetes causa alterações na ultra-estrutura das células epiteliais e que estas alterações podem ser revertidas com a aplicação do hormônio na forma sintética (Carvalho et al., 2003; Soundamani et al., 2005). Quando interrompida a produção de insulina durante a maturação sexual, ocorre um prejuízo no desenvolvimento da glândula prostática (Soudamani et al., 2005). Em adultos, o diabetes induzido pela estreptozotocina promove uma alta incidência de infiltrados inflamatórios na próstata, além de aumentar a incidência de lesões pré-malignas e malignas em ratos (Ribeiro et al., 2008).

Já foi demonstrado que a castração aumenta o nível de fosforilação inativadora em serina 307 (às 24 horas) e diminui o conteúdo de IRS-1 (às 48 horas após cirurgia) (Ohlson et al. 2006). Isto afeta a resposta da próstata ventral ao IGF-1, reduzindo a proliferação celular do epitélio e o aumento da densidade de volume do leito vascular, observado nos animais intactos. Estas alterações explicam a resistência periférica à insulina em ratos machos castrados e sua reversão pela aplicação de testosterona (Halmang & Bjorntorp, 1992). Mais recentemente, foi demonstrado que a deficiência em testosterona resulta em comprometimento da produção de insulina e da expressão do seu receptor em músculo, fígado e tecido adiposo (Muthusamy et al. 2007). Estes resultados demonstram a existência de um mecanismo de regulação endócrina cruzada entre insulina e andrógenos e sugerem uma associação entre envelhecimento, obesidade, níveis reduzidos de testosterona e incidência do diabetes,

A castração cirúrgica promove a eliminação quase completa da concentração de testosterona circulante. Trabalhos sugerem que esta redução ocorre menos de 12 horas após a castração e a redução em animais castrados é de 95% (Kashiwagi et al. 2005).

A próstata ventral de ratos regride após a remoção da testosterona pela castração, o que envolve a morte de células endoteliais e alterações vasculares (Shabsigh et al. 1998), a morte de células epiteliais (Kerr e Searle, 1973; Kyprianou & Isaacs, 1988; Isaacs et al. 1994) e alterações nas células musculares lisas e da matriz extracelular (Carvalho & Line, 1996; Carvalho et al., 1997a; 1997b; Vilamaior et al., 2000; 2005; Antonioli et al., 2004; 2007; Augusto et al., 2008).

No presente trabalho, investigamos o papel da insulina em ratos adultos submetidos à castração, procurando evidenciar seu papel na sobrevivência celular e sua participação na defasagem entre a queda dos níveis de testosterona e o pico de apoptose das células epiteliais que ocorre 72 horas após a cirurgia.

O tratamento com aloxana foi eficaz em produzir um quadro diabético caracterizado por glicemia elevada e glicosúria. Optamos por utilizar um modelo agudo de diabetes, para evitar efeitos cumulativos de alterações em resposta a hipo-insulinemia e/ou hiperglicemia ou aplicação prolongada de insulina, porém, com estes estudos ainda não é possível distinguir se os efeitos aqui apresentados são devidos aos seguintes fatores, tratamento pela aloxana, hiperglicemia proveniente da manifestação do diabetes tipo I ou pela própria diabetes.

No presente estudo, identificamos uma redução do nível de testosterona que teve seu valor médio reduzido à metade. O tratamento com insulina recuperou em parte esta queda. Talvez por causa do número de animais utilizados, as diferenças não foram significativas, como apontado em outros trabalhos (Carvalho et al., 2003; Ribeiro et al., 2007). Foi também demonstrado que há uma diminuição nos níveis de 17β -estradiol nos animais diabéticos e uma recuperação dos níveis observados nos animais não diabéticos após o tratamento com insulina exógena. Observação semelhante foi publicada por Suthagar et al. (2009). O 17β -estradiol tem ações diretas e indiretas sobre as glândulas acessórias do aparelho reprodutor, incluída a próstata ventral, que expressam receptores específicos (Risbridger et al. 2001; Prins & Korach 2008). Foi também demonstrado que o mesmo efeito ocorre na indução do diabetes pela estreptozotocina (Sudha et al., 2000) e que essa redução na concentração de 17β -estradiol promove a diminuição no conteúdo dos receptores de estrógeno (Suthagar et al. 2009). O tratamento com insulina recupera os níveis de estradiol. Um achado curioso, foi que isto ocorre também nos animais castrados, pois levanta a questão de qual seria o precursor para a síntese de 17β -estradiol nestes animais, nos quais a concentração de testosterona está abaixo do nível de detecção dos métodos empregados. É possível, entretanto, que haja contribuição de andrógenos produzidos pela glândula adrenal, como a deidroepiandrosterona, que também pode ser convertida a estrógeno pela enzima aromatase.

Os experimentos demonstraram que o peso corporal de ratos diabéticos induzidos pela aloxana aumenta significativamente. Yono et al. (2005) obteve o mesmo resultado para a linhagem de ratos BB/Wor, cujos machos manifestam a síndrome hiperglicêmica espontaneamente entre os 50 e os 90 dias de idade (Rossini et al., 1995) e para ratos BB/Wor que não manifestaram diabetes espontaneamente e foram tratados pela estreptozotocina. A insulina é um hormônio classificado com anabólico, tendo uma importante função na regulação

do peso corporal e do metabolismo (Flakoll et al., 2000) e este aumento de peso pode ser devido a uma maior ingestão de água ou alimentos nas etapas iniciais do diabetes

O peso da glândula prostática não se altera nos animais diabéticos, diferentemente do que foi demonstrado por Yono et al. (2005) e Ribeiro et al. (2007). Estes autores afirmam que o diabetes promove uma redução do peso prostático em função de uma diminuição do nível sérico de testosterona. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa na concentração de testosterona, foi evidente uma queda no valor médio obtido. Portanto, parece-nos que a diferença entre nossos resultados e os daqueles grupos seja devida principalmente ao tempo de exposição ao diabetes.

À semelhança do que ocorre nos animais não diabéticos, a castração resulta em diminuição do peso da glândula dos animais diabéticos e esta redução não é afetada pela aplicação de insulina exógena. Apesar disto, foi observado que o máximo de redução de peso da glândula após 120 horas seja 57% para as três situações experimentais. Porém, as cinéticas de perda de peso foram diferentes. Enquanto nos animais não diabéticos a redução de peso se manifesta após as 48 horas, aquela observada nos animais diabéticos é mais progressiva a partir da castração. Já nos animais diabéticos tratados com insulina o máximo de redução foi atingido já às 48h horas após a cirurgia. Fica aparente a partir destes resultados que a insulina exógena tem um efeito de aceleração metabólica, levando a uma regressão prostática mais rápida.

Para procurar caracterizar o efeito do diabetes sobre a glândula prostática, realizamos uma análise da estrutura tecidual, utilizando estereologia para definição da contribuição dos compartimentos epitelial, luminal, estroma não muscular e de células musculares lisas. Foi possível identificar reduções importantes nos volumes ocupados pelos compartimentos epiteliais e de células musculares lisas.

Carvalho et al. (2003) demonstram alterações ultra-estruturais do sistema de endomembranas e de organelas envolvidas no processo de secreção das células epiteliais na ausência de insulina que compromete a fertilidade dos animais. Os presentes resultados sugerem que a redução do volume do epitélio nos animais diabéticos parece ter sido compensada por um aumento do volume do lúmen, o que confirma os resultados de Ribeiro et al. (2007), que demonstraram que o diabetes promove uma atrofia do compartimento epitelial prostático e sugeriram que esta atrofia assemelha-se àquela causada pela castração, sustentados principalmente pela redução de testosterona sérica. Esta sugestão é importante e parece ser reforçada pela observação do presente trabalho de que a aplicação de insulina não

restaura o volume do epitélio nos animais não castrados e isto talvez ocorra por conta do curto período de recuperação.

Parece importante salientar o efeito do diabetes na redução do volume ocupado pelas células musculares lisas. Enquanto a castração causa uma redução no volume destas células nos animais não diabéticos, ela tem pouco efeito nos animais diabéticos, dentro do período analisado, levando a crer que as células musculares lisas já se encontram numa situação de atrofia, mesmo nos animais não castrados. Parece que o diabetes antecipa uma redução do volume das células musculares lisas promovida pela castração (Antonioli et al. 2004). Isto parece significativo, do ponto de vista da patogenia da hiperplasia prostática benigna, principalmente nos indivíduos diabéticos, podendo indicar um papel da insulina diretamente sobre estas células, com conseqüências possíveis após longos períodos de tratamento com insulina exógena.

