

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ÁREA DE FISIOLOGIA

CARLA LÚCIA PENHA CARDOSO

**EFEITO DA CASTRAÇÃO E DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL
SOBRE A QUANTIDADE E ATIVIDADE DA ENZIMA QUE DEGRADA
INSULINA (IDE) EM FRAÇÃO CITOSÓLICA DE ÚTERO DE RATO.**

Recife

2003

CARLA LÚCIA PENHA CARDOSO

**EFEITO DA CASTRAÇÃO E DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL
SOBRE A QUANTIDADE E ATIVIDADE DA ENZIMA QUE DEGRADA
INSULINA (IDE) EM FRAÇÃO CITOSÓLICA DE ÚTERO DE RATO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Ciências Biológicas – Área Fisiologia da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Biológicas – Área de Fisiologia.

Orientador: Pr^{fa}. Dr^a. Maria Inês Wanderley

Co-orientador: Pr^o Dr^o. Daniel Pedro Udrisar

Recife

2003

Cardoso, Carla Lúcia Penha.

Efeito da castração e do tratamento com estradiol sobre a quantidade e atividade de enzima que degrada insulina (IDE) em fração citosólica de útero de ratas. Carla Lúcia Penha Cardoso – Recife, 2003.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Curso de 'mestrado em Ciências Biológicas – Área Fisiologia', Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

1. Enzima – degradação insulina – rato. 2. castração – tratamento. 3. útero de ratas – fração citosólica. 4. estradiol. I. Título.

CDU 591. 133. 2: 599. 323 - 4

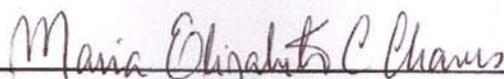
CARLA LÚCIA PENHA CARDOSO

**EFEITO DA CASTRAÇÃO E DO TRATAMENTO COM ESTRADIOL
SOBRE A QUANTIDADE E ATIVIDADE DA ENZIMA QUE DEGRADA
INSULINA (IDE) EM FRAÇÃO CITOSÓLICA DE ÚTERO DE RATOS.**

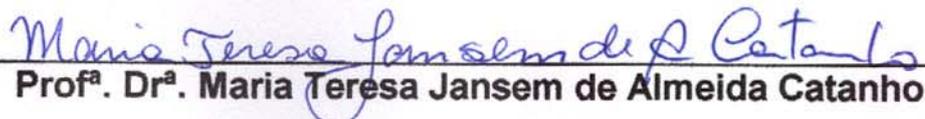
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Ciências Biológicas – Área Fisiologia da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas – Área de Fisiologia.

Aprovada em 23/01/2004

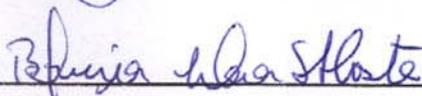
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves



Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Janssem de Almeida Catanho



Prof^ª. Dr^ª. Belmira Lara Silveira Andrade da Costa

AGRADECIMENTOS

À Jessiene Furtado pelo incentivo, companheirismo e dedicação;

À Maria Cristina Vilela e Carla Valença pela fraternidade e acolhimento;

Aos meus corajosos orientadores Prof^o. Dr^o. Daniel Pedro Udrisar e Prof^a.

Dr^a. Maria Inês Wanderley pela paciência, amizade e compreensão;

À Maria do Carmo Lacerda e Regina Coeli pela perseverança e atenção dispensadas às nossas árduas e comuns tarefas do mestrado;

À Maria do Carmo Araújo pela coragem inspirada nos meus primeiros passos dentro do laboratório;

À família Furtado pelo apoio oferecido à minha família em minha ausência;

Ao meu irmão Marcelo Cardoso por estar sempre disposto a ouvir-me;

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

“[...] este trabalho é uma pequena parte de uma folha de um galho de uma árvore que se encontra no meio de uma imensa floresta”.

D. Udrisar

RESUMO

A enzima que degrada a insulina (IDE) é uma proteína intracelular, cuja função mais caracterizada “in vitro” tem sido sua atividade proteolítica, com alta especificidade para a insulina. Contudo, além da insulina, a IDE também metaboliza outros substratos, como vários fatores de crescimento, e possui outras funções, como a de proteína ligadora e a de proteína regulatória. A IDE se relaciona com várias funções celulares, como a diferenciação e crescimento celulares, e sua expressão é regulada de acordo com o período de desenvolvimento do animal. Também foi referido que a IDE facilita a união dos receptores de esteróides ao DNA nuclear. Por outro lado, sabe-se que o estradiol (E_2) estimula o crescimento do epitélio uterino. Para examinar se a IDE é regulada em relação a estímulo de crescimento celular, o presente estudo avaliou na fração citosólica de homogeneizados de útero de ratos, se a IDE é modificada em quantidade e atividade em diferentes “status” estrogênicos, ou seja, em situação de proliferação celular (proestro e castração + E_2) e apoptose (metaestro e castração). Os resultados mostraram que a quantidade e a atividade da IDE aumentam nos animais em fase de proestro ou nos castrados e tratados com E_2 e diminuem nos animais em fase de metaestro ou nos castrados. Foi encontrada correlação linear entre a degradação da insulina (atividade da IDE) e o peso relativo do útero, indicando ainda mais o envolvimento da IDE com o crescimento celular. Dessa forma, em condições de proliferação celular (induzida pelo estradiol) observamos aumento na quantidade e atividade da IDE e aumento do peso uterino. Esses dados sugerem que a IDE deve ser

considerada um requerimento importante para o crescimento do endométrio induzido pelo estradiol.

Palavras chave: estradiol, IDE, castração, útero, proliferação celular, apoptose.

ABSTRACT

The enzyme degrades in an intracellular protein that is characterized "in vitro" by its proteolytic activity with a high degree of insulin specificity. Nevertheless, besides the insulin, IDE also metabolizes other substrates such as various growth-promoting peptides and it has also other functions as a binding and regulatory protein. IDE is related to various other cellular functions such as cellular differentiation and growth and its expression is developmentally regulated in animals. It was also referred that IDE enhanced the binding of steroid receptor to DNA in the nuclear compartment. On the other hand, it is known that estradiol stimulates the growth of uterine epithelium. To examine if IDE is regulated regarding the stimulus of cellular growth, the present study evaluated in the cytosolic fraction of homogenized rat uterus, if IDE is modified in number and in activity at different estrogenic status, means, that during cellular proliferative conditions (proestrus and castration + E₂) and apoptosis (metestrus and castration). The results showed that the amount and IDE activity increase in animals in proestrus phase or in castrated and treated with E₂ and a decrease in metestrus phase or in the castrated one. It was found a linear correlation between insulin degradation (IDE activity) and the relative weight of uterus, emphasizing IDE's involvement with cellular growth. Thus, in terms of cellular proliferation (induced by estradiol) we observed an increase in the amount and IDE activity and an increase in uterus weight too. These data suggest that IDE should be considered an important requirement for endometrial growth induced by estradiol.

Key words: estradiol, IDE, castration, uterus, cellular proliferation, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de tradução do sinal da interação insulina/receptor de insulina.....	20
Figura 2	Diferentes etapas do processamento da insulina a nível celular.....	21
Figura 3	Esquema de transferência do gel de eletroforese para um sistema de sanduíches.....	36
Figura 4	Influência do estado estrogênico sobre o peso uterino úmido de ratas adultas.....	39
Figura 5	Influência do estado estrogênico sobre a variação do ganho de peso corporal de ratas adultas.....	40
Figura 6	Influência do estado estrogênico sobre a relação peso uterino(mg)/peso corporal (g) de ratas adultas.....	41
Figura 7	Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos C1 (controle em proestro) e C2 (controle em metaestro).....	43
Figura 8	Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em 400 µg de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos C1 (controle em proestro) e C2 (controle em metaestro).....	44
Figura 9	Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos castrado com e sem tratamento com estradiol (2 µg/100 g peso corporal).....	45

Figura 10	Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em 400 µg de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos cast (castrado) e cast + E2 (castrado + benzoato de estradiol; 2 µg/100 g peso corporal).....	46
Figura 11	Correlação linear entre a degradação de insulina (em 400 µg de proteínas citosólicas) e a relação do peso uterino/peso corporal em cada grupo experimental (C1, C2, Cast e Cast + E2).....	47
Figura 12	Análise do "immunoblotting" da IDE na fração citosólica de útero de ratas em diferentes estados estrogênicos.....	48
Figura 13	Quantificação da IDE por densitometria em diferentes estados estrogênicos	49
Figura 14	Correlação linear entre a ¹²⁵ I-insulina degradada e a densidade óptica (densitometria do "immunoblotting").....	50
Figura 15	Mecanismo da proliferação epitelial uterina induzida pelo estradiol.....	54
Figura 16	Modelo proposto para os efeitos do estradiol no balanço da proliferação celular/apoptose, que resulta em hiperplasia uterina e aumento da quantidade da IDE.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP: Peptídio natriurético atrial

APS: Persulfato de amônia

AR: Receptor de androgênio

CA: Câncer

CK-2: Caseína quinase 2

CK-II: Caseína quinase II

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FGF: Fator de crescimento dos fibroblastos

Glut-4: Transportador sensível à glicose

GRB2: Proteína-2 ligada ao receptor do fator de crescimento

GR: Receptor de glicocorticóide

HRE: Elementos responsivos aos hormônios

Hsp: Heat shock protein (proteína de choque térmico)

IDE: Enzima que degrada a insulina

IGF-I: Fator de crescimento-I semelhante à insulina

IGF-II: Fator de crescimento-II semelhante à insulina

IGFBPs: Proteínas de ligação para os fatores de crescimento

IGF-IR: Receptor para o fator de crescimento –I semelhante a insulina

¹²⁵I-insulina: Insulina marcada com iodo radioativo

IRS: Substrato do receptor de insulina

KGF: Fator de crescimento dos keratinócitos

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

NC: Nitrocelulose

PI3-K: Quinase do trifosfato de inositol

PKA: Proteína quinase dependente de AMPc

PKC: Proteína quinase C

RAF: Fator acessório para receptor

RE ou ER: Receptor estrogênico

SHBG: Proteína de ligação dos hormônios sexuais

SOS: Son-of-sevenless

TFIIB: Fator de transcrição IIB

TGF- α : Fator de crescimento transformante α

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Ação da Insulina.....	17
2.2 A IDE e a ação intracelular da insulina.....	19
2.3 A IDE como a principal protease responsável pela metabolização da insulina.....	23
2.4 Papel regulatório da IDE e seu envolvimento no crescimento e diferenciação celulares.....	24
2.5 Papel regulatório da IDE e sua interação com receptores esteróides.....	25
2.6 Fatores extrínsecos e intrínsecos na regulação do crescimento do endométrio uterino. Proliferação e apoptose no útero como modelo experimental.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Reagentes químicos e drogas utilizadas.....	28
4.3 Grupos experimentais.....	30
a) Grupo Controle.....	31
b) Grupo Castrado.....	31

c) Grupo castrado e tratado com benzoato de estradiol.....	31
4.4 Preparação da fração citosólica.....	34
4.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, sistema de tampão Laemmli).....	35
4.6 Transferência das proteínas do gel para uma matriz de nitrocelulose, imunodeteção (“immunoblotting”) e quantificação da IDE.....	35
4.7 Preparação da ¹²⁵ I-insulina monoiodada.....	37
4.8 Degradação da ¹²⁵ I-insulina.....	38
4.9 Determinação da concentração total de proteínas – método de Bradford.....	38
4.10 Tratamento Estatístico.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Influência do estado estrogênico sobre o peso uterino.....	39
5.2 Influência do estado estrogênico sobre a variação do ganho de peso corporal.....	40
5.3 Influência do estado estrogênico sobre a relação peso uterino/peso corporal.....	41
5.4 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ¹²⁵ I-insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero – animais de controle.....	42
5.5 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ¹²⁵ I-insulina em 400µg de proteínas da fração citosólica de útero – animais de controle.....	43
5.6 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ¹²⁵ I-insulina em diferentes concentrações de proteínas na fração citosólica de útero – animais castrados e castrados + E ₂	44

