



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM PRÓSTATA DE RATOS TRATADOS COM DEXAMETASONA

MAITÊ MEGETO COSTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DE INSULINA EM PRÓSTATA DE RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA

MAITÊ MEGETO COSTA
Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Costa, Maitê Megeto.

Análise da expressão de proteínas da via de sinalização de insulina em
próstata de ratos tratados com dexametasona / Maitê Megeto Costa. -
Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: José Roberto Bosqueiro

Capes: 20702000

1. Próstata. 2. Insulina. 3. Resistência à insulina.

Palavras-chave: Dexametasona; Proliferação celular; Próstata; Resistência à
insulina; Sinalização da insulina.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Mirtes Costa

Assinatura

Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Assinatura

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

Assinatura

Profa. Dra. Patricia Monteiro Seraphim

Assinatura

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

meus pais Lisette & Devanei,

minha irmã Lidiê e

meu namorado Marcelo.

Agradecimentos

Agradeço a toda minha família, em especial minha mãe e irmã, meu namorado e amigos pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro por sua orientação e por me proporcionar esta oportunidade de incrível aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Hugo Medeiros Garrido de Paula (in memmorian), meu orientador de iniciação científica, pelo principal incentivo e apoio em meu ingresso na carreira acadêmica.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino pela ajuda e, ao mesmo tempo, diversão nos experimentos, além de companheirismo e amizade.

Aos Profs. Rejane Maria Góes e Sebastião Roberto Taboga pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela receptividade em seus laboratórios na UNESP de São José do Rio Preto.

Aos técnicos Luiz Roberto Faleiros Jr. e Samantha Yuri Maeda, e todos os membros do Laboratório de Microscopia e Microanálise da UNESP de Rio Preto, pelo imprescindível auxílio técnico e descontração em minhas idas à Rio Preto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, UNESP de Botucatu, pela oportunidade e empenho na melhoria do programa.

Aos profs. que participaram da minha banca de qualificação e defesa de tese pela disponibilidade.

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo.

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Justificativa.....	21
Objetivos.....	22
Resultados.....	23
Conclusões.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

Lista de Abreviaturas

AKT - Serina treonina quinase

AR - Receptor de andrógeno

CTL - Controle

DEX - Dexametasona

DM - Diabetes mellitus

ERK - Quinase reguladora do sinal extracelular

GC - Glicocorticóide

GLUT4 - Transportador de glicose 4

GR - Receptor de glicocorticóide

IR - Receptor de insulina

IRS - Substrato do receptor de insulina

LADA - Diabetes auto-imune latente do adulto

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MODY - Diabetes da maturidade com início na juventude

mTOR - Alvo da rapamicina em mamífero

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

p70^{S6K} - Proteína ribossomal 70kDa S6 quinase

Resumo

Os glicocorticóides são amplamente utilizados na prática clínica como agentes antiinflamatórios e imunossupressores, e estão entre as drogas utilizadas nos tratamentos de cânceres, como o de próstata. Contudo, seu uso prolongado ou excessivo pode desencadear o diabetes mellitus tipo 2, caracterizado pela hiperglicemia devido à resistência periférica à insulina. Recente estudo do nosso grupo de pesquisa, utilizando modelo de diminuição da sensibilidade periférica à insulina pela administração de dexametasona (DEX, 1 mg/kg, ip) por 5 dias, demonstrou, na próstata ventral de ratos, atrofia epitelial e das células musculares lisas, além de alterações de elementos celulares do estroma prostático, como os fibroblastos. A partir deste estudo, inúmeras perguntas surgiram acerca dos mecanismos de sinalização presentes no tecido prostático neste modelo, especialmente em relação à insulina. Assim, neste trabalho investigamos as vias de sinalização da insulina e a proliferação celular epitelial na próstata ventral de ratos no modelo de resistência à insulina induzida pelo tratamento com dexametasona, buscando possível correlação com a expressão dos receptores de glicocorticóides (GR) e de andrógenos (AR). A resistência à insulina foi induzida em ratos Wistar machos adultos (n=4) pela administração de dexametasona (DEX, 1 mg/kg, ip), durante 5 dias, enquanto os ratos controles (CTL) receberam solução salina. O tratamento com a dexametasona resultou em diminuição significativa no peso corporal, mas não do peso prostático. Reduções na expressão das proteínas IRS-1/AKT/mTOR, constituintes da via de sinalização da insulina, e nos níveis das proteínas AR e GR foram observados nas próstatas de ratos resistentes à insulina, comparados com o grupo CTL. A frequência de células AR-positivas no epitélio acinar da próstata diminuiu no grupo tratado com DEX. Além disso, a intensidade da reação para este receptor no núcleo celular foi menor neste grupo. O tratamento com glicocorticóide reduziu a frequência de células PCNA-positivas em 30 vezes. Este estudo sugere que a inibição parcial na via IRS-1/AKT/mTOR na próstata de ratos resistentes à insulina, induzida pelo tratamento com dexametasona está envolvida, ao menos em parte, nas alterações morfológicas observadas nas próstatas destes animais, predominantemente a atrofia epitelial e das células musculares lisas.

Palavras-chave: Resistência à insulina, sinalização da insulina, dexametasona, próstata, proliferação celular.

Abstract

Glucocorticoids are widely used in clinical practice as anti-inflammatory and immunosuppressants agents, and are among the drugs used in treatment of cancers, such as the prostate. However, excessive or prolonged use can trigger diabetes mellitus type 2, characterized by hyperglycemia due to peripheral insulin resistance. Recent study of our research group, using model of decreased peripheral insulin sensitivity by administration of dexamethasone (DEX, 1 mg / kg, ip) for 5 days, showed, in rat ventral prostate, epithelial atrophy and of smooth muscle cells, in addition to alterations of cellular elements of the prostatic stroma, such as fibroblasts. From this study, many questions have arisen about the signaling mechanisms present in prostate tissue in this model, especially in relation to insulin. Thus, this study investigated the insulin signaling pathway and epithelial cell proliferation in the rat prostate in a model of insulin resistance induced by treatment with dexamethasone, searching for possible correlation with the expression of glucocorticoid (GR) and androgen (AR) receptors. Insulin resistance was induced in adult male Wistar rats (n=4) by the administration of dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, ip) for 5 days, while the control (CTL) rats received saline. Dexamethasone treatment resulted in a significant decrease in body weight, but not of prostatic weight. Reductions in the expression of proteins IRS-1/AKT/mTOR, constituents of the signaling pathway of insulin, AR and GR levels protein were observed in the prostate of insulin resistant rats, compared with the CTL group. The frequency of AR-positive cells in the acinar epithelium of the prostate decreased in the group treated with DEX. Furthermore, the intensity of reaction for this receptor in the cell nuclei was lower in this group. The treatment with glucocorticoid reduced the frequency of PCNA-positive cells by 30-fold. This study suggests that the partial inhibition in IRS-1/AKT/mTOR pathway in the prostate of insulin resistant rats, induced by treatment with dexamethasone is involved, at least in part, on morphological alterations observed in prostates of these animals, predominantly epithelial and smooth muscle cells atrophy.

Keywords: Insulin resistance, insulin signaling, dexamethasone, prostate, cell proliferation.

Introdução

1. Resistência à Insulina

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e essencial para a manutenção da homeostase de glicose, além do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (Carvalho et al., 2002). A insulina participa de inúmeros processos metabólicos, entre eles, do controle do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Normalmente, a glicemia é controlada através de ações opostas de hormônios como a insulina e o glucagon (Anderson et al., 1994). Após a ingestão de alimentos, os níveis de glicose aumentam e a insulina promove a captação periférica de glicose no fígado, tecido adiposo e células musculares. Assim, aumenta a síntese proteica e lipídica, garantindo que a energia esteja armazenada para futura utilização. Em condições de jejum, o glucagon promove a mobilização da energia estocada, principalmente por meio da produção hepática de glicose (Fuchs & Wannmacher, 1992).

A resistência à insulina ocorre quando as células-alvo não respondem aos níveis normais de insulina circulante e, portanto, níveis maiores de insulina são necessários para manter a normoglicemia. Como resultado, mais insulina é produzida pelo pâncreas, levando à hiperinsulinemia. As principais características da resistência à insulina são o aumento da lipólise no tecido adiposo, aumento da gliconeogênese no fígado e diminuição da absorção da glicose pelo músculo. Ao longo do tempo, a compensação de células-beta pancreáticas para a resistência à insulina diminui, resultando em declínio progressivo da função dessas células, levando à instalação do diabetes mellitus tipo 2 (Kasuga, 2006). A manutenção da massa de células β pancreáticas é fundamental para homeostase glicêmica, e sua diminuição está entre os maiores agravantes para o desequilíbrio da homeostase deste substrato. A massa de células-beta é mantida através do balanço entre apoptose e proliferação destas células (Bonner-Weir, 2000). Nos últimos anos, tornou-se evidente que a proliferação de células β desempenha o maior papel no controle da massa de células β no indivíduo adulto (Dor et al., 2004; Teta et al., 2007).

Dados da literatura apontam para um componente genético associado à resistência à insulina (Kahn et al., 1996; Froguel & Velho, 2001), porém esta condição fisiopatológica também pode ser causada por fatores adquiridos como obesidade (Holness et al., 2005; Prada et al., 2005), sedentarismo, gravidez e excesso de hormônios diabetogênicos como os

glicocorticóides, glucagon, hormônio do crescimento, entre outros (Andrews & Walker, 1999; Kahn, 1994; DeFronzo, 1997).

2. Diabetes mellitus

A resistência à insulina está associada com o diabetes mellitus (DM), uma doença prevalente, classificada como uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A estimativa da prevalência mundial está em torno de 4% (King et al., 1998; Wild et al., 2004) e, no Brasil, em 7,6% (Gross et al., 2002). Sua incidência vem aumentando de modo alarmante nos países em desenvolvimento e estima-se um aumento de 60% da prevalência na população adulta acima de 30 anos em 2025 (King et al., 1998), sendo sua maior magnitude na faixa dos 45 aos 64 anos (King et al., 1998; Wild et al., 2004). A Federação Internacional de Diabetes estimou que o gasto mundial com o diabetes para 2010 fosse de US\$ 376 bilhões, sendo que para 2030 esta estimativa excede os 490 bilhões de dólares (IDF, 2009). A tabela 1 mostra que as últimas diretrizes nacionais e internacionais recomendam a classificação do DM em quatro categorias: DM tipo 1, DM tipo 2, Outros tipos e DM Gestacional (ADA, 2009).

Tabela 1 - Classificação Etiológica do Diabetes mellitus

I. Diabetes mellitus tipo 1
A. Mediado imunologicamente
B. Idiopático
Diabetes auto-imune latente do adulto (LADA)
II. Diabetes mellitus tipo 2
III. Outros tipos específicos
Defeitos genéticos da função da célula β (MODY, DNA mitocondrial)
Defeitos genéticos na ação da insulina (diabetes lipoatrófico)
Doenças do pâncreas exócrino (pancreatite, hemocromatose)
Endocrinopatias (acromegalia, síndrome de Cushing)
Induzido por drogas (hormônio da tireóide, tiazídicos)
Infecções (citomegalovírus, rubéola congênita)
Formas imunológicas incomuns (anticorpos contra receptor da insulina)
Outras síndromes genéticas (síndrome de Down, Turner, Prader Willi)
IV. Diabetes mellitus gestacional

Fonte: Adaptado de Maraschin et al. (2010).

O DM tipo 1 é responsável por cerca de 5% a 10% de todos os casos de DM, sendo subdividido em tipo 1A, tipo 1B e diabetes auto-imune latente do adulto (LADA). De modo geral, o DM tipo 1 inicia-se antes dos 30 anos de idade, mas pode acometer indivíduos em qualquer faixa etária. Existe destruição das células β pancreáticas e seu tratamento exige o uso de insulina exógena (Gross et al., 2002). No DM tipo 1A, a destruição das células β é de etiologia autoimune (90% dos casos) e no tipo 1B não tem causa conhecida (idiopático). No DM tipo LADA também existe destruição autoimune das células β , mas ela é muito mais lenta e acontece em indivíduos mais velhos (acima de 30 anos). O fenótipo é peculiar, pois os pacientes não são obesos, têm diagnóstico de DM em idade compatível com diagnóstico de DM tipo 2, têm sua doença inicialmente controlada com agentes orais, mas apresentam sinais de progressiva perda de função da célula β e eventualmente necessitam de insulina, por definição, após pelo menos seis meses do diagnóstico do DM (ADA, 2009).

