



MARINA GUIMARÃES GOBBO

**"A ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA
DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL:
INFLUÊNCIA NA HISTOFISIOLOGIA DA
PRÓSTATA ADULTA E PAPEL PROTETOR
CONTRA OS DANOS CAUSADOS PELO
DIABETES EXPERIMENTAL"**

**"MELATONIN ADMINISTRATION DURING
SEXUAL MATURATION: INFLUENCE ON ADULT
PROSTATE HISTOPHYSIOLOGY AND
PROTECTIVE ROLE AGAINST DAMAGES
CAUSED BY EXPERIMENTAL DIABETES"**

Campinas, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARINA GUIMARÃES GOBBO

**"A administração de melatonina durante a maturação sexual:
influência na histofisiologia da próstata adulta e papel protetor
contra os danos causados pelo diabetes experimental "**

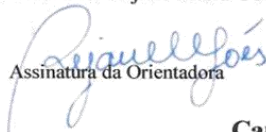
**"Melatonin administration during sexual maturation: influence
on adult prostate histophysiology and protective role against
damages caused by experimental diabetes"**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular .

Doctorate thesis presented to the Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme in the Institute of Biology, the State University of Campinas, required for the completion of a Doctorate degree, in the areas of Cellular Biology.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna *Marina Guimarães Gobbo* e orientada pela Profa. Dra. Rejane Maira Góes.


Assinatura da Orientadora

Campinas, 2015

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

G535a	Gobbo, Marina Guimarães, 1987- A administração de melatonina durante a maturação sexual : influência na histofisiologia da próstata adulta e papel protetor contra os danos causados pelo diabetes experimental / Marina Guimarães Gobbo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015. Orientador: Rejane Maira Góes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Próstata. 2. Diabetes. 3. Melatonina. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Melatonin administration during sexual maturation : influence on adult prostate histophysiology and protective role against damages caused by experimental diabetes

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Diabetes

Melatonin

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Valdecir Farias Ximenes

Maria Christina Werneck de Avellar

Sérgio Luís Felisbino


Data de defesa: 26-05-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 26 de maio de 2015.

BANCA EXAMINADORA

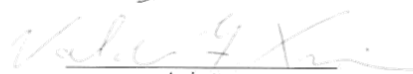
Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete


Assinatura

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes


Assinatura

Profa. Dra. Maria Christina Werneck de Avellar


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso

Assinatura

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari

Assinatura

Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Assinatura

Agradecimentos

A Deus pela vida, a capacidade de persistir e concluir essa etapa;

A minha querida mãe, Maria Margareth Guimarães por ter dedicado a sua vida à formação de seus filhos, ensinado valores morais e priorizá-los sempre;

Ao meu querido pai Adalberto Luís Gobbo por ter nos dado suporte e enquanto as condições físicas lhe permitiram;

Ao meu irmão Murilo Guimarães Gobbo por dividirmos o mesmo teto, a mesma história e a mesma opinião;

Aos meus avós maternos Josefa e Arymar (*In Memoriam*), inesquecíveis por sua presença constante e exemplos de caráter;

Ao meu amado namorado André Margoto que participou ativamente dessa formação, sempre me estimulando a não desistir. Peço desculpas pelos vários momentos dispensados para conclusão desse estudo. Agradeço também por ter me acompanhado no início do período que passei no exterior;

Ao meu sogro Álvaro Margoto pela ajuda em diversas ocasiões;

A minha querida orientadora Profa. Dra. Rejane Maira Góes, pelos quase dez anos de parceria, pelos ensinamentos em diversos âmbitos, por toda ajuda e por me proporcionar a realização de diversos sonhos;

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e a Profa. Dra. Patrícia Vilamaior pelo apoio e inserção no grupo de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida por permitir a colaboração desde o mestrado e contribuir com conhecimentos diversificados em minha formação;

À querida eterna co-orientadora Profa. Dra. Daniele Ribeiro por ter me iniciado na carreira acadêmica, por sua amizade e todo auxílio prestado;

À Eloísa Zanin por sua amizade e por estar ao meu lado não apenas nos bons momentos, mas também nas dificuldades;

À Prfa. Dra. Maria Etelvina por sua amizade e sábios conselhos;

À Profa. Dra. Silvana Campos por auxílio em diversos momentos destas análises;

Ao meu querido co-orientado Guilherme por me permitir exercer essa função maravilhosa, por toda sua ajuda nos experimentos e em minha formação. Que nossa parceria ultrapasse os limites acadêmicos e permaneçam laços de amizade e cumplicidade por muitos anos;

Ao amigo Luiz Roberto Falleiros Jr. pelo auxílio técnico, por seu bom humor inerente e pela ajuda;

Ao colega Danilo Humberto Grunig pelo auxílio com as análises bioquímicas e estatísticas;

A minha eterna vizinha e amiga de infância Simone Varriano, por estar sempre ao meu lado e abraçar todas as minhas causas;

A minha querida amiga fiel Samantha Yuri Maeda pela amizade que iniciamos durante o mestrado, mantida até os dias de hoje;

À amiga Paula Secco pela amizade e companheirismo mesmo com a distância;

À amiga Camila Helena Facina por me apoiar tanto e querer sempre meu bem;

Aos amigos Elcio Sfair, Patrícia, Weverson, Letícia Fernanda, Flávio Oliveira pela confiança e amizade;

À amiga Caroline Christante por ser tão especial e pelas inúmeras conversas agradáveis;

Aos colegas de trabalho por todo auxílio e por tornarem a rotina mais divertida: Cíntia, Ana Paula, Ricardo, Luiz Henrique, Nayara, Ellen, Douglas, Carol Negrin, Mariana Marcielo, Marianna Zanatelli, Nayara, Cássia, Patrícia, Bruno Sanchez, Bruno Zani, Juliana, Maysa, Manoel, Bianca, Carolina Frandsen;

À “irmã” holandesa Marieke Van der Molen por ter feito meu período na Suécia tão especial e por ter me ensinado tanto sobre os europeus;

À orientadora Profa. Dra. Nishtman Dizeyi por permitir a realização do estágio, por me ensinar as técnicas de cultura de células e por diversas lições de vida;

Ao Dr. Per-Anders Abrahamsson por possibilitar a colaboração;

À Nora pela agradável companhia entre os *vikings*;

Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho e Prof. Dr. Wagner Fávaro;

Aos membros da banca de defesa pela disponibilidade;

À secretária Liliam Panagio por estar sempre disponível, ser compreensível orientar nas questões burocráticas;

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP;

Às agências financiadoras FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro fundamental na realização desta pesquisa;

O sucesso profissional ainda é incerto, mas permanece a convicção de ter se dedicado até o presente momento às atividades que me fazem realizada.

Resumo

Dentre os efeitos decorrentes do diabetes na próstata de roedores estão a atrofia prostática, comprometimento da capacidade secretora, desequilíbrio na cinética epitelial, remodelação da matriz extracelular e mudanças morfofuncionais nas células estromais. Essas alterações têm sido associadas em grande parte à queda androgênica e à escassez insulínica. Entretanto, não se podem negligenciar os efeitos da hiperglicemia prolongada que ocasiona estresse oxidativo. A melatonina (MLT) possui propriedades antitumorais e é um potente antioxidante. Os indivíduos diabéticos apresentam comprometimento da síntese de MLT. Este estudo visou examinar se o tratamento de ratos com MLT desde o período pré-púbere até a idade adulta afeta a maturação da próstata ventral e os efeitos da administração prolongada de MLT na glândula. Também foi analisado o papel protetor da MLT nas alterações decorrentes do diabetes experimental em curto e longo prazo. A MLT foi administrada na água de beber (10µg/Kg peso corpóreo/dia) a partir da 5ª semana de idade até o final do experimento. Na 13ª semana de idade o diabetes foi induzido pela estreptozotocina (STZ, 40mg/Kg de peso corpóreo, ip). Os ratos foram eutanasiados na 14ª semana (1 semana de diabetes) e na 21ª semana de idade (2 meses de diabetes). Os resultados desse delineamento experimental (8 grupos/N = 10) resultaram em 3 capítulos. No 1º capítulo foram quantificados a atividade de catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx) e peroxidação lipídica na próstata, testículo e epidídimo. O sistema antioxidante prostático foi o mais vulnerável ao diabetes, no qual houve aumento em curto prazo da GPx e da GST ($p = 0.0186$) e em longo termo da CAT e GST ($p \leq 0.001$). A ingestão de MLT por ratos saudáveis aumentou em 47% a atividade da GPx epididimal. A MLT normalizou as desordens enzimáticas na próstata demonstrando a sua ação antioxidante mesmo em baixa dosagem. No 2º capítulo foram analisados os efeitos da MLT na maturação prostática e nas injúrias causadas pelo diabetes com ênfase na proliferação celular, apoptose e expressão do receptor de andrógeno (AR). Esse neurohormônio diminuiu em 10% a frequência de células AR-positivas epiteliais em ratos saudáveis no início da vida adulta. O tratamento com MLT a ratos diabéticos de longo prazo diminuiu os índices apoptóticos e aumentou a proliferação celular, devido à normalização da testosterona circulante encontrada nesses animais. A influência *in vitro* da MLT em células tumorais andrógeno-dependentes (22Rv1), independentes (PC3) e células epiteliais humanas (PNTA1) em condições normais (NC) e hiperglicêmicas (HG) foram avaliadas. As células 22Rv1 foram as mais sensíveis à MLT. Esse hormônio diminuiu os índices mitóticos das linhagens 22Rv1 e PNTA1 após curta pré-incubação em meio hiperglicêmico. Porém, os níveis proliferativos das células PC3 foram favorecidos pela MLT em condições HG. Assim como nos animais diabéticos de longo prazo, a MLT favoreceu a sobrevivência das células PC3 em condições hiperglicêmicas. No 3º capítulo foi analisado se o diabetes induzido por STZ favorece o estabelecimento de lesões malignas e

pré-malignas na próstata. Também foi avaliado se a MLT evita o desenvolvimento dessas alterações histopatológicas nos animais diabéticos e se ingestão desse hormônio afeta o componente epitelial e estromal de animais saudáveis. A MLT foi mais influente na histologia prostática quando administrada durante a puberdade. Esse tratamento atenuou a atrofia epitelial e das células musculares lisas, restaurou a distribuição colagênica e reduziu a incidência de neoplasias intraepiteliais (PIN) de alto grau, prostatite e atrofia proliferativa inflamatória (PIA) nos ratos diabéticos. Entretanto, a baixa dosagem MLT não impediu a ocorrência do carcinoma microinvasivo. O diabetes induzido por STZ permite o estudo da incidência e progressão tumoral em condições de hiperglicemia, porém não se podem descartar os efeitos específicos da droga tais como o aumento da metilação que ocorreu nos animais diabéticos.

Abstract

The prostate response to diabetes in rodents includes atrophy, impairment of secretory activity, imbalance in epithelial kinetics, extracellular matrix remodeling and morphofunctional changes of stromal cells. These alterations are associated to the drop in androgen levels and insulin scarcity. However, the effects of prolonged hyperglycemia, which leads to oxidative stress, cannot be neglected. Melatonin (MLT) has antitumor and antioxidant actions. Diabetic individuals have a malfunction of MLT synthesis. This investigation aimed to examine if MLT treatment to rats since prepubertal period until adulthood affects ventral prostate maturation and the effects of prolonged administration of this hormone in the gland. The protective action of MLT on alterations caused by short- and long-term diabetes was also analyzed. MLT was provided in drinking water (10 µg/kg b.w./day) since 5th week of age until the end of experiment. Diabetes was induced by streptozotocin (STZ, 40mg/kg b.w., ip) in 13 weeks old rats. The rats were euthanized with 14 (one-week diabetes) or 21 weeks old (two months diabetes). The results of the above experimental design (8 groups/N=10) were divided in 3 chapters. In the first chapter, the activity of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) and lipid peroxidation levels were assessed in prostate, testis and epididymis. Prostate antioxidant system was the most vulnerable to diabetic condition, in which there was an increase of GPx and GST ($p = 0.0186$) activities at short-term, and CAT and GST ($p \leq 0.001$) at long-term. MLT normalized the enzymatic disorders in prostate, proving its antioxidant property even at low dosage. In the second chapter, the effects of MLT in prostate maturation and injuries caused by experimental diabetes were studied regarding cell proliferation, apoptosis and androgen receptor expression (AR). This neurohormone decreased by 10% frequency of the epithelial AR-positive cells in healthy rats at early adult life. The treatment with MLT to long-term diabetic rats decreased the apoptotic index and increased the cell proliferation, and this was due to the normalization of circulating testosterone levels found in these animals. The in vitro effect of MLT on androgen-dependent (22Rv1), independent (PC3) tumor cells and human epithelial cells (PNTA1) under normal (NC) and hyperglycemic (HG) conditions were evaluated. 22Rv1 cells were the most sensitive to MLT. This hormone diminished the mitosis of 22Rv1 and PNTA1 after short pre-incubation in hyperglycemic medium. Similar to the long-term diabetic animals, MLT favored the survival of PC3 cells under hyperglycemic condition. In the third chapter, we investigated if STZ-induced diabetes favors the establishment of malignant and pre-malignant lesions in prostate. The effectiveness of MLT in avoiding these histopathological alterations in diabetic animals and if its ingestion by healthy rats affects the epithelial and stromal compartments were evaluated. MLT was more influent in prostatic histology when administered during puberty. This treatment attenuated the atrophy of epithelium and smooth muscle cells, restored the collagen distribution and reduced

the incidence of high-grade intraepithelial neoplasia (PIN), prostatitis and proliferative inflammatory atrophy (PIA). Meanwhile, low doses of MLT did not preclude the occurrence of microinvasive carcinoma. The STZ-induced diabetes allows the assessment of tumor incidence and progression under hyperglycemic conditions, but the secondary effects of STZ cannot be discarded, as the increase of DNA methylation found in diabetic animals.

Lista de abreviaturas

AGE : produtos finais de glicação não-enzimática
AMPc : adenosina monofostato cíclico
AR : receptor de andrógeno
C1 : grupo controle de curto prazo
C2 : grupo controle de longo prazo
CAT : catalase
CEL: Nε-(carboxietil) lisina
cml : célula muscular lisa
CML : Nε-(carboximetil) lisina
DHT : di-hidrotestosterona
D1 : grupo diabético não tratado de 1 semana
D2 : grupo diabético não tratado de 8 semanas
DM1 : grupo diabético de 1 semana tratado com melatonina por 9 semanas
DM2 : grupo diabético de 8 semanas tratado com melatonina por 16 semanas
ERα : receptor de estrógeno do tipo α
ERβ : receptor de estrógeno do tipo β
ERK : quinases reguladas por sinais extracelulares
GLUT1 : transportador de glucose do tipo 1
GLUT2 : transportador de glicose do tipo 2
GnIH : hormônio inibidor de gonadotrofinas
GPx : glutaciona peroxidase
GSH : glutaciona reduzida
GST : glutaciona transferase
HG : condição ou meio hiperglicêmico
HPB : hiperplasia benigna prostática HIF-1α : fator indutor de hipóxia do tipo 1α
IRS : substrato de receptor de insulina tipo 1
JNK : quinase c-Jun terminal
LH : hormônio luteinizante
M1 : grupo controle tratado com melatonina por 9 semanas
M2 : grupo controle tratado com melatonina por 16 semanas
MDA : malondialdeído
MAPK : proteína quinase ativada por mitógeno
MLT : melatonina
MMP : metaloproteinase de matriz MTR1B : receptor de melatonina do tipo 1B NC : condição normal
NF-κβ: fator nuclear κβ
NOD : camundongo diabético não obeso PCNA : antígeno nuclear de proliferação celular PARP : poli-ADP ribose polimerase
PIA : atrofia proliferativa inflamatória
PIN : neoplasia intraepitelial
PKA : proteína quinase A
PKC : proteína quinase C
RAGE : receptor de produtos finais de glicação não enzimática (AGE)
ROS : espécies reativas de oxigênio
STZ : estreptozotocina

TAC : “*transit-amplifying cells*”

TBA: ácido tiobarbitúrico

UGS: seio urogenital endodermal

VEGF : fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

Introdução	15
Objetivos	29
Capítulo 1	30
Introdução	32
Material e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	39
Referências Bibliográficas	43
Tabela	50
Figuras	53
Capítulo 2	58
Introdução	60
Material e Métodos	62
Resultados	68
Discussão	70
Referências Bibliográficas	74
Figuras	84
Capítulo 3	91
Introdução	93
Material e Métodos	95
Resultados	100
Discussão	102
Referências	107
Tabela	114
Figuras	118
Conclusões	124
Referências Bibliográficas	126
Anexos	142

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais sobre a próstata

A próstata é uma glândula do sistema genital masculino que juntamente com a vesícula seminal contribui com a produção de nutrientes para o fluido seminal e promove manutenção do gradiente iônico e pH adequado para sobrevivência dos espermatozoides (McNeal, 1983; Untergasser et al., 2005). É formada por unidades secretoras túbulo-alveolares ramificadas com epitélio secretor pseudo-estratificado colunar (McNeal, 1983; Schaklen e Van Leenders, 2003). Em humanos, ela exibe uma morfologia compacta sendo diferenciada em três zonas: central, de transição e periférica (McNeal, 1983). Nos roedores, a glândula forma um complexo composto por quatro lobos distintos: anterior ou glândula coaguladora, dorsal, lateral e ventral (Hayashi et al., 1991). Os lobos dispõem-se ao redor da base da bexiga exibindo particularidades quanto à ramificação de ductos e produção de secreções proteicas (Sugimura et al., 1986).

O epitélio secretor da próstata é composto por vários tipos celulares inter-relacionados como as células-tronco, as células basais, as células de amplificação transitória (“*transit-amplifying cells*” - TAC), as células intermediárias e as células luminais secretoras (De Marzo et al., 1998; Isaacs e Coffey, 1989; Schaklen e Van Leenders, 2003). Esses representam estágios progressivos de diferenciação, sendo distinguidos não apenas quanto à morfologia e localização, mas também quanto ao padrão de expressão gênica, respostas a estímulos fisiológicos e plasticidade celular. As células luminais secretoras são dependentes de andrógenos e representam a maioria das células epiteliais da próstata normal e hiperplásica (Liu et al., 1997). Portanto, a involução prostática causada por ablação androgênica é devida em grande parte à perda das células luminais secretoras por apoptose (Banerjee et al., 2000; Isaacs e Coffey, 1989; Kerr e Seale, 1973, Kyprianou et al., 1988, Staack et al., 2003). Outra linhagem de células do epitélio acinar corresponde às células neuroendócrinas, as quais não estão sujeitas à ação androgênica (Schaklen e Van Leenders, 2003). A população de células basais representa um *pool* de células-tronco essenciais para a renovação epitelial (Garcia-Florez e Carvalho, 2005).

Entremeando as porções glandulares há um estroma vascularizado, com moléculas reguladoras, enzimas de remodelamento, células do sistema imune, nervos, fatores de crescimento, além de fibras colágenas, elásticas, fibroblastos e células

musculares lisas (cml) (Carvalho e Line, 1996; McNeal, 1983). O colágeno é secretado pelos fibroblastos e cml e tem papel estrutural, promovendo adesão celular, resistência e integridade do tecido. Já as fibras elásticas estão relacionadas à extensibilidade e à deformação prostática (Carvalho et al., 1997; Montes, 1992). Juntos, esses elementos microfibrilares têm importante função, fornecendo a plasticidade celular necessária durante a contração da cml, que envolvem os ductos-acinares, e restauração elástica no retorno da contração (Carvalho et al., 1997).