A redução do volume do epitélio frente à castração é atribuída parcialmente à perda das células epiteliais por apoptose, o que está de acordo com trabalhos prévios que demonstram um pico de apoptose no terceiro dia após a castração (Kerr e Searle, 1973; Kyprianou & Isaacs, 1988; Isaacs et al., 1994; Johansson et al., 2005). Embora seja comprovado que o mecanismo principal destas alterações seja a privação androgênica, já foi demonstrado que a apoptose do epitélio se dá mesmo quando ele não expressa o receptor de andrógenos, sugerindo a existência de um mecanismo parácrino de regulação da sobrevivência ou de indução de apoptose das células epiteliais. Foi também identificado que as células musculares lisas são as principais, embora não únicas, produtoras de IGF-1 na próstata, revelando a existência de um mecanismo de regulação parácrino da função epitelial (Ohlson et al. 2006; Sutherland et al. 2008). Além disto, pouco se conhece dos eventos moleculares responsáveis por este processo. Tão pouco se conhecem as razões que levam ao atraso no pico de morte celular epitelial com respeito à queda dos níveis de testosterona. Um possível evento relacionado a este atraso, pode estar relacionado à cinética de queda dos níveis de DHT tecidual. Segundo Kashiwagi et al. (2005), os níveis de DHT tecidual é cerca de 16 vezes mais elevado que o de testosterona e, mesmo 24 após castração, a concentração de DHT ainda é maior do que o nível de testosterona observado na próstata do animal não castrado. Uma possibilidade é que o tempo necessário para ativação (ou inativação) de um mecanismo parácrino responsável pela indução de apoptose (ou de supressão de um mecanismo de sobrevivência). A segunda possibilidade é que velocidade de redução dos níveis teciduais de DHT, mais lenta que aquela da testosterona (Kashiwagi et al. 2006) seria o responsável por garantir a sobrevivência do epitélio. A terceira possibilidade é que hormônios somatotróficos possam tamponar as variações nos níveis de

andrógeno por um certo período. Embora seja possível que haja contribuições individuais de cada um destes mecanismos, decidimos explorar a terceira possibilidade, investigando o efeito do diabetes (hipoinsulinemia) e da aplicação de insulina exógena na cinética de morte das células epiteliais prostáticas

Os resultados do presente trabalho demonstram que o pico de morte das células epiteliais observado às 72 horas nos animais não diabéticos é antecipado para as 48 horas nos animais diabéticos. Isto sugere que a insulina tenha um efeito positivo sobre a sobrevivência das células epiteliais prostáticas, tamponando o efeito da privação androgênica. Isto foi confirmado pela aplicação de insulina exógena, que não somente restaura a posição do pico de morte celular para as 72 horas, mas também causa uma redução da taxa de morte celular não tanto nos animais não castrados, como ao longo de todo o período pós-castração analisado.

Além de um efeito direto sobre as células epiteliais prostáticas, é possível que a insulina tenha também um efeito indireto, por regular os níveis de 17β -estradiol, como discutido acima.

Neste trabalho demonstramos que não só os andrógenos, mas também a insulina é um fator relevante para a sobrevivência das células epiteliais prostáticas. Como não foi observada recuperação do volume do epitélio, mesmo nos animais não castrados, sugere-se que a insulina tenha efeito na sobrevivência das células, mas não na manutenção do seu estado funcional secretor.

Além disto, demonstramos que a cinética de morte celular difere entre animais castrados, animais diabéticos e animais diabéticos que receberam insulina, sugerindo que a apoptose das células epiteliais prostáticas induzida pela privação androgênica seja modulada por outros fatores além dos andrógenos. É possível que a insulina module a inibição da BAD pela AKT-p regulando a morte celular. 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), o que seria consistente com uma redução do fluxo sanguíneo e conseqüente condição de hipóxia e limitação de nutrientes que se estabelecem rapidamente após castração (Shabsigh et al., 1998; 1999; 2001).

7. CONCLUSÃO GERAL

A insulina consiste em elemento importante de regulação da fisiologia da próstata ventral de ratos, uma vez que:

1. Nas condições do presente trabalho, o diabetes não afeta o peso corporal e nem o peso relativo da próstata ventral de ratos;
2. Os volumes ocupados pelos compartimentos epitelial e de células musculares lisas são reduzidos pelo diabetes;
3. O diabetes afeta o pico de morte celular epitelial prostática em resposta à castração. Na sua ausência há uma antecipação do pico para 48 horas após a castração. A aplicação de insulina restaura a posição do pico e diminui a taxa de morte celular, sugerindo que a insulina consista em estímulo para a sobrevivência das células epiteliais prostáticas;
4. Não foi possível distinguir, neste trabalho, entre os efeitos diretos (via receptores locais) e indiretos via modulação dos níveis de testosterona e de 17 β -estradiol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altundag O, Altundag K, Gunduz (2004) DNA methylation inhibitor, procainamide, may decrease the tamoxifen resistance by inducing overexpression of the estrogen receptor beta in breast cancer patients. *Medical Hypoth* 63: 684-687
- Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF (2004) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 25: 50-56
- Antonioli E, Cardoso AB, Carvalho HF (2007) Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. *J Androl* 28:777-783
- Augusto TM, Felisbino SL, Carvalho HF (2008) Remodeling of rat ventral prostate after castration involves heparanase-1. *Cell Tiss Res* 332: 307-315
- Aümüller 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
- Aumüller G, Seitz J (1990) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121:127-231
- 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: 4368-4376
- 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
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL (1984) The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 132: 474–479
- 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

- Brändström A, Westin P, Bergh A, Cajander S, Damber JE (1994) Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in an androgen-sensitive prostatic adenocarcinoma in the rat. *Cancer Res* 1;54(13):3594-601
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA (2004) *Trends Biochem Sci* 29: 233–242
- Bruni-Cardoso A, Carvalho HF (2007) Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. *Anat Rec (Hoboken)* 290: 1223-1232
- 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 VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani CR, Padovani CR, Martinez FE (2000) Ultrastructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). *Tissue Cell* 32: 275–283
- 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
- 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
- Corbier P, Martikainen P, Pestis J, Härkönen P (1995) Experimental research on the morphofunctional differentiation of the rat ventral prostate: roles of the gonads at birth. *Arch Physiol Biochem* 103: 699-714
- 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
- Cunha GR, Riche W, Thomson, Marker P, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 221-236
- 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
- DeKlerk DP, Coffey DS (1978) Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique. *Biomorphometrics. Invest Urol* 16: 240-245
- 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
- Donjacour AA, Cunha GR (1988) The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis inn the mouse prostate. *Dev Biol* 128: 1-14
- Farnsworth WE (1999) Prostate stroma: physiology. *Prostate.* 38: 60-72
- Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 34-45
- Feng X, Clark RA, Galanakis D, Tonnesen MG (1999) Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alphav/beta3 mRNA by fibrin1. *J Invest Dermatol* 113: 913-919
- Flakoll PJ, Carlson MG, Cherrington AD (2000) Physiological action of insulin. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editores. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins p. 148-60
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) *Oncogene* 22: 8983–8998
- Freeman SN, Rennie PS, Chao J, Lund LR, Andreasen PA (1990) Urokinase- and tissue-type plasminogen activators are suppressed by cortisol in the involuting prostate of castrated rats. *Biochem J* 269: 189-193

- García-Flórez M, Carvalho HF (2005) A célula epitelial prostática. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB, editores. Células – Uma abordagem multidisciplinar. Ed. Manole, Barueri, p. 335-345
- 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
- Häggström S, Wikström P, Bergh A, Damber JE (1998) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate* 36: 71-79
- Holmang A, Bjortorp P (1992) The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats. *Acta Physiol Scand* 146: 505-510
- Hamilton JB, Bunch LD, Mestler GE (1959) Urinary 17-ketosteroids in castrated vs. noncastrated men. *J Clin Endocrinol Metab* 19: 1680-1682
- 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
- Hayek OR, Shabsigh A, Kaplan SA, Kiss AJ, Chen MW, Burchardt T, Burchardt M, Olsson CA, Buttyan R (1999) Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. *J Urol* 162: 1527-1531
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996) Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)* 155: 81-93
- Heinlein CA, Chang C (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25(2):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. *J Androl* 25: 330-337
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ (1981) A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. *J Anat* 132: 357-370
- Hu Z, Ito T, Yuri K, Xie C, Ozawa H, Kawata M (1998) In vivo time course of morphological changes and DNA degradation during the degeneration of castration-induced apoptotic prostate cells. *Cell Tissue Res* 294: 153-60
- Ikeda K, Wada Y, Foster Jr HE, Wang Z, Weiss RM, Latifpour J (2000) Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor- β . *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
- Isaacs JT, Furuya Y & Berges R (1994). The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Sem Cancer Biol* 5: 391-400
- Jacobs MN, Dickins M, Lewis DF (2003) Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84: 117-132
- 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
- Jemal A, Ward E, Hao Y, et al (2005) Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* 294: 1255-1259

- Johansson A, Rudolfsson SH, Wikström P, Bergh A (2005) Altered levels of angiopoietin 1 and tie 2 are associated with androgen-regulated vascular regression and growth in the ventral prostate in adult mice and rats. *Endocrinology* 146: 3463-3470
- Kashiwagi B, Shibata Y, Ono Y, Suzuki R, Honma S, Suzuki K (2005) Changes in testosterone and dihydrotestosterone levels in male rat accessory sex organs, serum, and seminal fluid after castration: establishment of a new highly sensitive simultaneous androgen measurement method. *J Androl* 26: 586-591
- Kerr JF, Searle J (1993) Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch B Cell Pathol* 13: 87-102
- Kheradmand F, Rishi K, Werb Z (2002) Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci* 115: 839-848
- Kofoed JA, Tumilasci OR, Curbelo HM, Fernandez Lemos SM, Arias NH, Houssay AB (1990) Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. *Prostate* 16: 93-102
- 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
- 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
- Kyprianou N, Isaacs JT (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122: 552-562
- 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
- Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997) 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 (1997) 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