O DM tipo 2 é responsável por mais de 90% dos casos de DM, não tem componente autoimune, acontece em geral após os 30 anos em indivíduos com história familiar positiva. O tratamento em geral envolve dieta e agentes hipoglicemiantes orais, sem necessidade do uso de insulina, que, se necessário, deve ocorrer pelo menos cinco anos após o diagnóstico para configurar que não há dependência como no DM tipo 1 (Skyler et al., 2009). A informação genética na história familiar tem sido utilizada na avaliação clínica do DM tipo 2. O risco de desenvolver esse tipo de diabetes é de cerca de 7% na população em geral, cerca de 40% em filhos com um dos pais com DM tipo 2, e aproximadamente 70% se ambos os pais são afetados (Majithia & Florez, 2009). Além da informação genética, cerca de 80% do DM tipo 2 é associado com obesidade e estilo de vida sedentário. Estudos têm demonstrado forte associação entre a atividade física diária e modificação de dieta para reduzir o risco no desenvolvimento do DM tipo 2 (Venables & Jeukendrup, 2009).

Na categoria “outros tipos de DM”, destaca-se o diabetes da maturidade com início na juventude (MODY), subtipo que acomete indivíduos abaixo dos 25 anos, não obesos, sendo caracterizado por defeito na secreção de insulina. Apresenta herança autossômica dominante, envolvendo, portanto, várias gerações de uma mesma família (Campagnolo et al., 2005).

O DM gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. A definição é aplicável independentemente se a insulina ou apenas a modificação da dieta for usado para o tratamento ou se a situação persistir após a gravidez. Isso não exclui a possibilidade de que a intolerância à glicose não reconhecida possa ter começado anterior ou concomitantemente com a gravidez. A DM gestacional consegue complicar aproximadamente 4% das gestações nos EUA, resultando em

quase 135 mil casos anuais. A prevalência pode variar de 1 a 14% das gestações, dependendo da população estudada. A deterioração da tolerância à glicose ocorre normalmente durante a gravidez, especialmente no terceiro trimestre (ADA, 2009).

Apesar da classificação do DM definir essas e outras categorias por meio de características peculiares, pode existir sobreposição de quadros clínicos, principalmente no DM que se inicia no adulto jovem. Muitas vezes é difícil distinguir um subtipo de outro com base em dados clínicos apenas, principalmente o DM tipo 1 do MODY e do DM tipo 2 de início precoce, sendo este cada vez mais frequente devido ao aumento da prevalência de obesidade e síndrome metabólica nas sociedades ocidentais (Reinehr et al., 2006).

Assim, por diminuírem a qualidade e a expectativa de vida de milhões de indivíduos afetados, o DM forma uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em seres humanos. Dentre as inúmeras consequências, o DM pode causar doenças cardiovasculares, derrames cerebrais, cegueira, disfunções renais e amputações (Spellman, 2007). Disfunções nas células β como diminuição da síntese e/ou secreção de insulina e redução da massa deste tipo celular, devido ao aumento de apoptose e defeitos na regeneração, são componentes cruciais no desenvolvimento dessa doença (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Mathis et al., 2001; Rhodes, 2005).

3. Glicocorticóides

Os hormônios glicocorticóides (GC) são produzidos no córtex adrenal sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e têm vários efeitos importantes em diferentes sistemas fisiológicos, como a regulação do balanço hídrico, pressão arterial, função imune e no metabolismo. São amplamente utilizados na prática clínica como agentes antiinflamatórios e imunossupressores, além de estarem entre as inúmeras drogas que exercem atuação direta ou indireta sobre a secreção de insulina (Saklatvala, 2002). O excesso de GC resulta na resistência à insulina (Amatruda et al., 1985) por diminuir a ação da insulina em suprimir a produção hepática de glicose e estimular a utilização de glicose periférica (Pagano et al., 1983).

Os GC podem potencialmente inibir a captação de glicose em uma ou mais etapas ao longo da via de sinalização. Além de serem utilizados experimentalmente para indução de resistência à insulina tanto *in vivo* (Saad et al., 1993; Severino et al., 2002; Rafacho et al., 2009) quanto *in vitro* (Burén et al., 2002; Ruzzin et al., 2005) e seus efeitos sobre os tecidos periféricos insulino-dependentes como o tecido muscular, adiposo e hepático são bem conhecidos (Saad et al., 1993; Burén et al., 2002, 2008; Ruzzin et al., 2005).

A resistência à insulina nesses tecidos periféricos observada em ratos tratados com dexametasona *in vivo* parece ser mediada por mecanismos pós-receptores. Em fígado e músculo de ratos tratados com dexametasona por 5 dias (1 mg/kg) a expressão da proteína IR (receptor de insulina) não apresentou alterações significativas. Já os níveis das proteínas IRS-1 (substratos do receptor de insulina 1) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) mostraram-se aumentados no fígado e diminuídos no músculo desses animais (Saad et al., 1993). Em tecido adiposo de ratos submetidos ao mesmo protocolo de administração de dexametasona, houve redução nos conteúdos das proteínas IRS-1 e IRS-2 e aumento de IRS-3 (Caperuto et al., 2006). Já em ratos tratados por 11 dias com dexametasona (1 mg/kg) foi demonstrado redução dos níveis da proteína AKT (serina treonina quinase) em músculo e tecido adiposo (Burén et al., 2008). Os efeitos dos GC no metabolismo podem ser particularmente dependentes da dose, do tempo de administração e do tipo e idade do animal (Sasson & Amsterdam, 2002).

4. Sinalização Intracelular da Insulina

A insulina exerce importantes efeitos metabólicos e mitogênicos mediados por seu receptor, presente em praticamente todos os tecidos de vertebrados (Kahn, 1985). Os receptores exercem basicamente três funções: reconhecem e se ligam à insulina com alta especificidade, transmitem um sinal que resulta na ativação/inativação de vias metabólicas intracelulares, e são posteriormente endocitados juntamente com o hormônio ligado, com subsequente degradação, armazenamento ou reciclagem das subunidades do receptor (Felig & Bergman, 1995; Genuth, 1998). O receptor de insulina, uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosina quinase intrínseca, sofre autofosforilação rápida e, em seguida, fosforila os IRSs (Figura 1) (Cheatham & Kahn, 1995).

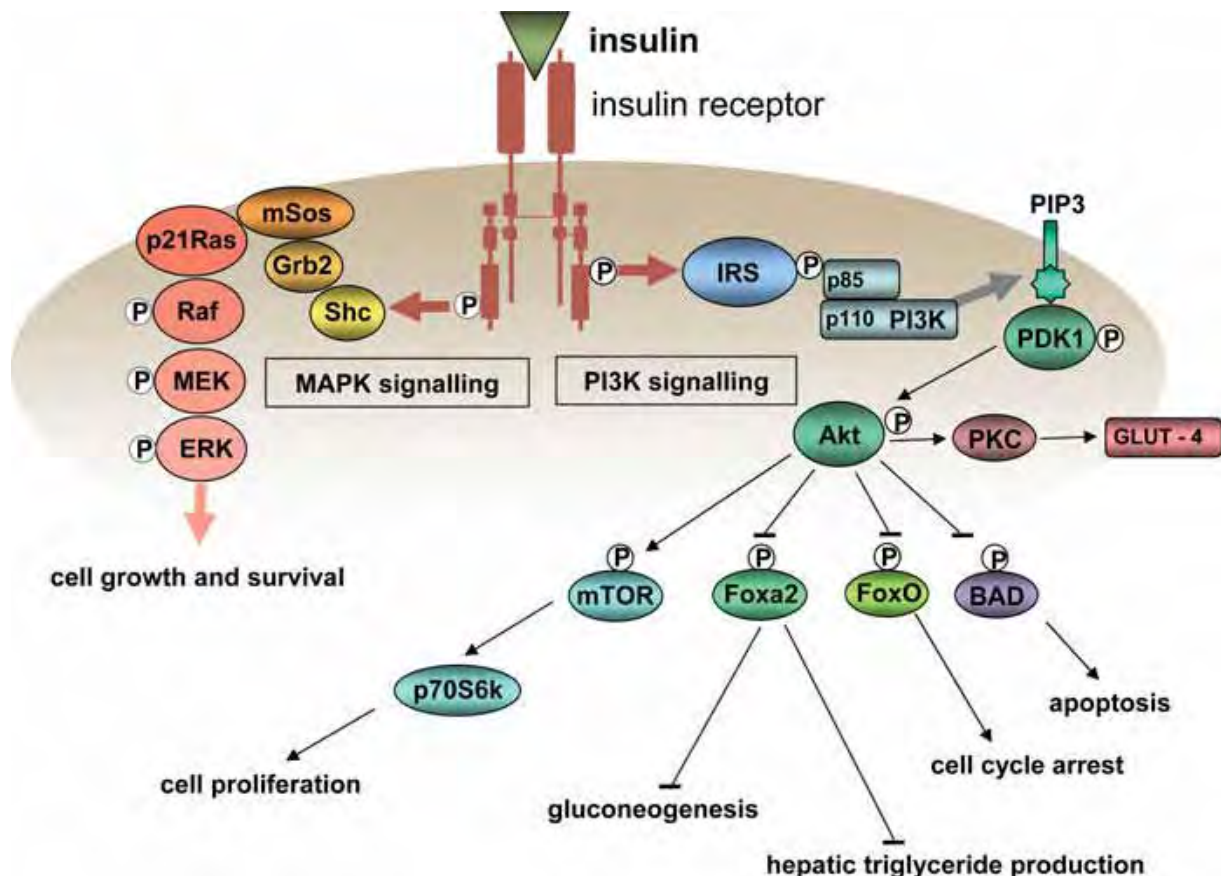


Figura 1. Principais vias de sinalização ativadas pelo receptor de insulina. Fonte: Godsland (2010).

Os IRS-1 e 2 são expressos em diversos tecidos em ratos, como fígado, músculo esquelético, coração, cérebro, rim, pulmão, baço, testículo (Sun et al., 1995). O IRS-1 encontra-se duas vezes mais concentrado na membrana plasmática que o IRS-2, que está duas vezes mais concentrado no citosol (Sesti et al., 2001). O IRS-3 é abundante em tecido adiposo, tendo sido encontrado em outros tecidos, como pulmão e coração (Sciacchitano & Taylor, 1997). Já o IRS-4 é pouco expresso em ratos, e sua caracterização foi realizada em células embrionárias de rim humano (Lavan et al., 1997) e pode ser encontrado em tecido tireóideo, hipófise, ovário e fibroblastos (Sesti et al., 2001). As funções biológicas dos IRSs têm sido alvo de inúmeros estudos através da produção de camundongos geneticamente modificados. Camundongos *knockout* para IRS-1 apresentam resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não são hiperglicêmicos (Araki et al., 1994). Camundongos *knockout* para IRS-2 apresentam hiperglicemia acentuada, devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e falência da atividade secretória das células β , além de redução significativa da massa destas células (Withers et al., 1998). No entanto, camundongos

knockout para IRS-3 e 4 têm crescimento e metabolismo de glicose quase normais (Fantin et al., 2000).

Uma das principais moléculas ativadas pelas proteínas IRSs é a PI3K, importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e para o processo de translocação do GLUT4 (Folli et al., 1992; Saad et al., 1993; Shepherd et al., 1995). A PI3K foi originalmente identificada como dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85) (Backer et al., 1992). A via de sinalização iniciada após a ativação da PI3K também é importante para a prevenção de apoptose. A AKT destaca-se como uma das principais proteínas alvo da PI3K para esse efeito (Carvalho et al., 2003; Thirone et al., 2004). Além disso, a AKT tem papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação celular e metabolismo intermediário (Chen et al., 2001). É uma serina treonina quinase composta por três isoformas: AKT1, AKT2 e AKT3, com grande similaridade entre elas (Zhang et al., 2006). Mais recentemente, a atenção foi direcionada para um diferente ramo da via PI3K/AKT, o da mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos). Ela é descrita como controladora central do crescimento e proliferação celular, permitindo o progresso da fase G1 para S do ciclo celular. Crescente evidência sugere que sua desregulação está associada a doenças humanas, incluindo câncer e diabetes (Sabatini, 2006). A mTOR controla diretamente a translação de proteínas através da fosforilação da p70^{S6K}, a qual ativa a síntese de proteínas (Thomas & Hall, 1997).

Além da ativação da PI3K, uma contribuição da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), principalmente pela ativação da quinase reguladora do sinal extracelular (ERK), para proliferação celular, proteção contra a morte celular e a expressão gênica tem sido observada, embora sua importância não esteja completamente esclarecida (Briaud et al., 2003; Lawrence et al., 2005). Proteínas fosfatases e fosfolipídios fosfatases modulam a intensidade e a duração dos sinais de insulina. Dependendo do local do tecido, a desregulação destes mecanismos de sinalização pode evoluir para a resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e metabolismo lipídico desregulado (White, 2003).

5. Estrutura Prostática

A próstata, glândula sexual acessória do aparelho reprodutor masculino, é responsável pela produção da maior fração do fluido seminal. O grande interesse em se compreender a biologia desta glândula deve-se à alta incidência de doenças prostáticas, como o adenocarcinoma e a hiperplasia prostática benigna nos homens (Marker et al., 2003). O câncer de próstata já supera o câncer de pulmão como o tipo de câncer mais comumente

diagnosticado em homens que vivem nos Estados Unidos e é a segunda principal causa de morte por câncer (Ross & Kantoff, 2007).