5.7	Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ¹²⁵ I-insulina em 400µg de proteínas da fração citosólica de útero – animais castrados e castrados + E ₂	45
5.8	Correlação linear entre a degradação de ¹²⁵ I-insulina e a relação do peso uterino/peso corporal.....	46
5.9	Análise do “immunoblotting” da IDE na fração citosólica de útero de ratas em diferentes estados estrogênicos.....	47
5.10	Quantificação da IDE por densitometria em diferentes estados estrogênicos....	48
5.11	Correlação linear entre a degradação da ¹²⁵ I-insulina e a densidade óptica da IDE.....	49
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÕES.....	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Numerosas evidências indicam que a enzima que degrada a insulina (IDE) é a protease que inicia e controla a degradação da insulina (Bennett e col., 1994; Duckworth e col., 1998; Duckworth e col., 1997; Duckworth e col., 1991; Kuo e col., 1991; Camberos e col., 2001; Kayalar e col., 1989; Saltiel, 2000; Shii e col., 1986; Udrisar e col., 1992). Contudo, além da função proteásica, a IDE apresenta múltiplas funções celulares como a de proteína ligadora e proteína regulatória (Goldfine, 1987; Exton, 1991; Hari e col., 1987; Kahn e col., 1995; Kuo e col., 1993; Kupfer e col., 1993; Kupfer e col., 1994; Rivett, 1993; Udrisar e col., 1990 e Camberos e col., 2001). Como proteína regulatória a IDE foi pouco explorada. Existem evidências de que desempenhe papel importante no desenvolvimento e diferenciação celulares. (Kayalar e col., 1990; Kayalar e col., 1989; Plas, 1982; Stopelli e col., 1988; Adesanya e col., 1996; Miller, 1988 e Wilden e col., 1990). Além de insulina e glucagon, a IDE metaboliza vários fatores de crescimento, o peptídeo natriurético atrial e o peptídeo β -amilóide (Petanceska e col., 2000; Kurochkin, 2001; Perez e col., 2000; Polonsky e col., 1995; Bondy e col., 1994; Duckworth e col., 1998; Duckworth e col., 1997; Kuo e col., 1993). Sendo uma protease capaz de unir e remover a insulina e fatores de crescimento, a IDE e os mecanismos que regulam a sua atividade podem desempenhar um papel importante nos processos de expressão gênica e crescimento celular. Também foi demonstrado que a IDE interage diretamente com receptores de esteróides e aumenta a ligação desses receptores ao DNA (Kupfer e col., 1993; Kupfer e col., 1994). O “cross-talk” entre vias de tradução do sinal está sendo considerado como um modelo comum em estudos de desenvolvimento celular e homeostasia (Porto e col., 2002; Shii e col.,

1986; Richards e col.,1996; Quarmby e col., 1984 e Plas, 1982). A interação dos receptores de esteróides com a IDE pode ter conseqüências importantes para a tradução do sinal mediado pela insulina e pelos esteróides. Essa relação pode ser importante para vários fenômenos biológicos, tais como resistência à insulina, metabolismo dos receptores de esteróides e especificidade da ação dos hormônios esteróides e suas possíveis implicações no desenvolvimento de neoplasias uterina e mamária e na enfermidade de Alzheimer. Para verificar se a IDE é regulada em relação a estímulos de crescimento celular, foi utilizado no presente estudo a regulação estrogênica do útero como modelo experimental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ação da Insulina

A insulina é o mais importante produto secretório das células beta pancreáticas, sendo a chave para as diversas vias de processos metabólicos; é o principal responsável pela estocagem e utilização de glicose e de muitos outros nutrientes; além de exercer efeitos regulatórios e de crescimento em quase todas as células do corpo. Este hormônio age tanto ativando sistemas de transporte e enzimáticos envolvidos na utilização e estocagem de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, quanto inibindo a gliconeogênese, glicogenólise, lipólise e proteólise (Polosny e col., 1995; Kahn e col., 1995; Pessin e col., 2000; Saltiel, 2000). Cineticamente, os efeitos da insulina a nível celular podem ser classificados como imediato, intermediário e em longo prazo. São efeitos imediatos: recrutamento de proteínas transmembranas para o transporte de glicose e modificação covalente por fosforilação ou desfosforilação de enzimas preexistentes (piruvato desidrogenase, acetil-CoA, carboxilase, triacilglicerolipase, fosforilasequinase, glicogêniosintetase e fosforilase) (Kahn e col., 1995; Blenis, 1991; Duckworth e col., 1997). Dentre os efeitos intermediários citamos: a estimulação e inibição da transcrição de genes específicos e sínteses de novo de proteínas (Kahn e col., 1995; Granner e col., 1992; Duckworth e col., 1997; O'Brien e col., 1991) enquanto que os efeitos em longo prazo compreendem: a síntese de DNA, proliferação e diferenciação celular; sendo que estes últimos efeitos estão na dependência dos efeitos imediatos e intermediários bem como de mudanças

coordenadas pela expressão de muitos genes celulares (Kahn e col., 1995; Duckworth e col., 1997; O'Brien e col., 1991).

O conceito mais aceito para o mecanismo de ação da insulina é que a ligação da insulina ao seu receptor ativa a tirosina quinase do receptor, resultando em uma cascata de fosforilação/defosforilação (Figura 1). Dois alvos importantes para a fosforilação da tirosina são os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), proteínas que são fosforiladas após exposição das células à insulina (White e col., 1987). Vários e diferentes efeitos da insulina foram relacionados a fosforilação do IRS-1. Esse foi considerado o mecanismo de ação da insulina durante um certo tempo. O IRS-2 está agora sendo sugerido como um mecanismo de ação da insulina. Apesar de não haver controvérsia sobre a importância dos IRS-1 e IRS-2 na ação da insulina, outros mecanismos de tradução do sinal podem estar envolvidos na ação da insulina, como o da ação intracelular da insulina e/ou do seu processamento (Duckworth e col., 1997; Udrisar e col., 1984). O conceito de que as várias ações da insulina requerem múltiplas vias de sinalização está sendo mais aceito. Estudos com receptores que sofreram mutação mostraram que diversas ações da insulina podem ser afetadas diferentemente pelas modificações estruturais no receptor (Wilden e col., 1990). Esses e outros estudos indicam que a multiplicidade de sinais da insulina originam-se, pelo menos em parte, ao nível do receptor. Embora a ativação da tirosina quinase seja um aspecto fundamental na ação da insulina, receptores sem atividade de tirosina quinase também podem gerar efeitos da insulina (Goldfine, 1987) e processos de fosforilação/defosforilação não estão envolvidos em todos os aspectos da ação da insulina. O desejo de uma explicação simplista para a ação da insulina, contudo, tem

retardado a aceitação de muitos desses processos. A ligação entre o receptor de insulina e a cascata de fosforilação/defosforilação não é um processo simples. A ativação do complexo ras pela insulina está envolvida na atividade mitogênica da insulina e de outros fatores de crescimento. Uma cascata de fosforilação do IRS-1, ligação do domínio SH2 e ativação do complexo ras é mostrada na Figura 1. Contudo, a ativação do complexo ras pela insulina pode ocorrer sem o envolvimento do IRS-1 (O'Brien e col., 1991), o que reflete não apenas múltiplas vias de sinalização para diferentes ações da insulina, mas também múltiplos processos de sinalização para a mesma ação da insulina (redundância da ação hormonal). Esse conceito explica muito das aparentes discrepâncias em vários estudos sobre a ação da insulina.

O conceito de “cross talk” também deve ser considerado. Esse termo descreve os efeitos de diferentes hormônios sobre o mesmo sistema intracelular, resultando em aumento ou modificação de um sistema por diferentes hormônios. Ele também pode ser usado para descrever múltiplos efeitos de um único hormônio sobre um processo intracelular. Exemplos de “cross talk” é o efeito da insulina sobre o sistema do cálcio-calmodulina (Pershad Singh e col., 1987; Solomon e col., 1994).

2.2 A IDE e a ação intracelular da insulina

A metabolização da insulina auxilia no controle das respostas celulares à insulina, diminuindo a sua biodisponibilidade, mas a sua metabolização também.

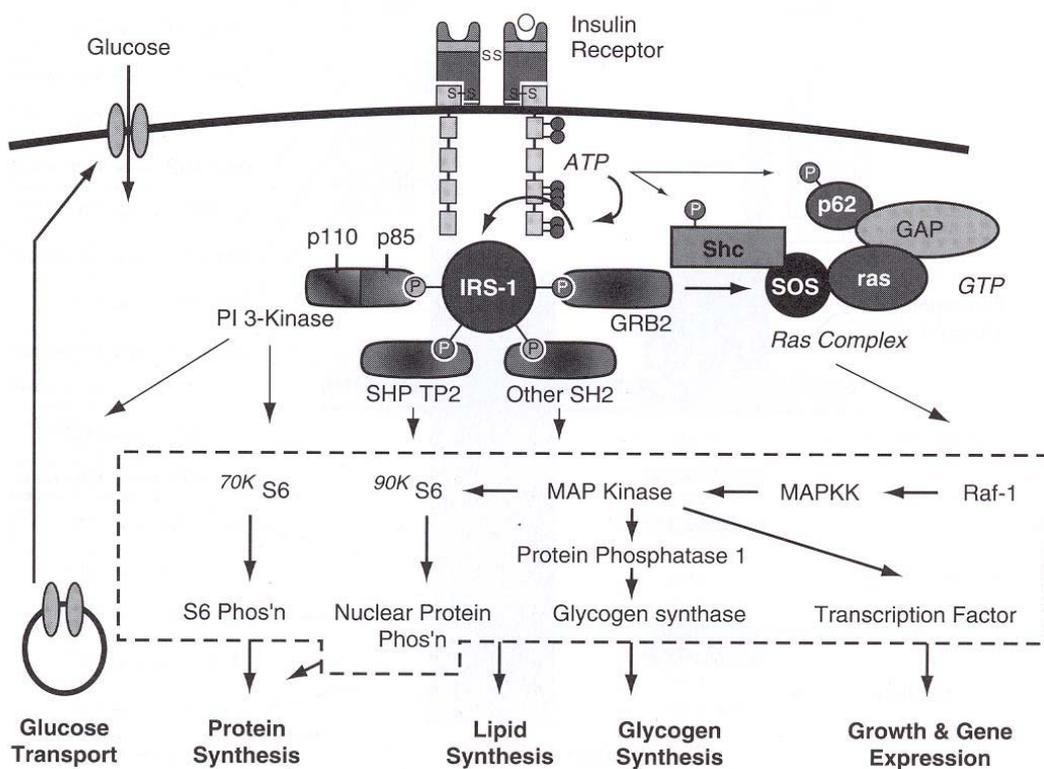


Figura 1. Mecanismo de tradução do sinal da interação insulina/receptor de insulina. O substrato para a fosforilação inicial é o IRS-1. Retirado de Kahn C. R. Banting Lecture: Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43:1066-1084, 1994.

Está possivelmente implicada na mediação de alguns aspectos da atividade hormonal desse hormônio. A interação da insulina com suas células alvo envolve os seguintes passos: 1) ligação a receptores específicos como passo necessário à ação e à metabolização da insulina nas células alvo; 2) internalização do complexo insulina-receptor com formação do endossoma; 3) transporte e processamento do complexo insulina-receptor; 4) deslocamento da insulina no citosol; 5) metabolização da insulina pela IDE; 6) liberação pela célula dos produtos de metabolização da insulina (Figura 2).

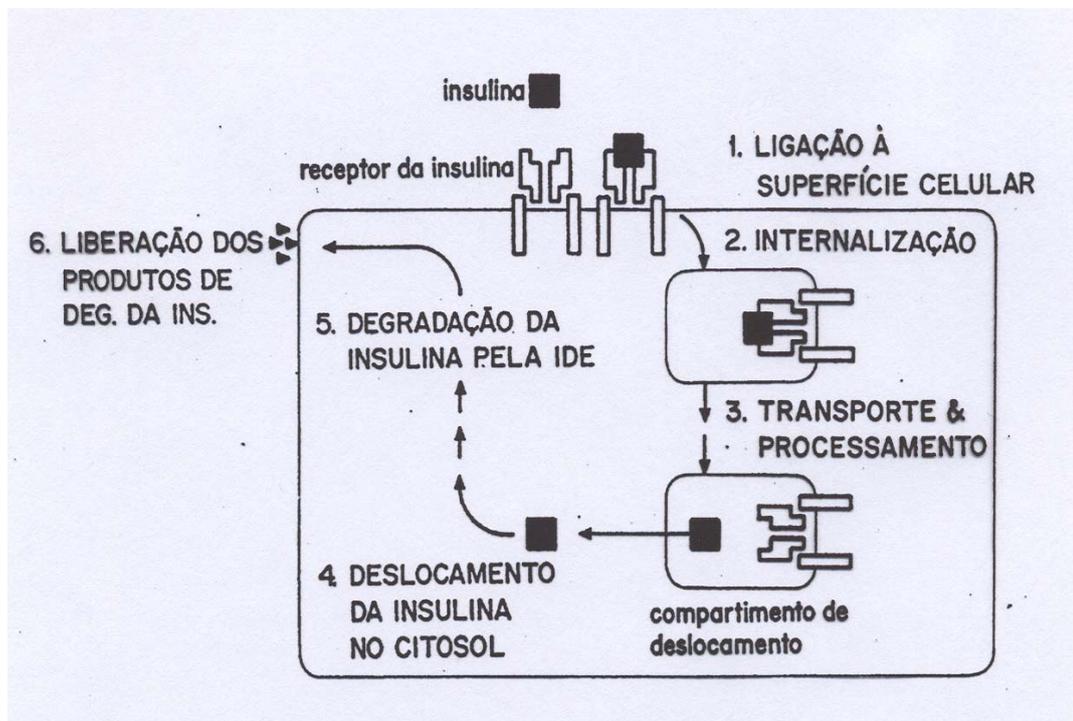


Figura 2. Diferentes etapas do processamento da insulina a nível celular. Retirado de Daniel P. Udrisar e cols. Bating Lecture: Insulin processing. Its correlation with glucose conversion to CO_2 . Acta physiol.