Em todas as espécies, a próstata desenvolve-se a partir do seio urogenital endodermal (UGS). O desenvolvimento da próstata, assim como o de outros órgãos formados pela associação de um parênquima epitelial com um estroma fibromuscular, depende de interações recíprocas entre o epitélio em diferenciação e o mesênquima subjacente (Marker et al., 2003). A ação androgênica é fundamental ao desenvolvimento e manutenção da homeostasia prostática (Fig. 1) e os processos de proliferação e morte celular são direta ou indiretamente regulados por andrógenos. A testosterona entra nas células prostáticas e é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5- α -redutase (Jena e Ramarão, 2010). O efeito dos andrógenos é mediado pelo seu receptor (AR), cuja ativação leva à expressão de genes relacionados com a atividade secretória ou genes regulatórios de fatores de crescimento (Doncajour e Cunha, 1973). Sabe-se que, durante o desenvolvimento, as células mesenquimais são as primeiras a expressarem tais receptores (Cooke et al., 1991). A estimulação parácrina das cml sobre o epitélio, além de induzir a diferenciação e aquisição de morfogênese ductal, é essencial para a sua manutenção. Vários estudos indicam que os sinais parácrinos de origem epitelial, aliados aos andrógenos também influenciam o padrão de diferenciação das cml (Marker et al., 2003). Vale ressaltar que o desequilíbrio nessas interações é decisivo na instalação e progressão das doenças que acometem esse órgão como a hiperplasia benigna (HPB) e o carcinoma de próstata (Cunha et al., 1996; Hayward et al., 1996; Tuxhorn et al., 2002).

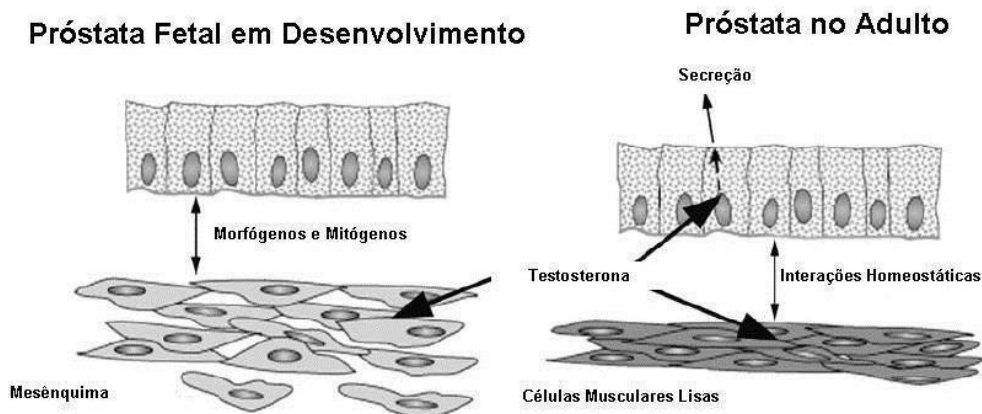


Figura 1 - Interações entre o epitélio e os componentes do estroma/mesênquima na próstata, durante o desenvolvimento e no adulto. No desenvolvimento fetal (esquerda), baixos níveis de andrógenos séricos agem através de AR mesenquimais, estimulando a proliferação e diferenciação do epitélio prostático. Concomitantemente, o epitélio induz a diferenciação do mesênquima em cml. No adulto (direita), altos níveis de testosterona sérica, agem via AR localizados nas cml, mantendo a morfologia do epitélio. A diferenciação das cml e do epitélio é mantida por fatores parácrinos que agem homeostaticamente. (Modificado de Cunha et al., 2003).

2. Diabetes: generalidades

O *diabetes mellitus* é um conjunto de desordens metabólicas, de origem genética ou ambiental, caracterizado pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Entre os sintomas característicos do diabetes destacam-se a poliúria (alto volume de urina), a polidipsia (sede), a cetoacidose e a perda de peso. Esses distúrbios acarretam inúmeras complicações sistêmicas envolvendo principalmente o sistema cardiovascular, excretor, nervoso e ocular podendo levar ao severo comprometimento na qualidade de vida dos indivíduos (Avedano et al., 1999; Sanai et al., 2000; Stefan, 1996). O diabetes mellitus afeta 8.3% da população (~387 milhões de pessoas) e aproximadamente 5.1 milhões de pessoas entre 20 e 80 anos morreram em decorrência do diabetes em 2014 (Internacional Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 2014). São estimados que existam 13 milhões de diabéticos no Brasil (Internacional Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 2013).

Dois quadros clínicos são classicamente descritos de acordo com a etiologia: o *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), caracterizado por uma total deficiência de insulina e o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), que se instala por uma ação ineficiente da insulina nos tecidos periféricos (Öztürk et al., 1996). Os indivíduos portadores de DM1 se tornam dependentes de insulina para a sua sobrevivência (Ordóñez et al., 2007). Por sua vez, o

DM2, está relacionado à obesidade que leva a situação de resistência periférica à insulina, culminando com essa desordem metabólica (Suthagar et al., 2009). No mesmo âmbito de definição de diabetes pertencem ainda o diabetes gestacional e outras alterações de origens diversas no metabolismo e homeostase da glicose, como a resistência periférica à insulina (McCance et al., 1997; Schinner et al., 2005).

A maioria dos casos de *diabetes mellitus* do tipo I tem origem genética na qual uma resposta imune anormal é desencadeada e ocasiona o desenvolvimento de anticorpos pelos linfócitos T contra as proteínas das células β -pancreáticas (Simmons et al., 2015). Este tipo de diabetes é mais comum em crianças e adolescentes e possui maior incidência entre os homens (Harjutsalo et al., 2008) com prevalência média de 13/100000 (Simmons et al., 2015).

A utilização de modelos experimentais tem possibilitado avaliar o prejuízo do diabetes em vários órgãos (Cagnon et al., 2000; Leiter et al., 2013; Gobbo et al., 2012a,b; Ribeiro et al., 2009). Dentre esses modelos, são utilizados animais espontaneamente diabéticos tais como os camundongos diabéticos não obesos (*non obese diabetic* - NOD), portadores de mutações que acarretam apoptose das células β -pancreáticas (*Akita Mouse*) e *knockouts* para genes funcionais das células β (Terauchi et al., 1995). Drogas diabetogênicas que causam a depleção das células β pancreáticas, tais como estreptozotocina e aloxana são usadas na indução do diabetes (Lenzen, 2008). Há também modelos de indução de diabetes por inoculação do vírus linfocítico da

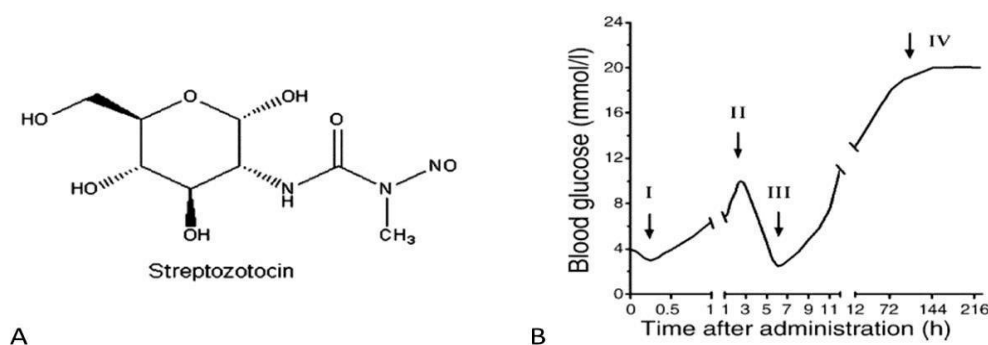


Figura 2 - Fórmula estrutural da estreptozotocina (A). Fases da resposta glicêmica às drogas diabetogênicas (B); aloxana (I-IV), estreptozotocina (II-IV). (Modificado de Lenzen, 2008).

coriomeningite (LCMV) que provoca uma resposta mediada dos linfócitos T contra células β transgênicas (Oldstone et al., 1984).

A estreptozotocina é um antibiótico fúngico (Fig. 2), utilizada no tratamento do câncer de pâncreas, e é seletivamente acumulada nas células β pancreáticas pelo transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2). Esse composto promove a alquilação das

células β que resulta na ruptura das fitas de DNA (Wilson e Leiter, 1990) Este dano ao DNA aumenta a atividade da poli-ADP ribose polimerase (PARP) que por sua vez limita os níveis de NADH intracelulares e ocasiona apoptose das células β (Lenzen, 2008). Os níveis hiperglicêmicos nestes modelos experimentais são alcançados cerca de 10 a 12 horas (Fig. 2B) após um curto período hipoglicêmico (Lenzen, 2008).

3. Hiperglicemia e o estresse oxidativo

Muitos estudos têm demonstrado que o *diabetes mellitus* aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente desencadeia um desequilíbrio no *status* oxidativo (Martin-Galan et al., 2002; Seghrouchni et al., 2002; Varvarovská et al., 2003). A condição hiperglicêmica é associada a alterações de várias vias metabólicas e de sinalização, tais como:

1) Oxidação da glicose

A oxidação da glicose aumenta no citoplasma incrementando a produção de NADH e FADH₂, os quais fazem com que a cadeia respiratória mitocondrial atinja sua capacidade máxima e os elétrons são direcionados de volta ao complexo III, aumentando a produção das ROS devido ao maior fluxo de elétrons (Bonfont-Rousselot, 2002).

2) Via dos polióis

Os altos níveis glicêmicos ativam a via dos polióis que converte a glicose em sorbitol através da aldose redutase. O sorbitol, em seguida, é oxidado à frutose concomitante com a superprodução de NADPH, gerando também sobrecarga do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (Morré et al., 2000).

3) Aumento na produção do diacilglicerol

O aumento do fluxo glicolítico resulta em aumento da síntese de diacilglicerol que ativa a proteína quinase C (PKC) a qual está envolvida em diversos eventos de transdução de sinais (Tangvarasittichai et al., 2015).

4) Via das hexosaminas

O aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDPGlcNAc), resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (Du et al., 2000).

5) Produtos finais de glicação não-enzimática

O aumento de glicose e de outros açúcares no plasma leva à glicação não enzimática de proteínas, lipídios ou DNA e à posterior formação de produtos finais de glicação não-enzimática (AGE) (Baynes et al., 1989; Stitt et al., 1997). Uma das principais reações não enzimáticas é ligação que ocorre entre o oxi-grupo do açúcar e o amino grupo das proteínas (Deyl & Miksik, 1997; Monnier et al., 1992). Os produtos de Amadori são o resultado do primeiro passo irreversível na cascata de reações entre os açúcares e as proteínas. Já os AGE, como a N ϵ -(carboximetil) lisina (CML) e N ϵ -(carboxietil) lisina (CEL), são as estruturas químicas finais derivadas de rearranjos dos produtos de Amadori (Denis et al., 2002). A renovação de moléculas modificadas por AGE ocorre via receptores de AGE (RAGE) presentes na superfície celular, mediando a endocitose e subsequente degradação, tendo importante função no catabolismo dos AGE. Os RAGE são compostos de 3 domínios extracelulares e um domínio transmembrana, o qual está conectado a um domínio intracelular (Bierhaus et al., 2009). A meia-vida de proteínas, duração das condições e os níveis hiperglicemia são fatores cruciais na formação dos AGE (Prasad et al., 2014).

Tem sido constatado que a formação de ROS pelos AGE depende ligação com seus receptores (RAGE) e subsequente ativação de NADPH oxidase (Walter et al., 2001; Yan et al., 1994). A ativação dos RAGE pode também alterar a transdução de sinais e processos genômicos através do fator nuclear β (NF- κ B), ocasionando a expressão de genes pró-inflamatórios (Bierhaus et al., 2009; Du et al., 1998; Waltier et al., 2001) e a indução de apoptose (Denis et al., 2002; Naruse et al., 2000). A interação AGE-RAGE tem sido correlacionada à formação e progressão de tumores, visto que acentua também a síntese de fatores de crescimento e citocinas importantes para o crescimento celular, bem como de (como MMP-2 e MMP-9) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) envolvidas na invasão e metástase de células cancerosas. (Kuniyasu et al., 2002; Singh et al., 2001). Estudos mostraram que o bloqueio do sinal de RAGE inibe o crescimento e a metástase de células de glioma (Taguchi et al., 2000).

A produção de ROS tais como peroxila (LO_2), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), oxigênio *singlet* (1O_2) entre outros, culmina no aumento da peroxidação lipídica, danos no DNA como a formação de aductos tais como a 8-oxo-guanina, ruptura das fitas e inativação de enzimas de reparo (Gupta et al., 2004; Koyu et al., 2006; Koyuturk et al., 2006) alterando a expressão gênica. As células com comprometimento do DNA que não ativam mecanismos de apoptose podem iniciar

processos de carcinogênese. O aumento na produção de ROS está envolvido em vários estágios da progressão tumoral incluindo a indução, proliferação, adesão e invasão (Pani et al., 2010). Vale ressaltar que tem sido cada vez mais constatado a influência dos ROS na carcinogênese em diversos tecidos (Gago-Domingues et al., 2005; Kotrikadze et al., 2008; Spector, 2000; Thanan et al., 2014), inclusive na próstata (Pande et al., 2013; Paschos et al., 2013).

4. Terapia com antioxidantes: melatonina

A fim de auxiliar nos sistemas antioxidantes endógenos têm sido utilizados vários tipos de antioxidantes, como as vitaminas A, C e E, ácido lipóico, flavonoides, carnitina, licopeno e ômega 3. Os antioxidantes atenuam as alterações biológicas relacionadas à hiperglicemia tais como a expressão de citocinas e a renovação celular, em diferentes sistemas orgânicos (Abdali et al., in press; Cameron e Cotter, 1999; Fernandes et al., 2011, Gobbo et al., 2012b; Muralidhara, 2007a,b; Oyenihi et al., 2015; Rahimi et al., 2005).

A melatonina (MLT, N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal e foi inicialmente descrito por modular hormônios e o ritmo de vários processos fisiológicos em resposta às variações no foto período (Macchi e Bruce, 2004; Peschke et al., 2007). Este hormônio é amplamente conhecido como um regulador da fisiologia reprodutiva à luz ambiental em mamíferos sazonais (Reiter et al., 2010). Sua síntese (Fig. 3) ocorre a partir do triptofano o qual é convertido à serotonina, esta por sua vez, é acetilada e posteriormente convertida à melatonina (Pandi-Perumal et al., 2006). Há dois grandes declives nos níveis de melatonina, durante a puberdade e na transição da fase adulta para a senescência (Touitou et al., 2001).

Trata-se de um hormônio com muitas funções, entre as quais se destacam a ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral atuando também no metabolismo energético. Seu papel antioxidante se deve a sua capacidade de atuar como um doador de elétrons, inibir as enzimas da família da P450, sequestrar ROS (como hidroxila e peroxila), regular a expressão de enzimas antioxidantes e influenciar os níveis endógenos de glutathione reduzida (GSH) (Mayo et al., 2002; Pandi-Perumal et al., 2006; Tan et al., 2012; Vural et al., 2001; Zhepy et al., in press). Há relatos de que a melatonina agiria sinergicamente com as vitaminas C e E (Cuzzocrea e Reiter, 2001),

sendo mais eficiente que tais antioxidantes clássicos. A melatonina também suprime a atividade de enzimas pró-oxidantes mitocondriais e estabiliza a membrana mitocondrial interna (Acuña-Castroviejo, 2011). Os efeitos anti-inflamatórios se devem à ativação de macrófagos e linfócitos e de enzimas envolvidas em processos que reduzem a produção intracelular de prostaglandinas e leucotrienos (Ragdong et al., 2010). Tem sido sugerido que a melatonina promove uma regulação temporal do sistema imune (Esquifino et al., 2004). A administração de MLT a ratos submetidos à dieta hiperlipídica promoveu a perda de peso corpóreo e de gordura abdominal (Rios-Lugo et al. 2010; Wolden-Hanson et al., 2000; Wan et al. 2013) além de atenuar a hiperinsulinemia, reduzir os níveis de triglicerídeos e do colesterol total e normalizar os níveis de glicose e leptina (Prunet-Marcassus et al., 2003; Rasmussem et al., 1999; 2001; Watve e Yajnik, 2007).

Esta indolamina se liga a receptores específicos de 3 subtipos (MT1, MT2 e MT3) acoplados à proteína G. Esta via de sinalização suprime atividade da adenilil ciclase, reduzindo os níveis intracelulares do AMP cíclico (AMPC) e modificando o status fosforilativo e ação de proteínas alvo (Reppert et al., 1995). Além disso, a melatonina pode agir diretamente no núcleo (Becker-Andre et al., 1994) por meio dos receptores nucleares retinóides (RZR/ROR α e RZB β) e no citoplasma por meio da calmodulina e quinona redutase (Benitez-King et al, 1993; Nosjean et al., 2000).

A MLT vem sendo utilizada como adjuvante no tratamento de diversas doenças,

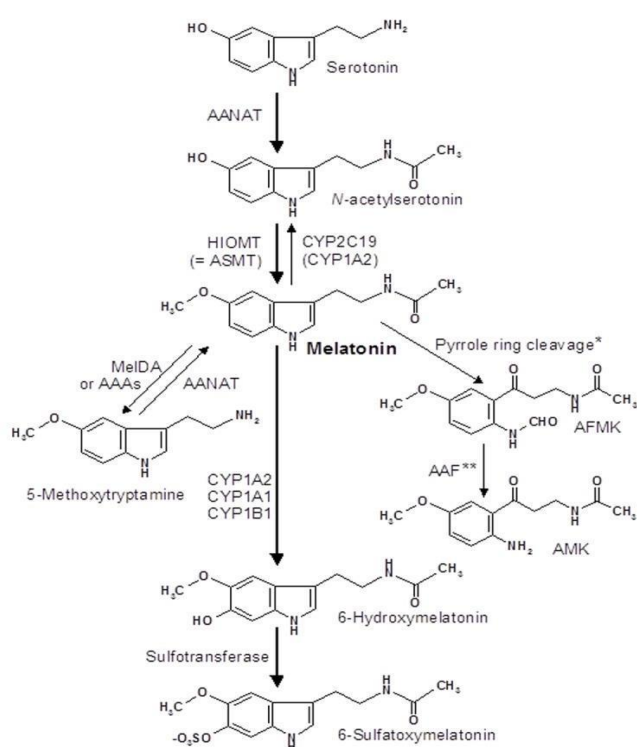


Figura 3 - Biosíntese e catabolismo da Melatonina. A via principal está indicada pelas setas em negrito. Legenda: AAAs – aril acilamidases; AAF – arilamina formamidase; AANAT – arilalquilamina N-acetiltransferase; AFMK – N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina; AMK – N1-acetil-5-metoxiquinuramina; ASMT – acetilserotonina metiltransferase; CYP - citocromo P450 monoxigenase ou dealquilase; HIOMT – hidroxindol O-metiltransferase; MeIDA – melatonina deacetilase; * Clivagem do anel pirrólico é catalisada por diversas enzimas, como indolamina 2,3-dioxigenase, mieloperoxidase, outras peroxidases e espécies reativas de oxigênio; ** Alternativamente, AFMK pode ser deformilada por hemoperoxidases e mecanismos fotoquímicos (Hardeland, 2012).

tais como o câncer, endometriose e distúrbios do sono (Costello et al., 2014; Mehta et al., 2014; Reiter, 2007; Schwertner et al., 2013). Existem evidências na literatura da associação entre distúrbios na síntese de melatonina e desordens como o *diabetes mellitus* (Champney et al. 1985; 1986; Peschke et al., 2006; 2007). A pinealectomia leva a um desequilíbrio na secreção de insulina em ratos Wistar (Seraphim et al., 2000). Desse modo, a liberação da insulina, em humanos, possui um pico durante o dia e uma diminuição durante a noite, o qual é oposto ao padrão de liberação de melatonina pela pineal (Bazwinky-Wutschke et al., 2012; Peschke, 2007). Os indivíduos diabéticos possuem um ritmo circadiano prejudicado (O'Brien et al., 1986), além disso, a síntese de MLT pela glândula pineal é afetada pela hiperglicemia (Amaral et al., 2014). Esse neurohormônio ocasiona a inibição da via AMPc e diminui liberação da insulina (Pechke et al., 2002) e parece promover a melhora da sensibilidade à insulina por meio da fosforilação de componentes da via de sinalização da insulina tais como IRS-1 e IRS-2 (Zanuto et al., 2013).

5. *Consequências do diabetes mellitus na próstata*

O diabetes mellitus é associado a complicações sistêmicas como infecções, neuropatia e angiopatia, as quais afetam o trato genital. Alguns efeitos nocivos do diabetes sobre a função reprodutiva masculina são bem conhecidos, como a impotência, a redução da libido e do potencial reprodutivo devido à diminuição da quantidade e qualidade dos espermatozoides e infecções unárias (Arrellano-Valdez et al., 2014; Kolodny et al., 1874; Stege e Rabe, 1997).