A morfogênese da próstata de humanos e roedores ocorre de maneira análoga: os lobos compõem arranjos circunferenciais ao redor da uretra prostática e apresentam características particulares de ramificação de ductos e produção de secreções protéicas. Em um mesmo lobo, os ductos prostáticos apresentam heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, síntese e produção de proteínas, além de distintas respostas a hormônios (Marker et al., 2003; Cunha et al., 2004). Morfologicamente, a próstata humana de um adulto é mais compacta, sem distinção entre seus lobos. Este tipo de organização determina o aparecimento de três zonas diferentes: periférica, central e de transição (Figura 2A) (McNeal, 1983).

A zona periférica constitui cerca de 70% da massa prostática e está localizada na face lateral e posterior da próstata, ao redor da zona central e de transição. A zona central, representada por aproximadamente 25% da massa do tecido, envolve o ducto ejaculatório, compreendendo o espaço de onde o ducto se conecta com a uretra. Já a zona de transição, com apenas 5% da massa prostática, está localizada ao redor da uretra proximal, sendo contornada totalmente pelas zonas central e periférica (Roy-Burman et al., 2004).

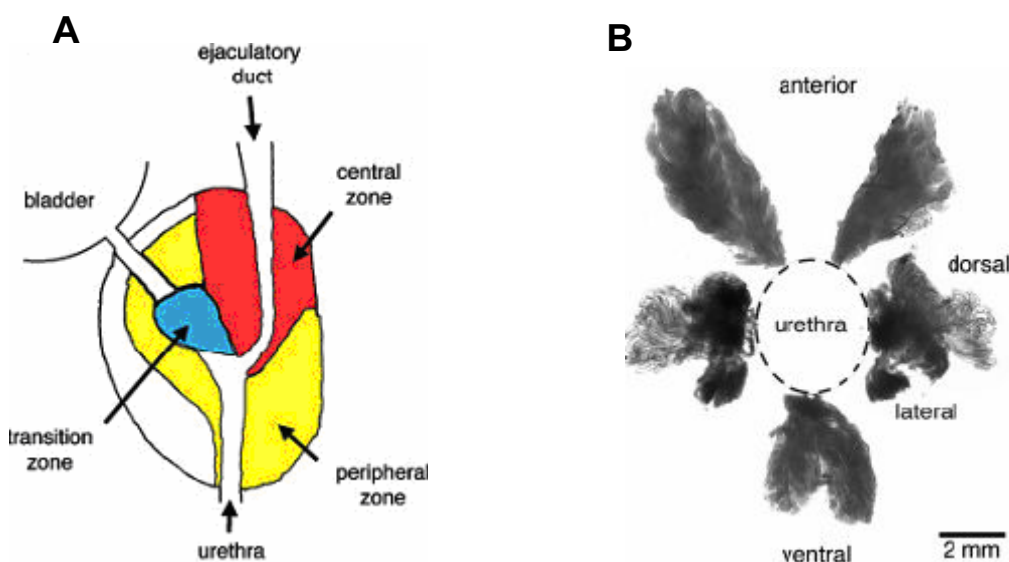


Figura 2. (A) Divisões morfológicas da próstata humana (McNeal, 1983) e (B) da próstata de rato (Thomson & Marker, 2006).

Nos roedores observa-se um complexo prostático formado por quatro pares de lobos, os quais drenam suas secreções por meio de ductos para a uretra e são designados, segundo a sua posição, como anterior, ventral, lateral e dorsal (Figura 2B) (Jesik et al., 1982). Uma

considerável heterogeneidade é observada quanto à sensibilidade androgênica entre os diferentes lobos prostáticos, sendo o lobo ventral o que apresenta resposta mais semelhante à próstata humana (Prins et al., 1992).

A próstata é composta por uma parte epitelial e outra estromal que em conjunto formam os túbulos secretores e ácinos da glândula (McNeal, 1988). A figura 3 mostra que o epitélio é constituído predominantemente por células luminais secretoras, incluindo também em frequência intermediária as células basais proliferativas e um pequeno número de células neuroendócrinas (Di Sant'Agnese, 1991; Singh et al., 2006). Este epitélio é sustentado pelo estroma, composto principalmente por células musculares lisas e fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, nervos e vasos sanguíneos (Marker et al., 2003). Ao redor destas células estromais, existe a complexa matriz extracelular composta principalmente de fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas (Vilamaior et al., 2000).

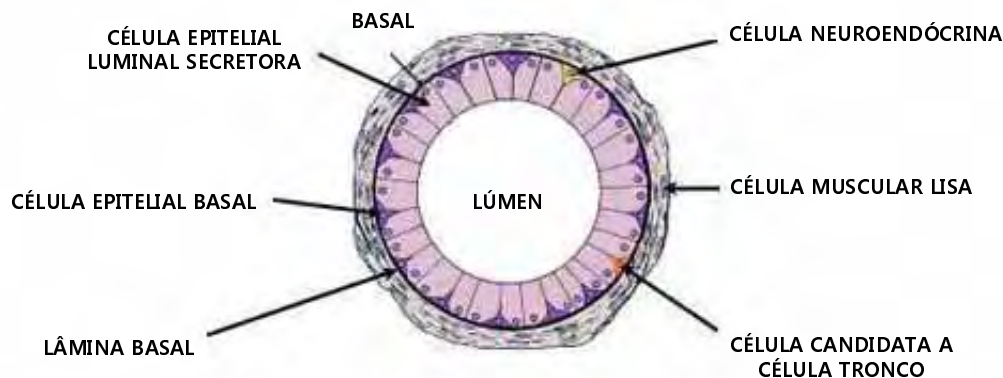


Figura 3. Diagrama do corte transversal de um ácino prostático. As setas indicam os tipos celulares que estão presentes. Adaptado de Marker et al. (2003).

6. Fisiologia da Próstata

O desenvolvimento e crescimento normal da próstata dependem de interações críticas entre as células epiteliais e o estroma, moduladas principalmente por andrógenos (Cunha et al., 2003). Os hormônios androgênicos são essenciais para a diferenciação celular, manutenção da morfologia e função secretória da próstata (Davies & Eaton, 1991), além de manter a funcionalidade da glândula durante a vida adulta (Thomson, 2001). A ação destes hormônios, que também regulam as ações co-dependentes das interações epitélio-estroma, é mediada via receptores hormonais específicos (Cunha et al., 1985; Hsing et al., 2002). Desse modo, os

processos biológicos que ocorrem nas células epiteliais são controlados indiretamente por mediadores dependentes de andrógenos de origem estromal (Hayward & Cunha, 2000).

O receptor de andrógenos (AR) é um membro da família dos receptores nucleares, funcionando como fator de transcrição ativado por ligante. O AR é responsável pela mediação dos efeitos fisiológicos dos andrógenos por meio da sua ligação a sequências de DNA específicas, influenciando a transcrição de genes responsivos a andrógenos (Gelman, 2002). Na próstata, este receptor está entre os fatores de transcrição cuja atividade é influenciada pela cascata de transdução de sinal, por meio da fosforilação direta do AR ou através da fosforilação de correguladores do AR. A falha da interação normal entre a transdução de sinal e a transativação do AR podem contribuir para a progressão do câncer de próstata (Heilen & Chang, 2004).

Estudos têm demonstrado que vários hormônios não-androgênicos, como o estrógeno, prolactina, insulina e glicocorticóides também podem interferir na homeostase prostática (Bodker et al., 1999; Reiter, 1999; Ribeiro et al., 2008). Estudos epidemiológicos associam altos níveis de insulina no sangue com o aumento do risco de câncer de próstata (Lehrer et al., 2002; Barnard et al., 2002). Webber (1981), baseado em seus trabalhos com epitélio prostático *in vitro*, sugeriu que a insulina é estritamente necessária para a manutenção da glândula, alterando a permeabilidade celular, aumentando a captação de aminoácidos e estimulando a síntese de DNA, RNA e proteínas. Também tem sido demonstrado que o diabetes promove redução no peso da próstata ventral e atrofia no epitélio secretor em camundongos, indicando que a ausência de insulina, a hiperglicemia e a queda androgênica decorrentes do diabetes afetam o funcionamento da glândula (Cagnon et al., 2000; Ribeiro et al., 2006).

Tendo em vista que a homeostase prostática depende de uma variedade de fatores esteróides e não-esteróides, e o fato de que a próstata humana é alvo de uma série de doenças como a hiperplasia prostática benigna e o câncer (King et al., 2006), o estudo de mecanismos fisiológicos presentes na próstata se faz importante para um melhor entendimento do funcionamento desta glândula e das situações patofisiológicas de interesse clínico.

Justificativa

Nosso grupo de pesquisa tem caracterizado um interessante modelo de indução de resistência periférica à insulina em ratos pelo tratamento com dexametasona (1 mg/kg) por 5 dias. Juntamente com outros dados da literatura, observam-se além da instalação de franca resistência à insulina, alterações na morfologia e função das células β pancreáticas que, frente ao novo estado, hipertrofiam e passam a ser mais responsivas a diversos estimuladores da secreção de insulina, com aumento desta secreção e consequente instalação de hiperinsulinemia (Ogawa et al., 1992; Andrews et al., 1999; Rafacho et al., 2008; Rafacho et al., 2009).

A partir deste modelo, investigamos as alterações morfológicas ocorridas na próstata ventral de ratos resistentes à insulina. O tratamento com a dexametasona resultou em atrofia epitelial e das células musculares lisas, além de alterações de elementos celulares do estroma prostático, como os fibroblastos. Alterações mitocondriais também foram observadas nas células musculares lisas. Sabe-se que os glicocorticóides têm importante função no metabolismo e funcionamento de tecidos periféricos, e este estudo revelou que isto também se aplica à próstata (Ribeiro et al., 2008). Deste trabalho, inúmeras perguntas surgiram acerca dos mecanismos de sinalização presentes no tecido prostático neste modelo, especialmente em relação à insulina.

Objetivos

Geral

Avaliar a expressão de proteínas da via de sinalização de insulina e a proliferação celular epitelial em próstata de ratos em um modelo de resistência à insulina induzida por dexametasona.

Específicos

- Determinar o conteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina na próstata (IR, IRS-1, PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, p70^{S6K}, ERK e p-ERK).
- Determinar o conteúdo das proteínas AR e GR na próstata.
- Avaliar a frequência de células AR- e PCNA-positivas no epitélio acinar prostático.

Resultados

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho estão apresentados a seguir sob a forma de um artigo submetido:



Inhibition of insulin-signaling pathway and decrease of epithelial cell proliferation in the prostate of glucocorticoid-treated rats

Journal:	<i>International Journal of Experimental Pathology</i>
Manuscript ID:	IJEP-2010-12-1172
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	21-Dec-2010
Complete List of Authors:	Costa, Maitê; Institute of Biology Taboga, Sebastião; Insitute of Biosciences, Letter ans Exact Sciences, Biology Góes, Rejane; Insitute of Biosciences, Letter ans Exact Sciences, Biology Bosqueiro, José; Faculty of Sciences, Department of Physical Education
Keywords:	insulin resistance, insulin signaling, prostate

1
2 **Inhibition of insulin-signaling pathway and decrease of epithelial cell proliferation in**
3
4 **the prostate of glucocorticoid-treated rats**
5
6
7

8
9 INSULIN SIGNALING IN PROSTATE OF DEX RATS
10
11

12
13 **Maitê Megeto Costa¹, Sebastião Roberto Taboga², Rejane Maria Góes², José Roberto**
14 **Bosqueiro^{3,*}**
15
16
17
18
19

20
21 1- Institute of Biosciences, São Paulo State University-Unesp, Botucatu, São Paulo, Brazil.
22

23 2- Department of Biology, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, São Paulo State
24 University-Unesp, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.
25

26
27 3- Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State University-Unesp,
28 Bauru, São Paulo, Brazil.
29
30

31
32
33
34 * Correspondence to:

35
36 José Roberto Bosqueiro, Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State
37 University-Unesp, Bauru, São Paulo, Brazil.
38

39
40 Address: Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, CEP: 17033-360 Bauru/SP - Brasil
41

42 Phone: 55-14-3103-6041
43

44 FAX: 55-14-3103-6041
45

46 E-mail: bosqueir@fc.unesp.br
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

We investigated the insulin-signaling pathway and epithelial cell proliferation in the rat prostate in a model of insulin resistance, induced by dexamethasone, and correlated these with the expression of glucocorticoid (GR) and androgen (AR) receptors. Insulin resistance was induced in adult male Wistar rats by injection of dexamethasone-phosphate (DEX; 1 mg/kg, i.p.) for 5 days, whereas control (CTL) rats received saline. Rats were weighed daily and, following treatment, the ventral prostates were removed, weighed and prepared for immunoblotting or immunocytochemical reactions. Dexamethasone treatment resulted in a significant decrease in body weight, but not of prostatic weight. Reductions in the insulin-signaling pathway IRS-1/AKT/mTOR, AR and GR levels were observed in the prostate of dexamethasone-treated rats, compared with the CTL group. IR and ERK protein expressions were similar in both groups; p-ERK levels increased, but not significantly, in DEX rats and PI3K, p70 and p-AKT protein content showed a tendency towards reduction in the prostate of insulin-resistant rats, although this was not significant. The frequency of AR-positive cells in the acinar epithelium of the prostate decreased in the glucocorticoid-treated group, in addition, the intensity of the reaction for this receptor in the cell nuclei was lower in this group. Furthermore, the treatment with dexamethasone reduced the frequency of PCNA-positive cells by 30-fold. This investigation shows that downregulation in the IRS-1/AKT/mTOR pathway in the prostate of dexamethasone-treated rats induces a reduction in the initial steps of insulin action, which affects the signaling pathway involved in the stimulation of epithelial cell proliferation.