- Lekås E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber JE (1997) Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. *Urol Res* 25: 309-314
- Li LC, Chui R, Nakajima K, Oh B, Au HC, Dahiya R (2000) Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression. *Cancer Res* 60: 702–706
- 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
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253: 165-174
- McNeal JE, Stamey TA, Hodge KK (1988) The prostate gland: morphology, pathology, ultrasound anatomy. *Monogr Urol* 9:36-54
- Men S, Cakar B, Conkbayir I, Hekimoglu B (2001) Detection of prostatic carcinoma: the role of TRUS, TRUS guided biopsy, digital rectal examination, PSA and PSA density. *J Exp Clin Cancer Res* 20: 473-480
- Muthusamy T, Dhevika S, Murugesan P, Balasubramanian K (2007) Testosterone deficiency impairs glucose oxidation through defective insulin and its receptor gene expression in target tissues of adult male rats. *Life Sci* 81: 534-542
- 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
- Ohlson N, Berg A, Persson ML, Wikström P (2006) Castration rapidly decreases local insulin-like growth factor-I levels and inhibits its effects in the ventral prostate in mice. *Prostate* 66: 1687-1697
- 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
- Paulino MCR (2007) Pesquisa de tecido prostático em paciente 46, XX portadores da forma

clássica de hiperplasia congênita das supra-renais. Tese de Mestrado, USP. 68 p

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

Powell WC, Domann FE Jr, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden GT (1996) Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 29: 159-168

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

Prins GS, Birch L, Greene GL. (1991) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*. 129(6):3187-99

Prins GS, Korach KS (2008) The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 73: 233-244

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

Ribeiro DL, Marques SF, Alberti S, Spadella CT, Manzato AJ, Taboga SR, Dizelyi N, Abrahamsson PA, Góes RM (2008) Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol* 89: 276-283

Risbridger GP, Wand H, Young P, Tekeshi K, Wong YZ, Lubahn D (2001) Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol* 229: 432-444

Robbins SL (1989) Doenças Sistêmicas. In: Diabetes Mellitus. Patologia Estrutural e Funcional, pp. 238–250 (editor S.L. Robbins), Canadá: W.B. Saunders Company

Rossini AA, Handler ES, Mordes JP, Greiner DL (1995) Human autoimmune diabetes mellitus: lessons from BB rats and NOD mice—Caveat emptor. *Clin Immunol Immunopathol* 74: 2–9

- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806
- Santos FC, Leite RP, Custódio AM, Carvalho KP, Monteiro-Leal LH, Santos AB, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2006) Testosterone stimulates growth and secretory activity of the female prostate in the adult gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Biol Reprod* 75: 370-379
- 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
- Saucier J, Dube JY, Tremblay RR (1981) Specific insulin binding sites in the rat testis. Characterization and variation. *Endocrinology* 109: 2220-2225
- Scott AM, Atwater I, Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 21(5):470-5
- 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, 1991
- 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
- Shabsigh A, Chang DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ, Buttyan R (1998) Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival. *Prostate* 36: 201-206
- 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
- Simpson E, Rubin G, Clyne C (1999) Local estrogens biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer* 6: 131-137
- 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
- Stattin P, Kaaks R, Riboli E, Ferrari P, Dechaud H, Hallmans G. (2001) Circulating insulin-like growth factor -1 and benign prostatic hyperplasia: a prospective study. *Scand J Urol Nephrol* 35:122-126
- 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
- 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. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287: 1281-1289
- Sudha S, Ravisankar V, Julie PM, Arunakaran J, Govindarajulu P, Balasubramanian K (2000) Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin replacement on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp Clin Endocrinol Diab* 108:14-20
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod.* 34: 961-971
- 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.* 63: 43-50
- 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
- Sutherland BW, Knoblaugh SE, Kaplan-Lefko PJ, Wang F, Holzenberger M, Greenberg NM (2008) Conditional deletion of insulin-like growth factor-I receptor in prostate epithelium. *Cancer Res* 68: 3495-3504
- 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- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology* 134: 1039-1045
- Tsugaya M, Harada N, Tozawa K (1996) Aromatase mRNA levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Int J Urol* 3: 292-296
- 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
- Vilamaior PSL, Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF (2005) Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int* 29: 809-816
- Vilamaior PS, Taboga SR, Carvalho HF (2006) Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 288: 885-892
- 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.
- Zhao GQ, Holterhus PM, Dammshäuser I, Hoffbauer G, Aumüller G (1992) Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21:183-99

- Ziada A, Rosenblum M, Crawford ED (1999) Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Urology* 53:1–6
- Webber MM (1981) Polypeptide hormones and the prostate. *Prog Clin Biol Res* 75B: 63-88
- Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafsson J-A (2002) An endocrine pathway in the prostate, ER(, AR, 5(- androstane-3(, 17(-diol and CYP7B1, regulates the prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13589-13594
- Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002) *Trends Endocrinol. Metab* 13: 444–451
- White MF (1997) The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 (Suppl 2) S2-17
- Wilson JD, Griffin JE, Leshin M, George FW (1981) Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. *Hum Genet* 58: 78-84
- Wilson MJ, Whitaker JN, Sinha AA (1991) Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat ventral prostate: evidence for castration-induced expression of cathepsin D in basal cells. *Anat Rec* 229: 321-333
- Wiseman BS, Werb Z (2002) Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296: 1046-1049
- Yang H, Chen C, Yan P, Huang T, Shi H, Bugar M, Nimmrich I, Maier S, Belin K, Caldwell C (2003) The androgen receptor gene preferentially hypermethylated follicular non- Hodgkin's lymphomas. *Clinical Cancer Res* 9: 4034-4042
- 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 2005

9. ANEXOS

		Não Diabético			
		Peso			
Horas Após Castração	Animal	Corporal		Prostático (g)	Relativo (%)
		Absoluto (g)	Relativo (%)		
Não castrado	1	176	100	0,1620	0,0920
Não castrado	2	236	100	0,2500	0,1059
24	1	281	136	0,2900	0,1032
24	2	300	146	0,4049	0,1350
24	3	230	112	0,1458	0,0634
24	4	276	134	0,3530	0,1279
48	1	382	185	0,3540	0,0927
48	2	302	147	0,3745	0,1240
48	3	301	146	0,2687	0,0893
48	4	320	155	0,3560	0,1113
72	1	253	123	0,2000	0,0791
72	2	268	130	0,2304	0,0860
72	3	343	167	0,2492	0,0727
72	4	328	159	0,2420	0,0738
96	1	350	170	0,2416	0,0690
96	2	262	127	0,1332	0,0508
96	3	341	166	0,2534	0,0743
120	1	287	139	0,1287	0,0448
120	2	269	131	0,0860	0,0320
120	3	356	173	0,1757	0,0494

		Diabético			
		Peso			
Horas Após Castração	Animal	Corporal		Prostático (g)	Relativo (%)
		Absoluto (g)	Relativo (%)		
Não castrado	1	306	100	0,2109	0,0689
Não castrado	2	311	100	0,2488	0,0800
Não castrado	3	270	100	0,4522	0,1675
Não castrado	4	305	100	0,2062	0,0676
24	1	236	79	0,2603	0,1103
24	2	209	70	0,1771	0,0847
24	3	211	71	0,1271	0,0602
24	4	279	94	0,1945	0,0697
48	1	271	91	0,2560	0,0945
48	2	248	83	0,1258	0,0507
48	3	230	77	0,1934	0,0841
48	4	255	86	0,2288	0,0897
72	1	273	92	0,1005	0,0368
72	2	251	84	0,1636	0,0652
72	3	218	73	0,1810	0,0830
96	1	299	100	0,0956	0,0320
96	2	338	113	0,2722	0,0805
96	3	309	104	0,1621	0,0525
120	1	352	118	0,1242	0,0353
120	2	333	112	0,1375	0,0413
120	3	267	90	0,1295	0,0485
120	4	344	115	0,2203	0,0640

		Diabético + Insulina			
		Peso			
Horas Após Castração	Animal	Corporal		Prostático (g)	Relativo (%)
		Absoluto (g)	Relativo (%)		
Não castrado	1	293	100	0,2714	0,0926
Não castrado	2	346	100	0,5180	0,1497
Não castrado	3	336	100	0,3368	0,1002
24	1	214	66	0,1756	0,0819
24	2	332	102	0,2710	0,0816
24	3	383	118	0,2656	0,0693
24	4				
48	1	389	120	0,1512	0,0389
48	2	360	111	0,1616	0,0449
48	3	315	97	0,1838	0,0583
72	1	332	102	0,1321	0,0398
72	2	327	101	0,2106	0,0644
72	3	345	106	0,2869	0,0831
72	4	256	79	0,1288	0,0504
72	5	308	95	0,1049	0,0341
72	6	346	106	0,1932	0,0558
96	1	337	104	0,1567	0,0465
96	2	320	99	0,1378	0,0430
120	1	344	106	0,1882	0,0547
120	2	339	104	0,1071	0,0316
120	3	343	105	0,1728	0,0504

Dosagem Hormonal - Não Diabético			
Horas Após Castração	Animal	E2 (pg/mL)	Testosterona (ng/dL)
Não castrado	1	42,47	437,22
Não castrado	2	33,83	208,69
Não castrado	3	40,13	273,00
Não castrado	4	32,92	636,46
Não castrado	5	32,85	117,44

Dosagem Hormonal - Diabético			
Horas Após Castração	Animal	Testosterona (ng/dL)	E2 (pg/mL)
Não castrado	1	<1,08	7,0676
Não castrado	2	200,47	11,649
Não castrado	3	119,48	27,969
24	1	<1,08	18,971
24	2	<1,08	20,553
24	3	<1,08	12,805
24	4	<1,08	11,252
48	1	<1,08	22,747
48	2	<1,08	19,104
48	3	<1,08	2,9027
72	1	<1,08	1,7519
72	2	<1,08	32,269
72	3	<1,08	22,917
96	1	<1,08	4,1531
96	2	<1,08	1,7519
96	3	2,1413	1,7519
96	4	<1,08	18,407
120	1	<1,08	12,66
120	2	<1,08	10,745
120	3	<1,08	452,55
120	4	<1,08	8,2142