Alguns estudos clínicos apontam para um declínio no risco de desenvolvimento do câncer de próstata especialmente no DM do tipo 1 (Fall et al., 2013; Moreira et al., 2011; Xu et al., 2013; Yu et al., 2013), devido à carência de insulina e declínio dos níveis séricos de testosterona (Bhasin et al., 2007; Cap, 2012). Entretanto, outros estudos apontam para maior susceptibilidade ao acometimento tumores prostáticos em indivíduos diabéticos (Hammarsten e Hogstedt, 2002; Park et al., 2014; Shiozawa e Horie et al., 2014). Além disso, pesquisas com indivíduos afetados pelo câncer de próstata submetidos à terapia de privação androgênica evidenciaram que há um risco desses indivíduos desenvolverem resistência à insulina e hiperglicemia (Basaria et al., 2006; Tsai et al., in press).

Os efeitos dessa desordem metabólica têm sido vastamente pesquisados na próstata de roedores com o uso de modelos de experimentais de diabetes induzido ou espontâneo e evidenciaram que há um prejuízo precoce deste órgão (Barbosa-Desongles et al., 2013; Cagnon et al., 2000; Carvalho et al., 2003; Cagnon e Fávoro, 2009; Fávoro et al., 2009; Porto et al., 2011; Ribeiro et al., 2006; Ye et al., 2011; Yono et al., 2008). Ambos os compartimentos, epitelial e estromal, são afetados por essa doença, sendo constatada a atrofia da glândula (Fig. 4), comprometimento da atividade secretora, aumento dos níveis apoptóticos, diminuição da proliferação celular, remodelamento dos componentes da matriz extracelular e mudanças fenotípicas nas células estromais tais como dilatação das organelas e aproximação dos corpos densos citoplasmáticos (Arcolino et al., 2010; Cagnon et al., 2000; Carvalho et al. 2003; Fávoro et al., 2009; Fávoro e Cagnon, 2010; Gobbo et al., 2012a; Ribeiro et al., 2006; 2008; 2009; Suthagar et al., 2009). Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa constataram maior incidência de lesões malignas e pré-malignas na próstata de animais diabéticos após 3 meses de exposição à doença (Ribeiro et al., 2008). Embora não se possam negligenciar os efeitos das drogas diabetogênicas, é válido ressaltar que o diabetes induzido experimentalmente acarreta o remodelamento das fibras colagênicas interacinárias, processos inflamatórios e alteração as proteínas de adesão, fatores que podem favorecer o estabelecimento das neoplasias intraepiteliais e adenocarcinoma (Cagnon et al., 2000; Cagnon e Fávoro, 2009; Ribeiro et al., 2006). Além disso, esse distúrbio metabólico afeta negativamente a maturação prostática (Soudamani et al., 2005) e a indução do diabetes materno durante gravidez acarreta reprogramação metabólica e hormonal da prole que interfere na histofisiologia prostática durante a vida adulta (Damasceno et al., 2014). Estudos com análises de cDNA *microarray* evidenciaram que o diabetes experimental pode alterar a expressão de múltiplos genes na próstata, particularmente aqueles relacionados à proliferação celular, diferenciação, biomarcadores de estresse oxidativo, reparos de danos ao DNA e apoptose (Ye et al., 2011).

Além dos baixos níveis de glicose intracelulares, outro sintoma desse distúrbio que modula tais alterações na próstata é a queda androgênica (Chandrashekar et al., 1991; Yono et al., 2005) originária de desequilíbrio no eixo pituitária-gonadal, afetando a secreção de hormônios que estimulam a síntese androgênica pelas células de Leydig (Bebakar et al., 1990; Bhasin et al. 2007; Ikeda et al. 2000). Em paralelo a essa escassez androgênica a expressão dos receptores de andrógeno (AR) é alterada (Arcolino et al. 2010; Gobbo et al., 2012b; Tesone et al., 1980). A expressão de AR é normalizada com

a reposição de insulina, a qual é mais eficiente quando associada à terapia hormonal com testosterona e estrógeno (Fávaro e Cagnon et al., 2010; Suthagar et al., 2009). Entretanto, nem mesmo o tratamento combinado com testosterona e insulina foi capaz de normalizar os níveis de proliferação celular em camundongos diabéticos (Favaro et al., 2009).

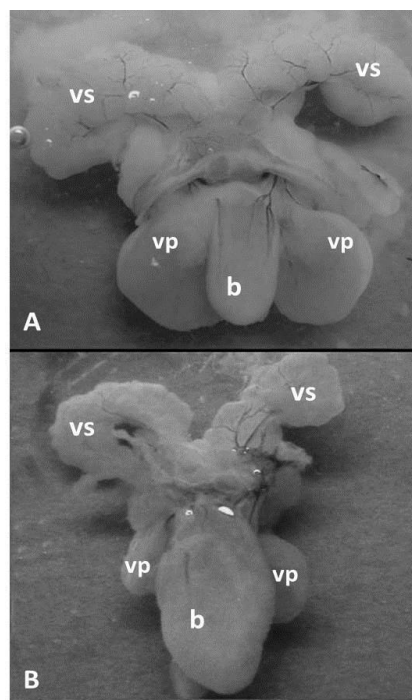


Figura 4 - Aspecto macroscópico do lobo ventral da próstata de ratos saudáveis (A) e submetidos ao diabetes induzido por estreptozotocina sem tratamento (B).
Legenda: b - bexiga;
vs – vesícula seminal;
vp – próstata ventral.

Tem sido observado que a reposição de insulina potencializa os efeitos da administração de testosterona em culturas de células prostáticas e normaliza tanto o peso prostático quanto os níveis séricos de testosterona em animais diabéticos (Calame e Lostroh, 1964; Lostroh, 1970; Sudha et al., 2000; Suthagar et al., 2009; Wang et al., 2000). Análises prévias demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos por aloxana com insulina mantém os níveis de testosterona circulantes, bem como preserva parcialmente a morfologia de células estromais, em especial dos fibroblastos (Arcolino et al., 2010; Gobbo et al. 2012a). Também foi constatado nesses estudos que a reposição de insulina protege contra os desequilíbrios nas taxas de apoptose, mas não afeta os níveis de proliferação celular (Arcolino et al., 2010).

Recentemente (Gobbo et al. 2012b), nós analisamos os efeitos do diabetes induzido por estreptozotocina sobre o sistema antioxidante da próstata, os processos de morte e proliferação celular bem como o papel protetor da vitamina C frente a este distúrbio. Foi constatado que um mês de diabetes não foi suficiente para alterar os biomarcadores de estresse oxidativo no plasma aumentando apenas os níveis de atividade das enzimas catalase e glutathione S-transferase (GST). O tratamento com

vitamina C normalizou os níveis de GST e diminuiu os níveis apoptóticos elevados pelo diabetes. Esse estudo mostrou que um mês de diabetes já compromete alguns biomarcadores do sistema antioxidante prostático, aumenta a imunexpressão dos AGE na glândula e que mesmo antioxidantes fracos podem prevenir e até mesmo reverter os danos iniciais do diabetes. Em continuidade a essa linha de investigação que focaliza a interferência de substâncias antioxidantes nos danos teciduais causados na próstata pelo diabetes experimental, nos propomos a avaliar os efeitos da melatonina (MLT).

6. *Problemática do estudo*

A ação da melatonina tem sido elucidada na próstata, e no início especulou-se que sua ação era mediada exclusivamente por receptores específicos (Gilad et al., 1999). Em ratos castrados a suplementação com MLT ocasionava atrofia prostática de maneira dose-dependente (Svrilai et al., 1989). Este efeito atrófico é associado a sua ação antigonadotrófica, que diminui os níveis do hormônio luteinizante (LH), ou de sua ação direta nas células de Leydig (Dubocovich et al., 2005; Yilmaz et al., 2000). Alguns dos genes reguladores do ritmo circadiano, tais como *Dpb* e *Per2*, voltaram a ter oscilação rítmica em estudos *in vitro*, com células cancerosas prostáticas após o tratamento com melatonina (Jung-Hynes et al., 2010). A inibição do crescimento tumoral em humanos e roedores tem sido descrita para a MLT (Sainz et al., 2005; Siu et al., 2002; Shiu et al., 2003; Xi et al., 2001). Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que este hormônio exerce ação antitumoral na próstata de diversas maneiras: 1) atenuação do fluxo de cálcio induzido por di-hidrotestosterona (Xi et al., 2000); 2) atraso no ciclo celular na fase G₀/G₁ e encurtamento da interfase (Marelli et al., 2000; Moretti et al., 2000; Siu et al., 2002); 3) efeito pró-apoptótico via p38 e c-Jun N-terminal cinase (JNK) (Joo e Yoo, 2009); 4) aumento da sensibilidade aos quimioterápicos (Rodriguez-Garcia et al., 2012); 5) menor captação de glicose por modulação do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1) (Hevia et al., 2015); 6) impedimento da angiogênese por redução do fator de crescimento endotelial (VEGF) e fatores que agem nas condições de hipóxia tais como o fator indutor de hipóxia 1 α (HIF-1 α) (Park et al., 2009).

Sabe-se que as linhagens de células prostáticas que não expressam AR e, portanto, andrógeno-independentes, tais como PC3 e DU145 são menos sensíveis à melatonina em comparação com as andrógeno-dependentes, tais como a LNCaP e 22Rv1 (Culig et al., 1996; Hevia et al., 2008; Sainz et al., 2005; Tiley et al., 1995). Essa diferença na resposta à MLT pode estar relacionada aos efeitos indiretos deste hormônio devido à

interferência na sinalização de AR, visto que a MLT leva à exclusão nuclear do AR com consequente ação antiproliferativa (Rimler et al., 2001; 2002). Os mecanismos pelos quais a MLT induz a exclusão do AR do núcleo não são compreendidos a contento. A ação antimitogênica da MLT em células prostáticas andrógeno-responsivas é mediada pelo receptor MT1 (Fig. 5), ativação das proteínas quinase A e C (PKA e PKC) e aumento da expressão do gene $p27^{kip1}$ (Shiu et al., 2013).

A maioria dos estudos enfatiza o impacto da administração de melatonina sobre linhagens de células prostáticas cancerosas (Hevia et al., 2010; 2015; Jung-Hynes et al., 2010; Park et al., 2009; Tam et al. 2010) e existem poucas informações sobre os efeitos *in vivo*, de doses prolongadas do hormônio (Agil et al., 2011; Xi et al., 2001). Além disso, há uma escassez de investigações sobre as possíveis interferências da administração da MLT ao longo do desenvolvimento pré-púbere e púbere na histofisiologia, atividade proliferativa e apoptótica da próstata de animais adultos. Considerando que o ambiente hormonal durante a maturação sexual pode afetar esses parâmetros, torna relevante examinar esse aspecto. Tais análises são necessárias para uma melhor compreensão da ação local da melatonina na próstata em condições normais e poderão trazer informações mais consistentes sobre sua aplicação terapêutica no tratamento do câncer de próstata.

Conforme exposto anteriormente, inúmeras evidências indicam a existência de uma relação entre o diabetes e os níveis de melatonina. Diversos relatos também demonstram que a melatonina exerce um papel protetor contra os danos teciduais resultantes do diabetes e drogas diabetogênicas em vários órgãos (Armagan et al., 2006; Feng et al., 2006; Guven et al., 2006; Paskaloglu et al., 2004). Entretanto, no nosso conhecimento, seu possível efeito protetor contra as lesões patológicas ou outras alterações teciduais da próstata causadas pelo diabetes ainda não foram investigadas especificamente. Também não são totalmente conhecidos os efeitos da administração prolongada da melatonina sobre o sistema oxidante dessa glândula. Consideramos que o desenvolvimento de terapias combativas ao estresse oxidativo, baseadas em substâncias naturalmente produzidas pelo organismo, como a melatonina - cujos efeitos gerais demonstram-se atóxicos - representa um avanço para o combate aos efeitos secundários do *diabetes mellitus*. Entretanto, por ser um hormônio de múltiplas funções, sua administração deve ser avaliada com cuidado e de maneira órgão-específica, principalmente no que concerne ao sistema genital. Por essas razões, torna-se relevante investigar se o tratamento com melatonina ao longo do desenvolvimento pré-púbere e

púbere interfere na histofisiologia da próstata e se apresenta um papel protetor contra os danos causados pelo diabetes seja em curto ou longo prazo. O esclarecimento dessas questões certamente fornecerá subsídios para a interpretação das alterações reprodutivas que podem acometer indivíduos com níveis alterados de melatonina, como os trabalhadores noturnos, bem como aqueles tratados com esse hormônio. Também poderão fornecer informações mais seguras sobre a relação entre a melatonina, comprometimento da função prostática e incidência de patologias na glândula de indivíduos diabéticos.

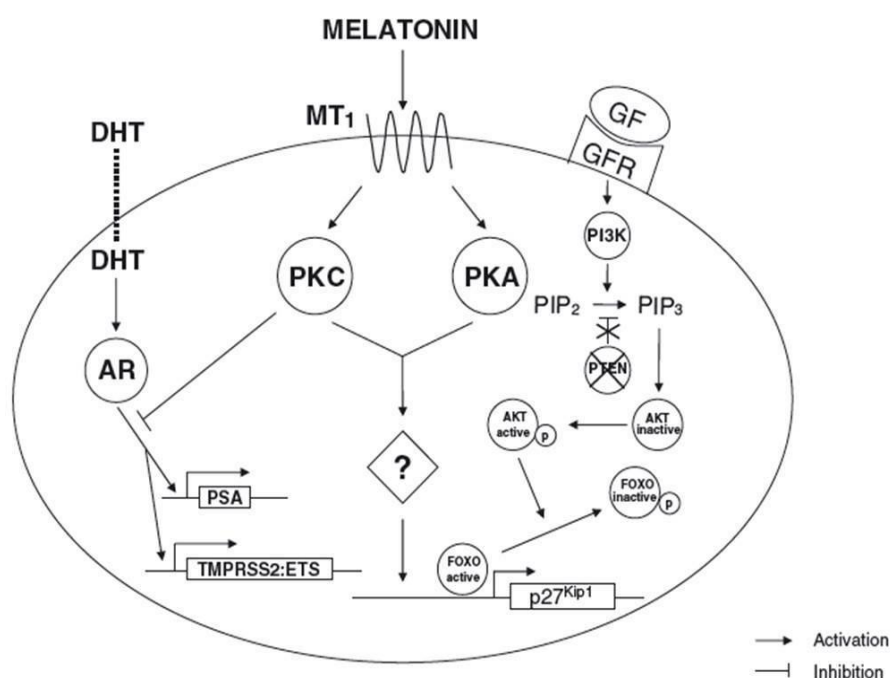


Figura 5 - Diagrama esquemático mostrando as vias de sinalização envolvidas na ação antiproliferativa da melatonina nas células cancerígenas prostáticas e a sua relação com a sinalização de di-hidrotestosterona (DHT), receptor de andrógeno (AR), homólogo fosfatase e tensina (PTEN) e p27Kip1. PKC, proteína quinase C; PKA, proteína quinase A; PSA, antígeno específico prostático; GF, fator de crescimento; GRF, receptor de fator de crescimento; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-difosfato; PIP₃, 3,4,5-trifosfato, AKT, proteína quinase B. (Shiu, 2007).

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- 1) Examinar se a administração exógena de baixas doses melatonina a ratos Wistar, desde o período pré-púbere até a idade adulta, afeta a maturação e histologia da próstata adulta e interfere nas atividades de proliferação e morte celular, sensibilidade androgênica e imunexpressão do receptor de melatonina;
- 2) Avaliar a possível influência protetora do tratamento prévio com melatonina sobre as alterações teciduais e no sistema antioxidante da próstata causadas, em curto (uma semana) e médio termo (8 semanas), pelo diabetes induzido por estreptozotocina.

Capítulo 1

Aceito em Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive organs of rats under experimental diabetes

Marina G. Gobbo^{1,3}, Carolina F. Pereira Costa^{1,3}, Danilo G. Humberto Silva^{1,2} Eduardo A. de Almeida², Rejane M. Góes³

¹Department of Biology and ²Department of Chemistry and Environmental Sciences, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences - Univ Estadual Paulista - UNESP. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Department of Cell Biology, Institute of Biology - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Running head: Melatonin in diabetic male genital tract

Key words: experimental diabetes; oxidative stress; prostate; testis; epididymis and melatonin.

Corresponding author: Prof. Dr. Rejane Maira Góes. Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

Abstract

This study investigated the antioxidant system response of male reproductive organs during early and late phases of diabetes and the influence of melatonin treatment. Melatonin was administered to five-week-old Wistar rats throughout the experiment, in drinking water (10 µg/kg b.w). Diabetes was induced at 13 weeks of age by streptozotocin (4.5 mg/100g b.w., i.p.) and animals were euthanized with 14 or 21 weeks old. Activities of catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and lipid peroxidation were evaluated in prostate, testis and epididymis. The enzymes activities and lipid peroxidation were not affected in testis and epididymis after one or eight weeks of diabetes. Prostate exhibited a 3-fold increase in GPx activity at short-term and a 2-fold increase in CAT at long-term diabetes and an augment of GST in both stages of the disease ($p=0.0186$; $p\leq 0.0001$). Melatonin treatment to healthy rats caused a 47% increase in epididymal GPx activity in 14-week-old rats. In prostate, melatonin administration normalized GST activity at both ages and mitigated GPx at short-term and CAT at long-term diabetes. The testis and epididymis were less affected by diabetes than prostate. Furthermore, melatonin normalized the enzymatic disorders in prostate demonstrating its effective antioxidant role, even at low dosages.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) affects 8.3% of the world population and approximately 5.1 million people aged between 20 and 79 years died from diabetes in 2014 [1]. The high mortality and negative impact of diabetes on life quality is due to the progressive impairment of multiple organ systems, caused mainly by hyperglycemia and oxidative stress [2]. The oxidative status in diabetes is due to impairment of mitochondrial electron transfer, the activation of polyol pathways, the catalysis of cyclo-oxygenase intermediate products and enhanced non-enzymatic glycation [3, 4, 5]. In turn, advanced glycation end-products (AGE) produced by non-enzymatic glycation lead to the generation of reactive oxygen species (ROS), the activation of Bax, and expression of pro-apoptotic and pro-inflammatory genes, such as c-Jun N-terminal kinase [6, 2, 7]. Thus, as confirmed by cDNA microarray analysis, diabetes can alter the expression of multiple genes, particularly those related to cell proliferation and differentiation, oxidative stress biomarkers, DNA damage repair and apoptosis [8].

The vast majority of patients with type 1 DM are diagnosed before the age of 30 and a modest excess of cases occurs in males [9] where its negative influence on reproductive function is relevant. Clinical evidence indicates that diabetes is associated with multiple impairment of male genital physiology, such as reduced androgen levels, erectile dysfunction, retrograde ejaculation, poor semen quality and reduced fertility [10, 11]. Diabetes has also been associated with an increased risk of numerous cancers, but the data concerning prostate cancer are inconsistent [12, 13]. Most evidence, including a meta-analysis [14] of 19 studies published between 1971 and 2005, has indicated an inverse correlation between diabetes and prostate cancer [15, 16].

Most clinical data concerning the negative impact of diabetes on male reproductive physiology have been corroborated by experimental models of induced diabetes [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. The influence of oxidative stress due to diabetes on the response of different genital organs has been previously investigated in rats [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32]. However, information concerning how these changes occur during disease progression is scarce.

The neurohormone melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is secreted rhythmically following a periodicity that is controlled by a circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus [33]. Melatonin (MLT) regulates several physiological functions, according to the light–dark daily cycle. It has been suggested that the rhythmicity of MLT action also controls the activity and gene expression of antioxidant

enzymes [34]. MLT and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) exhibit antioxidant activities that are related to the direct removal of hydroxyl radicals, nitric oxide and peroxynitrite anions acting as free radical scavengers [35, 36, 37, 38]. A few studies using cultured cells indicate that melatonin promoted the generation of ROS at pharmacological concentrations, however its pro-oxidant *action in vivo* remains to be elucidated [39]. Experimental evidence has shown that administration of MLT at doses of 5 mg to 150 mg/kg body weight ameliorates the oxidative status in the pancreas, liver, heart, kidneys and testis [26, 40, 41]. Besides, the administration of low doses of MLT (25 µg/mL) to rats fed with high fat-diet showed that this hormone was able to normalize the altered biochemical pro-inflammatory profile in these animals [42]. The consequences of MLT consumption at low doses during sexual maturation of the male genital organs and their oxidative status at adulthood are unknown. In addition, considering that MLT interferes with androgen production and affects androgen-dependent organs, which also occurs in diabetes, more information is necessary to better discriminate the putative and protective role of exogenous MLT in genital organs under diabetes and also to delineate the response of organs during disease progression. Thus, this study comparatively examined the early and advanced responses of the antioxidant system in rat male genital organs subjected to experimental diabetes and the influence of low MLT dose treatment prior to and concomitant with the disease in these systems.