Keywords: insulin resistance, insulin signaling, prostate, dexamethasone, cell proliferation.

Introduction

Insulin resistance is a disorder in which target cells fail to respond to normal levels of circulating insulin. An increased metabolic demand for insulin in several tissues commonly precedes the development of hyperglycemia. In the course of time, β cell compensation for insulin resistance fails, resulting in a progressive decline of β cell function that leads to type 2 diabetes (Kasuga, 2006). Recently, it was demonstrated that the administration of dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, for 5 days in adult rats induces hyperinsulinemia and insulin resistance in a dose-dependent fashion (Rafacho et al., 2008).

Clinical and experimental studies demonstrate the deleterious effects of diabetes on the genital system, which is associated mainly with erectile dysfunction and infertility (Jackson & Hutson, 1984; Scarano et al., 2006). Experimentally induced diabetes impairs spermatogenesis, which can be accompanied by decreases in the weights of reproductive organs, such as the prostate, and a reduction in serum testosterone levels (Seethalakshmi et al., 1987; Saito et al., 1996). Prostate atrophy, induced by diabetes, was accompanied by lower cell proliferation and higher apoptotic rates in acinar epithelium (Arcolino et al., 2010). Androgens are probably the main trophic factor in the prostatic acinar epithelium, being fundamental for normal cellular proliferation and differentiation and also for malign transformation (Cunha et al., 1992; Marker et al., 2003; Yan & Brown, 2008; Yuan & Balk, 2009). Thus, while mounting evidence has implicated testosterone withdrawal and AR signaling in the prostate modifications induced by diabetes, the understanding of the cellular mechanisms underlying these alterations is incomplete and their putative interactions with impaired insulin actions are unknown (Cagnon et al., 2000). Furthermore, most experimental studies concerning the response of the prostate to diabetes are based on experimental protocols of type 1 diabetes and knowledge of the effect of the more common type 2 diabetes and insulin resistance on this gland are still incipient (Ribeiro et al., 2008; Vikran et al., 2010a). In rat ventral prostate, dexamethasone treatment resulted in epithelial and smooth muscle cell atrophy and alterations in fibroblasts. Mitochondrial changes have also been detected in the prostatic smooth muscle cells, indicating possible deleterious effects of glucocorticoid (Ribeiro et al., 2008).

Insulin exerts important metabolic and cellular mitogenic effects mediated through the insulin receptor (IR) that is present in virtually all vertebrate tissues (Kahn, 1985). IR, a

transmembrane glycoprotein with intrinsic tyrosine kinase activity, undergoes rapid autophosphorylation and subsequently phosphorylates intracellular protein substrates, including IRS-1 and IRS-2 (Cheatham & Kahn, 1995). Phosphorylated IRS acts as a protein scaffold that activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Yenush & White, 1997). Downstream from PI3K, the serine threonine kinase (AKT), is activated playing a pivotal role in the regulation of various biological processes, including apoptosis, proliferation, differentiation, and intermediary metabolism (Downward, 1998; Chen et al., 2001). AKT phosphorylates many proteins with essential physiological roles, including Rheb (Inoki et al., 2003). Rheb leads to the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which phosphorylates the p70^{S6K}, which is important for protein synthesis. The mTOR pathway is a key regulator of cell growth and proliferation, and increasing evidence suggests that its deregulation is associated with human diseases, including cancer and diabetes (Ueno et al. 2005; Sabatini, 2006). Besides PI3K activation, a contribution of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, especially extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation, to proliferation, protection against cell death and gene expression has been observed although its significance is not completely understood (Briaud et al., 2003; Lawrence et al., 2005). Protein and phospholipid phosphatases modulate the strength and duration of insulin signals. Depending upon the tissue site, dysregulation of these heterologous signaling mechanisms can progress to glucose intolerance, hyperinsulinemia, dysregulated lipid metabolism, and insulin resistance (White, 2003).

Much is known about the glucose metabolism and the insulin signaling pathway in insulin-responsive tissues such as muscle, fat, and liver (Saad et al., 1992; Paéz-Espinosa et al., 1998), although studies show that insulin plays an important role in the metabolism and functioning of the prostate, the downstream signaling pathways in the gland are practically unknown. Thus, we investigated the insulin signaling pathway and epithelial cell proliferation in the rat prostate in a model of decreased insulin sensitivity induced by dexamethasone.

Materials and methods

Materials

Dexamethasone-phosphate (Decadron) was from Aché (Campinas, SP, Brazil). SDS-PAGE

1 and western blotting were performed using Bio-Rad systems (Hercules, CA, USA), and all
2 chemicals used were from Rio-Rad and from Sigma (St. Louis, MO). Anti-IR α (sc-710), anti-IRS-1
3 (sc-560), anti-AKT (sc-8312), anti-phospho-AKT Ser473 (sc-7985-R), anti-p70 S6K (sc-8418), anti-
4 phospho-ERK (sc-7383), anti-AR (sc-816), anti-GR (sc-1004) and anti-PCNA (sc-56) were from
5 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-mTOR (7C10) was from Cell Signaling
6 Technology (Beverly, MA). Anti-PI3K, subunit p85, (06-195) and anti-ERK (06-182) were from
7 Upstate (Lake Placid, NY). Anti-beta-actin (ab8227) was from Abcam (Cambridge, MA).

18 *Animals and dexamethasone treatment*

19
20
21 Adult male Wistar rats (320-420 g) obtained from the UNESP-São Paulo State University
22 Animal Care Unit, Campus of Botucatu, were kept at 22 \pm 2°C on a 12h light/dark cycle. The rats
23 had free access to food and water. The experimental group (DEX) received daily injections of
24 dexamethasone-phosphate (1 mg/kg body weight, dissolved in saline, intraperitoneally for 5 days),
25 whereas control (CTL) rats received saline (1 ml/kg body weight intraperitoneally for 5 days). Rats
26 were weighed daily. Following treatment, animals of both groups were anaesthetized by CO₂
27 inhalation and killed by decapitation. The ventral prostates were removed and weighed.
28 Experiments with animals were approved by the institutional UNESP Committee for Ethics in
29 Animal Experimentation and conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

36 *Protein extraction and immunoblotting*

37
38
39 Fragments of ventral prostate were homogenized for 15 seconds at the maximum speed in
40 ice-cold cell lysis buffer (Cell Signaling). The samples were centrifuged for 15 minutes at 4°C and
41 the supernatants were removed. Protein concentration from total cell lysate was determined by the
42 RCDC method (reducing agent compatible and detergent compatible assay), according to the
43 manufacturer (Bio-Rad). Protein obtained from prostate (150 μ g) was used for each experiment.
44 Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose membrane was performed for 90 min at
45 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean) with 0.02% SDS and
46 20% methanol. After blocking at room temperature for 2 hours in Tris buffer salt tween (TBST) dry
47 skimmed milk, membranes containing prostatic cell lysates were washed in TBST and incubated

1 overnight with the appropriate primary antibodies. After washing in TBST, membranes were
2
3 incubated with the appropriate secondary antibody. Antibody binding was detected by enhanced
4
5 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL), as described by the
6
7 manufacturer. Blots were scanned and the densitometry of protein bands was determined by pixels
8
9 intensity using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD). The protein content
10
11 values were corrected by expression of β -actin, used as a control blot.
12
13
14
15
16

17 *Immunocytochemical reactions*

18
19 Prostatic fragments were fixed by immersion in metacarn and embedded in paraffin.
20
21 Histological sections were submitted to antigen retrieval in citrate buffer, pH 6.0, for 20 min and
22
23 treated for a further 30 min in 3% H₂O₂ in methanol to block endogenous peroxidases. Sections
24
25 were treated for 15 min with a background sniper blocker to eliminate non-specific binding (Biocare
26
27 Medical, Concord, CA). Sequentially, slides were incubated with the following primary antibodies,
28
29 diluted 1:100 in 1% BSA: rabbit anti-androgen receptor (overnight, at 4°C) and mouse anti-PCNA
30
31 (1 h, at 37°C). AR detections were performed with biotinylated secondary anti-rabbit antibody, for
32
33 45 min, followed by the ABC Staining System (sc-2018, Santa Cruz Biotechnology), according to
34
35 the manufacturer's instructions. Anti-PCNA was detected by Polymer conjugated to peroxidase
36
37 (Novolink Polymer; Novocastra, Norwell, MA), for 45 min. The reactions were revealed with
38
39 diaminobenzidine (0.03% in TBS) and sections were stained with haematoxylin. Negative controls
40
41 were obtained by omission of the primary antibody. Slides were observed using a Zeiss-Jenamed
42
43 light microscope (Jena, Germany) coupled with a camera and a semi-automatic image analysis
44
45 system (Image-Pro Plus Media Cybernetics version 4.5 for Windows software, Bethesda, MD).
46
47
48
49
50

51 *Quantitative and statistical analysis*

52
53 The quantification of PCNA- and AR-positive cells in the acinar epithelium of the ventral
54
55 prostate was performed by using 20 microscopic randomly selected fields at 200x. Three rats were
56
57 employed, resulting in 60 fields per group. The immunoreaction index was calculated as the
58
59 number of positive nuclei in the epithelial cells divided by the total number of epithelial cell nuclei
60
counted, expressed as a percentage. Statistical comparisons between data from the DEX and CTL

groups were performed using the unpaired Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant and results are expressed as means \pm SE.

Results

Biometric parameters

Table 1 represents the mean values of body weight and prostatic weight of the control and dexamethasone-treated groups. The body weight of DEX animals was reduced significantly by 20% when compared with the controls ($P < 0.05$, $n=4$). However, the prostatic weight did not differ significantly between groups.

Insulin signaling in the prostate of insulin-resistant rats

Western blotting experiments were performed to determine modification in the insulin signaling pathway in the prostate of insulin-resistant rats. Insulin receptor (IR) protein expression was similar in the prostate of control and dexamethasone-treated rats (CTL 0.89 ± 0.24 vs. DEX 0.91 ± 0.05 , Fig. 1A). IRS-1 protein content was significantly reduced in the DEX group (CTL 1.08 ± 0.09 vs. DEX 0.83 ± 0.04 , $P < 0.05$, Fig. 1B). A marginal, but not significant, reduction in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) protein expression, p85 regulatory subunit, was observed in the prostate of dexamethasone-induced animals (CTL 0.68 ± 0.13 vs. DEX 0.57 ± 0.04 , Fig. 1C).

AKT protein levels were reduced significantly in the DEX group (CTL 0.98 ± 0.05 vs. DEX 0.79 ± 0.04 , $P < 0.05$, Fig. 2A), but this reduction was not significant in the phospho-AKT (CTL 0.63 ± 0.09 vs. DEX 0.52 ± 0.15 , Fig. 2B). mTOR protein content was significantly reduced in the prostate of dexamethasone-treated animals (CTL 0.61 ± 0.13 vs. DEX 0.24 ± 0.07 , $P < 0.05$, Fig. 2C). Although not significantly different, towards a reduction in p70^{s6k} was noticed in the DEX group, compared with the CTL group (CTL 0.90 ± 0.15 vs. DEX 0.63 ± 0.17 , Fig. 2D).

In both groups, the ERK protein expression was similar (0.92 ± 0.06 for CTL and 0.92 ± 0.05 for DEX animals, Fig. 3A). The levels of p-ERK increased, but not significantly, in dexamethasone-treated rats (CTL 0.60 ± 0.13 vs. DEX 0.91 ± 0.13 , Fig. 3B).

Treatment with dexamethasone decreased GR and AR expression

A significant reduction in glucocorticoid receptor (GR, CTL 1.30 ± 0.15 vs. DEX 0.66 ± 0.21 , $P < 0.05$, Fig. 4A) and androgen receptor (AR, CTL 1.81 ± 0.26 vs. DEX 0.57 ± 0.18 , $P < 0.05$, Fig. 4B) protein expression was observed in the prostate of DEX animals.