Dosagem Hormonal - Diabético + Insulina			
Horas Após Castração	Animal	Testosterona (ng/dL)	E2 (pg/mL)
Não castrado	1	108,92	30,44
Não castrado	2	328,93	25,64
Não castrado	3	215,24	42,6
48	2	<3,65	33,36
48	3	<3,65	33,27
72	1	<3,65	46,75
72	2	<3,65	38,67
72	3	<3,65	12,75
72	4	<3,65	13,98
72	5	<3,65	29,06
72	6	<3,65	43,24

Estereologia - Não Diabético													
Horas Após Castração	Animal	Quantidade Estimada (Pontos)				Volume Relativo (%)				Volume Absoluto (mL)			
		Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma
Não castrado						56,90	6,90	6,30	36,80	0,054	0,007	0,006	0,035
Não castrado						56,90	11,10	21,50	21,50	0,054	0,011	0,021	0,021
Não castrado						58,30	8,30	11,10	30,60	0,056	0,008	0,011	0,029
Não castrado						48,60	8,30	40,30	11,10	0,046	0,008	0,038	0,011
Não castrado						36,80	13,90	27,80	35,40	0,035	0,013	0,026	0,034
Não castrado						41,70	8,30	34,70	23,60	0,040	0,008	0,033	0,023
Não castrado						41,70	6,90	36,10	22,20	0,115	0,019	0,100	0,061
Não castrado						40,30	6,30	18,10	41,70	0,111	0,017	0,050	0,115
Não castrado						51,40	18,10	16,00	32,60	0,142	0,050	0,044	0,090
Não castrado						36,10	9,70	41,70	22,20	0,100	0,027	0,115	0,061
Não castrado						47,20	16,70	14,60	38,20	0,131	0,046	0,040	0,106
Não castrado						27,80	12,50	46,50	25,70	0,077	0,035	0,129	0,071
Não castrado						51,40	13,90	4,90	30,60	0,238	0,051	0,018	0,113
Não castrado						44,40	4,90	38,90	13,20	0,176	0,018	0,143	0,049
Não castrado						59,70	10,40	14,60	21,50	0,235	0,038	0,054	0,079
Não castrado						36,80	6,30	19,40	11,80	0,253	0,023	0,072	0,043
Não castrado						36,80	11,80	19,40	29,20	0,189	0,043	0,072	0,107
Não castrado						37,50	4,90	29,20	18,10	0,194	0,018	0,107	0,066
Não castrado						45,10	9,00	27,10	27,80	0,207	0,041	0,124	0,128
Não castrado						31,90	7,60	38,90	29,20	0,147	0,035	0,179	0,134
Não castrado						46,50	11,10	16,00	37,50	0,214	0,051	0,073	0,172
Não castrado						55,60	15,30	8,30	36,10	0,255	0,070	0,038	0,166
Não castrado						36,80	6,90	47,90	15,30	0,169	0,032	0,220	0,070
Não castrado						36,80	8,30	44,40	18,80	0,169	0,038	0,204	0,086
Não castrado						54,90	9,70	3,50	41,70	0,198	0,035	0,013	0,150
Não castrado						63,90	13,20	13,20	22,90	0,230	0,048	0,048	0,083
Não castrado						52,80	11,80	9,00	38,20	0,190	0,043	0,033	0,138
Não castrado						53,50	8,30	25,70	20,80	0,193	0,030	0,093	0,075
Não castrado						46,50	19,40	23,60	29,90	0,168	0,070	0,085	0,108
Não castrado						59,70	10,40	16,00	24,30	0,215	0,038	0,058	0,088

24	1	53	14	42	35	36,81	9,72	29,17	24,31	0,102	0,027	0,081	0,068
24	1	71	16	22	35	49,31	11,11	15,28	24,31	0,137	0,031	0,043	0,068
24	1	91	22	11	20	63,19	15,28	7,64	13,89	0,176	0,043	0,021	0,039
24	1	68	22	27	27	47,22	15,28	18,75	18,75	0,131	0,043	0,052	0,052
24	1	58	20	22	44	40,28	13,89	15,28	30,56	0,112	0,039	0,043	0,085
24	1	60	16	26	42	41,67	11,11	18,06	29,17	0,116	0,031	0,050	0,081
48	1	72	22	12	38	50,00	15,28	8,33	26,39	0,127	0,039	0,021	0,067
48	1	54	10	24	56	37,50	6,94	16,67	38,89	0,096	0,018	0,042	0,099
48	1	59	22	24	39	40,97	15,28	16,67	27,08	0,104	0,039	0,042	0,069
48	1	77	18	26	23	53,47	12,50	18,06	15,97	0,136	0,032	0,046	0,041
48	1	46	21	21	56	31,94	14,58	14,58	38,89	0,081	0,037	0,037	0,099
48	1	78	19	18	29	54,17	13,19	12,50	20,14	0,138	0,034	0,032	0,051
72	1	66	41	22	15	45,83	28,47	15,28	10,42	0,113	0,070	0,038	0,026
72	1	52	53	14	25	36,11	36,81	9,72	17,36	0,089	0,091	0,024	0,043
72	1	78	17	13	36	54,17	11,81	9,03	25,00	0,133	0,029	0,022	0,062
72	1	80	8	19	37	55,56	5,56	13,19	25,69	0,137	0,014	0,032	0,063
72	1	64	18	23	39	44,44	12,50	15,97	27,08	0,109	0,031	0,039	0,067
72	1	64	22	22	36	44,44	15,28	15,28	25,00	0,109	0,038	0,038	0,062
96	1	34	5	40	51	23,61	3,47	27,78	35,42	0,057	0,008	0,067	0,086
96	1	24	4	56	46	16,67	2,78	38,89	31,94	0,040	0,007	0,094	0,077
96	1	14	8	87	21	9,72	5,56	60,42	14,58	0,023	0,013	0,146	0,035
96	1	29	7	82	12	20,14	4,86	56,94	8,33	0,049	0,012	0,138	0,020
96	1	42	11	61	16	29,17	7,64	42,36	11,11	0,070	0,018	0,102	0,027
96	1	25	3	39	63	17,36	2,08	27,08	43,75	0,042	0,005	0,065	0,106
120	1	62	31	19	32	43,06	21,53	13,19	22,22	0,068	0,034	0,021	0,035
120	1	63	24	29	28	43,75	16,67	20,14	19,44	0,069	0,026	0,032	0,030
120	1	48	23	33	40	33,33	15,97	22,92	27,78	0,052	0,025	0,036	0,044
120	1	52	18	64	10	36,11	12,50	44,44	6,94	0,057	0,020	0,070	0,011
120	1	47	26	25	46	32,64	18,06	17,36	31,94	0,051	0,028	0,027	0,050
120	1	26	18	55	45	18,06	12,50	38,19	31,25	0,028	0,020	0,060	0,049

Estereologia - Diabético													
Horas Após Castração	Animal	Quantidade Estimada (Pontos)				Volume Relativo (%)				Volume Absoluto (mL)			
		Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma
Não castrado	1	58	7	25	40	44,6	5,4	19,2	30,8	0,094	0,011	0,041	0,065
Não castrado	1	43	8	38	41	33,1	6,2	29,2	31,5	0,070	0,013	0,062	0,067
Não castrado	1	53	10	48	19	40,8	7,7	36,9	14,6	0,086	0,016	0,078	0,031
Não castrado	1	64	4	28	34	49,2	3,1	21,5	26,2	0,104	0,006	0,045	0,055
Não castrado	1	51	5	42	32	39,2	3,8	32,3	24,6	0,083	0,008	0,068	0,052
Não castrado	1	54	2	37	37	41,5	1,5	28,5	28,5	0,088	0,003	0,060	0,060
Não castrado	1	46	4	33	47	35,4	3,1	25,4	36,2	0,075	0,006	0,054	0,076
Não castrado	1	30	3	56	41	23,1	2,3	43,1	31,5	0,049	0,005	0,091	0,067
Não castrado	2	66	8	29	27	50,8	6,2	22,3	20,8	0,126	0,015	0,056	0,052
Não castrado	2	76	9	22	23	58,5	6,9	16,9	17,7	0,145	0,017	0,042	0,044
Não castrado	2	52	10	40	28	40,0	7,7	30,8	21,5	0,100	0,019	0,077	0,054
Não castrado	2	47	5	61	17	36,2	3,8	46,9	13,1	0,090	0,010	0,117	0,033
Não castrado	2	59	9	24	38	45,4	6,9	18,5	29,2	0,113	0,017	0,046	0,073
Não castrado	2	46	3	57	24	35,4	2,3	43,8	18,5	0,088	0,006	0,109	0,046
Não castrado	2	50	3	13	64	38,5	2,3	10,0	49,2	0,096	0,006	0,025	0,122
Não castrado	2	65	1	19	45	50,0	0,8	14,6	34,6	0,124	0,002	0,036	0,086
Não castrado	3	61	7	47	15	46,9	5,4	36,2	11,5	0,212	0,024	0,163	0,052
Não castrado	3	54	7	25	44	41,5	5,4	19,2	33,8	0,188	0,024	0,087	0,153
Não castrado	3	51	11	52	16	39,2	8,5	40,0	12,3	0,177	0,038	0,181	0,056
Não castrado	3	48	6	46	30	36,9	4,6	35,4	23,1	0,167	0,021	0,160	0,104
Não castrado	3	55	14	31	30	42,3	10,8	23,8	23,1	0,191	0,049	0,108	0,104
Não castrado	3	46	1	36	47	35,4	0,8	27,7	36,2	0,160	0,003	0,125	0,163
Não castrado	3	63	2	43	22	48,5	1,5	33,1	16,9	0,219	0,007	0,150	0,077
Não castrado	3	57	3	41	29	43,8	2,3	31,5	22,3	0,198	0,010	0,143	0,101
Não castrado	4	35	11	51	33	26,9	8,5	39,2	25,4	0,056	0,017	0,081	0,052
Não castrado	4	32	9	82	7	24,6	6,9	63,1	5,4	0,051	0,014	0,130	0,011
Não castrado	4	25	7	46	52	19,2	5,4	35,4	40,0	0,040	0,011	0,073	0,082
Não castrado	4	55	10	42	23	42,3	7,7	32,3	17,7	0,087	0,016	0,067	0,036
Não castrado	4	49	8	57	16	37,7	6,2	43,8	12,3	0,078	0,013	0,090	0,025
Não castrado	4	31	1	64	34	23,8	0,8	49,2	26,2	0,049	0,002	0,102	0,054
Não castrado	4	34	2	63	31	26,2	1,5	48,5	23,8	0,054	0,003	0,100	0,049
Não castrado	4	36	2	49	43	27,7	1,5	37,7	33,1	0,057	0,003	0,078	0,068