Pharmacol latinoam. 34: 427 – 440, 1984.

Nesse processamento intracelular a insulina tem a possibilidade de associar-se a organelas intracelulares como os elementos de Golgi, de mobilizar-se para o núcleo ou para um compartimento de metabolização, ou de ser reciclada para a membrana. Alguns desses efeitos estão correlacionados com alguns efeitos da insulina (Exton, 1991; Plas, 1982; Udrisar e col., 1984; Goldfine, 1987). A hiperinsulinemia (provocada de forma exógena) está correlacionada com o aumento do processamento celular da insulina (ligação com os receptores, internalização e aumento da metabolização do hormônio) e com o aumento na resposta celular à insulina (conversão

de glicose à CO₂) (Udrisar e col., 1984). As interações intracelulares da insulina com a IDE estão também envolvidas no controle da ação da insulina sobre a metabolização das proteínas e da oxidação das gorduras (Duckworth e col., 1998).

Embora seja inquestionável a importância da metabolização da insulina mediada por receptor, a associação da ligação da insulina ao seu receptor e sua ação, com a internalização da insulina e sua metabolização levantou a questão do papel da internalização e metabolização na ação da insulina. A visão mais simples é a de que a internalização e metabolização são importantes na finalização da ação da insulina. Apesar da finalização do efeito ser um aspecto importante num sistema que deve responder a rápidas variações nos níveis hormonais, o possível papel da insulina intracelular e seu metabolismo na geração de alguns dos efeitos da insulina foi sugerido por muitos pesquisadores (Steiner, 1977; Draznin e col., 1982; Udrisar e col., 1984). Por exemplo, foi demonstrado que um inibidor da metabolização da insulina, a dansilcadaverina, bloqueia o efeito inibitório da insulina sobre a degradação protéica intracelular, mas não o efeito estimulatório da insulina sobre a síntese de glicogênio (Draznin e col., 1982). Com uma abordagem diferente, Miller (1988) mostrou que os efeitos da insulina podem ser produzidos pela injeção intracelular de insulina em oócitos. Outros estudos mostraram que a insulina internalizada pode ser encontrada no citoplasma e no núcleo (Smith e col., 1990), além do endossoma e lisossoma e que a insulina adicionada a núcleos isolados tem efeito sobre a função nuclear.

2.3 A IDE como a principal protease responsável pela metabolização da insulina

A maioria dos estudos indicam que a IDE é o mecanismo enzimático primário para iniciar o processamento e metabolização da insulina. A IDE é uma enzima que apesar de estar funcionalmente ligada a metabolização da insulina nos endossomos e na membrana celular, é encontrada principalmente no citoplasma. A insulina internalizada interage com a IDE (Hari e col., 1987) e anticorpos monoclonais antiIDE microinjetados nas células inibem a metabolização celular da insulina (Shii e col., 1986). A hiperexpressão da IDE aumenta a taxa de metabolização da insulina pelas células (Kuo e col., 1991). Todos esses dados indicam que a IDE é a principal protease para a metabolização celular da insulina, embora não possamos descartar outros processos na degradação da insulina. A atividade proteolítica da IDE deve-se à presença de zinco em sua estrutura; seu peso molecular é de cerca de 110 kDa; outros cátions divalentes podem ativá-la, como exemplo o cálcio. O aumento de cálcio no tecido promove aumento na degradação de insulina (Duckworth e col., 1998; Kuo e col., 1993).

Embora a insulina possua a mais alta afinidade pela IDE, outros substratos podem ser degradados pela IDE. Eles incluem glucagon, fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II), fator natriurético atrial (ANP), fator de crescimento transformante α (TGF α), proinsulina, fator de crescimento epidérmico (EGF), β -amilóide, β -endorfina e hemoglobina oxidada (Duckworth e col., 1998; Kurochkin, 2001 e Kuo e col., 1993).

2.4 Papel regulatório da IDE e seu envolvimento no crescimento e diferenciação celulares

A metabolização da insulina não é a única função celular da IDE, pois tanto os tecidos sensíveis à insulina quanto os não sensíveis possuem IDE, sugerindo um papel multifuncional para essa proteína. A distribuição da IDE foi caracterizada em vários tecidos no rato, sendo a seguinte sua distribuição relativa: altos níveis no testículo, língua, cérebro e tecido adiposo marrom; níveis moderados nos rins, próstata, coração, músculo, fígado, intestino e pele; e baixos níveis no baço, pulmões, timo e útero (Kuo e col., 1993; Bondy e col., 1994). Adicionalmente, há evidências de que os níveis de RNAm da IDE variam com a fase de desenvolvimento (da embrionária a fase adulta) em que se encontra a *Drosophila* (Stoppelli e col., 1988). A IDE também se relaciona com várias funções celulares, como a diferenciação do músculo e outros tecidos (Kayalar e col., 1990). Em geral, há uma significativa relação entre a expressão gênica da IDE e os receptores de insulina e de IGFs. Como a IDE degrada tanto insulina quanto IGF-II, esses dados sugerem um papel para a IDE tanto na metabolização quanto na ação de ambos hormônios (Bondy e col., 1994). A insulina e os IGFs ligam-se aos receptores de membrana e deflagram uma variedade de efeitos biológicos que levam ao crescimento e diferenciação (Cross e col., 1991). Regulando a remoção desses hormônios, a IDE está potencialmente influenciando o processo de crescimento celular e desenvolvimento.

2.5 Papel regulatório da IDE e sua interação com receptores esteróides

Outra propriedade regulatória (não metabólica) da IDE é a de associar-se e os receptores citosólicos de glicocorticóides e andrógenos, aumentando a ligação dos mesmos ao DNA e, subseqüentemente, sua atividade (Kupfer e col., 1994) (Kupfer e col., 1993; Kupfer e col., 1994). A IDE citoplasmática também forma um complexo com o proteossoma (proteínase multicatalítica) e regula sua atividade (Bennett e col., 1994), a qual é importante para a degradação intracelular de proteínas (Rivett, 1993). A insulina antagoniza a ação dos hormônios esteróides do mesmo modo que antagoniza a metabolização de proteína celular, abrindo a possibilidade de que uma interação citosólica direta da insulina internalizada com a IDE pode estar envolvida nestes efeitos celulares.

2.6 Fatores extrínsecos e intrínsecos na regulação do crescimento do endométrio uterino. Proliferação e apoptose no útero como modelo experimental

Existem vários mecanismos de sinalização relativamente bem caracterizados que contribuem para o crescimento do endométrio. Moléculas sinalizadoras sintetizadas dentro do útero atuam dentro e fora das células através de mecanismos parácrinos, autócrinos e intrácrinos, tais como EGF, IGF-1, TGF α , fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de crescimento hepático e dos queratinócitos (Murphy e col., 1990). Os fatores extrínsecos que influenciam o crescimento uterino incluem estrógenos e progesterona. O útero de roedores, tanto imaturos como adultos, é muito

utilizado como modelo experimental para a avaliação da ação dos hormônios esteróides. A parede do útero é constituída por três túnicas, que de fora para dentro são: o endométrio (mucosa), o miométrio (músculo liso) e a serosa (tecido conjuntivo). O endométrio é formado por epitélio colunar simples que repousa em uma lâmina própria de tecido conjuntivo; do epitélio de superfície aprofundam-se glândulas uterinas por toda a espessura do endométrio, as quais estão separadas pelo tecido conectivo do estroma; o endométrio pode ser dividido em uma parte superficial espessa, que sofre mudanças funcionais e estruturais durante o ciclo menstrual/estral e em uma parte basal, que se altera pouco durante o ciclo menstrual/estral e que é responsável pela reconstituição da camada superficial (Junqueira e col., 1999). Existem diferenças importantes entre as respostas celulares do útero em ambos períodos de vida. Por exemplo, no rato imaturo, doses altas de estrógeno estimulam a divisão celular em todos os tecidos componentes do útero: endométrio (epitélios luminal e glandular e estroma) e miométrio (Kaye e col., 1971; Kirkland e col., 1979). Já no rato adulto ovariectomizado a resposta proliferativa ao estradiol só ocorre nas células epiteliais glandulares e luminares (Martin e col., 1973; Quarmby e col., 1984; Clark, 1971; Tachi e col., 1972.). Durante o ciclo estral em ratos, as células epiteliais glandulares e luminares apresentam um padrão cíclico de proliferação e regressão (Bertalanffy e col., 1963), refletindo o efeito dos hormônios esteróides, estrógeno e progesterona. Esses períodos de crescimento e regressão endometrial são sincronizados com a função ovariana através de modificações nos níveis circulantes e/ou locais de estrógenos e progesterona. Para a maioria das espécies de mamíferos, os mecanismos responsáveis por esses efeitos dos esteróides sobre o endométrio não estão completamente esclarecidos. O estradiol produz seus efeitos através dos receptores de estrógenos

(RE). Estes receptores são expressos nas células epiteliais e estromais do rato imaturo e adulto (Bigby e col., 1990). A estimulação estrogênica da mitogênese epitelial uterina pode ser mediada por fatores de crescimento, os quais seriam produzidos no estroma uterino por ação dos estrógenos e atuariam sobre o epitélio uterino para estimular a mitogênese (Cooke e col., 1997).

3 OBJETIVOS

Avaliar na fração citosólica de homogeneizados de úteros de ratos, se a enzima que degrada a insulina (IDE) é modificada em quantidade e atividade, em situações de proliferação celular (proestro, castração mais estradiol) e apoptose (metaestro, castração).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos machos Wistar (*ratu norvegicos albinus*) adultos pesando entre 225 e 269g foram utilizados nos experimentos. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, recebendo alimentação (ração purina para ratos) e água filtrada *ad libitum*. Os animais

foram mantidos em sala com a ventilação e iluminação naturais (aproximadamente 12 horas de claro e 12 horas de escuro) e temperatura que variava entre 25 e 29°C durante todo o ano.

4.2 Reagentes químicos e drogas utilizadas

- Hormônio para tratamento dos animais:

Benzoato de estradiol (Sigma)

- Preparação das frações citosólicas:

EDTA (Vetec)

Sacarose (Reagen)

Tris[hidroximetil] aminometanohidrocloreto- HCl (Sigma)

Coquetel de inibidores de proteases (Sigma)

- Determinação fotolorimétrica:

Commassie Brilliant Blue G – (Sigma)

Albumina sérica bovina (BSA, fração V) Miles (Naperville, IL);

Etanol, Ácido fosfórico concentrado (Reagen)

- Eletroforese em gel de poliacrilamida:

Água Deionizada

Dodecilsulfato de sódio (SDS) (Sigma)

Acrilamida (Sigma)

N,N'- Metilenobisacrilamida (Bis acrilamida) (Sigma)

Persulfato de amônia (APS) (Sigma)

N, N, N', N', - Tetrametiletilenodiamina, (TEMED) (Sigma)

Tris[hidroximetil]aminometano (Tris base) (Sigma)

Glicina (Sigma)

Glicerol (Reagen)

2-mercaptoetanol (Sigma)

Azul de bromofenol (Sigma)

Ácido Clorídrico (HCl) (Reagen)

- “Immunoblotting” :

Tris (Sigma)

Glicina (Sigma)

Metanol

Tampão Tris– salina (TBS) (20 mM Tris-HCl, 0,9 g% NaCl, pH 8,0) (Sigma)

Anticorpo antiIDE: o peptídeo sintético YKEMLAVDAPRRHK (p15) correspondendo aos resíduos 940-953 da seqüência da IDE de rato mais uma cisteína adicionada ao N-terminal, foi preparada pelo Instituto de Química, Universidade de São Paulo. O peptídeo foi acoplado a uma proteína imunogênica utilizando um “kit” da Pirce (Rockford, IL, USA), misturado com o adjuvant de Freund's e injetado em coelhos, em nosso laboratório. Os animais foram injetados três vezes com o peptídeo antigênico em adjuvant de Freund's incompleto. O sangue foi coletado e o anticorpo foi testado para reatividade específica com o peptídeo marcado com ¹²⁵I pelo

método da cloramina-T. O anti-p15 foi purificado por cromatografia de afinidade usando coluna de peptídeo ligado a agarose (Sulfolink coupling gel, Pierce). Após eluição com 0,1 mol/L de glicina, pH 2,5, o eluato contendo o anticorpo anti-p15 foi dialisado e concentrado.