Immunocytochemical analysis

Immunocytochemical methods were used to detect proliferation of cell nuclear antigen (PCNA) and androgen receptor (AR). The frequency of PCNA-positive cells in the acinar epithelium of the prostate decreased 30-fold in the dexamethasone-treated group, when compared with controls (CTL $5.40 \pm 0.64\%$ vs. DEX $0.18 \pm 0.05\%$; $P < 0.001$; Fig. 5A-B and 7A). Although treatment with dexamethasone has caused only a small reduction in the frequency of AR-positive cells in the rat prostate, the intensity of staining in each nucleus decreased sharply, in particular in the intermediate gland region (CTL $97.71 \pm 1.09\%$ vs. DEX $88.64 \pm 1.82\%$; $P < 0.05$; Fig. 6 and 7B).

Discussion

The effects of glucocorticoids *in vivo* include both impaired insulin-dependent glucose uptake in the periphery and enhanced gluconeogenesis in the liver (Rizza et al., 1982; Rooney et al., 1994). We have recently demonstrated that peripheral insulin resistance has been confirmed by the high levels of glucose and fast serum insulin measured in dexamethasone-treated rats (Rafacho et al., 2009). In addition, glucocorticoids oppose other actions of insulin, including its effect on central appetite reduction (Chavez et al., 1997). In this study, animals in the DEX group demonstrated reduced body weight, probably due to the action of insulin's anorexigenic effects in the hypothalamus (Wood et al., 1979; Santos et al., 2007). Nevertheless, the prostatic weight did not differ between groups.

A previous investigation reported that glucocorticoid-induced insulin resistance led to epithelial and smooth muscle cell atrophy in the rat ventral prostate and structural alterations in fibroblasts and mitochondria (Ribeiro et al., 2008). A novel set of experiments based on this model of hyperinsulinemia now examines the insulin-signaling pathway in this gland. Our results show that, after treatment with dexamethasone, there was no change in insulin receptor levels, however

1 a significant reduction in the expression of IRS-1 could be observed in the rat prostate. This is in
2 agreement with other studies, such as in the muscle of dexamethasone treated rats (Saad et al.,
3 1993; Rojas et al., 2003). Additionally, a significant decrease in AKT content was observed in the
4 prostate of insulin-resistant rats. The decrease in the IR/IRS/PI3K/AKT pathway could also be
5 demonstrated in the liver and muscle of hyperinsulinaemic rats (Ueno et al., 2005) and in adipocyte
6 cells incubated with dexamethasone (Burén et al., 2002).

7
8
9
10
11
12
13
14
15 A major downstream target of AKT is mammalian target of rapamycin (mTOR), which has
16 key roles in cell survival, growth, protein synthesis, cellular metabolism and angiogenesis (Garcia
17 & Danielpour, 2008). Our findings showed that, after treatment with dexamethasone, there was a
18 drastic reduction in mTOR expression in the ventral prostate. The downregulation in AKT/mTOR
19 signaling in the prostate explains the reduction in cell proliferation detected in the gland of this
20 model of insulin resistance. Current estimations suggest that PI3K/AKT/mTOR signaling is
21 upregulated in 30-50% of prostate cancers. Multiple inhibitors of this pathway have been
22 developed and are being assessed, with attention focusing on mTOR inhibition (Morgan et al.,
23 2009). In prostate cancer cells, mTOR and p70^{s6k} are downstream of PI3K and AKT in regulating
24 G₁ cell cycle progression. PI3K transmits the mitogenic signal through AKT, mTOR to p70^{s6k},
25 suggesting that the PI3K/AKT/mTOR/ p70^{s6k} signaling pathway could serve as a target for
26 therapeutic intervention in prostate cancer (Gao et al., 2003). Additional *in vivo* studies with lower
27 doses of dexamethasone may provide new information about its antiproliferative effects on prostate
28 cells and its potential use in the treatment of proliferative prostate disorders.

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45 Besides the reduction in the insulin-signaling pathway, we also noticed a significant
46 decrease in the expression of glucocorticoid receptors (GR) and androgen (AR) in the prostate of
47 rats treated with dexamethasone. Glucocorticoids can inhibit androgen signaling, since the GR and
48 AR inhibit the transcriptional activity of each other in cultured cells (Chen et al., 1997). A study in
49 the prostate cancer cell lines, DU145 and PC-3, showed a dose-dependent decreased level of GR
50 after treatment with dexamethasone, where this reduction was more evident in PC-3 cells than in
51 DU145 cells. These results support the hypothesis that dexamethasone inhibits the growth of
52 prostate cancer cells through intrinsic GRs (Nishimura et al., 2001). As regards to the androgen
53 receptor, a recent study demonstrated that the inhibition of the PI3K pathway activates AR
54
55
56
57
58
59
60

1
2 signaling. Despite the increase in AR signaling, which has proliferative effects, PI3K pathway
3
4 inhibition has antiproliferative effects, suggesting that the PI3K pathway is dominant over AR
5
6 signaling in prostate cancer cells (Kaarbo et al., 2010).
7

8
9 Experimental evidence has shown the association between insulin resistance, caused by
10
11 the excess of fat in feeding, and prostate enlargement (Cai et al., 2001; Escobar et al., 2009;
12
13 Vikram et al., 2010a). Furthermore, clinical trials have indicated a positive correlation between
14
15 insulin resistance and higher risk of benign prostatic hyperplasia (BPH), which has been reinforced
16
17 by experimental data (Kasturi et al., 2006; Vikram et al., 2010b). In this context, the decrease in
18
19 prostatic cell proliferation observed after dexamethasone-induced insulin resistance may appear
20
21 contradictory. However, previous experiments from our laboratory in which rat insulin resistance
22
23 was induced by high-fat diet also led to the downregulation of IRS-1, AKT and AR in the rat ventral
24
25 prostate, however PI3K and cell proliferation were increased (unpublished data). According to
26
27 Escobar et al. (2009), dietary saturated fat influences prostate growth and proliferation via
28
29 peroxysome-proliferator-activated receptor gamma and upregulation of AR. On the other hand, in
30
31 dexamethasone-induced insulin resistance, there is a downregulation of GR and AR in the
32
33 prostate, as well as of IRS-1/AKT/mTOR.
34
35

36
37 Thus, the present results indicate the occurrence of a specific signaling mechanism in
38
39 dexamethasone- and high-fat dietary induced insulin resistance. We have demonstrated, for the
40
41 first time, a downregulation in the IRS-1/AKT/mTOR pathway in the prostate of dexamethasone-
42
43 treated rats that induces a reduction in the initial steps of insulin action, in turn affecting the
44
45 signaling pathway involved in the stimulation of epithelial cell proliferation in the prostate.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Acknowledgments**

55
56 This work was supported by grants from the Foundation for Research Support of São Paulo
57
58 (FAPESP). We thank Mr. Luis Roberto Faleiros Jr. and Ms. Samantha Yuri Maeda for technical
59
60 support.

References

- 1
2
3
4 Arcolino F.O., Ribeiro D.L., Gobbo M.G., Taboga S.R., Góes R.M. (2010) Proliferation and
5
6 apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium
7
8 of alloxan-induced diabetic rats. *Int. J. Exp. Path.* 91, 144-154.
9
10
11 Briaud I., Lingohr M.K., Dickson L.M., Wrede C.E., Rhodes C.J. (2003) Differential activation
12
13 mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52, 974-
14
15 983.
16
17 Burén J., Liu H., Jensen J., Eriksson J.W. (2002) Dexamethasone impairs insulin signalling and
18
19 glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and
20
21 protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *J. Endocrinol.* 146, 419-429.
22
23
24 Cagnon V.H.A., Camargo A.M., Rosa R.M., Fabiani C.R., Padovani C.R., Martinez F.E. (2000)
25
26 Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced
27
28 diabetes (C57bl/6j). *Tissue & Cell* 32, 275-283.
29
30
31 Cai X., Haleem R., Oram S., Cyriac J., Jiang F., Grayhack J.T., Kozlowski J.M., Wang Z. (2001)
32
33 High fat diet increases the weight of rat ventral prostate. *Prostate* 49, 1-8.
34
35
36 Chavez M., Seeley R.J., Green P.K., Wilkinson C.W., Schwartz M.W., Woods S.C. (1997)
37
38 Adrenalectomy increases sensitivity to central insulin. *Physiol. Behav.* 62, 631-634.
39
40
41 Cheatham B. & Kahn C.R. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16,
42
43 117-142.
44
45
46 Chen R., Kim O., Yang J., Sato K., Eisenmann K.M., McCarthy J., Chen H., Qiu Y. (2001)
47
48 Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 31858-
49
50 31862.
51
52
53 Chen S., Wang J., Yu G., Liu W., Pearce D. (1997) Androgen and glucocorticoid receptor
54
55 heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J.*
56
57 *Biol. Chem.* 272, 14087-14092.
58
59
60 Cunha G.R., Alarid E.T., Turner T., Donjacour A.A., Boutin E.L., Foster B.A. (1992) Normal and
abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial
interactions, and growth factors. *J. Androl.* 13, 465-475.

- 1
2 Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr.*
3
4 *Opin. Cell. Biol.* 10, 262-267.
5
- 6 Escobar E.L., Gomes-Marcondes M.C., Carvalho H.F. (2009) Dietary fatty acid quality affects AR
7
8 and PPAPgamma levels and prostate growth. *Prostate* 69, 548-558.
9
- 10 Gao N., Zhang Z., Jiang B., Shi X. (2003) Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle
11
12 progression of human prostate cancer. *Biochem. and Biophysic. Res. Communications* 310,
13
14 1124-1132.
15
- 16 Garcia J.A. & Danielpour D. (2008) Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic
17
18 strategy in the management of urologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1347-1354.
19
- 20 Inoki K., Li Y., Xu T., Guan K.L. (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and
21
22 regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17, 1829-1834.
23
- 24 Jackson F.L. & Hutson J.C. (1984) Altered responses to androgens in diabetic male rats. *Diabetes*
25
26 33, 819-824.
27
- 28 Kaarbo M., Mikkelsen O.L., Malerod L., Qu S., Lobert V.H., Akgul G., Halvorsen T., Maelandsmo
29
30 G.M., Saatcioglu F. (2010) PI3K-AKT-mTOR pathway is dominant over androgen receptor
31
32 signaling in prostate cancer cells. *Cell Oncol.* 32, 11-27.
33
- 34 Kahn C.R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.* 36, 429-451.
35
36
- 37 Kasturi S., Russell S., McVary K.T. (2006) Metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms
38
39 secondary to benign prostatic hyperplasia. *Curr. Urol. Rep.* 7, 288-292.
40
- 41 Kasuga M. (2006) Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J. Clin. Invest.* 116, 1756-
42
43 1760.
44
- 45 Lawrence M.C., McGlynn K., Park B.H., Cobb M.H. (2005) ERK1/2-dependent activation of
46
47 transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene
48
49 promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 26751-26759.
50
- 51 Marker P.C., Donjacour A.A., Dahiya R., Cunha G.R. (2003) Hormonal cellular and molecular
52
53 control of prostatic development. *Dev. Biol.* 253, 165-174.
54
- 55 Morgan T.M., Koreckij T.D., Corey E. (2009) Targeted therapy for advanced prostate cancer:
56
57 inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 237-249.
58
59
60

- 1
2 Nishimura K., Nonomura N., Satoh E., Harada Y., Nakayama M., Tokizane T., Fukui T., Ono Y.,
3
4 Inoue H., Shin M., Tsujimoto Y., Takayama H., Aozasa K., Okuyama A. (2001) Potential
5
6 mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate
7
8 cancer. *J. National Cancer Institute* 93, 1739-1746.
9
- 10 Páez-Espinosa V., Carvalho C.R.O., Alvarez-Rojas F., Janeri L., Velloso L.A., Boschero A.C., Saad
11
12 M.J.A. (1998) Insulin induces tyrosine phosphorylation of Shc and stimulates Shc/Grb2
13
14 association in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *Endocrine* 8, 193-200.
15
16
- 17 Rafacho A., Giozzet V.A.G., Boschero A.C, Bosqueiro J.R. (2008) Functional alterations in
18
19 endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin
20
21 resistance. *Pancreas* 36, 284-293.
22
23
- 24 Rafacho A., Cestari T.M., Taboga S.R., Boschero A.C., Bosqueiro J.R. (2009) High doses of
25
26 dexamethasone induce increased β -cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am. J. Physiol.*
27
28 *Endocrinol. Metab.* 296, 681-689.
29
- 30 Ribeiro D.L., Rafacho A., Bosqueiro J.R., Taboga S.R., Góes R.M. (2008) Cellular changes in the
31
32 prostatic stroma of glucocorticoid treated rats. *Cell & Tissue Research* 332, 499-508.
33
34
- 35 Rizza R.A., Mandarino L.J., Gerich J. (1982) Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired
36
37 suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor
38
39 defect of insulin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54, 131-138.
40
- 41 Rojas F.A., Hirata A.E., Saad M.J.A. (2003) Regulation of insulin receptor substrate-2 tyrosine
42
43 phosphorylation in animal models of insulin resistance. *Endocrine* 21, 115-122.
44
- 45 Rooney D.P., Neely R.D.G., Cullen C., Ennis C.N., Sheridan B., Atkinson A.B. (1994) The effect of
46
47 cortisol on glucose/glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. *J. Clin. Endocrinol.*
48
49 *Metab.* 77, 1180-1183.
50
- 51 Saad M.J., Araki E., Miralpeix M., Rothenberg P.L., White M.F., Kahn C.R. (1992) Regulation of
52
53 insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J. Clin.*
54
55 *Invest.* 90, 1839-1849.
56
57
- 58 Saad M.J.A., Folli F., Kahn J.A., Kahn C.R. (1993) Modulation of insulin receptor, insulin receptor
59
60 substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated
rats. *J. Clin. Invest.* 92, 2065-2072.