24	1	43	12	29	46	33,1	9,2	22,3	35,4	0,086	0,024	0,058	0,092
24	1	56	7	27	40	43,1	5,4	20,8	30,8	0,112	0,014	0,054	0,080
24	1	43	8	42	37	33,1	6,2	32,3	28,5	0,086	0,016	0,084	0,074
24	1	44	4	26	56	33,8	3,1	20,0	43,1	0,088	0,008	0,052	0,112
24	1	52	7	44	27	40,0	5,4	33,8	20,8	0,104	0,014	0,088	0,054
24	1	47	4	48	31	36,2	3,1	36,9	23,8	0,094	0,008	0,096	0,062
24	1	36	6	38	50	27,7	4,6	29,2	38,5	0,072	0,012	0,076	0,100
24	1	46	3	35	46	35,4	2,3	26,9	35,4	0,092	0,006	0,070	0,092
24	2	40	10	22	58	30,8	7,7	16,9	44,6	0,054	0,014	0,030	0,079
24	2	35	4	53	38	26,9	3,1	40,8	29,2	0,048	0,005	0,072	0,052
24	2	19	3	52	56	14,6	2,3	40,0	43,1	0,026	0,004	0,071	0,076
24	2	26	0	19	85	20,0	0,0	14,6	65,4	0,035	0,000	0,026	0,116
24	2	24	2	41	63	18,5	1,5	31,5	48,5	0,033	0,003	0,056	0,086
24	2	32	4	15	79	24,6	3,1	11,5	60,8	0,044	0,005	0,020	0,108
24	2	25	1	28	76	19,2	0,8	21,5	58,5	0,034	0,001	0,038	0,104
24	2	28	5	18	79	21,5	3,8	13,8	60,8	0,038	0,007	0,025	0,108
24	3	19	6	67	38	14,6	4,6	51,5	29,2	0,019	0,006	0,066	0,037
24	3	26	10	49	45	20,0	7,7	37,7	34,6	0,025	0,010	0,048	0,044
24	3	20	5	72	33	15,4	3,8	55,4	25,4	0,020	0,005	0,070	0,032
24	3	30	10	59	31	23,1	7,7	45,4	23,8	0,029	0,010	0,058	0,030
24	3	33	4	58	35	25,4	3,1	44,6	26,9	0,032	0,004	0,057	0,034
24	3	11	3	62	54	8,5	2,3	47,7	41,5	0,011	0,003	0,061	0,053
24	3	16	1	78	35	12,3	0,8	60,0	26,9	0,016	0,001	0,076	0,034
24	3	24	2	47	57	18,5	1,5	36,2	43,8	0,023	0,002	0,046	0,056
24	4	19	6	67	38	14,6	4,6	51,5	29,2	0,028	0,009	0,100	0,057
24	4	26	10	49	45	20,0	7,7	37,7	34,6	0,039	0,015	0,073	0,067
24	4	20	5	72	33	15,4	3,8	55,4	25,4	0,030	0,007	0,108	0,049
24	4	30	10	59	31	23,1	7,7	45,4	23,8	0,045	0,015	0,088	0,046
24	4	33	4	58	35	25,4	3,1	44,6	26,9	0,049	0,006	0,087	0,052
24	4	27	5	59	39	20,8	3,8	45,4	30,0	0,040	0,007	0,088	0,058
24	4	29	8	55	38	22,3	6,2	42,3	29,2	0,043	0,012	0,082	0,057
24	4	26	4	64	36	20,0	3,1	49,2	27,7	0,039	0,006	0,096	0,054

48	1	30	5	23	72	23,1	3,8	17,7	55,4	0,059	0,010	0,045	0,142
48	1	33	2	33	62	25,4	1,5	25,4	47,7	0,065	0,004	0,065	0,122
48	1	21	2	19	88	16,2	1,5	14,6	67,7	0,041	0,004	0,037	0,173
48	1	28	1	55	46	21,5	0,8	42,3	35,4	0,055	0,002	0,108	0,091
48	1	27	3	44	56	20,8	2,3	33,8	43,1	0,053	0,006	0,087	0,110
48	1	21	2	33	74	16,2	1,5	25,4	56,9	0,041	0,004	0,065	0,146
48	1	34	2	32	62	26,2	1,5	24,6	47,7	0,067	0,004	0,063	0,122
48	1	37	4	21	68	28,5	3,1	16,2	52,3	0,073	0,008	0,041	0,134
48	2	29	1	41	59	22,3	0,8	31,5	45,4	0,028	0,001	0,040	0,057
48	2	27	1	15	87	20,8	0,8	11,5	66,9	0,026	0,001	0,015	0,084
48	2	9	2	61	58	6,9	1,5	46,9	44,6	0,009	0,002	0,059	0,056
48	2	16	3	72	39	12,3	2,3	55,4	30,0	0,015	0,003	0,070	0,038
48	2	34	2	42	52	26,2	1,5	32,3	40,0	0,033	0,002	0,041	0,050
48	2	42	1	30	57	32,3	0,8	23,1	43,8	0,041	0,001	0,029	0,055
48	2	29	2	10	89	22,3	1,5	7,7	68,5	0,028	0,002	0,010	0,086
48	2	27	1	40	62	20,8	0,8	30,8	47,7	0,026	0,001	0,039	0,060
48	3	44	1	16	69	33,8	0,8	12,3	53,1	0,065	0,001	0,024	0,103
48	3	17	1	75	37	13,1	0,8	57,7	28,5	0,025	0,001	0,112	0,055
48	3	7	2	80	41	5,4	1,5	61,5	31,5	0,010	0,003	0,119	0,061
48	3	12	2	38	78	9,2	1,5	29,2	60,0	0,018	0,003	0,057	0,116
48	3	13	1	93	23	10,0	0,8	71,5	17,7	0,019	0,001	0,138	0,034
48	3	8	1	60	61	6,2	0,8	46,2	46,9	0,012	0,001	0,089	0,091
48	3	12	2	81	35	9,2	1,5	62,3	26,9	0,018	0,003	0,121	0,052
48	3	18	1	57	54	13,8	0,8	43,8	41,5	0,027	0,001	0,085	0,080
48	4	26	1	33	70	20,0	0,8	25,4	53,8	0,046	0,002	0,058	0,123
48	4	34	2	30	64	26,2	1,5	23,1	49,2	0,060	0,004	0,053	0,113
48	4	17	1	31	81	13,1	0,8	23,8	62,3	0,030	0,002	0,055	0,143
48	4	33	2	35	60	25,4	1,5	26,9	46,2	0,058	0,004	0,062	0,106
48	4	34	3	44	49	26,2	2,3	33,8	37,7	0,060	0,005	0,077	0,086
48	4	27	1	25	77	20,8	0,8	19,2	59,2	0,048	0,002	0,044	0,136
48	4	31	1	38	60	23,8	0,8	29,2	46,2	0,055	0,002	0,067	0,106
48	4	31	2	55	42	23,8	1,5	42,3	32,3	0,055	0,004	0,097	0,074

72	1	33	5	50	42	25,4	3,8	38,5	32,3	0,026	0,004	0,039	0,032
72	1	23	9	65	33	17,7	6,9	50,0	25,4	0,018	0,007	0,050	0,026
72	1	23	8	63	36	17,7	6,2	48,5	27,7	0,018	0,006	0,049	0,028
72	1	40	4	48	38	30,8	3,1	36,9	29,2	0,031	0,003	0,037	0,029
72	1	22	5	71	32	16,9	3,8	54,6	24,6	0,017	0,004	0,055	0,025
72	1	35	9	47	39	26,9	6,9	36,2	30,0	0,027	0,007	0,036	0,030
72	1	26	7	63	34	20,0	5,4	48,5	26,2	0,020	0,005	0,049	0,026
72	1	20	4	79	27	15,4	3,1	60,8	20,8	0,015	0,003	0,061	0,021
72	2	49	9	22	50	37,7	6,9	16,9	38,5	0,062	0,011	0,028	0,063
72	2	47	6	30	47	36,2	4,6	23,1	36,2	0,059	0,008	0,038	0,059
72	2	48	6	30	46	36,9	4,6	23,1	35,4	0,060	0,008	0,038	0,058
72	2	44	5	39	42	33,8	3,8	30,0	32,3	0,055	0,006	0,049	0,053
72	2	43	5	37	45	33,1	3,8	28,5	34,6	0,054	0,006	0,047	0,057
72	2	45	9	33	43	34,6	6,9	25,4	33,1	0,057	0,011	0,042	0,054
72	2	56	12	23	39	43,1	9,2	17,7	30,0	0,070	0,015	0,029	0,049
72	2	42	6	40	42	32,3	4,6	30,8	32,3	0,053	0,008	0,050	0,053
72	3	19	4	93	14	14,6	3,1	71,5	10,8	0,026	0,006	0,129	0,019
72	3	26	10	65	29	20,0	7,7	50,0	22,3	0,036	0,014	0,091	0,040
72	3	24	8	71	27	18,5	6,2	54,6	20,8	0,033	0,011	0,099	0,038
72	3	19	8	92	11	14,6	6,2	70,8	8,5	0,026	0,011	0,128	0,015
72	3	18	12	65	35	13,8	9,2	50,0	26,9	0,025	0,017	0,091	0,049
72	3	19	8	79	24	14,6	6,2	60,8	18,5	0,026	0,011	0,110	0,033
72	3	14	3	72	41	10,8	2,3	55,4	31,5	0,019	0,004	0,100	0,057
72	3	34	9	68	19	26,2	6,9	52,3	14,6	0,047	0,013	0,095	0,026