Albumina sérica bovina (BSA, fração V) Miles (Naperville,IL)

A-2306 – Monoclonal anti-rabbit Immunoglobulins, Alkaline Phosphatase Conjugate-clone RG-16- Sigma Immunochemicals

Substrato de fosfatase alcalina BCIP/NBT (Sigma)

-Atividade da IDE

Insulina de porco cristalina (Bio-Bras)

¹²⁵ Iodo (Amersham)

Sephadex G-50 (Pharmacia)

DEAE-Bio-Gel A Agarose

Ácido tricloroacético (TCA) (Vetec)

4.3 Grupos experimentais

Foram utilizados 19 ratos cujos pesos variaram entre 225 a 269 mg, fêmeas, adultos, divididos nos seguintes grupos experimentais:

a) Grupo Controle (C)

Este grupo foi dividido em dois subgrupos: C1 (ratos em proestro) e C2 (ratos em metaestro). Os animais deste grupo foram acompanhados para a observação do ciclo estral, objetivando identificar as fases onde há maior quantidade de estrogênio (proestro) e menor quantidade de estrogênio (metaestro); para tanto se utilizou a coleta da secreção vaginal. Em seguida as ratas foram imediatamente sacrificadas, retirados seus úteros e armazenados em nitrogênio líquido para posterior processamento.

b) Grupo Castrado

Os animais foram anestesiados com éter e castrados por via lombar 7 dias antes do experimento. No quarto dia após a castração os mesmos foram tratados com óleo de milho, por via subcutânea, durante três dias consecutivos.

c) Grupo castrado e tratado com benzoato de estradiol

O tratamento hormonal foi instituído 4 dias após a ovariectomia. O tratamento consistiu na injeção de 2 µg/100 g de peso corporal de benzoato de estradiol (E₂) (diluído em óleo de milho, 0,1 ml/100 g peso corporal), por dia, durante 3 dias consecutivos. Esse período de tratamento com estradiol é necessário para as análises de crescimento uterino (Clark e col., 1988). Vinte e quatro horas após a última injeção

de estradiol os animais foram sacrificados por decapitação e o útero foi removido, pesado e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido, para posterior homogeneização e determinação da atividade e quantidade da IDE.

Na realização da ovariectomia seguiu-se a etapa abaixo:

- Anestesia dos animais com éter e retirada dos pêlos do dorso (entre a borda inferior das costelas e a coxa) do animal. Em seguida realizou-se a assepsia do local com álcool iodado.

- Fixação do animal em decúbito ventral e incisão de aproximadamente 4 cm comprimento, com tesoura, na pele do dorso, na linha mediana. Em seguida, foi feita difusão da parede muscular (com 1,5 cm de extensão) entre a última costela e a coxa, distante 2 cm da linha mediana, até cair na cavidade abdominal. O ovário foi identificado logo abaixo envolto em uma massa de gordura. Após pinçamento do ovário foi realizada a ligadura abaixo da trompa uterina, e o ovário foi retirado após corte feito entre ele e a ligadura da trompa.

- Reintrodução do útero na cavidade abdominal e sutura da parede muscular e pele.

- Repetição das etapas para a retirada do segundo ovário (no lado oposto).

Para a análise da secreção vaginal foram realizadas as seguintes etapas:

- Preparação de um conta gotas de calibre adequado com um pequeno volume de soro fisiológico e introdução do soro (ponta do conta gotas cerca de 0,5 cm intravaginal) na vagina da rata (segura em decúbito dorsal) e, logo em seguida, aspiração do soro, colhendo assim o fluido vaginal.

- Exame ao microscópio óptico, com aumento médio, do material colhido e colocado em lâmina de vidro.

- A identificação da fase do ciclo na qual o animal encontrava-se é observada, de acordo com a seguinte caracterização: em proestro o esfregaço vaginal apresentava muitas células epiteliais, nucleadas, redondas ou fusiformes (rápido crescimento epitelial); em estro o esfregaço vaginal apresentava remanescentes de células epiteliais, células cornificadas grandes, achatadas e irregulares (máximo crescimento epitelial); em metaestro o esfregaço vaginal apresentava muitas células cornificadas e epiteliais com infiltração de leucócitos (descamação); em diestro o esfregaço vaginal apresentava poucas células epiteliais com poucos ou muitos leucócitos (poucas camadas de células epiteliais).

4.4 Preparação da fração citosólica

Nesses grupos experimentais foi estudada a quantidade da enzima que degrada a insulina e sua atividade na fração citosólica, através da determinação da imunoreatividade com anticorpos específicos e da precipitação com TCA, respectivamente. Os úteros (500 mg), foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados com tampão (25mM Tris-HCl, pH 7,4 , 0,25 M de sacarose, 2mM EDTA) com adição do coquetel de inibidores de proteases em um homogeneizador de 7ml de teflon-vidro (Kontes), em volume de 2ml por grama de útero. Após a homogeneização do tecido, os núcleos foram separados por centrifugação de 10 minutos a 800 x g; em seguida, o sobrenadante correspondente à fração pós-nuclear foi centrifugado a 100.000 x g durante 1 hora. O correspondente sobrenadante foi considerado fração citosólica. Em seguida, foi feita a purificação da fração citosólica por precipitação, através da adição de 0,21g de sulfato de amônio por ml da fração citosólica, deixando-o descansar por 45 minutos. Centrifugou-se e separou-se o precipitado do sobrenadante. Ao sobrenadante foi adicionado 0,21 g/ml de sulfato de amônio, produzindo-se assim uma concentração de 60%, com o objetivo de precipitar alguma proteína que não precipitou a 30%. Este material foi submetido novamente à centrifugação e separado da mesma forma como descrito acima. O segundo precipitado obtido representou a fração 30-60%. Em seguida, foi realizada a dessalinização em coluna de Dextran (Cross-linked Dextran), recolhendo-se então a amostra com as proteínas para a determinação da concentração de proteínas totais.

4.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, sistema de tampão Laemmli)

Foi utilizado o aparelho Mini-Protean II-Electrophoresis Gell, seguindo-se todas as instruções do seu manual. O gel escolhido empiricamente para a IDE (110kDa) foi de 10%T (%T= g acrilamida+ g bis-acrilamida/volume total x 100). A separação das proteínas citosólicas foi realizada de acordo com Laemmli, 1970.

4.6 Transferência das proteínas do gel para uma matriz de nitrocelulose, imunodeteção (“immunoblotting”) e quantificação da IDE

O “immunoblotting” combina a resolução da eletroforese com a especificidade das reações imunológicas, sendo por isso um importante meio de verificação da validade da separação. Este procedimento mostra se há a proteína de interesse, no caso a IDE, como mostra também se ela está imunologicamente ativa para o anticorpo com o qual está sendo testada (Gershoni e col., 1983). Neste procedimento realizamos a transferência do gel de eletroforese para um sistema de sanduíches conforme a Figura 3. As proteínas são absorvidas pelo papel de nitrocelulose que pode absorver anticorpo. Para a transferência utiliza-se o tampão de transferência (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3). A montagem foi feita conforme a figura 3 e posteriormente o sanduíche foi introduzido na cuba do aparelho contendo o tampão de transferência e deixado ligado durante toda à noite.

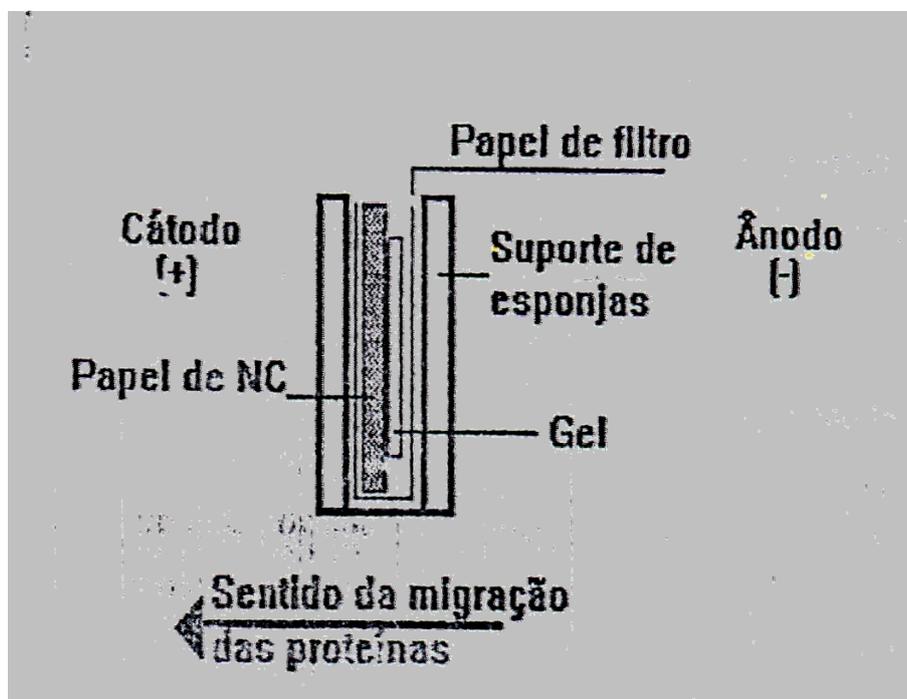


Fig 3. Esquema de transferência do gel de eletroforese para um sistema de sanduíches. Retirado de Gershoni J. M., Palade G. E. Principles and applications. Anal Biochem; 131: 1-15, 1983.

Após a noite de transferência, o papel de nitrocelulose (NC) foi cuidadosamente retirado e incubado com albumina (5%) por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. As proteínas foram absorvidas pelo papel de nitrocelulose e sobre este foram realizadas as incubações com os anticorpos. A IDE foi detectada pelo anticorpo específico antiIDE puro (obtido no Laboratório de Endocrinologia Molecular da UFPE) e revelada pelo uso de fosfatase alcalina acoplada ao segundo anticorpo. A incubação foi realizada durante 2-3 horas, à temperatura ambiente, com agitação constante e suave. Ao final de 3 horas retirou-se a solução do primeiro anticorpo e lavou-se 4 vezes o papel de nitrocelulose com tampão Tris-salina

(TBS) (20 mM Tris-HCl, 0,9 g% NaCl, pH 8,0). Cada lavagem permaneceu em agitação suave por 5 minutos. Após esta lavagem adicionou-se o segundo anticorpo (A-2306-Monoclonal Anti-rabbit Immunoglobulins, Alkaline Phosphatase Conjugate-clone RG-16-Sigma Immunochemicals), o qual reconhece somente o primeiro anticorpo. Em seguida, realizou-se uma lavagem semelhante à primeira e adicionou-se uma solução do substrato (YKEMLAVDAPRRHK (p15)), que reagiu com o segundo anticorpo e produziu uma coloração rosada, indicando a presença do segundo anticorpo.

As bandas de proteínas imunocoradas foram detectadas e quantificadas por meio de um densitômetro e os resultados foram expressos como porcentagem de aumento ou diminuição em relação ao grupo controle (para uma mesma quantidade de proteína separada por eletroforese - 30µg de proteína citosólica/linha) (Udrisar e col., 1990; Camberos e col., 2001).

4.7 Preparação da ¹²⁵I- insulina monoiodada

A insulina foi marcada pela técnica de cloramina T, com a relação iodo/insulina de 0,1/1. Para separar a insulina nativa da insulina marcada (obtenção da maior atividade específica) foi empregada uma cromatografia em DEAE-Bio-Gel A Agarose. A insulina assim obtida possui atividade biológica semelhante à insulina não iodada (Udrisar e col., 1992).

4.8 Degradação da ¹²⁵I-insulina

Em todos os experimentos a degradação de ¹²⁵I-insulina foi determinada por precipitação com 5% de TCA, considerando-se a radioatividade solúvel como material degradado (Udrisar e col., 1992; Camberos e col., 2001).