- 1
2 Sabatini D.M. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer* 6,
3
4 729-734.
5
- 6 Saito M., Nishi K., Fukumoto Y., Weiss R.M., Latifpour J. (1996) Effect of experimental diabetes on
7
8 rat prostate endothelin receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 310, 197-200.
9
- 10 Santos C.L., Rafacho A., Bosqueiro J.R. (2007) Efeitos da administração de dexametasona in vivo
11
12 sobre a glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de
13
14 tratamento. *Biosci. J.* 23, 101-110.
15
- 16 Scarano W.R., Messias A.G., Oliva S.U., Klinefelter G.R., Kempinas W.G. (2006) Sexual behaviour,
17
18 sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int.*
19
20 *J. Androl.* 29, 482-488.
21
- 22 Seethalakshmi L., Menon M., Diamond D. (1987) The effect of streptozotocin-induced diabetes on
23
24 the neuroendocrine-male reproductive tract axis of adult rat. *J. Urol.* 138, 190-194.
25
- 26 Ueno M., Carneiro E.M., Folli F., Franchini K.G., Saad M.J.A. (2005) Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia:
27
28 role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* 48, 506-
29
30 518.
31
- 32 Vikram A., Jena G.B., Ramarao P. (2010a) Increased cell proliferation and contractility of prostate
33
34 in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. *Prostate* 70,
35
36 79-89.
37
- 38 Vikram A., Jena G., Ramarao P. (2010b) Insulin-resistance and benign prostatic hyperplasia: the
39
40 connection. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 75-81.
41
- 42 White M.F. (2003) Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710-1711.
43
- 44 Wood S.C., Lotter E.C., McKay L.D. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin
45
46 reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503-505.
47
- 48 Yan J. & Brown T.R. (2008) Cell proliferation and expression of cell cycle regulatory proteins that
49
50 control the G1/S transition are age dependent and lobe specific in the brown Norway rat model
51
52 of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 149, 193-207.
53
- 54 Yenush L. & White M.F. (1997) The IRS-signalling system during insulin and cytokine action.
55
56
57
58
59
60 *Bioessays* 19, 491-500.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Yuan X. & Balk S.P. (2009) Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration.
Urol. Oncol. 27, 36-41.

For Peer Review

Figure Legends

Figure 1. Protein content of *A*, insulin receptor α (IR α); *B*, insulin receptor substrate-1 (IRS-1); and *C*, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in the ventral prostate of rats treated with saline (CTL) and dexamethasone (DEX). Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to control (Student's t-test), $n = 4$.

Figure 2. Protein expression of *A*, serine-threonine protein kinase (AKT); *B*, phosphorylated serine-threonine protein kinase (pAkt); *C*, mammalian target of rapamycin (mTOR); *D*, ribosomal protein S6 kinase (p70^{S6k}) in the ventral prostate of rats treated with saline (CTL) and dexamethasone (DEX). Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to control (Student's t-test), $n = 4$.

Figure 3. Protein content of *A*, extracellular signal-regulated kinase (ERK); and *B*, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) in the ventral prostate of rats treated with saline (CTL) and dexamethasone (DEX). Data are reported as means \pm SE, $P > 0.05$ (Student's t-test), $n = 4$.

Figure 4. Protein expression of *A*, glucocorticoid receptor (GR); and *B*, androgen receptor (AR) in the ventral prostate of rats treated with saline (CTL) and dexamethasone (DEX). Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to control (Student's t-test), $n = 4$.

Figure 5. PCNA immunocytochemistry of the intermediate region of the ventral prostate of control rats (*A*) or rats treated with dexamethasone (*B*). PCNA-positive cells are indicated by arrowheads. Note that proliferation in the prostate epithelium decreases significantly in the dexamethasone group (*B*). Scale bar: 20 μm .

Figure 6. Immunocytochemistry for AR in the ventral prostate of control rats (*A-C*) or rats treated with dexamethasone (*D-F*). Distal region (*A*, *B*, *D* and *E*) and intermediate region of the acini (*C* and *F*). Note the reduction in the staining of the androgen receptor in the prostate epithelium of the dexamethasone-treated group and the decreasing intensity of nuclear staining for this receptor after treatment

1
2 with dexamethasone. Scale bars = 100µm for A and D; 20µm for B, C, E and F.
3
4
5

6 Figure 7. Relative frequency (%) of immunoreactions for PCNA-positive cells (A) and AR-positive
7 cells (B). Data are reported as means ± SE. *P<0.05 compared to control (Student's t-test).
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

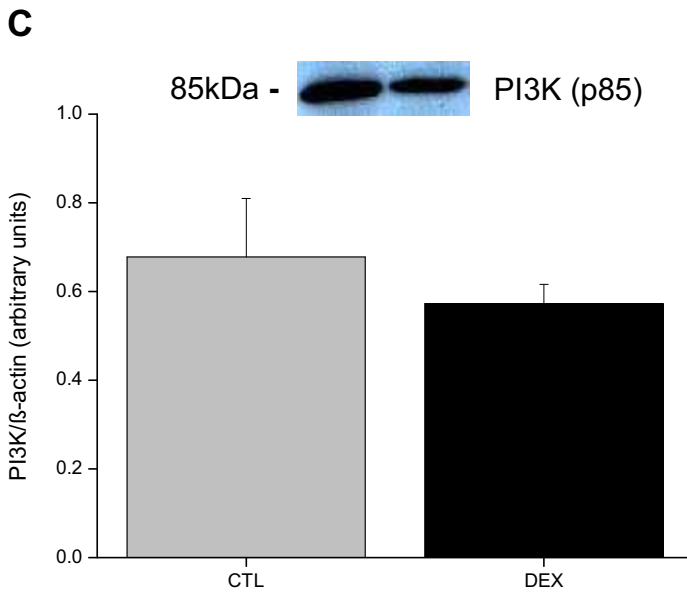
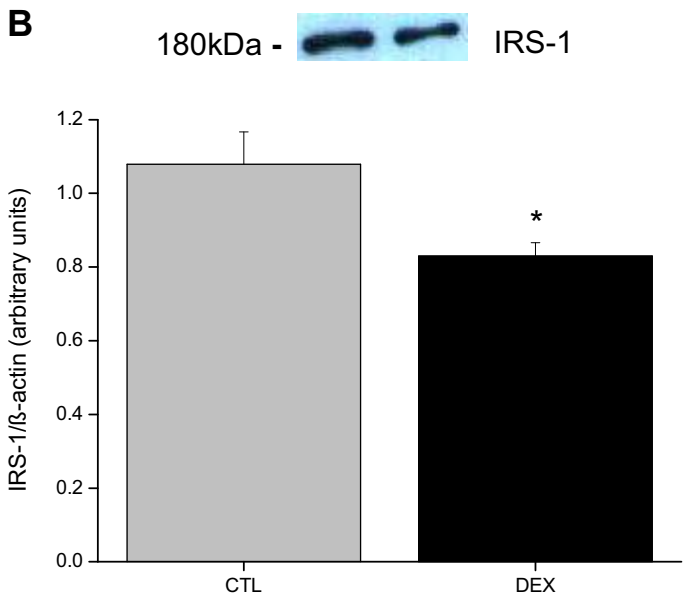
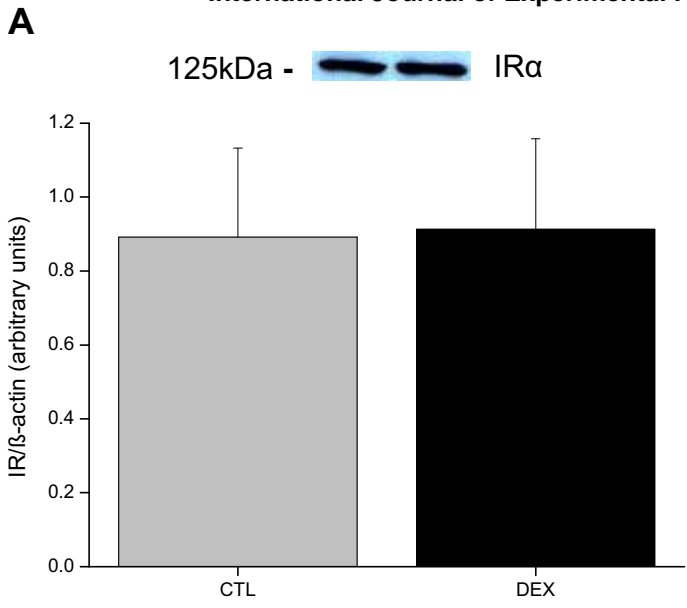
For Peer Review

Table 1. Mean values of body and prostatic weight of control and dex-treated groups

	CTL	DEX
Body weight (g)	396.25±18.3	317.5±24.5*
Prostatic weight (mg)	0.527±0.013	0.510±0.028

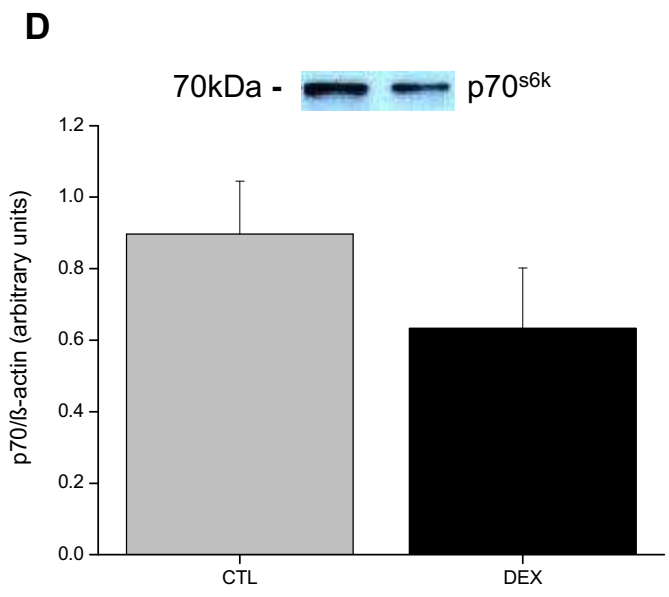
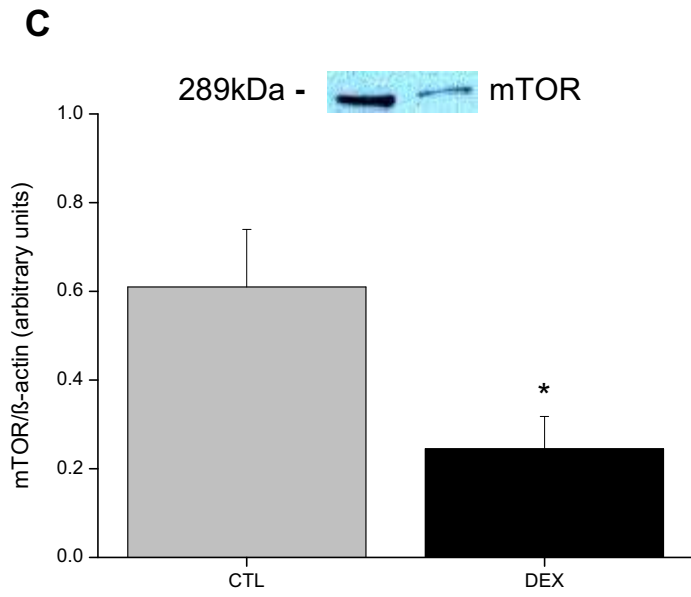
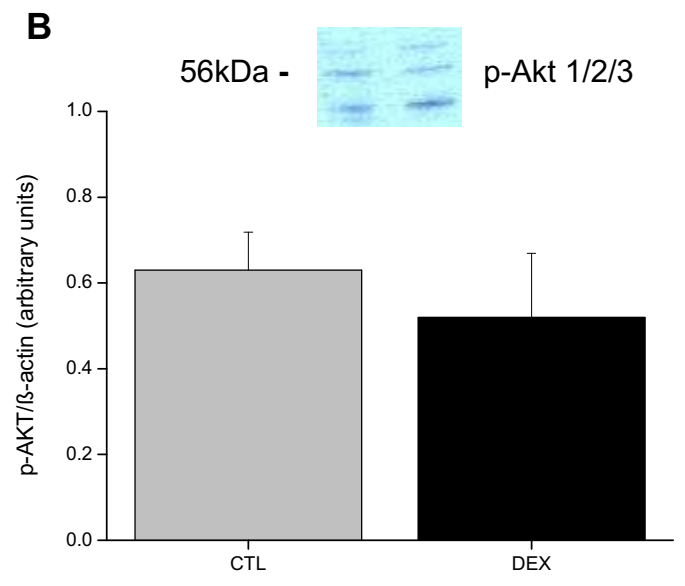
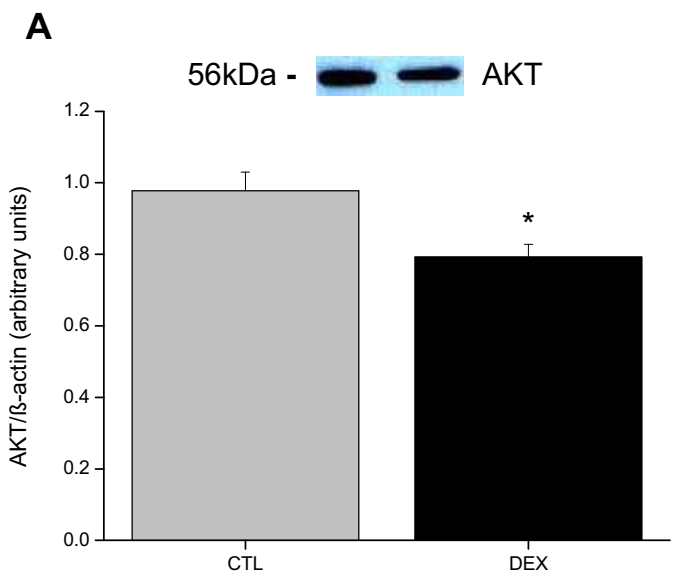
Data are mean ± SE. *Significantly different from control, P<0.05, n=4.