96	1	43	11	19	57	33,1	8,5	14,6	43,8	0,032	0,008	0,014	0,042
96	1	25	11	29	65	19,2	8,5	22,3	50,0	0,018	0,008	0,021	0,048
96	1	11	10	70	39	8,5	7,7	53,8	30,0	0,008	0,007	0,051	0,029
96	1	38	9	32	51	29,2	6,9	24,6	39,2	0,028	0,007	0,024	0,038
96	1	32	5	26	67	24,6	3,8	20,0	51,5	0,024	0,004	0,019	0,049
96	1	9	7	78	36	6,9	5,4	60,0	27,7	0,007	0,005	0,057	0,026
96	1	31	8	30	61	23,8	6,2	23,1	46,9	0,023	0,006	0,022	0,045
96	1	7	5	87	31	5,4	3,8	66,9	23,8	0,005	0,004	0,064	0,023
96	2	33	6	52	39	25,4	4,6	40,0	30,0	0,069	0,013	0,109	0,082
96	2	35	7	16	72	26,9	5,4	12,3	55,4	0,073	0,015	0,034	0,151
96	2	30	5	28	67	23,1	3,8	21,5	51,5	0,063	0,010	0,059	0,140
96	2	30	6	53	41	23,1	4,6	40,8	31,5	0,063	0,013	0,111	0,086
96	2	26	4	19	81	20,0	3,1	14,6	62,3	0,054	0,008	0,040	0,170
96	2	42	3	52	33	32,3	2,3	40,0	25,4	0,088	0,006	0,109	0,069
96	2	21	3	53	53	16,2	2,3	40,8	40,8	0,044	0,006	0,111	0,111
96	2	27	7	70	26	20,8	5,4	53,8	20,0	0,057	0,015	0,147	0,054
96	3	5	9	67	49	3,8	6,9	51,5	37,7	0,006	0,011	0,084	0,061
96	3	10	3	90	27	7,7	2,3	69,2	20,8	0,012	0,004	0,112	0,034
96	3	13	4	68	45	10,0	3,1	52,3	34,6	0,016	0,005	0,085	0,056
96	3	13	3	72	42	10,0	2,3	55,4	32,3	0,016	0,004	0,090	0,052
96	3	9	7	81	33	6,9	5,4	62,3	25,4	0,011	0,009	0,101	0,041
96	3	10	2	77	41	7,7	1,5	59,2	31,5	0,012	0,002	0,096	0,051
96	3	9	2	105	14	6,9	1,5	80,8	10,8	0,011	0,002	0,131	0,017
96	3	11	4	78	37	8,5	3,1	60,0	28,5	0,014	0,005	0,097	0,046
96	4	29	5	83	13	22,3	3,8	63,8	10,0	0,048	0,008	0,137	0,021
96	4	45	4	53	28	34,6	3,1	40,8	21,5	0,074	0,007	0,087	0,046
96	4	47	4	46	33	36,2	3,1	35,4	25,4	0,078	0,007	0,076	0,054
96	4	24	6	78	22	18,5	4,6	60,0	16,9	0,040	0,010	0,129	0,036
96	4	21	3	81	25	16,2	2,3	62,3	19,2	0,035	0,005	0,134	0,041
96	4	30	7	70	23	23,1	5,4	53,8	17,7	0,050	0,012	0,116	0,038
96	4	26	5	77	22	20,0	3,8	59,2	16,9	0,043	0,008	0,127	0,036
96	4	37	4	65	24	28,5	3,1	50,0	18,5	0,061	0,007	0,107	0,040

120	1	33	1	37	59	25,4	0,8	28,5	45,4	0,032	0,001	0,035	0,056
120	1	18	7	92	13	13,8	5,4	70,8	10,0	0,017	0,007	0,088	0,012
120	1	20	7	92	11	15,4	5,4	70,8	8,5	0,019	0,007	0,088	0,011
120	1	35	3	30	62	26,9	2,3	23,1	47,7	0,033	0,003	0,029	0,059
120	1	48	4	24	54	36,9	3,1	18,5	41,5	0,046	0,004	0,023	0,052
120	1	25	6	63	36	19,2	4,6	48,5	27,7	0,024	0,006	0,060	0,034
120	1	24	3	91	12	18,5	2,3	70,0	9,2	0,023	0,003	0,087	0,011
120	1	34	4	38	54	26,2	3,1	29,2	41,5	0,032	0,004	0,036	0,052
120	2	64	1	22	43	49,2	0,8	16,9	33,1	0,068	0,001	0,023	0,045
120	2	63	4	23	40	48,5	3,1	17,7	30,8	0,067	0,004	0,024	0,042
120	2	53	2	24	51	40,8	1,5	18,5	39,2	0,056	0,002	0,025	0,054
120	2	47	3	45	35	36,2	2,3	34,6	26,9	0,050	0,003	0,048	0,037
120	2	58	1	28	43	44,6	0,8	21,5	33,1	0,061	0,001	0,030	0,045
120	2	60	2	28	40	46,2	1,5	21,5	30,8	0,063	0,002	0,030	0,042
120	2	60	4	33	33	46,2	3,1	25,4	25,4	0,063	0,004	0,035	0,035
120	2	55	3	32	40	42,3	2,3	24,6	30,8	0,058	0,003	0,034	0,042
120	3	33	5	11	81	25,4	3,8	8,5	62,3	0,033	0,005	0,011	0,081
120	3	31	2	5	92	23,8	1,5	3,8	70,8	0,031	0,002	0,005	0,092
120	3	41	1	18	70	31,5	0,8	13,8	53,8	0,041	0,001	0,018	0,070
120	3	44	2	7	77	33,8	1,5	5,4	59,2	0,044	0,002	0,007	0,077
120	3	51	2	12	65	39,2	1,5	9,2	50,0	0,051	0,002	0,012	0,065
120	3	37	3	14	76	28,5	2,3	10,8	58,5	0,037	0,003	0,014	0,076
120	3	38	2	29	61	29,2	1,5	22,3	46,9	0,038	0,002	0,029	0,061
120	3	25	4	12	89	19,2	3,1	9,2	68,5	0,025	0,004	0,012	0,089
120	4	12	4	28	86	9,2	3,1	21,5	66,2	0,020	0,007	0,047	0,146
120	4	29	3	12	86	22,3	2,3	9,2	66,2	0,049	0,005	0,020	0,146
120	4	30	2	68	30	23,1	1,5	52,3	23,1	0,051	0,003	0,115	0,051
120	4	32	3	30	65	24,6	2,3	23,1	50,0	0,054	0,005	0,051	0,110
120	4	32	1	68	29	24,6	0,8	52,3	22,3	0,054	0,002	0,115	0,049
120	4	40	3	37	50	30,8	2,3	28,5	38,5	0,068	0,005	0,063	0,085
120	4	46	4	56	24	35,4	3,1	43,1	18,5	0,078	0,007	0,095	0,041
120	4	49	3	30	48	37,7	2,3	23,1	36,9	0,083	0,005	0,051	0,081