4.9 Determinação da concentração total de proteínas – método de Bradford

A determinação da concentração total de proteínas das frações citosólicas obtidas dos homogeneizados de úteros foi realizada por espectrofotometria, pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.10 Tratamento Estatístico

Os dados experimentais representam a média \pm o erro padrão da média (média \pm EPM) dos valores obtidos para cada grupo. A análise estatística dos dados e a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foram determinada pelo teste *t* de Student não pareado. Os valores de $P < 0,05$ (quando indicado) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Influência do estado estrogênico sobre o peso uterino

Como fato já bem estabelecido na literatura (Clark e col., 1988), o peso uterino úmido foi maior nos grupos Controle em proestro e Castrado + E₂, quando comparados com os grupos Controle em metaestro e Castrado, respectivamente (Figura 4). O peso seco foi proporcional ao peso úmido (dados não mostrados).

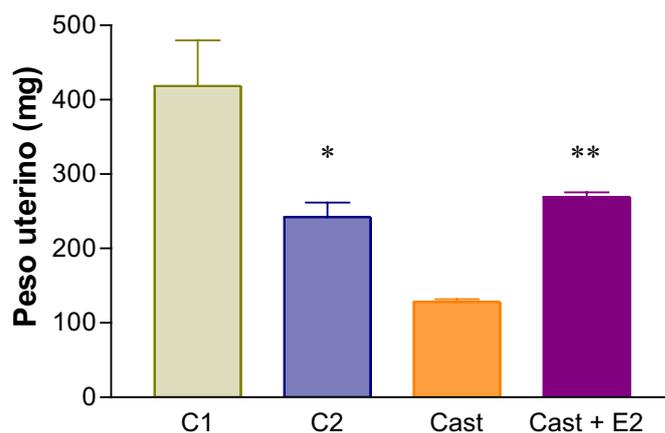


Figura 4. Influência do estado estrogênico sobre o peso uterino úmido de ratas adultas. C1 = controle em proestro; C2 = controle em metaestro; cast = Castrada; Cast + E₂ = castrada + benzoato de estradiol (2 µg/100 g peso corporal). Os dados representam a média de 4 animais por grupo ± EPM. * $p \leq 0,05$ versus C1; ** $p < 0,0001$ versus cast.

5.2 Influência do estado estrogênico sobre a variação do ganho de peso corporal

A medida da variação do ganho de peso corporal teve como finalidade descartar a influência do peso corporal sobre os valores do peso uterino obtidos nos diferentes estados estrogênicos. Essa medida foi realizada no período compreendido entre a castração e o término do tratamento com estradiol (7 dias). Os dados mostraram não haver diferença entre os grupos (Figura 5), indicando que as diferenças observadas no peso uterino são devidas à influência específica do estradiol sobre o aumento da proliferação celular/inibição da apoptose no útero.

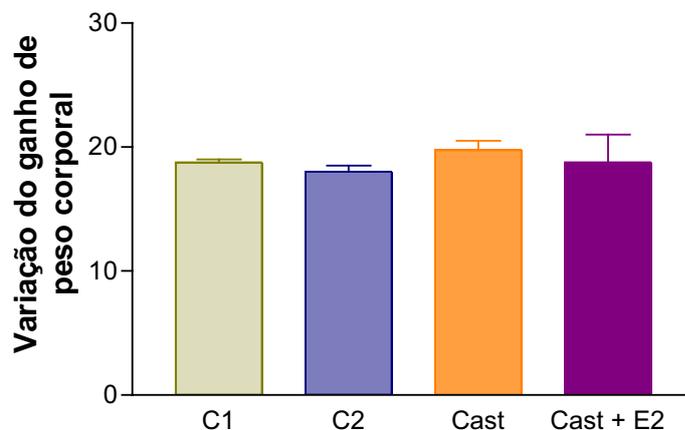


Figura 5. Influência do estado estrogênico sobre a variação do ganho de peso corporal de ratas adultas. Período compreendido: 7 dias (do dia da castração ao dia seguinte ao término do tratamento com estradiol). C1 = controle em proestro; C2 = controle em metaestro; Cast = castrada; Cast + E₂ = castrada + benzoato de estradiol (2 µg/100 g peso corporal). Os dados representam a média de 4 animais por grupo ± EPM.

5.3 Influência do estado estrogênico sobre a relação peso uterino/peso corporal

A relação peso uterino/peso corporal foi determinada para confirmar que as diferenças observadas no peso uterino são devidas à influência específica do estradiol sobre a proliferação celular uterina (Figura 6).

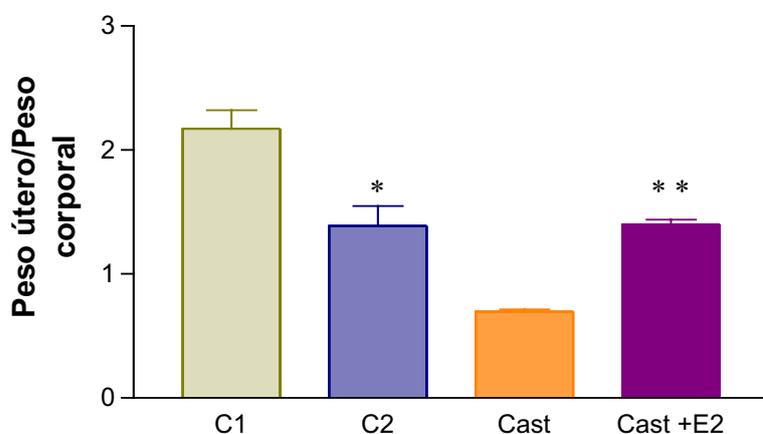


Figura 6. Influência do estado estrogênico sobre a relação peso uterino (mg)/peso corporal (g) de ratas adultas. C1 = controle em proestro; C2 = controle em metaestro; cast = castrada; cast + E2 = castrada + benzoato de estradiol (2 µg/100 g peso corporal).

Os dados representam a média de 4 animais por grupo ± EPM. * $p < 0,05$ versus C1;

** $p < 0,0001$ versus Cast.

5.4 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ^{125}I -insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero – animais controle

O sobrenadante (100.000 x g/60 min) do homogeneizado de úteros dos diferentes grupos experimentais foi considerado como fração citosólica e usada para estudar a atividade (determinada através da degradação da ^{125}I -insulina) e quantidade (determinada através de “immunoblotting”) da IDE.

Foram analisadas frações citosólicas com concentrações protéicas crescentes nos diferentes grupos. A Figura 7 mostra um crescimento linear da degradação da ^{125}I -insulina conforme a concentração de proteínas em ambos os grupos de animais. A maior atividade da IDE foi verificada no grupo experimental onde existe maior nível plasmático de estradiol e, conseqüentemente, maior proliferação celular (C1, proestro).

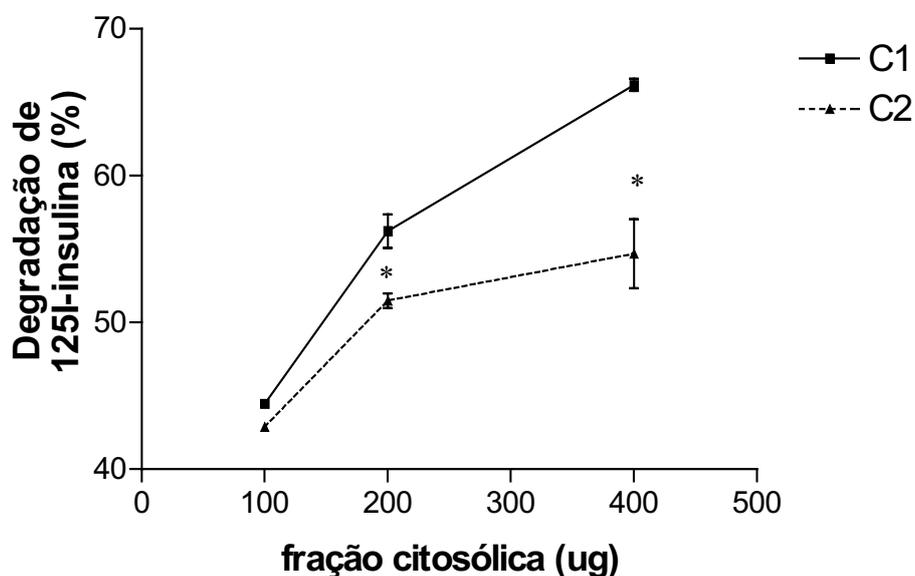


Figura 7. Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos C1 (controle em proestro) e C2 (controle em metaestro). Os dados representam a média \pm EPM de um experimento representativo, em triplicata. *

$p < 0,05$ versus C1 correspondente.

5.5 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ^{125}I -insulina em 400 μg de proteínas da fração citosólica de útero – animais controle

A Figura 8 mostra que na maior concentração de proteínas da fração citosólica (400 μg) o percentual de degradação da insulina foi 21% maior no grupo Controle em proestro (C1) em relação ao grupo Controle em metaestro (C2).

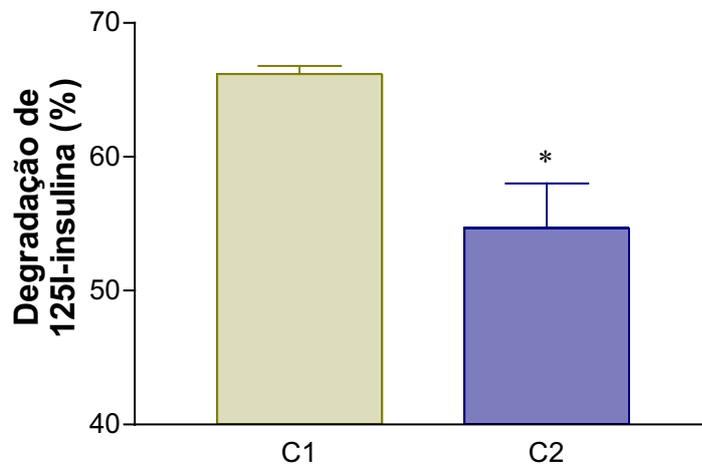


Figura 8. Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em 400 µg de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos C1 (controle em proestro) e C2 (controle em metaestro). Os dados representam a média ± EPM de um experimento representativo, em triplicata. * $p < 0,05$ versus C1. Dados derivados dos resultados mostrados na Fig. 7.

5.6 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ¹²⁵I-insulina em diferentes concentrações de proteínas na fração citosólica de útero – animais castrados e castrados + E₂.

Seguindo o mesmo protocolo da Figura 7, verificamos um crescimento linear da degradação da ¹²⁵I-insulina conforme a concentração de proteínas das frações citosólicas de ambos grupos experimentais. Novamente, pode-se observar que em situação de proliferação celular aumentada (castrado + E₂) corresponde uma maior degradação de ¹²⁵I-insulina para todas as quantidades de proteínas citosólicas estudadas (Figura 9).

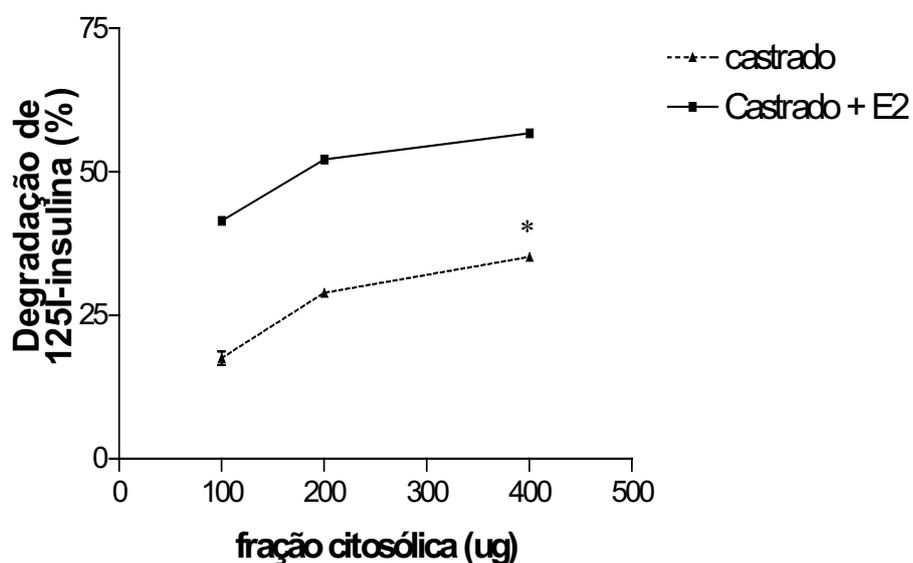


Figura 9. Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em diferentes concentrações de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos castrado com e sem tratamento com estradiol (2 $\mu\text{g}/100$ g peso corporal). Os dados representam a média \pm EPM de um experimento representativo, em triplicata. * $p < 0,05$ versus castrado + E_2 correspondente.