For Peer Review



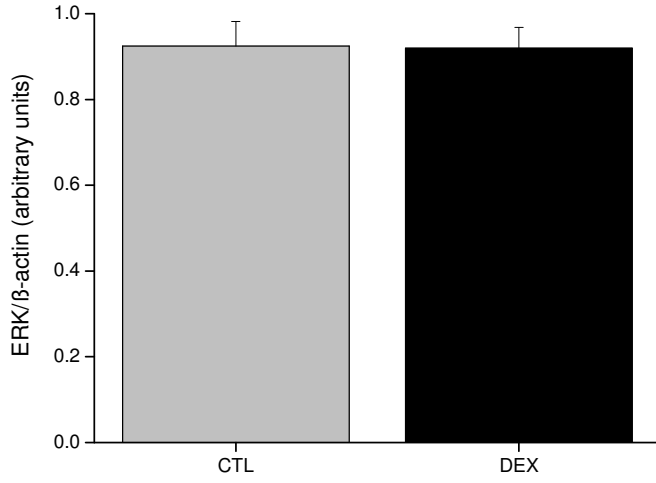
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

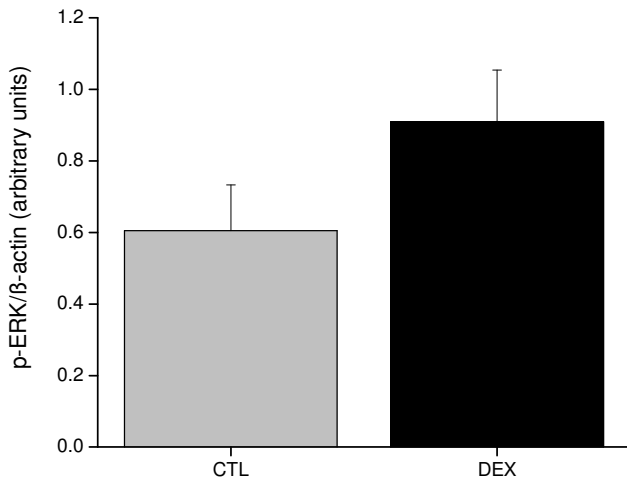


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

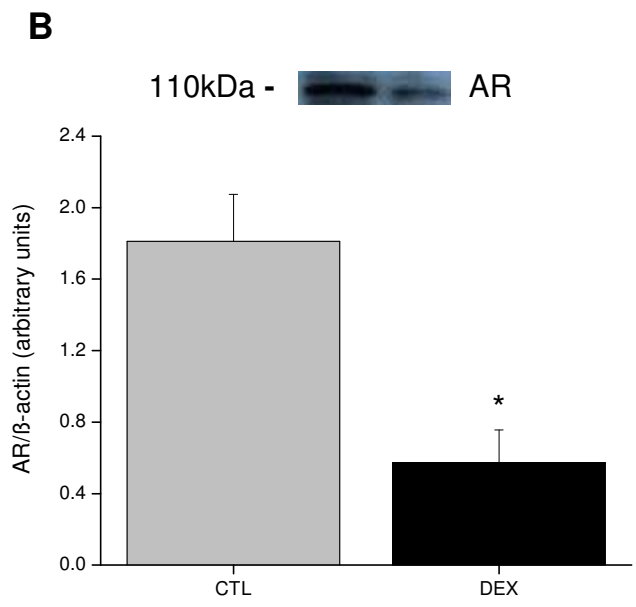
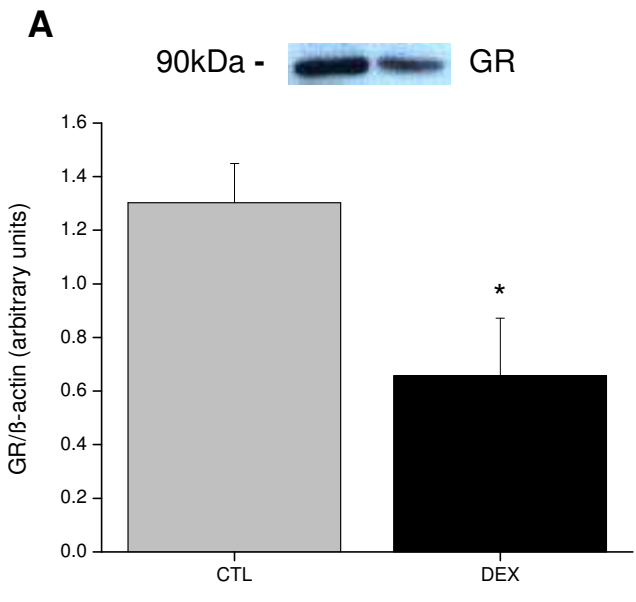
A 42kDa -  ERK 1/2



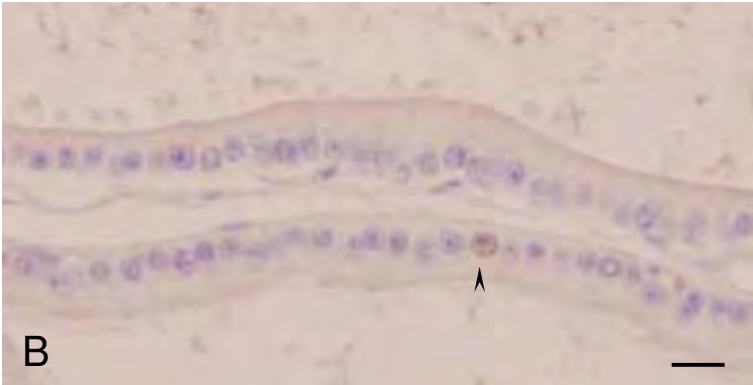
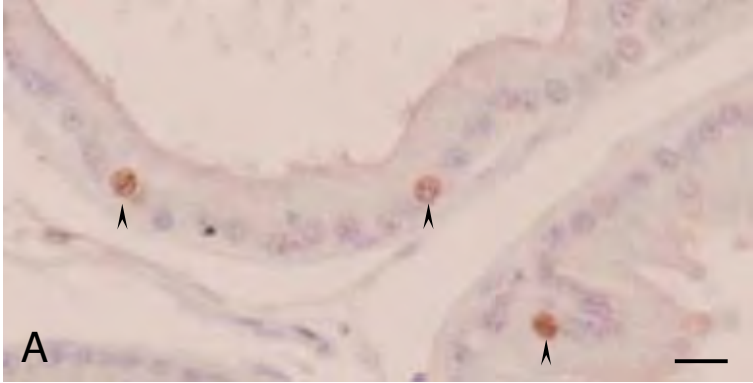
B 42kDa -  p-ERK 1/2

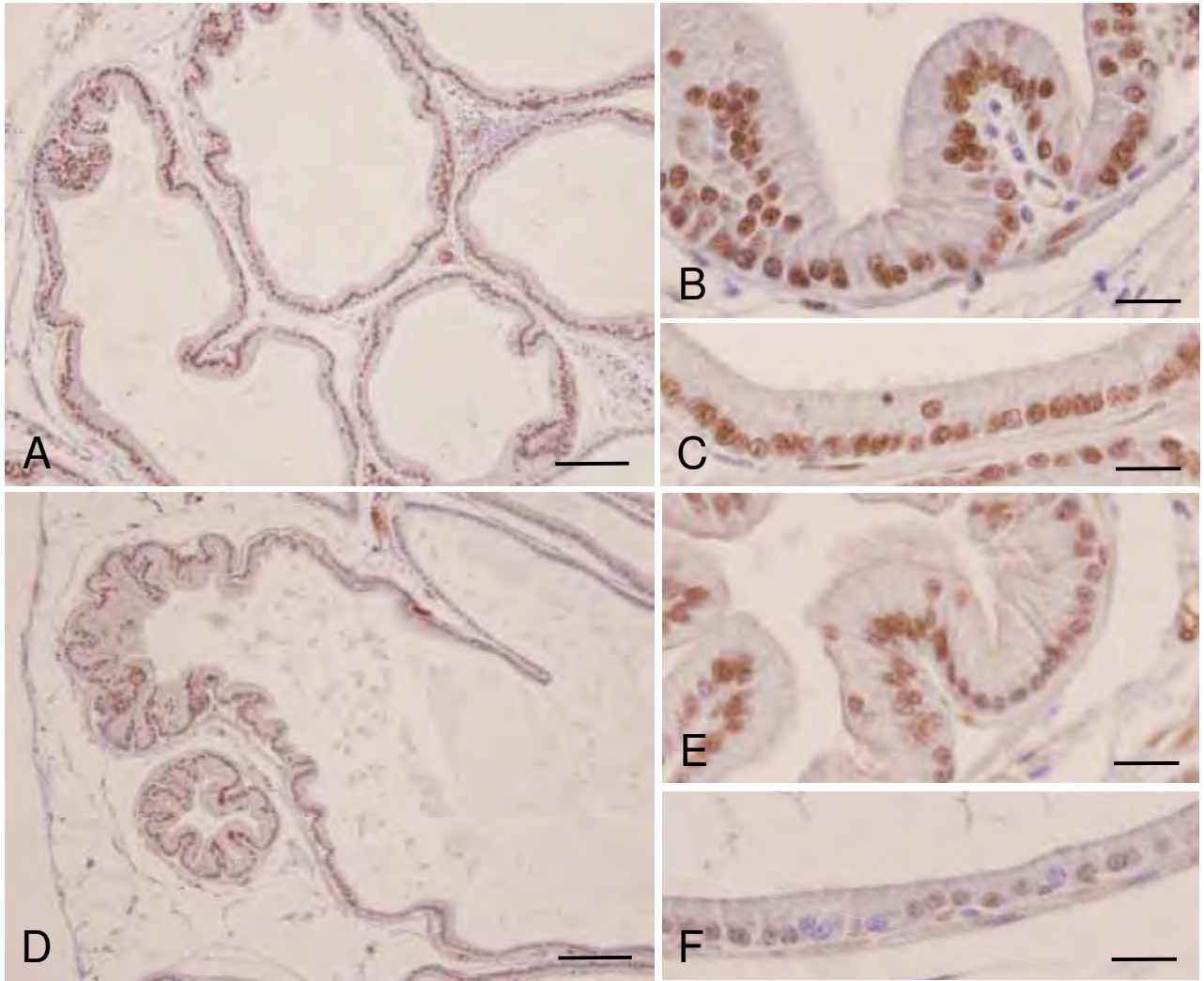


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



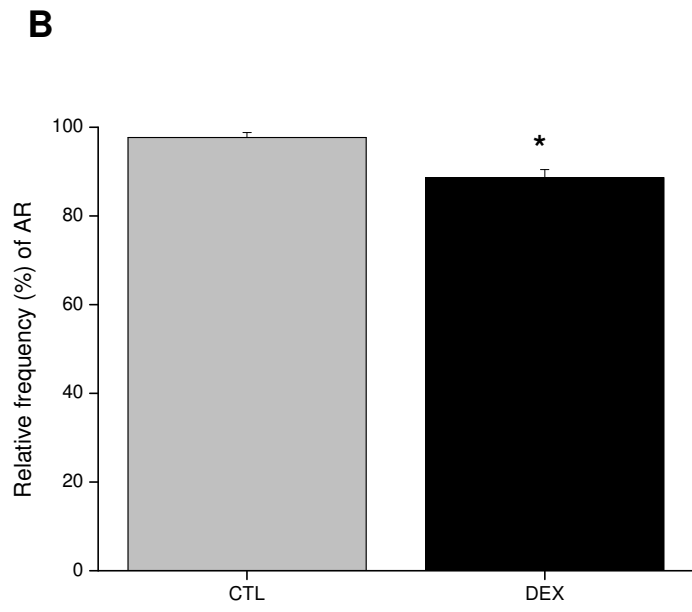
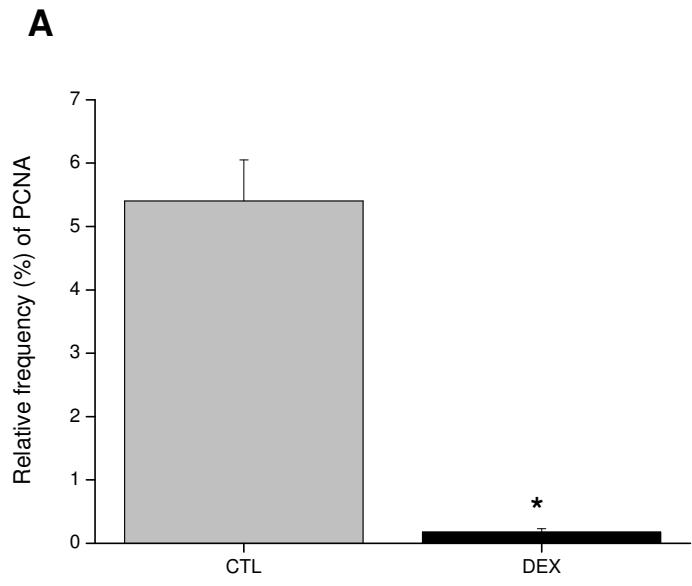
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60