Material and methods

Experimental design

Eighty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the breeding house of São Paulo State University (Botucatu, SP, Brazil). All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health and acknowledged by the institutional Ethical Committee for Animal Experimentation (Protocol no. 051/2011-CEEA). The animals were kept in polyethylene cages with wood shavings in a 12:12 light/dark cycle, at a temperature of about 22°C and with free access to food (Presence, Invivo, Paulinia, SP, Brazil) and filtered water. After an adaptation period, the rats were weighed and randomly distributed into eight groups (Fig. 1, N = 10 per group). The short-term experiment consisted of a control (C1), a control treated with MLT (M1), one-week-

diabetic rats (D1) and one-week-diabetic rats treated with MLT (MD1). The long-term experiment consisted of a control (C2), a control treated with MLT (M2), two-month-diabetic rats (D2) and two-month-diabetic rats treated with MLT (MD2). The administration of MLT (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) followed the procedures established by Wolden-Hanson et al. [43]. This hormone was dissolved in ethanol and stored in aliquots at -70°C . Rats in groups M1, M2, MD1 and MD2 were provided with MLT from five to 14 weeks of age, via drinking water ($10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ body weight in ethanol 0.001%/day). The MLT intake per day in this investigation was based on a mean daily water consumption of 80 mL/day/animal and a mean body weight of 350 g and was available to the animals in plastic bottles protected from light. These conditions were standardized by the application of various consumption preference and aversion tests; therefore, this is an appropriate dosage for the induction of increased MLT levels during the night [43].

Diabetes was induced in untreated (groups D1 and D2) and MLT-treated (groups DM1 and DM2) rats aged 13 weeks. After 24 h fasting, animals were anesthetized (0.1 mL ketamine and 0.1 mL xylazine/100 g body weight) and injected intraperitoneally with 4.5 mg/100 g body-weight of streptozotocin (Sigma, Louis, MO, USA), diluted in 0.01 M citrate buffer, pH 4.5. The control animals were injected only with citrate buffer. The blood glucose levels were evaluated two days after streptozotocin injection, in the tips of the paws using the glucose monitor Accu-chek (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Only animals that showed blood glucose levels above 220 mg/dL were included in the diabetic groups. Because water consumption is higher for diabetic animals, the MLT dose was corrected for groups D1, D2, MD1 and MD2 following the diagnosis of diabetes. The C1, M1, D1 and MD1 groups were euthanized when with 14 weeks old, and the C2, M2, D2 and MD2 groups were euthanized when 21 weeks old. The rats were euthanized using CO_2 inhalation and were subsequently decapitated for blood collection.

Activity of antioxidant enzymes

The antioxidant enzyme activity of all animals was assayed in the ventral prostate, testis and epididymis and also in blood. After dissection, these organs were weighed and homogenized in 1:4 volume of buffer with protease inhibitors (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 M sucrose, 0.15 M KCl, 1 mM PMSF, pH 7.4) and centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C . The supernatant was then re-centrifuged

at 50.000 g for another 60 min at 2^o C, the supernatant fraction was removed and was used to measure the activity of catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx).

The blood samples were collected in polyethylene tubes containing EDTA immediately after decapitating the animals. For the determination of CAT activity, the blood samples were diluted 50 times in distilled water, whereas for the determination of GPx and GST activities, blood was diluted 20 times in a hemolyzing solution (7 mM 2-mercaptoetanol; 2 mM NADP; 0.27M EDTA)

The CAT activity was quantified at 240 nm for 1 min by the decomposition of 10 mM H₂O₂ [44]. The total GST activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm for 1 min 40 s by an assay containing reduced glutathione (200 mM GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (200 mM CNDB) as substrates, according to Keen et al [45]. The total GPx activity was evaluated by NADPH (0.2M) oxidation, concomitant with GSSG reduction by excess glutathione reductase, using t-butyl hydroperoxide as substrate, causing a decrease in absorbance at 340 nm for 1 min, as according to Sies et al [46]. All tests were performed at room temperature. The total protein content (mg/mL) in the samples was determined using bovine serum albumin as a standard, by the modified Lowry method [47]. The specific molar extinction constant (ϵ) was used to estimate the levels of enzyme activity in U/mg protein ($\epsilon = 0.071 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for CAT, $\epsilon = 6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for GPx and $\epsilon = 9.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for GST). The equation used for enzymatic activity was: (Absorbance variation x 1000/ ϵ x sample volume [μL]/ total protein concentration of the sample [mg/mL]).

Determination of lipid peroxidation levels

The levels of lipid peroxidation were evaluated in the same organs and in blood, by the quantification of malondialdehyde (MDA) levels, an indicator of oxidation. For this, the presence of the colored derivative formed between MDA and 2-thiobarbituric acid (TBA) was detected via HPLC at 532 nm [48]. Quantification of MDA in the tissues was performed with 100 μL of homogenized tissue in buffer (1:4 v/v) and 100–200 μL of plasma. Three hundred μL of 0.4% thiobarbituric acid solution (diluted in 0.2 M HCl) was added to the tissue and plasma samples and they were incubated for 40 min at 90°C in a dry block. The samples of TBA-MDA were extracted with 1 mL n-butanol and centrifuged at 890 g for 3 min at 3^o C. TBA-MDA (20 μL) samples were directly injected in HPLC and monitored at 532 nm. The mobile phase consisted of 50 mM

monobasic phosphate potassium solution, pH 7.0, 20% methanol, and a pumped isocratic flow of 1.0 mL/min. The HPLC system (Shimadzu) consisted of two LC-10ADVP pumps, a SPD-M10ADVP UV-visible detector and a SCL-10AVP controller and a LC-18 (150 × 4.6 mm, 5- μ m pore diameter) column was used. The MDA estimation was based on a standard calibration curve of tetramethoxypropane (TMP) previously prepared using the same procedure as that used for samples. The data were expressed as nmol/mg tissue and μ mol/mL plasma. The equation to calculate the amount of MDA in samples was: (Peak Area/ Slope of calibration curve)/C, C = (sample volume [μ L] x injection volume [μ L])/ 1000 μ L of n-butanol).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed among groups of the same experimental period (Multiple comparison tests) and between both experimental periods for the same treatment (Paired difference tests) using the Statistica 9.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Data were tested for normality and homogeneity of variance assumptions according to the Shapiro–Wilk’s test and Levene’s test, respectively. Groups that met the assumptions (parametric data) were compared by applying a *t* test or one-way ANOVA followed by Tukey’s post-hoc test. Those groups that did not meet the assumptions (non-parametric data) were compared using the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post-hoc test. Data were expressed as mean \pm standard deviation and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Correlation tests were conducted (Pearson’s test for parametric data and Spearman’s test for nonparametric data) between the levels of lipid peroxidation (MDA) and the activity of CAT, GST and GPX, using Statistica 9.0 software (Statsoft Inc.).

Results

Biometric parameters and glycaemia

The body weights were respectively ~16 and ~42% lower ($p \leq 0.001$) after one week (D1) or two months of diabetes (D2), compared to the control groups (Table 1). The MLT treatment did not affect the body weight of normal rats or the body-weight loss in diabetic groups (Table 1).

The ingestion of low doses of MLT also did not influence the weight of the prostate of healthy rats (Table 1). Such treatment avoided the prostatic atrophy induced by short-term diabetes, but not by the long-term treatment (Table 1; $p \leq 0.05$).

In both experiments, the testicular weight was not affected by diabetes independent of treatment with MLT (Table 1). The epididymal weight was higher in the M1 group compared to the diabetic groups (Table 1; $p \leq 0.004$). Diabetes reduced the epididymal weight in both experiments (Table 1; $p \leq 0.04$). Despite the higher epididymal atrophy confirmed in long-term diabetes, the MLT treatment prevented this atrophy (Table 1). Animals showed blood glucose levels that were about three and six times higher after short- or long-term diabetes respectively, than that in the control groups ($p \leq 0.001$), regardless of MLT treatment (Table 1). Administration of MLT did not affect the glucose level homeostasis of groups M1 and M2.

CAT activity

The CAT activity in the blood (Fig. 2A) increased by about 40% in 21-week-old rats in comparison to the 14-week-old rats, but did not change among the groups in both experiments. In the ventral prostate, the CAT activity (Fig. 2B) was unchanged in the groups of the first experiment, but doubled after two months of diabetes compared with the control group and this increase was prevented by MLT treatment. The levels of testicular CAT were higher in the groups of long-term experiment (Fig. 2C, $p \leq 0.04$).

Melatonin had an inhibitory effect on testis CAT activity in long-term diabetes (Fig. 2C). Similar to the testis, the activity of CAT in the epididymis of 21-week-old rats was also higher in comparison to those of 14-week-old healthy rats ($p \leq 0.04$; Fig. 2C and $p \leq 0.01$; Fig. 2D, respectively).

GST activity

GST was the only biomarker of oxidative stress that changed in the blood after short-term diabetes (Fig. 3A). The GST activity increased during short-term diabetes ($p = 0.0042$) and this rise was partially prevented in the MLT-treated group (Fig. 3A); however, blood GST activity decreased ($p = 0.0007$) during long-term diabetes, regardless of the MLT treatment (Fig. 3A). The blood GST activity increased in 21-week-old groups in comparison to younger groups ($p \leq 0.001$). Prostatic GST activity (Fig. 3B) also increased after the onset of diabetes ($p = 0.0186$), and MLT administration prevented this increase only in the long-term experiment. The GST activity was not affected in testis and epididymis among the animals of short and long-term experimental groups (Fig. 3D), however the activity of this enzyme was decreased in the epididymis of older healthy rats, regardless of MLT treatment (Fig. 3D).

GPx activity

The GPx activity in blood had an inverse behavior to GST (Fig. 4A), i.e., the activity was unchanged during short-term diabetes and increased two-fold after two months of diabetes compared to the control group, independent of MLT treatment. In the prostate gland, GPx activity increased ~ 70% one week after the onset of diabetes and MLT normalized this value in the MD1 group; however, it was unaffected in groups of the longer experiment (Fig.4B). The activity of this antioxidant enzyme in testis was not influenced neither by experimental diabetes or melatonin treatment (Fig 4C). There was an increase in GPx activity in the epididymis of healthy rats after MLT treatment in comparison to those in the control group (Fig. 4D; $p = 0.007$). Moreover, the epididymis GPx activity was very low in the two-month experiment (Fig. 4D).

Lipid peroxidation

In blood, the MDA levels were unchanged in the groups of the short-term experiment (Fig. 5A), and increased after two months of untreated diabetes ($p = 0.038$), regardless of MLT treatment. Diabetes did not affect lipid peroxidation in prostate, (Fig. 5G, H), either in the short- or long-term, but MLT treatment reduced by 50% the lipid peroxidation levels of long-term diabetic rats (Fig. 5B). Besides that, prostatic MDA levels were higher in all groups of the long-term experiment compared to the short-term groups ($p \leq 0.04$). The testicular levels of MDA were lower ($p \leq 0.01$) in the groups of the long-term experiment (Fig. 5C) whereas in the epididymis, the peroxidation levels were high in these groups (Fig. 5D; $p \leq 0.04$).

Correlation tests

There was an inverse correlation between lipid peroxidation and GST activity in both short- ($r = -0.477$; $p < 0.05$,) and long-term experiments ($r = - 0.669$; $p < 0.05$), in blood (Fig. 3A and 5A). The increase in GPx activity was directly proportional to the increase in plasma levels of MDA after two months of diabetes ($p < 0.05$ and $r = 0.74$; Fig 4A and 5A).

In the prostate, the rise in GST activity after one week of diabetes correlated inversely with the decrease in prostatic MDA levels ($r = - 0.604$; $p = 0.022$, Fig 3B and 5B).

Discussion

In the present study, we delineate the comparative oxidative status in three important reproductive organs in terms of acute and chronic response to streptozotocin-induced diabetes, based on the activity of the major antioxidant enzymes and quantification of lipid peroxidation. In addition, we analyzed the effects of pre-administration and prolonged use of low MLT doses on the antioxidant system of these organs and its influence on alterations caused by experimentally induced diabetes. However it is worthwhile to mention that the provision of melatonin in the drinking water, although it is less stressful and adequate for long-term experiments, was a limitation for this study since there is no way to know the exact amount of MLT that was ingested by each animal as well as the changes in the daily rhythm of this hormone throughout the experiment. Rasmunssen et al. using a similar experimental protocol [49] verified that rats drank more than 90% of their total daily water during the dark period resulting in higher melatonin levels during the night (150.5 ± 19.2 pg/mL against 24.1 ± 8.8 pg/mL of control) but not in daytime (14.1 ± 2.6 pg/mL against 11.5 ± 0.00 pg/mL of control). As we used the same model of melatonin administration as Rasmunssen et al. [49], we assume that the animals exhibited a comparable pattern of melatonin consumption and probably exhibited elevation in the levels of this hormone in dark period.

The biochemical analysis of the antioxidant system from healthy rats revealed that after 14 weeks of age, the prostate exhibited higher CAT and GST activities compared to the testis and epididymis. However, for 21-week-old rats, similar levels of antioxidant enzyme activities were detected among the three reproductive organs, with the exception of a higher GPx activity in the prostate. Therefore, biochemical analysis indicated that the levels of antioxidant enzyme activity were maintained in the prostate after a two-month interval, which was accomplished by an increase in lipid peroxidation in the gland. In contrast, the testis and epididymis showed an increase in CAT activity during aging. For the epididymis, the increase in CAT activity was accompanied by a decrease in GST and GPx activity. Taken together these findings might explain the higher susceptibility to oxidative stress of the prostate during aging, in comparison to testis and epididymis as indicated by the increase in MDA levels. These data also reinforce the organ specificity of antioxidant defense and the existence of compensatory mechanisms during aging.

The experimental protocol used here for the induction of type I diabetes is widely accepted, and most diabetic rats exhibited glucose levels above 360 mg/dL. As

expected, a drastic reduction in body weight was observed, mainly in animals with chronic untreated diabetes. The body weight or blood glucose levels of normal rats were not affected by MLT treatment. Even in short-term diabetes, MLT ingestion did not normalize the glycemia or ameliorate the severe weight loss, as previously observed with doses above 10 mg/kg b.w. [50, 28, 51]. Some studies with experimental diabetes, including those with high doses of MLT, showed a normalization of blood glucose levels [40, 52] however, this effect of MLT has been clearly reported for obese rodents in which there is an improvement in insulin sensitivity [43, 53]. Furthermore, MLT increases the metabolic activity of brown adipose tissue [54] which might favor weight loss in diabetic animals.

Streptozotocin-induced diabetes caused atrophy in the prostate and epididymis. The atrophy of these androgen-dependent organs was expected, since diabetes leads to androgen withdrawal [55, 56] and has been reported in previous studies using similar protocols for diabetes induction [28, 57, 32]. Some reports indicate a decrease in the relative testicular weight within three weeks of experimentally induced diabetes, but thereafter, testicular atrophy is no longer conspicuous [24,57] and a similar variation was observed here, although this was not statistically significant. Treatment with MLT mitigated prostate atrophy induced by diabetes in the short-term, whereas an opposite effect was observed for the epididymis, where atrophy after short-term diabetes was not prevented, but maintenance of wet weight for long-term diabetic rats was observed. Results of our laboratory demonstrated that maintenance of epididymal weight by MLT after long-term diabetes was due to higher sperm counts in this organ (unpublished data).

The biochemical assays indicated that the prostate exhibited a more pronounced antioxidant system response to diabetes than the epididymis and testis, which were practically unresponsive. Our data demonstrate that GST participates in all phases of prostatic tissue in response to disease, but that early responses also involve the activation of GPx, whereas CAT activation occurs at later stages of untreated diabetes. The early activation of prostate antioxidant enzymes in response to acute diabetes in comparison to the unresponsiveness of the epididymis and testis raises several questions. This response could be due to a higher sensitivity of the prostate to streptozotocin, which is known to potentially generate free radicals [58] and might result in a direct pro-oxidant effect on this gland. The prostate blood barrier acts to the restrict leukocyte passage into the prostatic lumen under inflammatory conditions [59],

however, the permeability of this barrier to ROS is not well known. It is also possible that the prostate antioxidant system is vulnerable to androgen regulation, as shown by in vitro studies [60], and also to the hyperglycemic status [32].

Our findings emphasize that GST is an important component in the defense against oxidative damage in the prostate. These findings agree with previous data that report a pivotal role of GST isoforms in the healthy prostate and in disease progression [61, 62]. The GSTP1 gene, which encodes the pi-class glutathione-S-transferase, is a defense against oxidative damage to the genome and is expressed in high levels by epithelial cells in Proliferative Inflammatory Atrophy (PIA) [61, 62, 63], which are considered to be precursors of pre-malign and malign prostate lesions. The expression of GSTP1 is impaired in prostatic epithelial neoplasia (PIN) and neoplastic lesions, due to somatic “CpG island” DNA methylation changes [63, 60, 64, 65]. Such cells become vulnerable to oxidants and electrophiles, which result in genome damage. Furthermore, studies with transplants of tumor-cell lines demonstrated that the use of Gst-pi-siRNA suppressed the cell proliferation rate and high levels of intracellular ROS occurred in the Gst-pi knockout [63]. Experimental data from our laboratory have shown that the progression of aloxan-induced diabetes can lead to prostatic atrophy and neoplastic lesions in rats [18]. Previous studies regarding medium-term experimental diabetes showed that GST levels increased in the diabetic group and were reduced by vitamin C supplementation, which also restored rates of apoptosis in the prostate [32]. In this context, MLT treatment during diabetes prevented the increase in prostate GST, which might indicate a protective action of this neurohormone in the gland, even at low doses.

The assessment of blood-stress biomarkers was performed, to infer the systemic oxidative status. As expected, the lipid peroxidation rate indirectly demonstrated a rise in reactive oxygen species in chronic diabetes. Lipid peroxidation culminates in reduced membrane fluidity, increased non-specific permeability, and the activation of membrane enzymes [66]. The results here and previous data [32] indicate that blood CAT activities are not altered by diabetes. In addition, they demonstrate the involvement of GST in the short-term systemic response and the suppression of its action at later stages of disease, whereas GPx exhibited the opposite behavior, with a more important role at later stages. Both GST and GPx appeared to be effective in avoiding the increase in oxidative stress due to high glucose levels, and therefore, the levels of plasma lipid peroxidation correlated with the activity of these biomarkers although this inverse correlation was weak for MDA and GST levels.

As previously mentioned, unlike in the prostate, the response of the epididymis and testes to diabetes did not involve an increase in antioxidant enzyme activity. These results differed from data of Muralidhara [28], who observed significant changes in testicular antioxidant enzymes in diabetic rats on the fifth day of exposure to the disease. These discrepancies are presumably due to small differences in streptozotocin doses, the age of the animals used and the duration of the experiment, since this study consisted of eight weeks of experimental diabetes, compared with six weeks in that of Muralidhara [28]. Surprisingly, lipid peroxidation was not affected in the testis after two months of diabetes. An increase in MDA levels was reported by Muralidhara [28] in testicular mitochondria during the progression of diabetes, but no such increase for the testicular microsomal fraction was observed. This difference can be explained by the protective effect of the hematotesticular barrier and also by the existence of other oxidative stress protection mechanisms. Furthermore, our method of MDA extraction was performed using total testis homogenates, not in mitochondria and microsoma as in Muralidhara [28]. Spermatozoa are very vulnerable to oxidative stress, as its polyunsaturated fatty acids in the cell membrane and nuclear and mitochondrial DNA are susceptible to oxidization [67, 68]. Furthermore, spermatozoa are very poor in free radicals scavengers [31]. The process of steroidogenesis produces ROS largely from the mitochondrial respiration chain and the catalytic reactions of the steroidogenic cytochrome P450 enzymes [69, 70]. Otherwise, within in the testis, sperm is reasonably protected from oxidative stress by the microenvironment generated by the Sertoli cells [71]. For these reasons, it is reasonable to assume that the testis provides an environment that is relatively well protected against oxidative stress, as observed here.