5.7 Influência do estado estrogênico sobre a degradação da ^{125}I -insulina em 400 μg de proteínas da fração citosólica de útero – animais castrados e castrados + E_2

A Figura 10 mostra que na maior concentração de proteínas da fração citosólica (400 μg) a degradação da ^{125}I -insulina foi 61 % maior no grupo Castrado + E_2 em relação ao grupo Castrado.

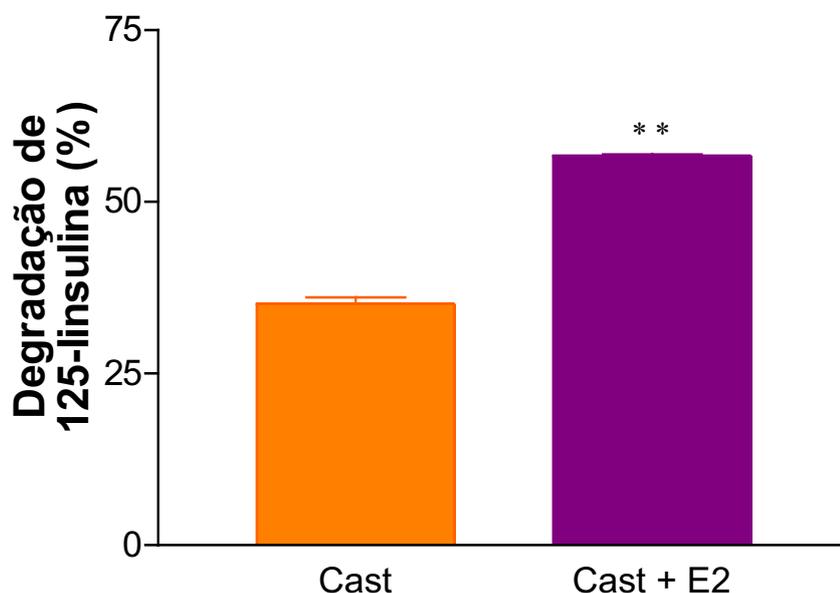


Figura 10. Influência do estado estrogênico sobre a degradação da insulina em 400 µg de proteínas da fração citosólica de útero, dos grupos cast (castrado) e cast + E₂ (castrado + benzoato de estradiol; 2 µg/100 g peso corporal). Os dados representam a média ± EPM de um experimento representativo, em triplicata. *p<0,05 *versus* castrado. Dados derivados dos resultados fornecidos na Fig. 9.

5.8 Correlação linear entre a degradação de ¹²⁵I-insulina e a relação do peso uterino/peso corporal.

Nesta análise foram utilizados os dados obtidos com a concentração de 400 µg de proteínas citosólicas de cada grupo experimental (Figs.8 e 10) e os dados da Fig. 6. Na Figura 11, constata-se que existe uma correlação linear (próxima a 1) entre a atividade da IDE e as correspondentes relações de peso uterino/peso corporal. O

coeficiente de correlação próximo a 1 ($r = 0,9185$) sugere que essa é a ordem da reação considerada.

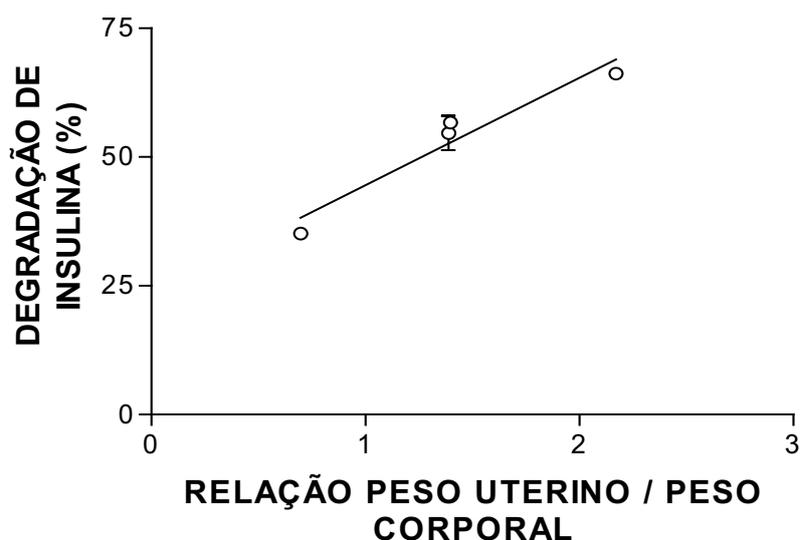


Figura 11. Correlação linear entre a degradação de insulina (em 400 μ g de proteínas citosólicas) e a relação do peso uterino/peso corporal em cada grupo experimental (C1, C2, Cast e Cast + E₂). ($r = 0,9185$).

5.9 Análise do "immunoblotting" da IDE na fração citosólica de útero de ratas em diferentes estados estrogênicos.

Para a imunodeteção da IDE em um suporte sólido (papel de nitrocelulose empregado na transferência de proteínas do gel de poliacrilamida, após a correspondente separação eletroforética das proteínas citosólicas dos diferentes grupos experimentais) foi utilizado o anticorpo anti-IDE obtido contra a região dos últimos 14 aminoácidos do terminal-carboxila da IDE. Conforme mostra a Figura 12, os

níveis de IDE variam de acordo com o estado estrogênico do animal, ou seja, estão diminuídos nos grupos onde o estradiol está baixo (C2 e Cast) e aumentados nos grupos onde o estradiol está alto (C1 e Cast + E₂).

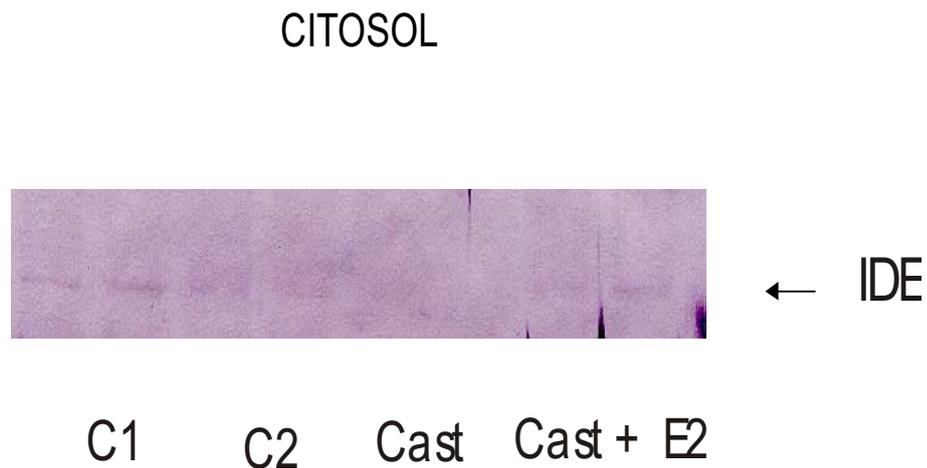


Figura 12. Análise do "immunoblotting" da IDE na fração citosólica de útero de ratas em diferentes estados estrogênicos. C2 = controle em metaestro; Cast = castrada; Cast + E₂ = castrada + benzoato de estradiol (2 µg/100 g peso corporal).

5.10 Quantificação da IDE por densitometria em diferentes estados estrogênicos

A quantidade da IDE foi avaliada por densitometria do "immunoblotting" da Figura 12. Os resultados obtidos (expressos em densidade óptica, DO) foram: C1: $93,0 \pm 10,5$ (n:5) DO, C2: $57,8 \pm 1,1$ (n:4) DO, Cast.: $10,3 \pm 1,3$ (n:4) DO e Cast + E₂: $66,5 \pm 5,8$ (n:6) DO, (Fig.13).

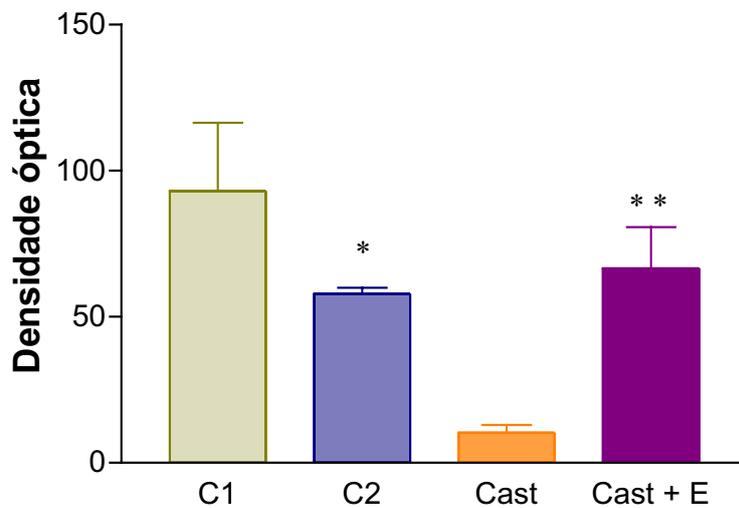


Figura 13. Quantificação da IDE por densitometria em diferentes estados estrogênicos. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). * $p < 0,01$ versus C1; ** $p < 0,0001$ versus Cast.

5.11 Correlação linear entre a degradação da ^{125}I -insulina e a densidade óptica da IDE

A comparação entre as atividades da IDE (degradação da ^{125}I -insulina) e as quantidades da IDE (“immunoblotting”) estudadas, também se correlacionaram linearmente (coeficiente de correlação próximo a 1, r^2 : 0,9962) (Fig.14). Esses resultados sugerem que a atividade da IDE é dependente de sua quantidade e que ambos parâmetros estudados dependem dos diferentes estados estrogênicos (aumento em situação de proliferação celular e diminuição em situação de apoptose).

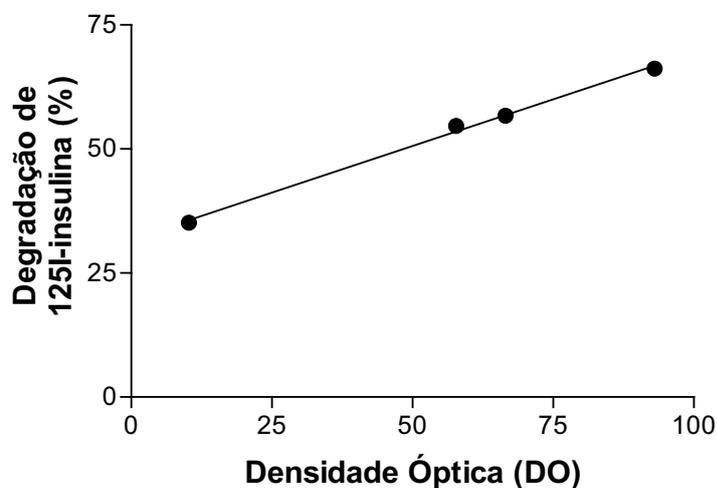


Figura 14. Correlação linear entre a degradação da ¹²⁵I-insulina e a densidade óptica da IDE (densitometria do “immunoblotting”). Dados derivados dos resultados mostrados nas figuras 8, 10 e 13)

Assim, situações de apoptose e proliferação celular podem regular a atividade/quantidade da IDE e o estradiol pode ser um fator importante na expressão gênica da IDE e sua regulação no útero.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que: 1) a quantidade e atividade da IDE aumentam na fração citosólica de homogeneizado de útero de ratas intactas na fase de proestro ou de ratas castradas e tratadas com benzoato de estradiol e 2) a quantidade e atividade da IDE diminuem em útero de ratas intactas na fase de metaestro ou de ratas castradas. No primeiro caso, a situação experimental é de proliferação celular – o endométrio prolifera em resposta ao estradiol exógeno ou em resposta ao aumento cíclico do estradiol endógeno. O estradiol é necessário para a morfogênese, citodiferenciação e atividade secretória do epitélio uterino. Durante o ciclo estral, o padrão de variação na proliferação celular, crescimento vascular e fluxo sanguíneo que ocorre no endométrio, reflete as variações nos níveis circulantes de estradiol e progesterona (Johnson e col., 1997). O nível de estradiol alcança o máximo durante o proestro e cai a níveis basais entre o estro e o metaestro (Butcher e col., 1974). O segundo caso, o do animal intacto em fase de metaestro ou do animal castrado, constitui a segunda situação experimental, de apoptose uterina, na qual há atrofia desse órgão devido à diminuição do estradiol circulante. Os resultados de aumento na atividade (aumento na degradação da insulina) e na quantidade da IDE no útero de ratas em proestro (estimulado com estradiol) e de diminuição desses parâmetros no útero de ratas em metaestro e, portanto, em ausência do estímulo com estradiol, evidenciam a importância fisiológica da IDE no processo de crescimento uterino durante o ciclo estral das ratas. O envolvimento da IDE com o crescimento celular foi ainda mais evidenciado, no presente estudo, ao se encontrar uma correlação linear entre a degradação da insulina e o peso relativo do útero.