1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Conclusões

A resistência à insulina induzida pelo tratamento com dexametasona causa na próstata ventral de ratos:

- Redução na expressão da via de sinalização da insulina IRS-1/AKT/mTOR
- Redução na expressão das proteínas AR e GR
- Redução na frequência de células AR- e PCNA-positivas no epitélio acinar prostático

Assim, o tratamento com dexametasona afeta a via de sinalização envolvida na estimulação da proliferação celular epitelial prostática.

Referências Bibliográficas

AMATRUDA, J.M.; LIVINGSTON, J.N.; LOCKWOOD, D.H. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. **Diabetes Metab. Rev.**, v.1, p.293-317, 1985.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position statement. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.32, p.S62-S67, 2009.

ANDERSON, L.C.; SULEIMAN, A.H.; GARRET, J.R. Morphological effects of diabetes on the glandular ducts and acini of the rat submandibular gland. **Mycroscopy Res. Tech.**, v.27, p.61-70, 1994.

ANDREWS, R.C.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin. Sci.**, v.96, p.513-523, 1999.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v.372, p.186-90, 1994.

BACKER, J.M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **Embo J.**, v.11, p.3469-3479, 1992.

BARNARD, R.J. et al. Prostate cancer: another aspect of the insulin-resistance syndrome? **Obes. Rev.**, v.3, n.4, p.303-308, 2002.

BODKER, A. et al. Estrogen receptor in the human prostatic urethra and prostate in prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. **J. Urol. Nephrol.**, v.33, p.237-242, 1999.

BONNER-WEIR, S. Life and death of the pancreatic beta cells. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.11, p.375-378, 2000.

BRIAUD, I. et al. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v.52, p.974-983, 2003.

BURÉN, J. et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **J. Endocrinol.**, v.146, p.419-429, 2002.

BURÉN, J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.474, p.91-101, 2008.

CAGNON, V.H.A. et al. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). **Tissue Cell**, v.32, p.275-283, 2000.

CAMPAGNOLO, N. et al. Aspectos clínicos e moleculares do Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY). **Rev. Hosp. Clin. Porto Alegre**, v.24, p.51-59, 2005.

CAPERUTO, L.C. et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. **Endocrine**, v.29, n.3, p.391-398, 2006.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, n.4, p.419-425, 2002.

CARVALHEIRA, J.B. et al. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v.46, n.12, p.1629-1640, 2003.

CHEATHAM, B.; KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocr. Rev.**, v.16, p.117-142, 1995.

CHEN, R. et al. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.31858-31862, 2001.

CUNHA, G.R. et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell Differ.**, v.17, p.137-148, 1985.

CUNHA, G.R. et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. **Int. J. Cancer**, v.107, p.1-10, 2003.

CUNHA, G.R.; COOKE, P.S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Arch. Histol. Cytol.**, v.67, n.5, p.417-434, 2004.

DAVIES, P.; EATON, C.L. Regulation of prostate growth. **J. Endocrinol.**, v.131, p.5-17, 1991.

DEFRONZO, R.A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. **Neth. J. Med.**, v.50, n.5, p. 191-197, 1997.

DI SANT'AGENESE, P.A. Endocrine-paracrine (APUD, neuroendocrine) cells in the normal and pathologic prostate. **Bull. Assoc. Anat. (Nancy)**, v.75, p.63-67, 1991.

DOR, Y. et al. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v.429, p.41-46, 2004.

EIZIRIK, D.L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death - the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia**, v.44, p.2115-2133, 2001.

FANTIN, V.R. et al. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.278, p.E127-E133, 2000.

FELIG, P.; BERGMAN, M. The endocrine pancreas: Diabetes Mellitus. In: FELIG, P.; BAXTER, P.D.; FROHMAN, L.A. (Eds.). **Endocrinology and metabolism**. New York: McGraw- Hill, 1995.

FOLLI, F. et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22171-22177, 1992.

- FROGUEL, P.; VELHO, G. Genetic determinants of type 2 diabetes. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.56, p.91-105, 2001.
- FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1992.
- GELMANN, E.P. Molecular biology of the androgen receptor. **J. Clin. Oncol.**, v.20, p.3001-3015, 2002.
- GENUTH, S.M. The endocrine system. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N. (Eds.). **Physiology**. Philadelphia: Mosby, 1998. p.779-1013.
- GODSLAND, IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. **Clinical Science**, v.118, p.315-332, 2010.
- GROSS, J.L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, v.46, p.16-26, 2002.
- GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984.
- HAYWARD, S.W.; CUNHA, G.R. The prostate: development and physiology. **Radiol. Clin. North Am.**, v.38, p.1-14, 2000.
- HEINLEIN, C.A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocr. Rev.**, v.25, p.276-308, 2004.
- HOLNESS, M.J. et al. Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation and glucocorticoids on pancreatic beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. **Diabetologia**, v.48, n.10, p.2062-2068, 2005.
- HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. **Prostate**, v.52, p.213-235, 2002.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**. 4.ed. 2009. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/content/economic-impacts-diabetes>>. Acesso em: 30 Jul. 2010.
- JESIK, C.J.; HOLLAND, J.M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **Prostate**, v.3, p.81-97, 1982.
- KAHN, C.R. The molecular mechanism of insulin action. **Annu. Rev. Med.**, v.36, p.429-451, 1985.
- KAHN, CR. Banting lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v.43, n.8, p.1066-1084, 1994.
- KAHN, C.R.; VICENT, D.; DORIA, A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. **Annu. Rev. Med.**, v.47, p.509-531, 1996.
- KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. **J. Clin. Invest.**, v.116, n.7, p.1756-1760, 2006.

- KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v.21, p.292-296, 1998.
- KING, K.J.; NICHOLSON, H.D.; ASSINDER, S.J. Effect of increasing ratio of estrogen: androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. **Prostate**, v.66, n.1, p.105-114, 2006.
- LAVAN, B.E. et al. A novel 160kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated human embryonic kidney 293 cells is a new member of the IRS family. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.21403-21407, 1997.
- LAWRENCE, M.C. et al. ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. **J. Biol. Chem.**, v.280, p.26751-26759, 2005.
- LEHRER, S. et al. Increased serum insulin associated with increased risk of prostate cancer recurrence. **Prostate**, v.50, n.1, p.1-3, 2002.
- MAJITHIA, A.R.; FLOREZ, J.C. Clinical translation of genetic predictors for type 2 diabetes. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v.16, p.100-106, 2009.
- MARASCHIN, J.F. et al. Diabetes Mellitus Classification. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.95, n.2, p.e40-e47, 2010.
- MARKER, P.C. et al. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. **Dev. Biol.**, v.253, p.165-174, 2003.
- MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature**, v.414, p.792-798, 2001.
- MC NEAL, J.E. The prostate gland: morphology and pathology. **Monogr. Urol.**, v.4, p.3-37, 1983.
- MC NEAL, J.E. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. **Semin. Ultrasound CT MR**, v.9, p.329-334, 1988.
- OGAWA, A. et al. Roles of insulin resistance and β -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes **J. Clin. Invest.**, v.90, n. 2, p.497-504, 1992.
- PAGANO, G. et al. An *in vivo* and *in vitro* study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. **J. Clin. Invest.**, v.72, p.1814-1820, 1983.
- PRADA, P.O. et al. Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1^{ser307} phosphorylation in rat tissues. **J. Endocrinol.**, v.185, n.3, p.429-437, 2005.
- PRINS, G.S. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. **Endocrinology**, v.130, p.3703-3714, 1992.
- RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36, n.3, p.284-93, 2008.

- RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased β -cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.296, p.681-689, 2009.
- REINEHR, T. et al. Beta-cell autoantibodies in children with type 2 diabetes mellitus: subgroup or misclassification? **Arch. Dis. Child.**, v.91, p.473-477, 2006.
- REITER, E. et al. Effects of pituitary hormones on the prostate. **Prostate**, v.38, p.159-165, 1999.
- RHODES, C.J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? **Science**, v.307, p.380-384, 2005.
- RIBEIRO, D.L. et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **Eur. J. Histochem.**, v.50, p.51-60, 2006.
- RIBEIRO, D.L. et al. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid treated rats. **Cell Tissue Res.**, v.332, p.499-508, 2008.
- ROSS, R.W.; KANTOFF, P.W. Predicting outcomes in prostate cancer: how many more nomograms do we need? **J. Clin. Oncol.**, v.25, p.3563-3564, 2007.
- ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocr. Relat. Cancer**, v.11, p.225-254, 2004.
- RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signaling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v.48, p.2119-2130, 2005.
- SAAD, M.J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.2065-2072, 1993.
- SABATINI, D.M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat. Rev. Cancer**, v.6, n.9, p.729-734, 2006.
- SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res.**, v.4, n.3, p.146-150, 2002.
- SASSON, R.; AMSTERDAM, A. Stimulation of apoptosis in human granulosa cells from in vitro fertilization patients and its prevention by dexamethasone: involvement of cell contact and Bcl-2 expression. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.3441-3451, 2002.
- SCIACCHITANO, S.; TAYLOR, S. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. **Endocrinology**, v.138, p.4931-4940, 1997.
- SESTI, G. et al. Defects of the insulin receptor substrates (IRSs) system in human metabolic disorders. **FASEB J.**, p.2099-2111, 2001.
- SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat. A model to study insulin resistance. **Am. J. Physiol.**, v.283, p.E367-E373, 2002.

SHEPHERD, P.R.; NAVE, B.T.; SIDDLE, K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **Biochem. J.**, v.305, p.25-28, 1995.

SINGH, P. et al. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v.13, p.653-666, 2006.

SKYLER, J.S. et al. Position statement. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials: a position statement of the American Diabetes Association and a Scientific statement of the American College of Cardiology; Foundation and the American Heart Association. **Diabetes Care**, v.32, p.187-192, 2009.

SPELLMAN, C.W. Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. **J. Am. Osteopath. Assoc.**, v.107, p.S1-S5, 2007.

SUN, X.J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. **Nature**, v.377, p.173-177, 1995.

TETA, M. et al. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. **Dev. Cell**, v.12, p.817-826, 2007.

THIRONE, A.C. et al. Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology**, v.145, n.1, p.281-293, 2004.

THOMAS, G.; HALL, M.N. TOR signaling and control of cell growth. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.9, p.782-787, 1997.

THOMSON, A.A. Role of androgens and fibroblast growth factor in prostatic development. **Reproduction**, v.121, p.187-195, 2001.

THOMSON, A.A.; MARKER, P.C. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. **Differentiaton**, v.74, p.382-392, 2006.

VENABLES, M.C.; JEUKENDRUP, A.E. Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Int. J. Exp. Diabetes Res.**, v.25, p.S18-S23, 2009.

VILAMAIOR, P.S. et al. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate**, v.45, p.253-258, 2000.

WEBBER, M.M. Polypeptide hormones and the prostate. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.75B, p.66-88, 1981.

WHITE, M.F. Insulin signaling in health and disease. **Science**, v.302, p.1710-1711, 2003.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.

WITHERS, D.J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v.391, p.900-904, 1998.

ZHANG, X. et al. Kinetic mechanism of AKT/PKB enzyme family. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.20, p.13949-13956, 2006.