Sperm maturation in the epididymis necessitates a certain level of oxidation, because ROS appear to be key modulators of the early signal transduction mechanisms that lead to capacitation [72]. Thus, a fine equilibrium between beneficial oxidation versus detrimental oxidative damage has to be maintained in the epididymal environment [73]. Previous reports indicated that CAT does not appear to be a major participant in the control of oxidative stress in this organ [74], whereas GPx have been implicated in this processes [75] and its expression is regulated by androgens [76]. Except for the increased of GPx activity in epididymis of healthy rats treated with MLT for 9 weeks, our data indicated no marked variations in activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels under diabetes and reinforce the importance of fine

adjustment of epididymal antioxidant system [72, 73] and its resilience to experimental diabetes.

Several studies have demonstrated the protective action of MLT against ROS during aging in various organs [77, 78, 79] however, there is no information concerning organs of the male genital system. These biochemical assays indicated that treatment with low MLT doses did not affect changes in the antioxidant system during aging, except for a discrete reduction in CAT activity in the epididymis.

The present research demonstrates that hyperglycemia can adversely affect the antioxidant defense of blood and tissue extracts, particularly of the prostate. The antioxidant system of the testis and epididymis is less vulnerable to diabetes effects and is probably related to intrinsic characteristics of histophysiology and to the expression pattern of antioxidant enzymes. The MLT treatment mitigated the rise in blood GST activity during the early phase of diabetes. This treatment was more effective for the prostate, mainly in the longer experiment, as demonstrated by normalization of CAT and GST activities and MDA levels. Glutathione-S-transferase proved to be a good marker of compensatory antioxidant defense in the ventral prostate, corroborating our previous data on medium-term diabetes. Melatonin normalized the activities of antioxidant enzymes in the prostate, even at low doses, which demonstrates its effective antioxidant role in this organ.

Acknowledgments

The authors are grateful for the technical assistance of Mr. Luiz Roberto Faleiros Jr., Mr. Guilherme Henrique Tamarindo and Ms. Viviane Sanches Masiteli. The work was supported by: National Research Council (CNPq) - Fellowship for R.M.Góes (number 306258/2011-0). São Paulo State Research Foundation (FAPESP) - Fellowships numbers 2011/19467-0 for MGG and number 2010/20756-4 for CFPC.

References

[1] IDF – International Diabetes Federation –Diabetes Atlas, 2014. Accessed on August 15th, 2014. <<http://www.idf.org/diabetesatlas/6e/Update2014>>.

[2] Wautier, M.P., Chappey O., Corda S., et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. American Journal of Physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab, vol. 280, n.5, pp. 685–694, 2001.

- [3] Montilla, P.L., Vargas J.F., Túnez, I.F., et al. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*, vol 25, n.2, pp. 94-100, 1998.
- [4] Jang, J.S., Lee J.S., Lee J.H., et al. Hispidin produced from *Phellinus linteus* protects pancreatic beta-cells from damage by hydrogen peroxide. *Arch Pharm Res*, vol. 33, n. 6, pp. 853-861. 2010.
- [5] Sivitz, W.I., Yorek, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, vol. 12, n. 4, pp. 537-577, 2010.
- [6] Du, X., Stotcklauser-Farber, K., Rosen, P., et al. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med*, vol. 27, n. 7-8, pp. 752-763. 1998.
- [7] Buccellato, L.J., Tso, M., Akinci, O.I., et al. Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, vol. 279, n. 8, pp. 6753-6760, 2004.
- [8] Ye, C., Li, X., Wang, Y., et al. Diabetes causes multiple genetic alterations and downregulates expression of DNA repair genes in the prostate. *Lab Invest*, vol. 91, n. 9, pp. 1373-1374, 2011
- [9] Weets, I., Van Autreve, J., Van Der Auwera, B.J., et al. Male-to-female excess in diabetes diagnosed in early adulthood is not specific for the immune-mediated form nor is it HLA-DQ restricted: Possible relation to increased body mass index. *Diabetologia*, vol. 44, n. 1, pp. 40 - 47, 2001.
- [10] Kolodny, R.C., Kahn, C.B., Goldstein, H.H., et al. Sexual dysfunction in diabetic men. *Diabetes*, vol. 23, n.4, pp. 306-309, 1974.
- [11] Pitteloud, N., Hardin, M., Dwyer, A.A., et al. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab*. vol. 90, n. 5, pp. 2636-2641, 2005.
- [12] Smith, U., Gale, E.A. Cancer and diabetes: are we ready for prime time? *Diabetologia*, vol. 53, n.8, pp. 1541-1544, 2010.
- [13] García-Jimézes, C., García-Martinez, J.M., Chocarro-Calvo A., et al. A new link between diabetes and cancer: enhanced Wnt/beta-catenin signalling by high glucose. *J. Mol Endocrinol*. vol. 52, n. 1, pp. 51-66, 2013.
- [14] Kasper, J.S., Liu, Y., Giovannucci, E. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer*. vol.124, n. 6, pp. 1398-1403, 2009.
- [15] Turner, E.L., Lane, J.A., Donovan, J.L. et al. Association of diabetes mellitus with prostate cancer: nested case control study (Prostate testing for cancer and treatment study). *Int J Cancer*, vol.128, n.2, pp. 440-446, 2011.

- [16] Yu, O.H., Foulkes, W.D., Dastani, Z, et al. An assessment of the shared allelic architecture between type 2 diabetes and prostate cancer. *Cancer Epidel Biomarkers Prev*, vol. 22, n. 8, pp. 1473-1475, 2013.
- [17] Ribeiro, D.L., Candido, E.M., Caldeira, E., et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*, vol.5, n.1, pp. 51-60. 2006.
- [18] Ribeiro, D.L., Marques, S.F., Alberti, S., et al. Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, vol. 89, n. 4, pp. 276-283, 2008.
- [19] Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., Góes, R.M. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulfate proteoglycans of the rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, vol. 90, n. 4, pp. 400-411, 2009.
- [20] Scarano, W.R., Messias, A.G., Oliva, S.U., et al. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl*, vol.29, n. 4, pp. 482-488, 2006.
- [21] Gunell, E., Tugyan, K., Ozturk, H., et al. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res*, vol.40, p. 4, pp. 354-360, 2008.
- [22] Arcolino, F.O., Ribeiro, D.L., Gobbo, MG, et al. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, vol.91, n. 2, pp.144-154, 2010.
- [23] Gobbo, M.G., Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., et al. Short-term stromal alterarions in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and influence of insulin replacement. *Micron*, vol.43, n. 2, pp. 326-333, 2011.
- [24] Navarro-Casado, L., Juncos-Tobarra, M.A., Cháfer-rudilla M., et al. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity study in rats. *J. Androl*, vol. 31, n.6, pp. 584-592, 2010.
- [25] Yono, M., Mane, S.M., Lin, A., Weiss, R.M, et al. Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sci*, vol. 83, n. 5-6, pp.192-197, 2008.
- [26] Armagan, A., Uz, E., Yilmaz, H.R., et al. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl*, vol. 8, n.5, pp. 595–600, 2006.
- [27] Sönmez, M., Yüce, A., Türk G. et al. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol*, vol. 23, n. 2, p.p. 226-231, 2007.

[28] Muralidhara, S.B. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl*, vol. 30, pp. 508-518. 2007a.

[29] Muralidhara, S.B. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol*, vol. 23, pp. 578-587, 2007b.

[30] Amiri, I., Karimi, J., Piri H., et al. Association between nitric oxide and 8-hydroxydeoxyguanosine levels in semen of diabetic men. *Syst Biol Reprod Med*, vol. 57, n.6, pp. 292- 295, 2011.

[31] Bal, R., Türk, G., Tuzcu M, et al. Protective effects of nanostructures of hydrated C(60) fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats. *Toxicology*, vol. 282, n.3, pp. 69-81, 2011.

[32] Gobbo, M.G., Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., et al. Oxidative estress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats is diminished by vitamin C. *J Cellular Biochem*, vol. 113, n. 7, pp. 2223-2233, 2012.

[33] Reiter, R.J., Tan, D.X., Fuentes-broto, L., et al. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*, vol 181, pp. 125-151, 2010.

[34] Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, vol. 36, n.1, pp.1-9, 2004.

[35] Matuszak, Z., Reszka, K., Chignell, C.F. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic Biol Med*, vol. 23, n. 3, pp. 367-372, 1997.

[36] Huang, M.D., Sun, X., Cao, X., H.U., et al. The protective effect of melatonin on auditory cortex toxicity induced by cis-platinum. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, vol. 25, n. 4, pp. 539-542, 2009.

[37] Reiter, R.J., Manchester LC, Tan, D.X. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol*, vol.8, n. 3, pp. 194-210, 2010.

[38] Galano, A.L., Tan, D.X., Reiter, R.J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res*. vol. 54, n. 3, pp. 245-257, 2013.

[39] Zhang, H.M., Zhang, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*, vol. 57, n. 2, pp.131-146, 2014.

[40] Rao, V.S., Santos, F.A., Silva, R.M., et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. *Vascul Pharmacol*, vol.38, n.3, pp. 127-130, 2002.

- [41] Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., et al. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Funct.* vol. 21, n.2, pp. 121-125, 2003.
- [42] Barquilla, P.C., Pagano, E.S., Jiménez-Ortega V, et al. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Pineal Res.*, vol.57, n.3, pp. 280-90, 2014.
- [43] Wolden-Hanson, T., Mitton, D.R., Mccants, R.L., et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinol.*, vol.141, n.2, pp. 487-497, 2000.
- [44] Beutler, E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* Catalase New York: Grune and Straton, p. 105–116, 1975.
- [45] Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, vol. 251, n.2, pp. 6186-6188, 1976.
- [46] Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett*, vol. 103, n.2, pp. 287-290, 1979.
- [47] Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, vol.83, n.2, pp. 346-356, 1977.
- [48] Almeida, E.A., Bainy, A.C., Loureiro, A.P., et al. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. *Bull Environ Contam Toxicol*, vol.71, n.2, pp. 270-275, 2003.
- [49] Rasmussen, D.D., Boldt, B.M., Wilkinson, C.W., Yellon, S.M., Matsumoto, A.M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*, vol.140, p. 1009–1012, 1999.
- [50] Klepac, N., Rudes, Z., Klepac, R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed Pharmacother*, vol.60, n.1, pp. 32-35, 2005.
- [51] Akmali, M., Ahmad, I.R., Vassal, M. Pre- and Post-treatment of Streptozotocin administered rats with melatonin: effects on some hepatic enzymes of carbohydrate metabolism. *Arch Iran Med*, vol. 13, n.2, pp. 105-110, 2010.
- [52] Sudnikovich, E.J., Maksimchik, Y.Z., Zabrodskaya, S.V. et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol*, vol. 569, n.3, pp. 180-187, 2007.
- [53] Zanuto, R., Siqueira-filho, M.A., Caperuto, L.C., et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J Pineal Res*, vol. 55, n. 2, pp.156-165, 2013.

[54] Tan, D.X., Manchester, L.C., Fuentes-Broto, L., et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*, vol.12, n. 3, pp. 167-188, 2011.

[55] Seethalakshmi, L., Menon, M., Diamond, D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol*, vol.138, n. 1, pp. 190-194, 1987.

[56] Steger, R.W., Amador, A., Lam, E., et al. Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology*. vol.124, n. 4, pp. 1737-1743, 1989.

[57] Fernandes, G.S., Fernandez, C.D.B., Campos, K.E.C., et al. Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats. *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 9, pp. 1-9, 2011.

[58] Murata, M., Takahashi, A., Saito, I., et al. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*, vol.57, n. 8, pp. 881-887, 1999.

[59] Fulmer, B.R., Turner, T.T. A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. *J Urol*, vol. 163, n.5, pp. 1591-1594, 2000.

[60] Pinthus, J.H., Bryskin, I., Trachtenberg, J., et al. Androgen induces adaptation to oxidative stress in prostate cancer: implications for treatment with radiation therapy. *Neoplasia*, vol. 9, n.1, pp. 68-80, 2007.

[61] Parsons, J.K., Nelson, C.P, Gage, W.R., et al. GSTA1 Expression in normal, preneoplastic, and neoplastic Human prostate Tissue. *Prostate*, vol. 49, n.1, pp.30-37, 2001.

[62] De Marzo, A.M., Nakai, Y., Nelson, W.G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*, vol. 2, n.5, pp. 398-400, 2007.

[63] Naiki, T., Asamoto, M., Toyoda-hokaiwado, N. et al. Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. *Prostate*, vol.72, n. 5, pp. 533-541, 2012.

[64] Hayes, J.D., Pulford, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol.30, n.6, pp. 445-600, 1995.

[65] Sarafinavska, Z.A., Eken, A., Matevska, N., et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem*, vol.42, p. 1228–1235, 2009.

[66] Gil, H.W., Oh, M.H., Woo, K.M., et al. Relationship between pulmonary surfactant protein and lipid peroxidation in lung injury due to paraquat intoxication in rats. *Korean J Intern Med*, vol.22, n.2, pp. 67-72, 2007.

- [67] Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest*, vol. 119, n.7, pp. 2074-2085, 2009.
- [68] Aitken, R.J., Koppers, A.J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*, vol.13, n. 1, pp. 36 – 41, 2011.
- [69] Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-ketela, T. et al. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*, vol. 137, n.1, pp. 105-112, 1996.
- [70] Hales, D.B. Another piece in the maddening puzzle of declining steroidogenesis in aging Leydig cells. *J Androl*, vol. 23, n. 3, pp. 327-328, 2002.
- [71] Bauché, F., Fouchard, M.H, Jégou, B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett*, vol. 249, n. 3, pp. 392-396, 1994.
- [72] Aitiken, R.J., Paterson, M., Fisher, H., et al. Redox regulation or tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in control of human sperm function. *J. Cell. Sci*, vol.108, n. 5, pp. 2017-2025, 1985.
- [73] Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., et al. Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice, *PLoS One*, vol.7, n. 9, p. 1-15, 2012.
- [74] Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C, et al. Analysis of reactive oxygen species generating system in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod*, vol.65, n. 4, pp. 1102-1113, 2001.
- [75] Schwaab, V., Lareyre, JJ, Vernet, P, et al. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.Suppl*, vol.53, pp. 157–162, 1998.
- [76] Ezer, N., Robaire, B. Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy. *Endocrinology*, vol. 144, n.3, p. 975-988, 2003.
- [77] Kleszczynski, K., Fischer, T.W., Melatonin and human skin aging. *Dermatoendocrinol*, vol.4, n. 3, pp. 245-252, 2012.
- [78] Lord, T., Nixon, B., Jones, K.T, et al. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Bio Reprod*, vol. 88, n.3, p. 63-67, 2013.
- [79] Manikonda, P.K., Jagota, A. Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology*. vol.13, n.5, pp. 511-524, 2012.

Table 1. The mean and standard deviation of body, prostate, testis and epididymis wet weight and blood glucose levels of short- and long-term experimental groups. C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). *Different lowercase letters indicate statistical differences among short-term experimental groups (parametric data: prostate and epididymis weight; non-parametric data: body and testis weight and blood glucose levels). Different uppercase letters indicate statistical differences among long-term experimental groups (parametric data: prostate weight; non-parametric data: body, testis and epididymis weight and blood glucose levels). *Indicates a statistical difference between experimental periods (parametric data). #Indicates a statistical difference between experimental periods (non-parametric data).

	C1	M1	D1	MD1
Body weight (g)	383.27 ± 39.92 ^a	390.85 ± 66.88 ^a	320.94 ± 46.91 ^U	293.85 ± 28.67 ^U
Prostate weight (mg)	371.57 ± 36.04 ^a	346.1 ± 42.28 ^{a,d}	288.53 ± 68.19 ^D	328.68 ± 82.24 ^{a,d}
Testis weight (g)	1.694 ± 0.10 ^{a,u}	1.795 ± 0.22 ^a	1.629 ± 0.19 ^{a,u}	1.570 ± 0.09 ^U
Epididymis (mg)	540.86 ± 0.06 ^{a,d,c}	590.39 ± 0.09 ^a	494.22 ± 0.11 ^{d,c}	496.58 ± 0.06 ^c
Blood glucose levels (mg/dL)	111.21 ± 33.10 ^a	102.85 ± 16.63 ^a	359.66 ± 79.48 ^U	404.18 ± 32.36 ^U

	C2	M2	D2	MD2
Body weight (g)	451.71 ± 16.14 ^{A#}	450.57 ± 40.72 ^{A,C*}	259.66 ± 14.22 ^{B#}	295.2 ± 59.33 ^{B,C}
Prostate weight (mg)	613.4 ± 89.0 ^{A*}	543.33 ± 67.58 ^{A*}	219.6 ± 50.53 ^B	231.5 ± 34.88 ^{B*}
Testis weight (g)	1.812 ± 0.09 ^{A*}	1.701 ± 0.21 ^A	1.603 ± 0.24 ^A	1.504 ± 0.30 ^A
Epididymis (mg)	728.64 ± 0.05 ^{A*}	612.35 ± 0.15 ^{A,B}	466.04 ± 0.05 ^B	733.75 ± 0.17 ^{A,B*}
Blood glucose levels (mg/dL)	87.85 ± 11.12 ^{A#}	89 ± 9.05 ^A	491.16 ± 56.55 ^{B*}	483.4 ± 84.2 ^{B*}

Figure legends

Figure 1. Experimental design of the study. Melatonin was offered in the drinking water (10 µg/kg b.w), and diabetes was induced by streptozotocin injection (4.5 mg/100g b.w., i.p.). C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). The euthanasia was performed at 13 weeks of age for short-term experiment and at 21 weeks of age for long-term experiment.

Figure 2. Catalase activity (U/mg protein) in blood (A), prostate (B), testis (C) and epididymis (D) of short- and long-term experiments. C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). Different lowercase letters indicate statistical differences among short-term experimental groups (parametric data: A, B, C and D). Different uppercase letters indicate statistical differences among long-term experimental groups (parametric data: A and D; non-parametric data: B and C). *Indicates a statistical difference between experimental periods (parametric data). # Indicates a statistical difference between experimental periods (non-parametric data).

Figure 3. Glutathione-S-transferase activity (U/mg protein) in blood (A), prostate (B), testis (C) and epididymis (D) extracts. C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). Different lowercase letters indicate statistical differences among short-term experimental groups (non-parametric data: A, B, C, and D). Different uppercase letters indicate statistical differences among long-term experimental groups (parametric data: C and D; non-parametric data: A and B). *Indicates a statistical difference between experimental periods (parametric data). # Indicates a statistical difference between experimental periods (non-parametric data).

Figure 4. Glutathione peroxidase activity (U/ mg protein) in blood (A), ventral prostate (B), testis (C) and epididymis (D) of rats. C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). Different lowercase letters indicate statistical differences among short-term experimental groups (parametric data: C; non-parametric data: A, B and D). Different uppercase letters indicate statistical differences among long-term experimental groups (parametric data: B, C and D; non-parametric data: A). [#] Indicates a statistical difference between experimental periods (non-parametric data).

Figure 5. Lipid peroxidation quantified by MDA levels in plasm (A, $\mu\text{mol} / \text{mL}$ plasm) and in extracts (U / mg protein) of prostate (B), testis (C) and epididymis (D). C1: One-week control; M1: One-week control treated with melatonin; D1: One-week diabetic; MD1: One-week diabetic treated with melatonin; C2: Two-month control; M2: Two-month control treated with melatonin; D2: Two-month diabetic; MD2: Two-month diabetic treated with melatonin (N=10 animals/group). Different lowercase letters indicate statistical differences among short-term experimental groups (parametric data: B, C and D; non-parametric data: A). Different uppercase letters indicate statistical differences among long-term experimental groups (parametric data: D, non-parametric data: A, B, C). *Indicates a statistical difference between experimental periods (parametric data). [#] Indicates a statistical difference between experimental periods (non-parametric data).