Estereologia - Diabético + Insulina													
Horas Após Castração	Animal	Quantidade Estimada (Pontos)				Volume Relativo (%)				Volume Absoluto (mL)			
		Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma	Epitélio	CML	Lumen	Estroma
Não Castrado	1	28	2	41	59	21,5	1,5	31,5	45,4	0,058	0,004	0,086	0,123
Não Castrado	1	34	1	61	34	26,2	0,8	46,9	26,2	0,071	0,002	0,127	0,071
Não Castrado	1	38	3	38	51	29,2	2,3	29,2	39,2	0,079	0,006	0,079	0,106
Não Castrado	1	27	3	64	36	20,8	2,3	49,2	27,7	0,056	0,006	0,134	0,075
Não Castrado	1	17	0	98	15	13,1	0,0	75,4	11,5	0,035	0,000	0,205	0,031
Não Castrado	1	31	0	41	58	23,8	0,0	31,5	44,6	0,065	0,000	0,086	0,121
Não Castrado	1	38	2	46	44	29,2	1,5	35,4	33,8	0,079	0,004	0,096	0,092
24	1	25	2	40	63	19,2	1,5	30,8	48,5	0,034	0,003	0,054	0,085
24	1	20	1	22	87	15,4	0,8	16,9	66,9	0,027	0,001	0,030	0,118
24	1	41	2	27	60	31,5	1,5	20,8	46,2	0,055	0,003	0,036	0,081
24	1	27	4	66	33	20,8	3,1	50,8	25,4	0,036	0,005	0,089	0,045
24	1	25	2	27	76	19,2	1,5	20,8	58,5	0,034	0,003	0,036	0,103
24	1	37	4	24	65	28,5	3,1	18,5	50,0	0,050	0,005	0,032	0,088
24	1	29	3	35	63	22,3	2,3	26,9	48,5	0,039	0,004	0,047	0,085
24	2	67	4	15	44	51,5	3,1	11,5	33,8	0,140	0,008	0,031	0,092
24	2	48	7	38	37	36,9	5,4	29,2	28,5	0,100	0,015	0,079	0,077
24	2	24	3	76	27	18,5	2,3	58,5	20,8	0,050	0,006	0,158	0,056
24	2	34	2	73	21	26,2	1,5	56,2	16,2	0,071	0,004	0,152	0,044
24	2	40	6	63	21	30,8	4,6	48,5	16,2	0,083	0,013	0,131	0,044
24	2	51	7	57	15	39,2	5,4	43,8	11,5	0,106	0,015	0,119	0,031
24	2	37	5	49	39	28,5	3,8	37,7	30,0	0,077	0,010	0,102	0,081
24	3	32	3	49	46	24,6	2,3	37,7	35,4	0,065	0,006	0,100	0,094
24	3	45	4	40	41	34,6	3,1	30,8	31,5	0,092	0,008	0,082	0,084
24	3	42	4	47	37	32,3	3,1	36,2	28,5	0,086	0,008	0,096	0,076
24	3	43	1	20	66	33,1	0,8	15,4	50,8	0,088	0,002	0,041	0,135
24	3	24	3	52	51	18,5	2,3	40,0	39,2	0,049	0,006	0,106	0,104
24	3	37	1	16	76	28,5	0,8	12,3	58,5	0,076	0,002	0,033	0,155
24	3	31	3	52	44	23,8	2,3	40,0	33,8	0,063	0,006	0,106	0,090
48	1	9	0	44	77	6,9	0,0	33,8	59,2	0,010	0,000	0,051	0,090
48	1	11	2	75	42	8,5	1,5	57,7	32,3	0,013	0,002	0,087	0,049
48	1	14	3	31	82	10,8	2,3	23,8	63,1	0,016	0,003	0,036	0,095
48	1	13	1	58	58	10,0	0,8	44,6	44,6	0,015	0,001	0,067	0,067
48	1	10	2	85	33	7,7	1,5	65,4	25,4	0,012	0,002	0,099	0,038
48	1	10	2	85	33	7,7	1,5	65,4	25,4	0,012	0,002	0,099	0,038

48	1	12	0	64	54	9,2	0,0	49,2	41,5	0,014	0,000	0,074	0,063
48	2	14	2	63	51	10,8	1,5	48,5	39,2	0,017	0,002	0,078	0,063
48	2	20	0	59	51	15,4	0,0	45,4	39,2	0,025	0,000	0,073	0,063
48	2	36	0	54	40	27,7	0,0	41,5	30,8	0,045	0,000	0,067	0,050
48	2	23	5	52	50	17,7	3,8	40,0	38,5	0,029	0,006	0,065	0,062
48	2	16	2	68	44	12,3	1,5	52,3	33,8	0,020	0,002	0,085	0,055
48	2	18	1	51	60	13,8	0,8	39,2	46,2	0,022	0,001	0,063	0,075
48	2	19	2	71	38	14,6	1,5	54,6	29,2	0,024	0,002	0,088	0,047
48	3	16	2	89	23	12,3	1,5	68,5	17,7	0,023	0,003	0,126	0,033
48	3	14	1	89	26	10,8	0,8	68,5	20,0	0,020	0,001	0,126	0,037
48	3	38	4	31	57	29,2	3,1	23,8	43,8	0,054	0,006	0,044	0,081
48	3	23	3	70	34	17,7	2,3	53,8	26,2	0,033	0,004	0,099	0,048
48	3	17	2	78	33	13,1	1,5	60,0	25,4	0,024	0,003	0,110	0,047
48	3	14	4	45	67	10,8	3,1	34,6	51,5	0,020	0,006	0,064	0,095
48	3	24	2	43	61	18,5	1,5	33,1	46,9	0,034	0,003	0,061	0,086
72	1	20	2	45	63	15,4	1,5	34,6	48,5	0,020	0,002	0,046	0,064
72	1	16	2	66	46	12,3	1,5	50,8	35,4	0,016	0,002	0,067	0,047
72	1	21	2	57	50	16,2	1,5	43,8	38,5	0,021	0,002	0,058	0,051
72	1	15	1	70	44	11,5	0,8	53,8	33,8	0,015	0,001	0,071	0,045
72	1	12	3	59	56	9,2	2,3	45,4	43,1	0,012	0,003	0,060	0,057
72	1	21	2	53	54	16,2	1,5	40,8	41,5	0,021	0,002	0,054	0,055
72	1	18	3	65	44	13,8	2,3	50,0	33,8	0,018	0,003	0,066	0,045
72	2	31	4	46	49	23,8	3,1	35,4	37,7	0,050	0,006	0,075	0,079
72	2	13	4	79	34	10,0	3,1	60,8	26,2	0,021	0,006	0,128	0,055
72	2	15	4	69	42	11,5	3,1	53,1	32,3	0,024	0,006	0,112	0,068
72	2	32	0	48	50	24,6	0,0	36,9	38,5	0,052	0,000	0,078	0,081
72	2	49	7	20	54	37,7	5,4	15,4	41,5	0,079	0,011	0,032	0,087
72	2	30	2	18	80	23,1	1,5	13,8	61,5	0,049	0,003	0,029	0,130
72	2	42	3	18	67	32,3	2,3	13,8	51,5	0,068	0,005	0,029	0,109
72	3	24	2	44	60	18,5	1,5	33,8	46,2	0,053	0,004	0,097	0,132
72	3	17	2	66	45	13,1	1,5	50,8	34,6	0,038	0,004	0,146	0,099
72	3	37	6	31	56	28,5	4,6	23,8	43,1	0,082	0,013	0,068	0,124
72	3	20	1	75	34	15,4	0,8	57,7	26,2	0,044	0,002	0,166	0,075
72	3	19	1	60	50	14,6	0,8	46,2	38,5	0,042	0,002	0,132	0,110
72	3	18	1	64	47	13,8	0,8	49,2	36,2	0,040	0,002	0,141	0,104
72	3	12	1	57	60	9,2	0,8	43,8	46,2	0,026	0,002	0,126	0,132

96	1	33	6	63	28	25,4	4,6	48,5	21,5	0,040	0,007	0,076	0,034
96	1	32	3	63	32	24,6	2,3	48,5	24,6	0,039	0,004	0,076	0,039
96	1	36	7	45	42	27,7	5,4	34,6	32,3	0,043	0,008	0,054	0,051
96	1	36	2	50	42	27,7	1,5	38,5	32,3	0,043	0,002	0,060	0,051
96	1	44	4	21	61	33,8	3,1	16,2	46,9	0,053	0,005	0,025	0,074
96	1	36	5	34	55	27,7	3,8	26,2	42,3	0,043	0,006	0,041	0,066
96	1	18	1	71	40	13,8	0,8	54,6	30,8	0,022	0,001	0,086	0,048
96	2	27	6	31	66	20,8	4,6	23,8	50,8	0,029	0,006	0,033	0,070
96	2	24	2	53	51	18,5	1,5	40,8	39,2	0,025	0,002	0,056	0,054
96	2	20	3	17	90	15,4	2,3	13,1	69,2	0,021	0,003	0,018	0,095
96	2	21	3	36	70	16,2	2,3	27,7	53,8	0,022	0,003	0,038	0,074
96	2	19	5	40	66	14,6	3,8	30,8	50,8	0,020	0,005	0,042	0,070
96	2	44	8	14	64	33,8	6,2	10,8	49,2	0,047	0,008	0,015	0,068
96	2	45	7	23	55	34,6	5,4	17,7	42,3	0,048	0,007	0,024	0,058
96	3	27	3	62	38	20,8	2,3	47,7	29,2	0,039	0,004	0,090	0,055
96	3	9	2	57	62	6,9	1,5	43,8	47,7	0,013	0,003	0,083	0,090
96	3	18	4	72	36	13,8	3,1	55,4	27,7	0,026	0,006	0,104	0,052
96	3	25	5	60	40	19,2	3,8	46,2	30,8	0,036	0,007	0,087	0,058
96	3	13	4	53	60	10,0	3,1	40,8	46,2	0,019	0,006	0,077	0,087
96	3	32	5	31	62	24,6	3,8	23,8	47,7	0,046	0,007	0,045	0,090
96	3	20	4	66	40	15,4	3,1	50,8	30,8	0,029	0,006	0,096	0,058
120	1	23	5	49	53	17,7	3,8	37,7	40,8	0,019	0,004	0,040	0,044
120	1	14	4	47	65	10,8	3,1	36,2	50,0	0,012	0,003	0,039	0,054
120	1	12	2	59	57	9,2	1,5	45,4	43,8	0,010	0,002	0,049	0,047
120	1	14	0	53	63	10,8	0,0	40,8	48,5	0,012	0,000	0,044	0,052
120	1	18	4	52	56	13,8	3,1	40,0	43,1	0,015	0,003	0,043	0,046
120	1	25	8	45	52	19,2	6,2	34,6	40,0	0,021	0,007	0,037	0,043
120	2	15	4	67	44	11,5	3,1	51,5	33,8	0,020	0,005	0,089	0,058
120	2	27	4	65	34	20,8	3,1	50,0	26,2	0,036	0,005	0,086	0,045
120	2	29	4	68	29	22,3	3,1	52,3	22,3	0,039	0,005	0,090	0,039
120	2	24	5	47	54	18,5	3,8	36,2	41,5	0,032	0,007	0,062	0,072
120	2	13	3	65	49	10,0	2,3	50,0	37,7	0,017	0,004	0,086	0,065
120	2	20	5	56	49	15,4	3,8	43,1	37,7	0,027	0,007	0,074	0,065
120	2	33	3	54	40	25,4	2,3	41,5	30,8	0,044	0,004	0,072	0,053