Várias evidências sugerem que enzimas, como a IDE, que metabolizam fatores de crescimento, podem estar envolvidas na regulação do crescimento e desenvolvimento. Stopelli e col. (1988) mostraram que a expressão da IDE é regulada durante o desenvolvimento, na *Drosophila*. Couch e col. (1983) demonstraram que inibidores da atividade de metaloprotease endógena bloqueiam a fusão de mioblastos oriundos de músculo esquelético de ratos. Posteriormente, Kayalar e col. (1989) mostraram uma correlação entre inibição da IDE e inibição da diferenciação morfológica e bioquímica no mesmo tipo de célula (mioblastos) e sugeriram que a degradação da insulina pela IDE é necessária para a diferenciação da célula muscular. Resultados prévios deste laboratório (Porto e col., 2002; Barbosa e col., 2003) mostraram que a atividade e a quantidade da IDE aumentam em próstata de ratos castrados e tratados com testosterona ou de ratos intactos tratados com dexametasona – condições de proliferação – e diminuem na próstata de ratos castrados – condição de apoptose.

Uma das principais ações dos estrógenos em tecido alvo é a estimulação da proliferação celular. As ações do estradiol na proliferação celular uterina são mediadas através da sua ligação específica aos receptores nucleares estrogênicos, os quais são expressos nas células epiteliais e estromais. Devido ao fato de que os níveis de receptores influenciam a resposta tissular ao estradiol, torna-se de grande interesse o entendimento de como os receptores de estrógenos são regulados. Sabe-se que a IDE se associa com os receptores de glicocorticóides e de andrógenos ativando-os (Kupfer e col., 1993; Kupfer e col., 1994), ou seja, aumenta a ligação desses receptores ao DNA assim como a atividade transcricional dos mesmos. Apesar de até a presente data não haver referência à interação da IDE com os receptores de estrógenos, pode-se

pensar, por inferência dos estudos citados (com receptores de glicocorticóides e andrógenos), que tal interação exista. Essa interação pode ter um impacto potencial sobre a sinalização da insulina e dos esteróides. Por exemplo, 1) os receptores de esteróides podem ser substratos para proteólise pela IDE, já que a mesma metaboliza, além da insulina, outras proteínas “in vitro” (TGF- α , ANF, IGF-I e IGF-II). Se a IDE metaboliza receptores de esteróides “in vivo”, ela pode ter um papel na regulação da ação dos esteróides, por modular a concentração dos receptores dos esteróides; 2) os receptores de esteróides podem interagir com a IDE para regular sua atividade degradativa sobre a insulina; 3) a IDE pode modular diretamente a atividade transcricional dos receptores de esteróides.

A correlação entre a expressão de RE no epitélio uterino e os efeitos do estradiol sobre a mitogênese levaram a suposição de que os efeitos estrogênicos fossem mediados diretamente através de receptores epiteliais. Contudo, Cooke e col., (1997) demonstraram que os receptores epiteliais não são nem necessários nem suficientes para a proliferação epitelial uterina induzida pelo estradiol. Esses autores propuseram um modelo para explicar a estimulação estrogênica da mitogênese epitelial uterina, o qual consiste no seguinte: os estrógenos ligam-se aos REs nas células mesenquimais/estromais uterinas e estimulam a produção de fatores parácrinos, os quais então atuam sobre o epitélio uterino para estimular a mitogênese (Figura 15).

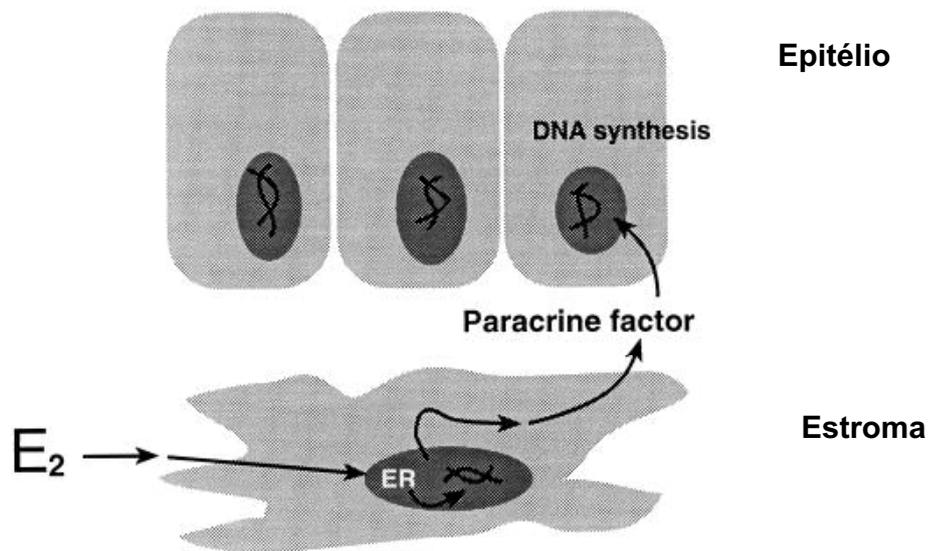


Figura 15. Mecanismo da proliferação epitelial uterina induzida pelo estradiol (Cooke e col., 1997).

Dentre os fatores parácrinos foi postulado que os fatores de crescimento poderiam ser os mediadores dos efeitos mitogênicos do estradiol sobre o epitélio uterino (Murphy e col., 1990; Cooke e col., 1997). Vários fatores de crescimento são produzidos pelo estroma do útero e de outros órgãos, como também foram descritos receptores epiteliais de fatores de crescimento e também ações biológicas dos fatores de crescimento sobre células epiteliais. Por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) é produzido, relativamente, em altas quantidades no útero, preferencialmente no estroma (Adesanya e col., 1996), e é um mitógeno epitelial potente, sendo regulado pelo estradiol no útero (Adesanya e col., 1996). Esse fator de crescimento poderia ser um mediador parácrino dos efeitos mitogênicos do estradiol no epitélio uterino. O RNAm do IGF-1 está presente no endométrio uterino na fase

proliferativa do ciclo menstrual e sua modificação cíclica coincide com as concentrações do estradiol (Zhou e col., 1995). Adicionalmente, foi demonstrado que o estradiol estimula a fosforilação da tirosina do receptor do IGF-1 e do substrato 1 da insulina (IRS-1) no epitélio do útero de camundongos (Richards e col., 1996); o IRS-1, como parte da via do receptor do IGF-1, pode ser importante na mediação da proliferação do útero estimulada pelo estradiol. Outros fatores de crescimento que poderiam estar envolvidos nas interações mesênquima/epitélio são o EGF, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento hepático, o fator de crescimento dos queratinócitos e o TGF- α (Das e col., 1994; Rider e col., 1995; Zarnegar e col., 1995; Koji e col., 1994; Nelson e col., 1992).

Para reforçar o modelo de resposta indireta ao estradiol no epitélio uterino, é interessante referir um trabalho anterior realizado com andrógenos no epitélio reprodutor masculino (Cunha e col., 1992). Nesse estudo os autores demonstraram que a proliferação epitelial induzida pelos andrógenos na próstata é mediada indiretamente pelos receptores de andrógenos mesenquimais/estromais. Esses efeitos indiretos dos andrógenos, juntamente com os do estradiol, sobre a proliferação epitelial, sugerem que a regulação do crescimento epitelial nos órgãos reprodutivos do macho e da fêmea é feita através de mecanismos parácrinos comuns, mediados pelos receptores hormonais do estroma.

Assim, como a IDE é uma protease que metaboliza insulina e fatores de crescimento, é razoável pensar que o aumento de IGFs em situações de proliferação celular leva a um aumento de receptores para os IGFs e, conseqüentemente, um

aumento da IDE (em seu papel de protease) para finalizar a ação hormonal. Na Figura 16 sugerimos um modelo da correlação entre estradiol, proliferação celular uterina e a quantidade/atividade da IDE.

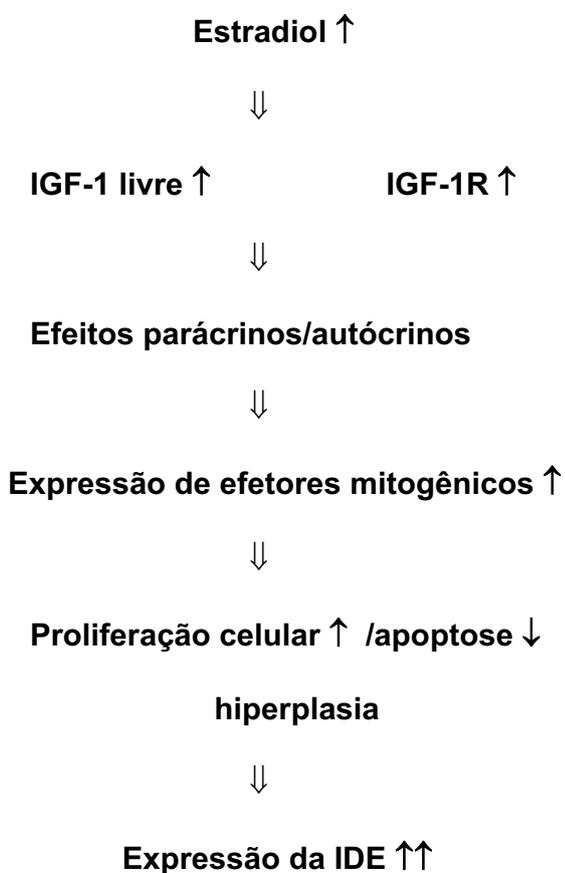


Figura 16. Modelo proposto para os efeitos do estradiol no balanço da proliferação celular/apoptose, que resulta em hiperplasia uterina e aumento da quantidade da IDE (possivelmente por aumento da expressão gênica). A IDE pode participar na proliferação celular como proteína regulatória.

Dentro do contexto do presente estudo e de suas implicações é interessante referir, ainda, que os estrógenos reduzem o acúmulo do peptídeo β -amilóide no cérebro, reduzindo o fator de risco para a enfermidade de Alzheimer (AD). Essa enfermidade é um desordem neurodegenerativa caracterizada pela acúmulo de formas agregadas do peptídeo β -amilóide. A IDE, entre outros peptídeos, metaboliza o β -amilóide e assim é plausível pensar que alterações na quantidade/atividade da IDE pode levar, ou não, ao acúmulo do peptídeo β -amilóide a nível cerebral, com possibilidade de aumentar o risco de desencadear a AD. Foi demonstrado recentemente, na fração citosólica de um homogeneizado de cérebro de paciente (estudo realizado pós-mortem) com AD, que a IDE estava diminuída em quantidade/atividade em relação ao grupo controle (normal), apoiando a hipótese de que a atividade reduzida da IDE pode contribuir para o acúmulo do β -amilóide (Perez e col, 2000). Além do mais, são conhecidos os efeitos neuroprotetores dos estrogênios em mulheres pós-menopáusicas, com redução no risco de desencadear a AD (Green e col., 2000). Também foi demonstrado recentemente, que a ovariectomia e a terapia substitutiva com estradiol modulam os níveis do peptídeo β -amilóide, podendo-se inferir que a cessação da produção de estrogênio ovariano na pós-menopausa facilitaria a deposição do β -amilóide por aumento de sua concentração. De forma oposta, o tratamento com estradiol diminui o β -amilóide do cérebro. Esses dados sugerem que a modulação do metabolismo do β -amilóide pela administração de estradiol a mulheres pós-menopáusicas preveniria ou retardaria o aparecimento da enfermidade de AD. Como nesses estudos não foi quantificada a IDE, não foi possível distinguir se o acúmulo do β -amilóide se devia a um aumento na sua geração ou a ausência de sua metabolização, em situações de diminuição de estradiol (Petanceska e col., 2000). Os

dados apresentados no presente estudo mostram uma correlação entre estradiol, proliferação celular uterina e quantidade/atividade da IDE, levando-nos a pensar que no cérebro poderiam ser observadas as mesmas alterações da IDE em resposta ao estradiol, como os que foram observados no tecido uterino. Assim, o acúmulo do β -amilóide na AD nas mulheres pós-menopáusicas, poderia ser devido, pelo menos em parte, a uma diminuição da quantidade/atividade da IDE no cérebro pela ausência de estradiol.