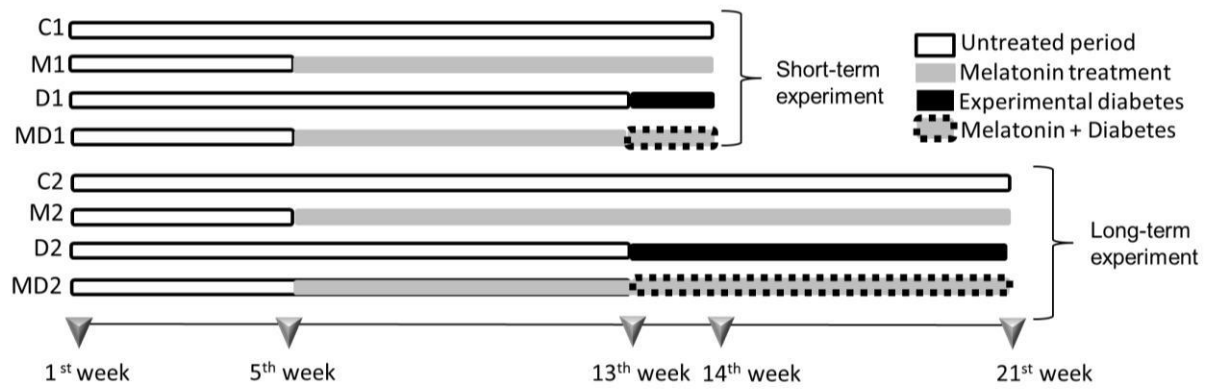
Figure1

Figure 2

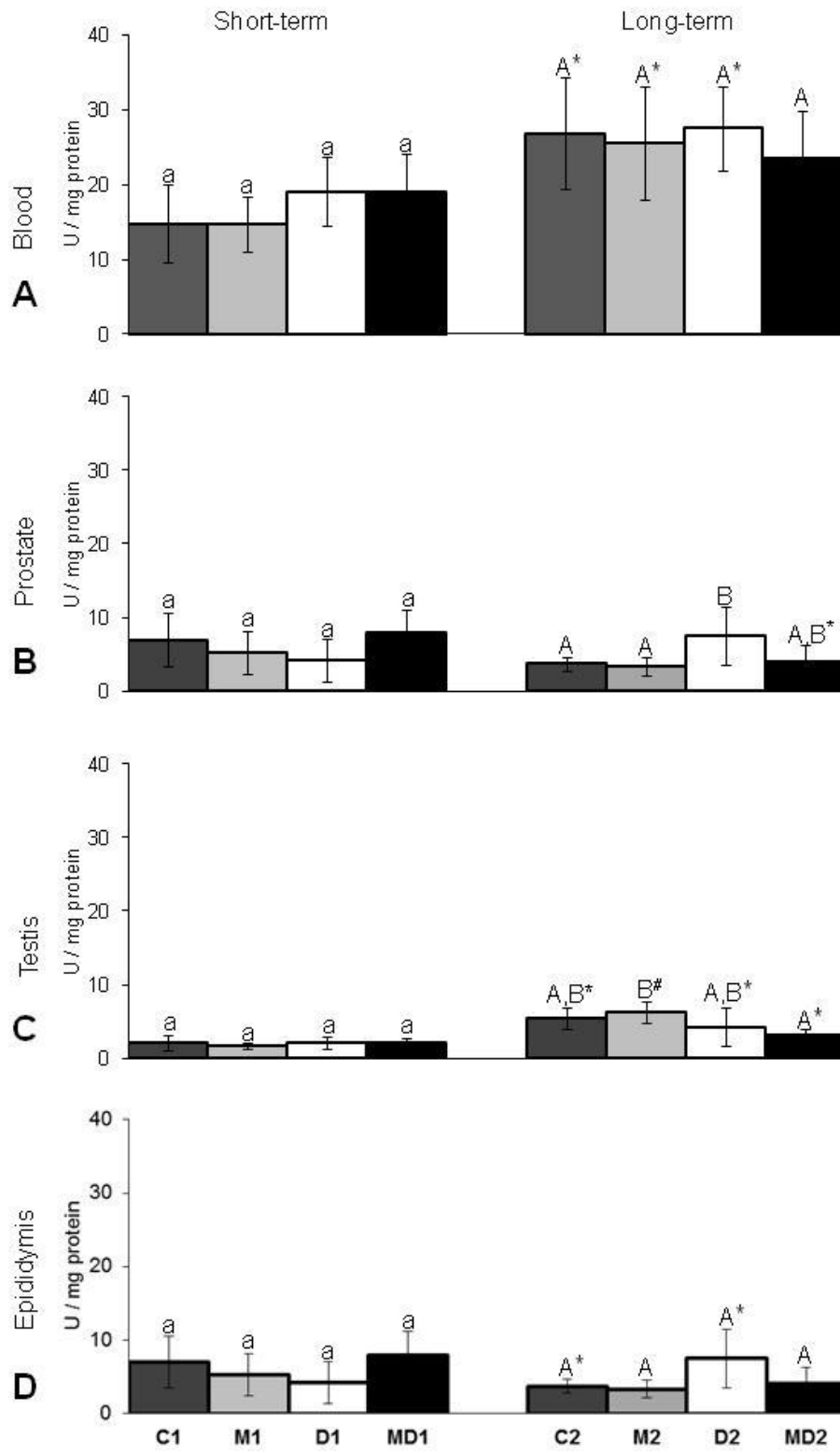


Figure 3

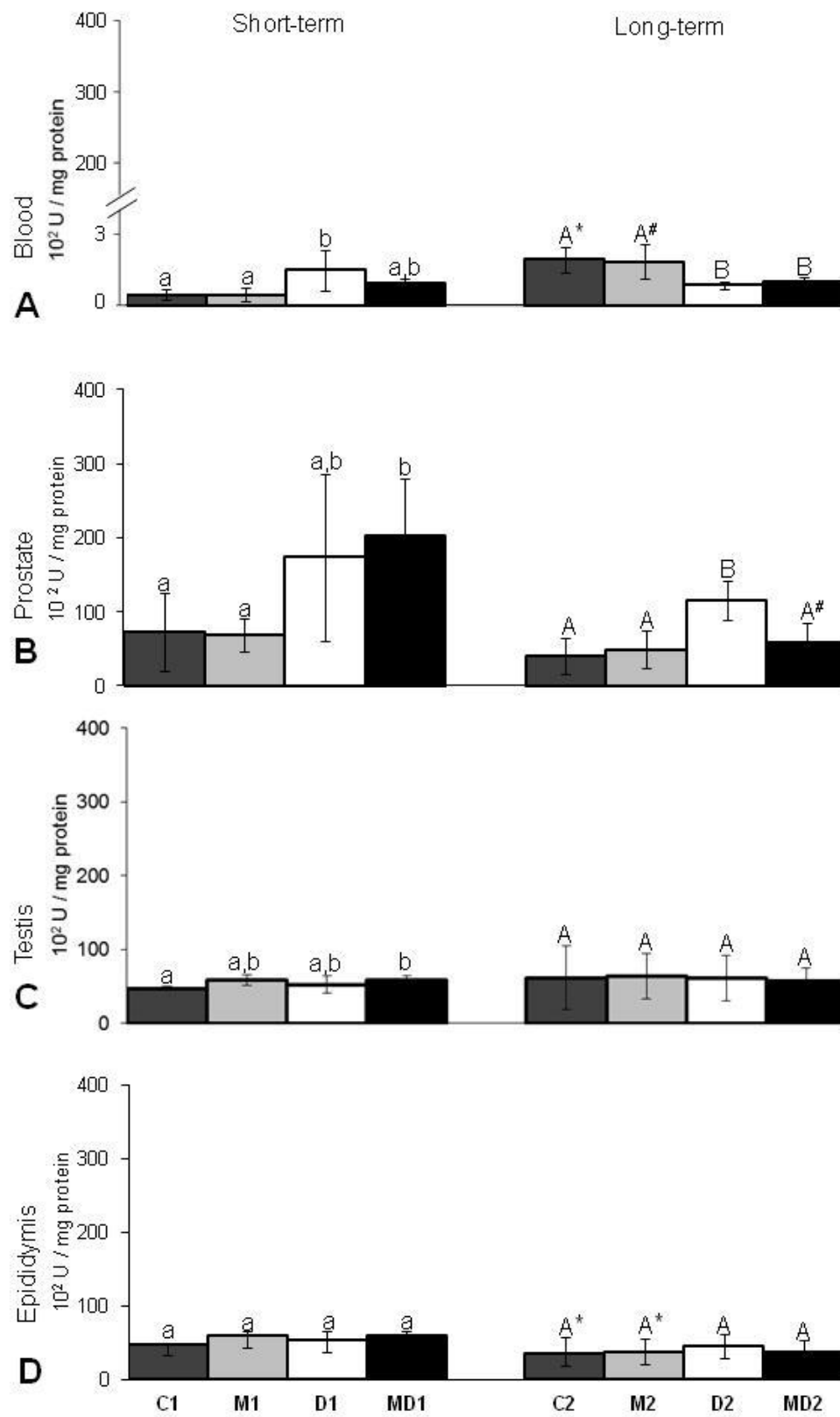
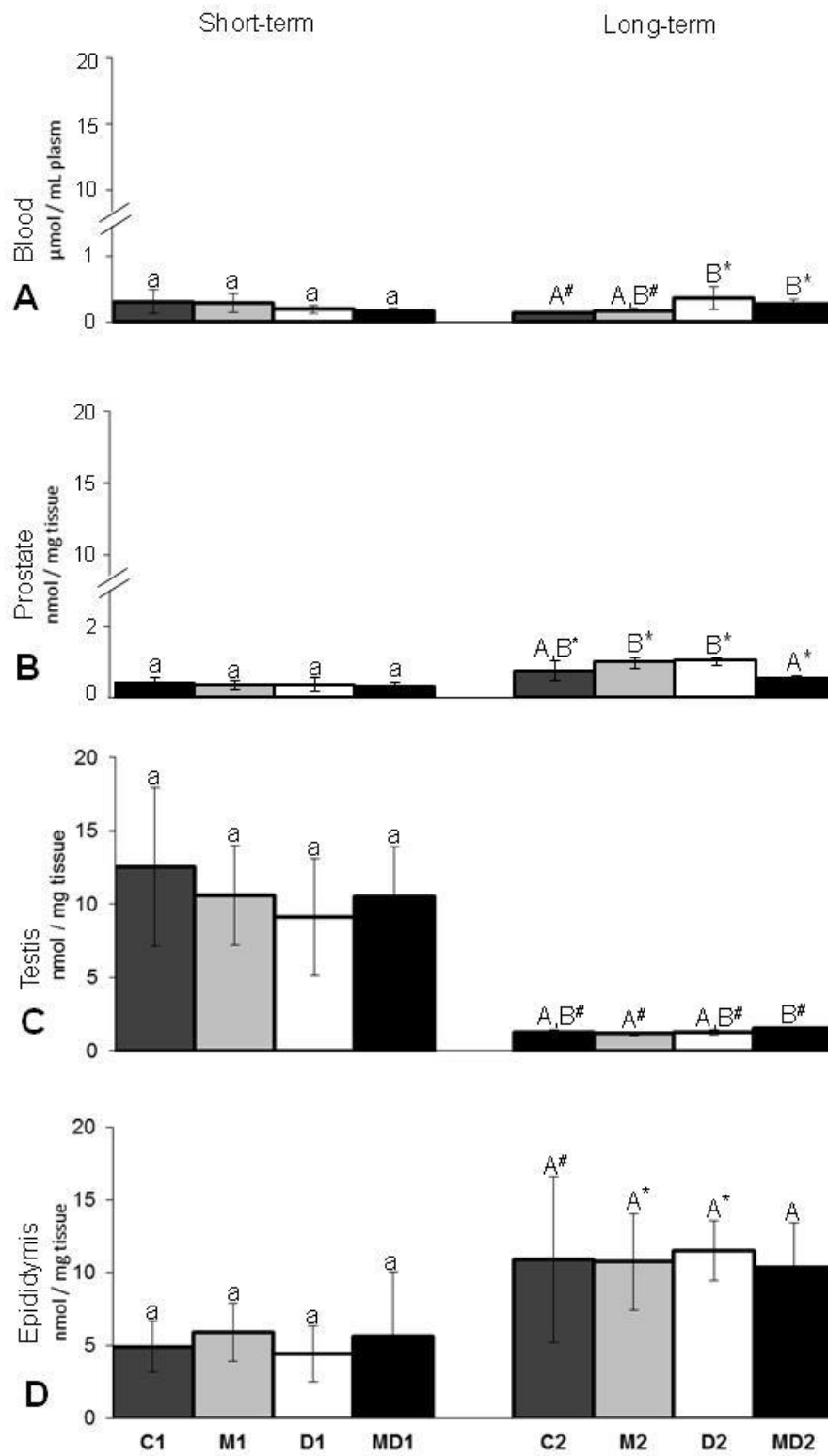


Figure 5



Capítulo 2

Aceito em *Journal of Diabetes Research*

Influence of melatonin on the proliferative and apoptotic responses of the prostate under normal and hyperglycemic conditions

Marina G. Gobbo¹, Nishtman Dizeyi², Per-Anders Abrahamsson², Per-Anders Bertilsson², Viviane Sanches Masitéli³, Sebastião R. Taboga³, Rejane M. Góes³.

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Clinical Sciences, Division of Urological Research, Skåne University Hospital, Lund University, Malmö, Sweden.

³Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences – UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Keywords: prostate; diabetes; melatonin; PC3, 22Rv1, PNTA1.

Corresponding author: Prof. Dr. Rejane Maira Góes. Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Telephone: +55 17 32212391, Fax +55 17 32212391. E-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

Abstract

The antitumor properties of melatonin (MLT) are known for prostate cancer cells. This study investigated whether MLT affects prostate maturation and interferes with tissue injuries induced by diabetes. MLT was administered to Wistar rats from 5 weeks of age in the drinking water (10 µg/kg b.w.), and diabetes was induced at the 13th week by streptozotocin (4.5 mg/100g b.w., i.p.). The animals were euthanized in the 14th and 21st weeks. MLT reduced the immunostained cells for androgen receptor (AR) by 10% in younger rats. Diabetes decreased cell proliferation and increased apoptosis. MLT treatment impeded apoptosis ($p=0.02$) and augmented proliferation ($p=0.0008$) and PCNA content in prostate following long-term diabetes due to restoration of testosterone levels and expression of melatonin receptor type 1B. The effect of MLT (500 µM, 5 mM, 10 mM) on androgen-dependent (22Rv1) and -independent (PC3) cancer cells and human prostate epithelial cells (PNTA1) under normal and hyperglycemic conditions (HG, 450 mg/dL) were analyzed. Contrary to PNTA1 and 22Rv1 cells, MLT improved the proliferation of PC3 cells in hyperglycemic medium. The combined data indicated that MLT had proliferative and anti-apoptotic effects in prostate cells subjected to HG levels and it seems to involve specific MLT pathways rather than AR.

INTRODUCTION

Melatonin (MLT) is an indoleamine produced by the pineal gland that controls the circadian cycle and acts as a neuromodulator, cytokine and biological response modifier [1]. This hormone is widely known as an adjustor of the reproductive physiology to the environmental light in seasonally dependent mammals [2]. MLT also has antioxidant [3, 4, 5, 6] and anti-inflammatory properties [7, 8]. The cellular action of MLT is mediated by three receptor subtypes (MT1, MT2 and MT3) coupled to G proteins. MLT signaling may also be modulated by the activation of a series of nuclear receptors referred to as retinoid Z receptors α and β [9, 10]. Depending on the concentration, MLT can act directly in the cytosol through calmodulin and quinone reductase 2 [11-13].

Data from Gilad et al. [14] indicated the presence of MLT receptors in the rat prostate. The inhibition of xenografted prostate tumor growth by MLT treatment has been reported in rodents, and the antiproliferative action of MLT occurred via activation of the MT1 receptor with consequent attenuation of calcium influx induced by sex steroids [15-17]. The antitumor action of MLT in prostate cancer cell lines has been attributed to changes in cell cycle, androgen receptor (AR) translocation and inhibition of angiogenesis through reduced expression of factors that act under hypoxic conditions, such as hypoxia-inducible factor 1 α (HIF -1 α) [18-25]. MLT also exerts a pro-apoptotic effect in tumor cells via p38 and c-jun terminal kinases (JNK); however, this effect is independent of extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation [26]. This hormone has been associated with increased sensitivity to some chemotherapeutic drugs [27]. Moreover, androgen-independent cell lines, such as PC3 and DU145, are less sensitive to MLT compared to the androgen-dependent cells, such as LNCaP, CW22Rv1 and RWPE-1 [28-30].

Because MLT has an antigonadotrophic effect in humans and rodents by inhibiting testosterone synthesis in the testis [31, 32], it is difficult to discriminate the direct influence of this hormone in androgen-dependent organs, such as the prostate. Few studies have considered the effects of MLT on prostate *in vivo*, especially during sexual maturation.

The effects of diabetes on prostate histophysiology have been investigated in rodents [33-42]. The alterations include atrophy, impaired secretory activity, reduced cell proliferation, an increased number of apoptotic and epithelial basal cells,

extracellular matrix remodeling, impaired androgen sensitivity, and phenotypic changes in stromal cells [34, 36, 38, 40, 42, 43- 48]. The prostatic response to diabetes has been related to the reduction of serum testosterone levels and lack of insulin, typical of this metabolic disorder [48, 49].

The diabetic condition is associated with a large production of reactive oxygen species resulting from hyperglycemia. The effectiveness of therapy with different antioxidants against oxidative stress caused by diabetes has been extensively investigated experimentally [50-55]. Treatment with ascorbic acid normalized the increased glutathione *S*-transferase (GST) activity and reduced epithelial apoptosis in the prostate after one month of experimental diabetes induced by streptozotocin [53]. MLT is a potent antioxidant, and its synthesis is impaired under hyperglycemia [56]; thus, it is worthwhile to investigate the efficacy of MLT treatment under diabetic conditions and its influence on prostate cells under hyperglycemia.

This study examined whether pre- and co-treatment with MLT interferes with tissue damage induced in the prostate of Wistar rats by experimental diabetes, particularly in terms of proliferative activity, apoptosis and AR expression. In this study we report for the first time the effects of continuous use of this neurohormone during sexual maturation on these processes and prostate histology. We also compared the influence of MLT under hyperglycemic condition on the proliferation and apoptosis of androgen-dependent (CW22Rv1) and androgen-independent (PC3) cancer cells and human prostate epithelial cells (PNTA1).

MATERIALS AND METHODS

1. *In vivo* experimental design

Male Wistar rats (n=80) were obtained from the breeding house of São Paulo State University (Botucatu, SP, Brazil) in the 5th week of life (weaning). This experiment was conducted according to the ethical principles adopted by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes, and all procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of IBILCE/UNESP (Protocol 051/2011 CEUA). The rats were kept in polyethylene cages with wood shaving substrate, subjected to light cycles (14 h of light and 10 h of darkness) and a temperature of approximately 25°C. Food (Presence, Invivo, Paulinia, SP, Brazil) and filtered water were provided *ad libitum*.

After one week of adaptation, the animals were weighed and randomly distributed into two experiments, with eight groups total (10 animals per group). The short-term experiment consisted of a control group (C1), a control treated with melatonin (M1), a one-week diabetic group (D1) and a one-week diabetic group treated with melatonin (MD1). The long-term experiment consisted of a control group (C2), a control treated with melatonin (M2), an eight-week diabetic group (D2) and an eight-week diabetic group treated with melatonin (MD2).

MLT administration (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was based on the procedures established by Wolden-Hanson et al. [57]. MLT was dissolved in ethanol and stored in aliquots at -80°C. Such conditions were standardized by application of various consumption preference and aversion tests, and MLT did not affect the amount of water consumed by rats. MLT was available to animals (groups M1, M2, MD1 and MD2) in drinking water (10 µg/kg body weight in ethanol 0.001%/day) from 5 to 14 weeks old. The MLT intake per day of this investigation was based on an average daily water consumption of 80 mL/day/animal and an average body weight of 350 g. Water bottles were protected from light because MLT is a photosensitive molecule, and the liquid content was changed every day.