Horas Após Castração	Tratamentos - Reação de Feulgen		
	Não Diabético	Diabético	Diabético + Insulina
Não castrado	0,00	1,12	0,00
Não castrado	1,28	0,00	0,00
Não castrado	1,96	1,54	0,00
Não castrado	0,00	0,00	0,00
Não castrado	2,30	0,00	0,00
Não castrado	2,41	0,00	0,00
Não castrado	0,00	0,88	0,00
Não castrado	0,00	1,18	0,00
Não castrado	0,00	0,95	0,00
Não castrado	0,00	1,92	0,00
Não castrado	0,00	1,52	0,00
Não castrado	0,00	0,00	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	0,00
Não castrado	-	-	1,14
24	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00
24	0,00	1,67	2,27
24	1,09	0,00	0,00
24	1,05	0,00	0,00
24	2,06	0,00	0,00
24	1,25	2,33	1,05
24	-	3,64	0,00
24	-	3,95	0,00
24	-	1,92	0,72
24	-	0,00	0,00
24	-	1,85	0,00
24	-	-	0,00
24	-	-	0,00
24	-	-	0,00
24	-	-	0,00
24	-	-	0,00
24	-	-	0,94
24	-	-	1,03
24	-	-	1,12
24	-	-	0,00
24	-	-	-
48	2,56	0,00	1,16
48	2,53	4,04	2,99
48	0,00	1,92	0,00
48	4,50	4,30	0,00
48	1,45	4,30	0,00

48	8,11	5,36	0,00
48	2,56	6,06	1,82
48	-	6,67	3,45
48	-	7,27	1,56
48	-	7,41	4,00
48	-	4,23	4,35
48	-	7,89	0,00
48	-	8,77	-
48	-	7,69	-
48	-	9,76	-
48	-	0,00	-
48	-	0,00	-
48	-	2,44	-
48	-	0,00	-
48	-	0,00	-
48	-	8,70	-
72	2,36	4,23	0,00
72	6,58	3,03	0,00
72	5,13	10,87	4,55
72	4,17	6,02	0,00
72	4,05	1,82	0,00
72	6,12	3,33	0,00
72	1,64	3,17	0,00
72	-	5,17	0,00
72	-	5,32	1,96
72	-	4,94	0,00
72	-	5,88	2,20
72	-	1,52	2,63
72	-	3,45	4,21
72	-	3,41	1,79
72	-	0,00	6,98
72	-	0,00	4,23
72	-	5,88	2,46
72	-	2,60	3,03
72	-	2,82	2,69
72	-	5,21	3,57
72	-	-	1,67
72	-	-	2,82
72	-	-	3,64
72	-	-	5,71
72	-	-	2,63
96	2,65	3,31	0,85
96	4,94	2,29	0,00
96	2,38	1,86	0,00
96	2,02	0,66	0,00
96	1,22	0,00	0,00
96	1,52	1,92	1,15
96	3,70	2,06	0,00
96	-	2,44	0,00
96	-	1,33	0,00

96	-	0,00	0,00
96	-	0,00	0,00
96	-	0,00	0,00
96	-	-	0,00
96	-	-	0,00
96	-	-	0,00
96	-	-	0,00
96	-	-	0,00
96	-	-	1,54
96	-	-	0,00
96	-	-	1,10
96	-	-	1,96
120	0,00	0,00	1,41
120	0,00	1,52	1,69
120	2,61	2,06	0,00
120	0,00	1,68	0,00
120	0,88	3,80	0,00
120	0,00	3,13	1,12
120	2,88	1,35	1,39
120	-	2,65	0,00
120	-	1,20	0,00
120	-	4,84	0,00
120	-	3,16	0,00
120	-	1,67	0,00
120	-	-	0,00
120	-	-	0,00
120	-	-	0,00
120	-	-	1,22
120	-	-	1,59
120	-	-	0,00
120	-	-	1,52
120	-	-	0,00
120	-	-	3,77

Reação de TUNEL - Não Diabético						
Horas Após Castração	Núcleos			Núcleos (%)		
	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total
Não castrado	7	408	415	1,69	98,31	100,00
Não castrado	6	527	533	1,13	98,87	100,00
Não castrado	6	485	491	1,22	98,78	100,00
Não castrado	4	411	415	0,96	99,04	100,00
Não castrado	7	452	459	1,53	98,47	100,00
Não castrado	3	341	344	0,87	99,13	100,00
48	7	390	397	1,76	98,24	100,00
48	10	411	421	2,38	97,62	100,00
48	6	344	350	1,71	98,29	100,00
48	6	394	400	1,50	98,50	100,00
48	9	383	392	2,30	97,70	100,00
48	4	375	379	1,06	98,94	100,00
72	14	293	307	4,56	95,44	100,00
72	12	241	253	4,74	95,26	100,00
72	16	272	288	5,56	94,44	100,00
72	39	344	383	10,18	89,82	100,00
72	15	348	363	4,13	95,87	100,00
72	26	376	402	6,47	93,53	100,00

Reação de TUNEL - Diabético						
Horas Após Castração	Núcleos			Núcleos (%)		
	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total
Não castrado	0	83	83	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	45	45	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	50	50	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	73	73	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	108	108	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	99	99	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	89	89	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	109	109	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	84	84	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	96	96	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	15	15	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	38	38	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	61	61	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	53	53	0,00	100,00	100,00
48	0	35	35	0,00	100,00	100,00
48	1	65	66	1,52	98,48	100,00
48	0	37	37	0,00	100,00	100,00
48	3	55	58	5,17	94,83	100,00
48	5	56	61	8,20	91,80	100,00
48	1	78	79	1,27	98,73	100,00
48	1	39	40	2,50	97,50	100,00
48	5	101	106	4,72	95,28	100,00
48	7	151	158	4,43	95,57	100,00
48	2	81	83	2,41	97,59	100,00
48	4	115	119	3,36	96,64	100,00
48	4	170	174	2,30	97,70	100,00
48	2	128	130	1,54	98,46	100,00
48	6	132	138	4,35	95,65	100,00
72	3	57	60	5,00	95,00	100,00
72	2	40	42	4,76	95,24	100,00
72	2	101	103	1,94	98,06	100,00
72	1	60	61	1,64	98,36	100,00
72	2	68	70	2,86	97,14	100,00
72	0	45	45	0,00	100,00	100,00
72	3	54	57	5,26	94,74	100,00
72	1	59	60	1,67	98,33	100,00
72	2	60	62	3,23	96,77	100,00
72	1	90	91	1,10	98,90	100,00
72	0	88	88	0,00	100,00	100,00
72	2	31	33	6,06	93,94	100,00
72	0	45	45	0,00	100,00	100,00
72	1	51	52	1,92	98,08	100,00

Reação de TUNEL - Diabético + Insulina						
Horas Após Castração	Núcleos			Núcleos (%)		
	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total	TUNEL (+)	TUNEL (-)	Total
Não castrado	0	52	52	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	35	35	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	40	40	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	31	31	0,00	100,00	100,00
Não castrado	1	55	56	1,79	98,21	100,00
Não castrado	1	67	68	1,47	98,53	100,00
Não castrado	0	33	33	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	88	88	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	177	177	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	93	93	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	100	100	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	110	110	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	71	71	0,00	100,00	100,00
Não castrado	0	112	112	0,00	100,00	100,00
48	0	119	119	0,00	100,00	100,00
48	1	87	88	1,14	98,86	100,00
48	1	92	93	1,08	98,92	100,00
48	1	106	107	0,93	99,07	100,00
48	0	25	25	0,00	100,00	100,00
48	0	113	113	0,00	100,00	100,00
48	2	126	128	1,56	98,44	100,00
48	0	61	61	0,00	100,00	100,00
48	0	65	65	0,00	100,00	100,00
48	0	24	24	0,00	100,00	100,00
48	0	36	36	0,00	100,00	100,00
48	0	25	25	0,00	100,00	100,00
48	0	107	107	0,00	100,00	100,00
48	0	47	47	0,00	100,00	100,00
72	0	42	42	0,00	100,00	100,00
72	2	98	100	2,00	98,00	100,00
72	1	55	56	1,79	98,21	100,00
72	2	65	67	2,99	97,01	100,00
72	3	54	57	5,26	94,74	100,00
72	0	91	91	0,00	100,00	100,00
72	0	52	52	0,00	100,00	100,00
72	1	67	68	1,47	98,53	100,00
72	2	86	88	2,27	97,73	100,00
72	1	65	66	1,52	98,48	100,00
72	1	106	107	0,93	99,07	100,00
72	0	48	48	0,00	100,00	100,00
72	3	52	55	5,45	94,55	100,00
72	3	81	84	3,57	96,43	100,00

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **EFEITO DA INSULINA SOBRE A CINÉTICA DE MORTE DE CÉLULAS EPITELIAIS PROSTÁTICAS APÓS CASTRAÇÃO**:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

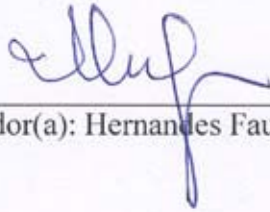
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(x) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1489-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno(a): Danilo Marchete Damas de Souza



Orientador(a): Hernandes Faustino Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARNALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEa/IB - UNICAMP