Tomados em seu conjunto, nossos resultados mostram que o aumento da atividade IDE na fração citosólica de um homogeneizado de útero se correlaciona com o aumento na quantidade dessa enzima que acompanha a proliferação celular induzida pelo estradiol e que possivelmente a IDE deve ser considerada um requerimento importante para o crescimento do endométrio. Esses dados sugerem que o papel degradativo da IDE e sua regulação (em quantidade e atividade) são propriedades importantes na tradução de sinal hormonal e na resposta biológicas das células. Assim, a IDE pode ser considerada uma proteína regulatória que liga e degrada a insulina, IGFs e outras proteínas importantes para o metabolismo celular, como os receptores de esteróides e o peptídeo β -amilóide.

Finalmente, é interessante enfatizar que o “cross-talk” entre vias de tradução do sinal é um fenômeno comum no desenvolvimento celular e na homeostasia. A interação da IDE com receptores esteróides acopla, potencialmente, as vias de sinalização da insulina e dos hormônios esteróides. A identificação das vias de sinalização induzidas por esteróides sexuais que estão associados com proliferação de

tecidos alvos, pode esclarecer os fatores bioquímicos que podem estar envolvidos no risco de câncer.

7 CONCLUSÕES

Conforme os dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- 1 – A quantidade e atividade da IDE aumentam nos grupos intacto em proestro e castrado e tratado com estradiol.
- 2 – A quantidade e atividade da IDE diminuem nos grupos intacto em metaestro e castrado.
- 3 – A correlação linear entre a atividade e quantidade da IDE e o peso relativo do útero, indica ainda mais o envolvimento da IDE com o crescimento celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adesanya O. O., Zhou J., Bondy C. A. Sex steroid regulation of insulin like-growth factor system gene expression and proliferation in primate myometrium. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81:1967-1974.

Barbosa M. C. L., Porto R. C. C., Cardoso C. L. P., Martins M. C. C., Wanderley M. I., Udrisar, D. P. (2003). Efeito do tratamento com dexametasona e testosterona sobre os níveis e atividade da enzima que degrada a insulina em fração citosólica de próstata de ratos castrados. XXI Congresso da Associação Latinoamericana, 170 (**Resumo**).

Bennett R. G., Hamel F. G., Duckworth W. C. Identification and isolation of a cytosolic proteolytic complex containing insulin degrading enzyme and the multicatalytic proteinase. **Biochem Biophys Res Commun** 1994; 202:1047-1053.

Bertalanffy F. D., Lau C. Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. **Acta Anat** 1963; 54:39-81.

Bigsby R. M., Aixim L., Luo K., Cunha G. R. Strain differences in the ontogeny of estrogen receptors in murine uterine epithelium. **Endocrinology** 1990; 126:2592-2596.

Blenis, J. Growth-regulated signal transduction by MAP kinases and risks. **Cancer Cells** 1991; 3:445-449.

Bondy C. A., Zhou J., Chin E., Reinhardt R. R., Roth R. A: Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression: comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. **J Clin Invest** 1994; 93:966-973.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976 ; 72: 248-254.

Butcher R. C., Collins W. E., Fugo N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol 17-beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology** 1974; 94: 1704-1708.

Camberos M. C., Pérez A. A., Udrissar D. P., Wanderley M. I., Cresto J. C. ATP inhibits insulin-degrading enzyme activity. **Exp Bio Med** 2001; 226: 334-341.

Clark B. F. The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. **J Endocrinol** 1971; 50:527-528.

Clark J. H., Markaverich B. M. (1988). Actions of ovarian steroid hormones. In **The Physiology of Reproduction** (Knobil, E. and Neill ,J.D., eds), pp.675-711, Raven Press.

Cooke P. S., Buchanan D. L., Young P., Setiawan T., Brody J., Korach K. S., Taylor J., Lubahn D. B., Cunha G. R. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. **Natl. Acad. Sci.** 1997; 94: 6535-6540.

Couch C. B., Strittmatter WJ. Rat myoblast fusion requires metalloendoprotease activity. **Cell** 1983; 32: 257-265.

Cross M., Dexter T. M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. **Cell** 1991; 64:271-280.

Cunha G. R., Alarid E. T., Turner T., Donjacour A. A., Boutin E. L., Foster B. A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **J Androl** 1992; 13:465-475.

Das S. K., Tsukamura H., Paria B. C., Andrews G. K., Dey S. K. Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. **Endocrinology** 1994; 134:971-981.

Draznin B., Trowbridge M. Inhibition of intracellular proteolysis by insulin in isolated rat hepatocytes: possible role of internalized hormone. **J Biol Chem** 1982; 257:11988-11993.

Duckworth W. C., Bennett R. G., Hamel F. G. Insulin degradation: Progress and Potential. **Endocr Rev** 1998; 19: 608-624.

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

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

Gershoni J. M., Palade G. E. Principles and applications. **Anal Biochem** 1983; 131:1-15.

Goldfine I. D. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signalling. **Endocr Rev** 1987; 8: 235-255.

Granner D. K., O'Brien R. M. Molecular physiology and genetics of NIDDM. **Diabetes Care** 1992;15:369-395.

Green P. S., Simpkins J. W. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. **Int J Devl Neurosci** 2000; 18:347-358.

Hari J., Shii K., Roth R. A. *In vivo* association of ¹²⁵I insulin with a cytosolic insulin - degrading enzyme: detection by covalent cross-linking and immuno-precipitation with a monoclonal antibody. **Endocrinology** 1987; 120:829-831.

Johnson M. L., Redmer D. A., Reynolds L. P. Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. **Biol Reprod** 1997; 56:393-401.

Junqueira L. C., Carneiro J. (1999). Aparelho Reprodutor Feminino. In: **Histologia Básica** (Junqueira, L.C. and Carneiro, J.), Guanabara Koogan.

Kahn C. R., White M. F.(1995). Molecular mechanism of insulin action. In: **Endocrinology** (DeGroot LJ. ed), 3^aed, pp.1373-1381, Saunders.

Kayalar C., Wong W. T., Hendrickson, L. Differentiation of BC₃H1 and primary skeletal muscle cells and the activity of their endogenous insulin-degrading enzyme are inhibited by the same metalloendoprotease inhibitors. **J. Cell. Biochem.** 1990; 44:137-151.

Kayalar C., Wong W. T. Metalloprotease inhibitors wich block the differentiation of L6 myoblasts inhibit insulin degradation by the endogenous insulin-degrading Enzyme. **J Biol Chem** 1989; 265:8928-8934.

Kaye A. M., Sheratzky D., Lindner H. R. Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. **Biochim Biophys Acta** 1971; 261:475-486.

Kirkland J. L., LaPointe L., Justin E., Stancel G. M. Effect of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. **Biol Reprod** 1979;21:269-272.

Koji T., Chedid M., Rubin J. S., Slyden O. D., Csaky K. G., Aaronson A. S., Brenner R. M. Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal

cells of the primate endometrium: keratinocyte growth factor as a progestomedin. **J Cell Biol** 1994; 125:393-401.

Kuo W. L., Gehm B. D., Rosner M. R. Regulation of insulin degradation: expression of an evolutionary conserved insulin-degrading enzyme increases degradation via an intracellular pathway. **Mol Endocrinol** 1991; 5: 1467-1476.

Kuo W. L., Montag A. G., Rosner M. R. Insulin-degrading enzyme is differently expressed and developmentally regulated in various rats tissues. **Endocrinology** 1993;132:604-611.

Kupfer S., Marschke K., Wilson E. M., French F. S. Receptor accessory factor enhances specific DNA binding of androgen and glucocorticoid receptors. **J Biol Chem** 1993; 268:17519-17527.

Kupfer S., Wilson E. M., French F. S. Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. **J Biol Chem** 1994; 269:20622-20628.

Kurochkin, I. V. Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. **Trends Biochem. Sci** 2001; 26:421-425.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227:680-685.

Martin L., Finn C. A., Trinder G. Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. **J Endocrinol** 1973; 56:133-134.

Miller D. S. Stimulation of RNA and protein synthesis by intracellular insulin. **Science** 1988; 240:506-509.

Murphy L. J. , Ghahary A. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. **Endocr Rev** 1990; 11:443-453.

Nelson K. G., Takahashi T., Lee D. C., Luetkeke N. C., Bossert N. L., Ross, K., Eitzman B. E., McLachlan J. A.. Transforming growth factor-alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. **Endocrinology** 1992; 131:1657-1664.

O'Brien R. M., Granner D. K. Regulation of gene expression by insulin. **Biochem. J** 1991; 278:609-619.

Perez A., Morelli L., Cresto J. C., Castano E. M. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. **Neurochem Res** 2000; 25:247-255.

Pershad Singh H. Á., Gale R. D., McDonald J. M. Chelation of intracellular calcium prevents stimulation of glucose transport by insulin and insulinomimetic agents in the adipocyte. Evidence for a common mechanism. **Endocrinology** 1987;121:1727-1732.

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

Petanceska S., Nagy V., Frail D., Gandy S. Ovariectomy and 17(beta) peptides in brain. **Am Acad Neurol** 2000; 54:2212-2217.

Plas C. B. Desbuquois: Receptor-mediated insulin degradation and insulin-stimulated glycogenesis in cultured foetal hepatocytes. **Biochem J** 1982; 202:333-341.

Polosny K. S., O'Meara N. M. (1995). Secretion and metabolism of insulin, proinsulin and c-peptide. In: **Endocrinology** (DeGroot LJ. ed), 3^aed, pp.1354-1358, Saunders .

Porto R. C. C., Barbosa M. C. L., Cardoso C. L. P., Martins M. C. C., Wanderley M. I., Udrisar, D. P. (2002). Efeito da castração e do tratamento com testosterona sobre níveis e atividade da enzima que degrada a insulina em frações nuclear e citosólica de próstata de ratos. XXXVII Congresso Brasileiro de Fisiologia, 109 (**Resumo**).

Quarmby V. E. , Korach K. S. The influence of 17 beta estradiol on patterns of cell division in the uterus. **Endocrinology** 1984; 114:694-702.

Reaven, G. M. Pathophysiology of insulin resistance in human diseases. **Physiol. Rev** 1995; 75:473-486.

Richards R. G., DiAugustine R. P., Petrusz P., Clark G. C. Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. **Proc Natl Acad Sci** 1996; 93:12002-12007.

Rider V., Piva M., Cohen M. E., Carlone D. L. Alternative splicing and differential targeting of fibroblast growth factor receptor 1 in the pregnant rat uterus. **Endocrinology** 1995; 136:3137-3145.

Rivett A. J. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. **Biochem J** 1993; 291:1-10.

Saltiel, A. R. The molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. **J Clin Invest** 2000;106:163-164.

Shii K., Roth R. A. Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosolic protease. **Proc Nat Acad Sci** 1986; 83:4147-4151.

Smith R. M., Jarett L. Partial characterization of mechanism of insulin accumulation in H35 hepatoma cell nuclei. **Diabetes** 1990; 39:683-689.

Solomon S., Palazzolo M., Elam M., Green S., Raghow R. Regulation of calmodulin gene expression by insulin is both transcriptional and post-transcriptional. **J Lab Clin Med** 1994; 124:348-358.

Steiner D. F. Insulin today. **Diabetes** 1977; 26:322-331.

Stoppelli M. P., Garcia J. V., Decker S. J., Rosner M. R. Developmental regulation of DNA insulin degrading enzyme from *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci** 1988; 85:3469-3473.

Tachi C., Tachi S., Lindner H. R. Modification by progesterone of estradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. **J Reprod Fertil** 1972; 31:59-76.

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

Udrisar D. P., Camberos M. C., Basabe J. C., Cresto J. C. Insulin processing. Its correlation with glucose conversion to CO₂. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.** 1984;34:427-440.

Udrisar D. P., Rodbell M. Microsomal and cytosolic fractions of guinea pig hepatocytes contain 100-kilodalton GTP-binding proteins reactive with antisera against α subunits of

stimulatory and inhibitory heteromeric GTP-binding protein. **Biochemistry** 1990; 87: 6321-6325.

White M. F., Stegman E. W., Dull T. J., Ullrich A., Kahn C. R. Characterization of an endogenous substrate of the insulin receptor in cultured cells. **J Biol Chem** 1987; 262:3358-3362.

Wilden P. A., Backer J. M., Kahn C. R., Cahill D. A., Schroeder G. J., White M. F. The insulin receptor with phenylalanine replacing tyrosine 1146 provides evidence for separate signals regulating cellular metabolism and growth. **Proc Nat Acad Sci** 1990; 87:3358-62.

Zarnegar R., Michalopoulos G. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. **Cell Biol** 1995; 129:1177-1180.

Zhou Y., Shughrue P. J., Dorsa D. M. Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. **Neuroendocrinology** 1995; 61:276-283.