Diabetes was induced on the 8th week of MLT treatment (13 weeks old) in groups D1, D2, MD1 and MD2 by the intraperitoneal injection of 4.5 mg/100 g of body weight of streptozotocin (Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA), diluted in 1 mL of 0.01 citrate buffer. This solution was injected after 24 h of fasting and anesthesia with ketamine and xylazine (0.1 mL/100 g of body weight). Control animals were injected with citrate buffer only.

Glucose levels were assessed two days after streptozotocin injection through the glucose monitor Accu-Chek (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in the fingertips of the paws. Animals with glucose levels above 200 mg/dL were used in this study. Due to the higher water intake of diabetic animals, the MLT dose was corrected for groups D1, D2, MD1 and MD2 after the diagnosis of diabetes. Groups C1, M1, D1 and MD1 were euthanized at 14 weeks old, whereas groups C2, M2, D2 and MD2 were euthanized in at 21 weeks old. Thus, there was a short administration of MLT for groups M1 and MD1 (9 weeks) and a prolonged treatment for groups M2 and MD2 (16 weeks). The rats were euthanized using CO₂ inhalation and then decapitated for blood collection.

Hormone dosages

The blood samples were collected after decapitation and plasma was separated through centrifugation at 1,200 g and frozen at -80°C for analysis of testosterone levels. The measurements were performed by a capture/sandwich ELISA (antibody-antigen-antibody) using specific commercial kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), with a sensitivity of 14.0 pg/mL and a variation for interassays of 11.3 pg/mL. The readings were performed using an Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System (BioTek Instruments, VT, USA).

Light microscopy

Ventral prostates were removed and weighed. Fragments of ventral prostate were fixed by immersion in 4% formaldehyde freshly prepared in phosphate buffer pH 7.2 and methacarn (1:3:6 of acetic acid, chloroform and methanol) and embedded in Paraplast. The histological sections stained with hematoxylin-eosin were used for general morphological studies and immunocytochemical analysis. The sections were observed under a bright-field microscope (Olympus CH30) coupled with a charge-coupled camera. The digitization of selected microscopic fields and quantitative analyses were performed using an image analysis system (Image-Pro Plus Media Cybernetics, version 6.0 for Windows software, Bethesda, MD, USA).

Immunohistochemistry

Immunocytochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA), androgen receptor (AR) and melatonin receptor type 1B (MTR1B) were assessed using specific antibodies purchased from Santa Cruz Biotechnology (AR and PCNA, Santa Cruz, CA, USA) and Novus Biologics (MTR1B, Novus Biologics, Littleton, CO,

USA). Sections were subjected to antigen retrieval in citrate buffer (10 mM, pH 6) for 20-40 min, followed by the blocking of endogenous peroxidase with 3% H₂O₂ in methanol or water (for MTR1B) and immersed at 3% normal bovine serum (for PCNA and MTR1B) or 5 % dry milk (for AR) in PBS for 1 h to block nonspecific protein. After PBS washing, incubation with primary antibodies diluted in 1% BSA was carried out: AR (sc816, rabbit polyclonal, 1:100, overnight at 4°C), PCNA (sc56, mouse monoclonal, 1:100, 1 h at 37°C) and MTR1B (NLS932, rabbit polyclonal, 1:75, overnight at 4°C). Then, the tissue sections used for PCNA and AR were incubated at RT with a Polymer/peroxidase kit (Novolynk Polymer, Novocastra, Norwell, MA, USA) for 1 h. The tissue sections used for MTR1B were incubated at 37°C with secondary antibody and then with avidin/biotin (ABC Staining Systems, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 45 min.

The reaction was detected with 0.1% diaminobenzidine (DAB) and 0.02% H₂O₂ in PBS, and the sections were counterstained with hematoxylin. Five animals per group and 3 prostatic fragments per animal were used to quantify the proliferation levels, AR-positive cells and MTR1B positive areas. The sections were digitalized, and 30 contiguous fields were observed in the 40X objective. AR and PCNA-positive cells were quantified by counting the number of positive nuclei and dividing it by the total number of nuclei per visual field. Areas showing specific staining for MTR1B were evaluated using a 130 point reticulum and the marked area was counted as previously done [45]. Data were expressed as relative frequency (%).

Detection of apoptotic cells

Apoptotic cells were detected *in situ* using the DNA fragmentation assay associated with cell death based on a Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) reaction (TdT-Fragel- Calbiochem, CN Biosciences, La Jolla, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The negative controls were obtained by omitting the incubation with TdT enzyme, and the slides were stained with hematoxylin. The quantification of apoptotic cells was performed in the same manner as the immunohistochemistry reaction for PCNA.

Western blotting analysis

The PCNA protein content in the prostate samples was quantified by Western blotting. Prostate samples were homogenized at 4°C in cell lysis buffer (20 mM Tris-

HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 2% SDS) containing 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 mM sodium orthovanadate and a protease inhibitor cocktail (1:1,000, Sigma, St Louis, MO, USA Chemical Co.). Lysates were centrifuged at 13,000 g at 4°C for 15 min, the supernatants were collected and the protein concentration was determined using the Bradford method [58]. Laemmli sample buffer with 5% β -mercaptoethanol was added to equal amounts of protein (150 μ g). The samples were then separated by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide Tris-glycine gels and electroblotted to nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using Bio-Rad assay equipment (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nonspecific proteins were blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20) for 1 h at room temperature, and the membranes were probed with primary antibody, PCNA (1:300) overnight at 4°C in 1% BSA in TBST. Then, the membranes were washed in TBST and incubated for 1 h at 4°C with the specific secondary horseradish peroxidase-conjugate antibody (1:200 in 1% BSA in TBST), followed by 3 washes in TBST. Antibody immunolabeling was revealed by an ECL chemiluminescent detection kit (Healthcare). β -Actin was used as a control for protein expression. Densitometric analysis was performed using the Image J 1.34 software (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

2. *In vitro* experimental design

Three human cell lines were used in this study; a non-tumoral cell line (PNTA1), and two prostate cancer cell lines (CW22Rv1, herein referred to as 22Rv1). 22Rv1 (CRL-2505, from xenograft line) and PC3 (CRL-1435, from bone metastasis) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). PNTA1 cells (#95012614) were obtained from the Health Protection Agency (England, UK). The cells were grown in RPM1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies, Paisley, UK) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Cells were fed every 2-3 days and subcultured once they reached 70-80% confluence. The first phase of the investigation consisted of dose-related experiments with different melatonin concentrations (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA). Melatonin (MLT) was always freshly prepared in a 40% DMSO stock solution (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) and diluted to different concentrations in the culture medium. After determining the correct range of

MLT doses, the cell lines were pre-incubated in hyperglycemic medium with 450 mg/dL of glucose (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then treated with MLT. Two different culture media were used because the 22Rv1 cells seeded in DMEM failed to attach properly. Thus, for the experiments with high glucose (HG) conditions, cells were cultured first with RPMI and then with DMEM with high glucose levels. The initial analysis of MLT effects using the light microscope revealed that 22Rv1 cells were more sensitive to indoleamine than the other cells types because more cells became detached when they were treated with 10 mM of MLT. Thus, a reduced MLT concentration (5 mM) was used for 22Rv1 cells, whereas PNTA1 and PC3 cells received 10 mM MLT. With this correction, a proportional cell density was maintained, which is crucial for the assays in this study. Thus, the following conditions were evaluated: in normal conditions (NC), the cells were plated with RPMI medium and incubated with DMSO (at the same concentration of the highest dose of melatonin used). Melatonin treatment was performed in the following concentrations: 500 μ M, 5 mM and 10 mM. Exposure to HG conditions was performed by replacing the RPMI medium with hyperglycosylated DMEM (450 mg/dL) and incubating with the vehicle (DMSO). The concomitant exposure to HG and MLT was performed in the same manner as described separately above.

Proliferation assay

For this assay, 96-well flat-bottomed plates were used at a density of 3,000 cells/well with 100 μ L of medium. The cells were pre-incubated with HG DMEM for 1 day for the short-term experiment and 7 days for the long-term experiment. Then, the cells were treated with DMSO and MLT (500 μ M, 5 mM or 10 mM) for an additional 1 and 2 days. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is reduced by metabolically active cells, which results in the formation of purple formazan. A solution of 50% MTT in PBS was applied to each well, and the plate was incubated for 2 h in a humidified incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ protected from light. 100 μ L of isopropanol with 0.04 N HCl was added to each well and mixed by tapping gently on the plate. After 15 min, the absorbance was measured on an ELISA plate reader with a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The results were expressed in absorbance values as a mean \pm S.D of the two experiments.

Flow cytometry

Cell cycle distribution (G0/G1, S and G2/M) and apoptosis were analyzed by flow cytometry based on DNA content. 22Rv1, PNTA1 and PC3 cells were seeded in 6-well plates with a density of 100,000 cells and 1,000 μL of RPM1. Some of the wells were pre-incubated with hyperglycemic DMEM for 24 h and then treated with MLT for an additional 24 h. The cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) without Ca^{2+} or Mg^{2+} , followed by centrifugation (400 g, 5 min, 4°C). The fixation was performed in ice cold 70% ethanol while vortexing. The samples were stored at 4°C for 2 h and centrifuged again (400 g, 5 min, 4°C). For staining with propidium iodide (PI), cells were washed with cold PBS, centrifuged (300 g, 5 min, 4°C) and then suspended in a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI solution (#11348639001; Roche, Mannheim, Germany) protected from the light at room temperature for 40 min. The samples were transferred to glass tubes (5 mL Falcon tubes) and kept on ice. The cells were gated, and the DNA content of at least 4,000 labeled cells was quantified with a FACSCalibur instrument (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). During data analysis, doublet discrimination was performed using a two parameter dot plot of FL2-Area versus FL2-Width. Data presented were analyzed using FlowJo 10.0.7 software (Treestar, Inc, Ashland, OR, USA). The percentage of fragmented DNA was considered an indirect measure of apoptosis.

Statistical analyses

Data were tested considering the assumptions of normality and homogeneity of variances according to the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The groups that have made such assumptions (parametric data) were compared by applying a t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (*post hoc*). Data that did not fit these assumptions (nonparametric data) were compared by applying the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (*post hoc*). Statistical analyses were performed between groups of the same experimental period and between different periods for the same treatment (for biometric data only) using the Statistica 9.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Data were expressed as a mean \pm standard deviation, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

1. *In Vivo* experiment

Physiological and biometric parameters

Body weight gain (Fig. 1A) did not vary among short-term experimental groups, except for a diminution in group MD1. Both diabetic groups from the longer duration experiment had smaller body weight gain, independently of MLT treatment ($p < 0.0001$). Prostate weight was not affected by MLT treatment under healthy conditions as well as in diabetes conditions in short- and long-term experiments (Fig. 1B). MLT administration prevented partially prostate atrophy caused by short-term diabetes ($p = 0.0025$, Fig. 1B), whereas this hormone was not able to prevent atrophy of the gland in two-month-old diabetic animals ($p < 0.01$). Ninety-one percent of the animals exhibited blood glucose levels of 404 mg/dL, as shown in Figure 1D. Glycemia decreased by 18% from C1 to C2 ($p = 0.026$), and MLT did not change this parameter (Fig. 1D). However, MLT affected the testosterone synthesis of healthy animals (Fig. 1E) in both short- (decreased by 24%) and long-term (decrease by 34%) experiments. The serum androgen levels were also drastically decreased by induced diabetes ($p < 0.005$). Group MD2 exhibited higher levels of this hormone compared to group D2 (Fig. 1E).

Expression of the androgen receptor using immunocytochemistry

The treatment of healthy rats with MLT from weaning to 9 weeks reduced the number of AR-positive cells in the prostatic epithelium at early adulthood ($p = 0.03$; Fig. 2C and D). However, the frequency of AR-positive cells did not change when the treatment was extended for an additional 7 weeks (Fig. 2D and I). One week of diabetes decreased the AR immunostained cells by 40% compared to group C1 (Fig. 2E, G and I), and MLT treatment did not prevent this depletion ($p < 0.0001$). Following two months of diabetes, the proportion of cells expressing AR nearly doubled (40%), and MLT consumption abrogated this increase (Fig. 2F, H and I).

Proliferation, apoptotic rates and PCNA content

The frequency of cell proliferation did not alter in the prostates of groups M1 and M2 (Fig. 3A, B, C, D and I). Cell proliferation in the gland was reduced by 80% after one week and by 40% after two months of diabetes (Fig. 3E, F and I). MLT therapy prevented the decrease in cell proliferation in the prostate caused by long-term, but not short-term diabetes (Fig. 3G, H, and I). Western blotting analysis showed no variation in PCNA expression in the short-term experiment; however, higher expression

of PCNA was detected (60%) for group MD2 compared to group D2 in the long-term experiment (Fig. 3J).

The administration of MLT did not affect apoptosis in the prostate of healthy rats in both experiments, although there was a non-significant augmentation in group M2 (Fig. 4A, B, C, D and I). The number of apoptotic cells increased by two-fold in the gland of diabetic animals (Fig. 4E, G, and I). MLT ameliorated the levels of apoptosis in the prostate of rats after two months of diabetes (Fig. 4H and I).

Immunolocalization and quantification of MTR1B

The immunolocalization of melatonin receptor type 1B occurred specially in the prostate epithelium (Fig. 5). Tissue sections of rat brain were used as a positive control and the neuron cell bodies presented positive staining for MTR1B (Fig. 5I). The relative frequency of stained areas was increased by ~30% due to melatonin administration to healthy rats and to experimental diabetes (Fig. 5C-F and K). MLT avoided such augmentation of relative frequency of MTR1B stained areas in diabetic animals of both experiments (Fig. 5G, H and K).

2. *In vitro* results

Effects of MLT and HG medium on cell proliferation

PNTA1 cells were not affected by MLT under NC after 24 or 48 h of incubation (Fig. 6A). The short incubation with HG medium and concomitant treatment with MLT at 10 mM decreased the amount of mitosis ($p = 0.02$; Fig. 6B). This effect was not observed in the 7-day pre-incubation experiment (Fig. 6C).

Cancer cell line 22Rv1 exhibited a decrease in cell proliferation ($p = 0.008$) after 1 day of exposure to 5 mM MLT under NC (Fig. 6D). The same exposure period to MLT, but with a previous incubation of one day in HG medium, provoked the same effect, decreasing the cell proliferation by 23% with 5 mM (Fig. 6E). These cells exhibited an early increase in proliferation after a short pre-incubation with the HG condition (Fig. 6E) and an inverse pattern after a long pre-incubation, decreasing the viability to approximately 40%, independently with MLT treatment in both time intervals (Fig. 6F).

Exposure to the lowest MLT concentration under NC for 24 h favored PC3 cell proliferation. However, after 48 h, MLT at the highest molarity diminished PC3 viable cells by 60% (Fig. 6G). The pre-incubation of PC3 cells in HG medium for one day had

a synergistic action associated with MLT on the proliferation index after 24 h in a dose-dependent manner (Fig. 6H). This effect was enhanced 48 h after the addition of MLT, mainly at the 10 mM concentration. One week of previous exposure to HG augmented PC3 cell proliferation, compared to 1 day of previous incubation, regardless of the treatment with neurohormone, especially after 2 days of 10 mM MLT exposure (Fig. 6I).

Cell cycle analysis by flow cytometry

The 1-day exposure of PNTA1 cells to 10 mM MLT under NC increased the population of G2/M cells by 36% in comparison to control medium (Fig. 7A and B). The incubation of these cells with HG for 24 h increased the G2/M cell population by 52% (Fig. 7C), and this increase was higher (92%) following 24 h of MLT incubation (Fig. 7D). However, there was a 90% increase in the number of cells with DNA fragmentation when this cell line was incubated in HG medium and a 105% increase when incubated in HG medium and MLT (Fig. 7D). There was a decrease in cell population at the S phase in both groups incubated with HG and a reduction in the G0/G1 cell population after HG and MLT incubation (Fig. 7D).

Melatonin treatment of 22Rv1 cells cultivated in NC for 24 h increased the percentage of apoptosis by 30%, the number of cells in interphase by 28%, and the number of G2/M phase cells by 64% (Fig. 7E and F). The exposure of 22Rv1 cells to HG medium also increased the apoptotic (36%) and G2/M (34%) cells (Fig. 7E and G), and the addition of MLT attenuated these alterations (Fig. 7H).

In the PC3 cell line, MLT caused a decrease of 30% in cells in the G0/G1 phase (Fig. 7I and J) and an augmentation of 92% in G2/M cells. HG conditions did not affect the proliferation (G2/M) of this lineage but increased the number of apoptotic cells by 90% (Fig. 7K). Such alterations were restored by MLT (Fig. 7L).

DISCUSSION

Beyond to corroborate with previous evidence that diabetes markedly reduces cell proliferation and increases apoptosis in the prostate [37, 39, 43, 53], the present results indicate, for the first time, that MLT administration (10 µg/kg body weight/day) to Wistar rats retrieved the proliferative activity of the prostate after two months of experimental diabetes. This retrieval was associated with improvement of the androgen synthesis that is known to be impaired in chronic diabetes [43, 45, 53]. In addition it

was observed that prostate response to MLT treatment differed during the disease progression, following alterations of testosterone levels, because modifications of proliferation and apoptosis in the gland or improvement of circulating testosterone were not found in the animals after short-term diabetes. We also noted that MLT administration to healthy rats since weaning had a negative action on testosterone synthesis but did not interfere with proliferative and apoptotic response in prostate. This suppressive action of MLT on androgen levels of healthy rats was expected and it may be due to the modulation of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its respective receptor [59], the decrease in LH levels [32] or the direct action of MLT in interstitial testicular cells through melatonin receptors [60]. Presumably, no effect was verified on cell proliferation and apoptosis rates because testosterone reduction did not induce a conspicuous change in AR expression in the gland of MLT-treated healthy rats, as indicated by a slight decrease of 10% in the frequency of AR-positive cells in short-term experiment. Then, our data indicated that even at lower doses than usually employed previously [6, 61, 62], the proliferative and anti-apoptotic effects of MLT treatment in the prostate of animals with chronic diabetes are likely due to its indirect action on circulating testosterone levels and also reflected the improvement of androgenic action in the gland under diabetes as demonstrated by AR-positive cells frequency. The increase of serum testosterone levels in diabetic animals treated with melatonin should be analyzed carefully, especially when melatonin is intended to be applied as a coadjuvant in the treatment of prostate cancer for patients with metabolic disturbances, such as diabetes.

Furthermore, testosterone influence in the prostate response to MLT in diabetes was also triggered by conventional membrane receptor. MTR1 had been related to antiproliferative response of prostate cancer cells to MLT, which leads to the down-regulation of activated AR signaling and upregulation of p27^{kip1} in 22Rv1 cells [63]. Our immunohistochemical data showed a significant reduction of melatonin receptor type 1B (MTR1B) for MD2 group in relation to D2 group, which can support the increased proliferation index found in these animals. In addition, in a parallel investigation with a similar experimental protocol, we demonstrated that MLT had effective antioxidant action in this gland under diabetes by equilibrating glutathione-S-transferase (GST), catalase, and glutathione peroxidase (GPx) activities [64]. The MLT ability of attenuate the production of reactive species (ROS) and also regulating the expression of proteins of the apoptotic pathways, such as Bcl-2 and Bax [65,66] have been related to the anti-

apoptotic property of this neurohormone. The increase in PCNA content in the melatonin-treated diabetic group (MD2), besides expressing an increasing in cell proliferation, can also corroborate the protective action of MLT because PCNA is also involved in DNA damage repair and epigenomic maintenance [67]. Taken together the *in vivo* results demonstrate that response of diabetic prostate to the MLT treatment was mainly due to the alterations androgen levels, as expected, but they also suggest the involvement of MTR1B receptor. Most evidence in the literature points to an anti-proliferative action of MLT on prostate cancer cells, and *in vivo* studies with normal cells are scarce [14, 68, 69]. Therefore our results for the long-term diabetic group treated with MLT are in contrast to *in vitro* studies and they also indicate a differential action of MLT during normoglycemia or hyperglycemia.

To better clarify the implications of MLT from its secondary effect on androgen levels, and the interferences of hyperglycemia and AR expression, we examined MLT influence on cell proliferation of human prostate epithelium cells and prostate cancer cell lineages. It is known MLT can detain mitosis through the attenuation of calcium influx induced by dihydrotestosterone (DHT) and down regulation of androgen signaling due to the nuclear exclusion of AR [17, 21, 22]. The inhibition of tumor enlargement due to the antiproliferative action of MLT is mediated by cell cycle delay at the G0/G1 phase and a shorter duration in the S phase by reducing the levels of cyclin D1 [16, 18, 19]. The usage of both tumor and non-tumor cell lines was pertinent because it was observed that 8% of diabetic animals presented prostate carcinoma and 15% presented high grade intraepithelial neoplasia (data not shown). The glucose concentration used in the medium (450 mg/dL) is equal to the glycemic index of diabetic animals in the present investigation. Our study was performed with high MLT concentrations (5 mM and 10 mM) compared with most previous studies, which utilized doses in the nM and μ M range [21, 24, 25, 63]. Higher MLT concentrations were expected to be effective in concomitantly covering three different cell lines. The uptake of MLT by prostate cancer cells is poor and dependent of the cell cycle phase, and the cells in the present investigation were not synchronized. Therefore, high concentrations of MLT in the medium do not necessarily correlate with higher internal concentrations [29]. Thus, the solubility of MLT was hampered, and a higher concentration of DMSO had to be used to dissolve it.

Proliferation assays did not indicate a drastic antiproliferative and pro-apoptotic action of MLT under NC, as reported previously [70]. These attenuated unintended

effects may be due to the shorter incubation times employed here. Sainz et al. [71] disposed the indoleamine for 2-6 days, allowing more time for its metabolism. Hevia et al. [72] proved that melatonin is still available in the medium and not transformed into its metabolites by prostate cancer cells until 24 h of incubation. Moreover, the intracellular levels of melatonin decay after 24 and 48 h [29], which support the possibility of differences in the influence of MLT between short and continuous exposure.

PNTA1 are human non-tumoral cells that were used here as an analogous for the epithelium cells of rat ventral prostate. As observed *in vivo*, MLT did not elicit an antiproliferative response in PNTA1 cells under normal conditions and HG medium increased the percentage of fragmented DNA. As also observed in a previous research, there was not an increase in proliferation by the association of PNTA1 cells and DMEM with HG (450 mg/dL) [73]. Androgen receptor positive but not androgen sensitive cells, 22Rv1 were highly sensitive to MLT in NC, particularly at high concentrations, but when incubated in HG medium, the MLT was capable of reducing cell proliferation of 22Rv1 after a short incubation period. PC3 cells revealed a different behavior from the other cells exhibiting a late antiproliferative response to MLT in NC and a synergistic proliferative effect with high glucose medium, as showed by both MTT and flow cytometry data. Thus, the prolonged incubation with HG medium impaired the mitosis of 22Rv1 and PNTA1 cells but improved this parameter for PC3 cells. Hevia et al. [74], using LNCaP and PC3 cells incubated under HG concentrations, and observed an antiproliferative effect of MLT that was caused via modulation of glucose transporter type 1 (GLUT1). Our results do not completely agree with the above findings, particularly in the case of PC3 cells. These discrepancies can be explained by the different incubation times and concentrations of HG.

Although the use of *in vivo* and *in vitro* experiments allowed observing some parallelisms in the results, the differences between the micro environments in which these cells are inserted should not be neglected. In this way, the *in vivo* experiment has a much more complex panel of variables. The prostate secretory epithelium is composed of various cell types, interrelated with each other, as the basal cells, transit-amplifying cells, intermediate cells and the luminal cells [75]. Thus, none of the cell lines used in this research can represent the population heterogeneity of prostatic epithelium. It is worth to mention that short-term diabetes drastically reduced the frequency of AR-positive cells in the prostate and this effect probably persists at later stages of the

disease as previously reported by our research group after one-month of streptozotocin-induced diabetes [53]. Therefore the results observed for the longer duration experiment reflect the MLT influence in cells whose majority does not express AR. In this context, PC3 cells displayed a comparable behavior to the prostatic cells under chronic diabetes. Furthermore, in this case, the MLT response *in vitro* can be mediated by other signaling pathways, such as those related to specific membrane or nuclear receptors for this hormone.

CONCLUSION

Our *in vivo* data indicated that under chronic diabetes exogenous melatonin had a proliferative and anti-apoptotic effect due its indirect action on testosterone circulating levels and also direct effect through specific MTR1B receptor. PC3 cell line showed a similar result to the *in vivo* experiments, because an increase in mitosis was elicited at longer pre-incubation times with hyperglycemic medium and MLT. As PC3 cells are androgen-independent prostate cancer cells, our findings indicate that this improvement of PC3 cell viability probably is not related to AR expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the technical assistance of Mr. Luiz Roberto Faleiros Jr., and Mr. Guilherme Henrique Tamarindo. The work was supported by: National Research Council (CNPq) - Fellowship for Rejane M. Góes (number 306258/2011-0). São Paulo State Research Foundation (FAPESP) - Fellowships numbers 2011/19467-0 and 2014/07266-9 for Marina G. Gobbo.

DISCLOSURE

The authors declare that no conflicts of interest are present in this paper.

REFERENCES

- [1] Reiter, R. J., Tan, D.X., Fuentes-Broto, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*, 181,127–151.
- [2] Reiter, R. J., Tan, D.-X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, 81(3), 445–456.
- [3] Montilla, P. L., Vargas, J. F., Túnez, I. F., Muñoz de Agueda, M. C., Valdelvira, M. E., Cabrera, E.S. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*, 25(2), 94-100.

- [4] Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273(13), 2813–2838.
- [5] Reiter, R. J. (2000). Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci*, 15(14), 246–250.
- [6] Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, S. O., & Aksoy, N. (2001). Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res*, 31(3), 193–8.
- [7] Mohan, N., Sadeghi, K., Reiter, R. J., & Meltz, M. L. (1995). The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B *J Biol Chem*, 37(6), 1063–1070.
- [8] Radogna, F., Diederich, M., Ghibelli, L. (2010). Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*, 80(12), 1844–1852.
- [9] Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., & Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, 269(46), 28531–28534.
- [10] Wiesenberg, I., Missbach, M., Kahlen, J. P., Schröder, M., Carlberg, C. (1995). Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res*, 23(3), 327–333.
- [11] Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Rodriguez, M.I., & Lopez, L.C. (2007). Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci*, 12, 947–963.
- [12] Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F. (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9(3), 209–220.
- [13] Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon F., Fauchere, J.L., Delagrangé P., Canet, E., Boutin, J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 275, 31311–31317.
- [14] Gilad, E., Laudon, M., Matzkin, H., & Zisapel, N. (1998). Evidence for a local action of melatonin on the rat prostate. *Journal Urol*, 159(3), 1069–73.
- [15] Paroni, R., Terraneo, L., Bonomini, F., Finati, E., Virgili, E., Bianciardi, P., Samaja, M. (2015). Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling. *J Pineal Res*. 57(1), 43–52.

- [16] Siu, S. W. F., Lau, K. W., Tam, P. C., & Shiu, S. Y. W. (2002). Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. *Prostate*, 52(2), 106–122.
- [17] Xi, S. C., Siu, S. W., Fong, S. W., & Shiu, S. Y. (2001). Inhibition of androgen-sensitive LNCaP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression. *Prostate*, 46(1), 52–61.
- [18] Marelli, M. M., Limonta, P., Maggi, R., Motta, M., & Moretti, R. M. (2000). Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate*, 45(3), 238–244.
- [19] Moretti, R. M., Marelli, M. M., Maggi, R., Dondi, D., Motta, M., & Limonta, P. (2000). Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells. *Oncol Rep*, 7(2), 347–351.
- [20] Park, J.W., Hwang, M.S., Suh, S.I., Baek, W.K. (2009). Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J Pineal Res*. 46(4), 415–421.
- [21] Rimler, A, Culig, Z., Levy-Rimler, G., Lupowitz, Z., Klocker, H., Matzkin, H., Zisapel, N. (2001). Melatonin elicits nuclear exclusion of the human androgen receptor and attenuates its activity. *Prostate*, 49(2), 145–154.
- [22] Rimler, A., Culig, Z., Lupowitz, Z., & Zisapel, N. (2002). Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(1), 77–84.
- [23] Sohn, E.J., Won, G., Lee, J., Lee, S., Kim, S.H. (2015). Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer*. 1,6(1), 19-28.
- [24] Tam, C. W., Chan, K. W., Liu, V. W., Pang, B., Yao, K. M., Shiu, S. Y. (2008). Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J Pineal Res*, 45(4), 403–412.
- [25] Tam, C. W., & Shiu, S. Y. W. (2011). Functional interplay between melatonin receptor-mediated antiproliferative signaling and androgen receptor signaling in human prostate epithelial cells: potential implications for therapeutic strategies against prostate cancer. *J Pineal Res*, 51(3), 297–312.
- [26] Joo, S. S., Yoo, Y.M. (2009). Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res*, 47(1), 8–14.
- [27] Rodriguez-Garcia, A., Mayo, J. C., Hevia, D., Quiros-Gonzalez, I., Navarro, M., & Sainz, R. M. (2012). Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis. *J Pineal Res*, 54(1), 1–13.

- [28] Culig, Z., Stober, J., Gast, A., Peterziel, H., Hobisch, A., Radmayr, C., Klocker, H. (1996). Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev*, 20(1), 68–75.
- [29] Hevia, D., Sainz, R.M., Blanco, D., Quirós, I., Tan, D.X., Rodríguez, C., Mayo J.C. (2008) Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. *J. Pineal. Res.* 45(3), 247-57.
- [30] Tilley, W. D., Bentel, J. M., Aspinall, J. O., Hall, R. E., & Horsfall, D. J. (1995). Evidence for a novel mechanism of androgen resistance in the human prostate cancer cell line, PC-3. *Steroids*, 60(1), 180–186.
- [31] Frungieri, M. B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O. P., Calandra, R. S., & Gonzalez-Calvar, S. I. (2005). Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology*, 146(3), 1541–1552.
- [32] Yilmaz, B., Kutlu, S., Mogulkoç, R., Canpolat, S., Sandal, S., Tarakçi, B., & Kelestimur, H. (2000). Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett*, 21(4), 301–306.
- [33] Barbosa-Desongles, A., Hernández, C., De Torres, I., Munell, F., Poupon, M.-F., Simó, R., & Selva, D. M. (2013). Diabetes protects from prostate cancer by downregulating androgen receptor: new insights from LNCaP cells and PAC120 mouse model. *PLoS One*, 8(9).
- [34] Cagnon, V. H., Camargo, A. M., Rosa, R. M., Fabiani, R., Padovani, C. R., Martinez, F. E. (2000). Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue Cell*, 32(4), 275–283.
- [35] Cagnon, V. H., Fávoro, W. J. (2009). Dystroglycan patterns on the prostate of non-obese diabetic mice submitted to glycaemic control. *Int J Exp Pathol*, 90(2), 156–165.
- [36] Carvalho, C.F., Camargo, M., Cagnon, V. H., Padovani, C.R. (2003). Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. *Anat Rec*, 270(2), 129–136.
- [37] Fávoro, W.J., Padovani, C.R., Cagnon, V.H. (2009) Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue Cell*, 41(2), 119-132.
- [38] Fávoro, W. J., Cagnon, V. H. A. (2010). Effect of combined hormonal and insulin therapy on the steroid hormone receptors and growth factors signalling in diabetic mice prostate. *Int J Exp Pathol*, 91(6), 537–545.
- [39] Porto, E.M.; Santos, S.A.A.; Ribeiro, L.M.; Lacorte, L.M.; Rinaldi, J.C.; Justulin Jr, L.A.; Felisbino, S.L. (2011). Lobe variation of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc Res Tech*, 74(11), 1040-1048.

- [40] Ribeiro, D. L., Caldeira, E. J., Cândido, E. M., Manzato, A. J., Taboga, S. R., Cagnon, V. H. (2006). Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*, 50(1),51–60.
- [41]Ye, C., Li, X., Wang, Y., Zhang, Y., Cai, M., Zhu, B., Wen, X. (2011). Diabetes causes multiple genetic alterations and downregulates expression of DNA repair genes in the prostate. *Lab Invest*, 91(9),1363–1374.
- [42] Yono, M., Mane, S. M., Lin, A., Weiss, R. M., & Latifpour, J. (2008). Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sci*, 83(5-6),192–197.
- [43] Arcolino, F. O., Ribeiro, D. L., Gobbo, M.G., Taboga, S. R., Góes, R.M. (2010). Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, 91(2), 144–154.
- [44] Burke, J.P., Jacobson, D.J., Mcgree, M., Roberts, R.A., Girman, C., Lieber, M.M., Jacobson, S.J. (2006). Diabetes and benign prostatic hyperplasia progression in Olmsted county, Minnesota. *Adult Urol*, 67,22-25.
- [45] Gobbo, M. G., Taboga, S. R., Ribeiro, D. L., Góes, R.M. (2012a). Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. *Micron*, 43(2-3),326–333.
- [46] Ribeiro, D. L., Marques, S. F. G., Alberti, S., Spadella, C. T., Manzato, A. J., Taboga, S. R.,Góes, R. M. (2008). Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, 89(4), 276–283.
- [47] Suthagar, E., Soudamani, S., Yuvaraj, S., Ismail Khan, A., Aruldas, M. M., & Balasubramanian, K. (2009). Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomedicine*, 63(1), 43–50.
- [48] Yono, M., Pouresmail, M., Takahashi, W., Flanagan, J. F., Weiss, R. M., Latifpour, J. (2005). Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 372(3),251–255.
- [49] Chandrashekar, V., Steger, R. W., Bartke, A., Fadden, C. T., Kienast, S. G. (1991). Influence of diabetes on the gonadotropin response to the negative feedback effect of testosterone and hypothalamic neurotransmitter turnover in adult male rats. *Neuroendocrinology*, 54(1), 30–35.
- [50] Abiko, T., Abiko, A., Clermont, A. C., Shoelson, B., Horio, N., Takahashi, J., Bursell, S.E. (2003). Characterization of retinal leukostasis and hemodynamics in insulin resistance and diabetes: role of oxidants and protein kinase-C activation. *Diabetes*, 52(3), 829–837.

- [51] Cameron, N.E., Gibson, T. M., Nangle, M. R., Cotter, M.A. (2005). Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1043,784–792.
- [52] Fernandes, G. S., Fernandez, C.D.B., Campos, K.E., Damasceno, D.C., Anselmo-Franci, J., Kempinas, W.D.G. (2011). Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats. *Reprod Biol Endocrinol*, 9(1),100.
- [53] Gobbo, M. G., Ribeiro, D. L., Taboga, S. R., de Almeida, E. A., Góes, R.M. (2012b). Oxidative stress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats and the influence of vitamin C treatment. *J Cell Biochem*, 113(7),2223–2233.
- [54] Koya, D., Lee, I. K., Ishii, H., Kanoh, H., King, G.L. (1997). Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol*, 8(3), 426–435.
- [55] Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., Abdollahi, M. (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine*, 59(7), 365–373.
- [56] Amaral, F. G., Turati, A. O., Barone, M., Scialfa, J. H., do Carmo Buonfiglio, D., Peres, R., Cipolla-Neto, J. (2014). Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. *J Pineal Res*, 57(1),67–79.
- [57] Wolden-Hanson, T.; Mitton, D.R.; Mccants, R.L.; Yellon, S.M.; Wilkinson, C.W.; Matsumoto, A.M.; Rasmussen, D.D. (2000). Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinol*,141(2), 487-497.
- [58] Bradford, M.M. (1972) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 71, 248-254
- [59] McGuire, N. L., Kangas, K., & Bentley, G. E. (2011). Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone. *Endocrinology*, 152(9),3461–3470.
- [60] Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101-110.
- [61] Sudnikovich, E.J.; Maksimchik, Y.Z.; Zabrodskaya, S.V.; Kubyshin V.L.; Lapshina, E.A.; Bryszewska, M.; Reiter, R.J.; Zavodnik, I.B. (2007). Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol*, 569(3), 180-187.
- [62] Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-mir, M.Y., Vázquez, G.F. (2011) Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*, 5(2) 207-212.

- [63] Shiu, S. Y. W., Leung, W. Y., Tam, C. W., Liu, V. W. S., Yao, K.M. (2013). Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27(Kip1) in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF- κ B): potential implications on prostate cancer chemoprevention an. *J Pineal Res*, 54(1), 69–79.
- [64] Gobbo, M.G.; Costa, C.F.P.; Silva, D.G.H.; Almeida, E.A.; Góes, R.M. Biomarkers of oxidative stress in rat male reproductive organs under experimental diabetes and interference of melatonin treatment. *Oxid Med Cell Longev*, In press.
- [65] Radogna, F., Paternoster, L., Albertini, M.C., Accorsi, A., Cerella, C., DAlessio, M, et al. (2006). Melatonin as an apoptosis antagonist. *Ann N Y Acad Sci*, 1090, 226-233.
- [66] Zhang, S., Zhao, S., Bai, L., Guan, M.; Mo, J.; Lan, L. (2011). Melatonin restores normal Bax and Bcl-2 protein expression in the subgranular zone of the dentate gyrus in pinealectomized rats. *Neural Regen Res*. 27(6),2129 – 2133.
- [67] Wang, S.-C. (2014). PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends Pharmacological Sci*, 35(4),178–186.
- [68] Limanowski A., Miśkowiak, B., Otulakowski, B. (1995). Effects of melatonin, testosterone and the two hormones administered in parallel on ventral prostate of the rat treated with stilbestrol in the first day of life. *Histol Histopathol*, 10(4), 869-874.
- [69] Srivilai, W., Withyachumnarnkul, B., Trakulrunsi, W. (1989). Stereological changes in rat ventral prostate induced by melatonin. *J Pineal Res*, 6(2), 111-119.
- [70] Lupowitz, Z., Zisapel, N. (1999) Hormonal interactions in human prostate tumor LNCaP cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 68(1-2), 83-88.
- [71] Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D., León, J., Manchester, L., Reiter, R. J. (2005). Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate*, 63(1), 29–43.
- [72] Hevia, D., Mayo, J. C., Quiros, I., Gomez-Cordoves, C., & Sainz, R. M. (2010). Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC *Anal Bioanal Chem*, 397(3),1235–1244.
- [73] Ribeiro, D. L., Taboga, S. R., Góes, R. M. (2009). Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, 90(4),400–411.
- [74] Hevia, D., González-Menéndez, P., Quiros-González, I., Miar, A., Rodríguez-García, A., Tan, D.X., Reiter, R.J., Mayo, J.C., Sainz, R.M. (2015). Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer *J Pineal Res*, 58(2), 234-250.
- [75] De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Meeker, A.K., Coffey, D.S. (1998). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol*, 160,2381–2392.

Figure legends

Figure 1 - Mean and standard deviation of body weight gain (A), prostate wet weight (B), prostate relative weight (C), blood glucose levels (D) and serum testosterone (E). C1, short-term control; M1, short-term control treated with MLT; D1, short-term untreated diabetic; MD1, short-term diabetic treated with MLT; C2, long-term control; M2, long-term control treated with MLT; D2, long-term untreated diabetic and MD2, long-term diabetic treated with MLT. Light bars; short-term experiment and dark bars; long-term experiment. (N = 10 animals/group). Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups C1, M1, D1, MD1 (parametric data: prostate weight, relative prostate weight, serum testosterone; non-parametric data: body weight gain, glycemia), and different capital letters indicate significant differences between groups C2, M2, D2 and MD2 (parametric data: body weight gain; prostate weight, relative prostate weight, serum testosterone; non-parametric data: glycemia). *significant difference between experimental periods (t-test or Mann Whitney).

Figure 2 – Immunohistochemistry (A-H) for the androgen receptor and quantification of AR-positive cells (I) in the acinar epithelium of rat ventral prostate (brown nuclei). A, short-term control (C1); B, short-term control treated with MLT (M1); C, short-term untreated diabetic (D1); D, short-term diabetic treated with MLT (MD1); E, long-term control (C2); F, long-term control treated with MLT (M2); G, long-term untreated diabetic (D2); H, long-term diabetic treated with MLT (MD2). Captions: e - epithelium, l – lumen, s – stroma, arrow- AR-positive cells. Magnification: 400X, bar = 25 μ m. I, AR-positive epithelial cells frequency (%), light bars; short-term experiment and dark bars; long-term experiment. (N= 5 animals/group). Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups C1, M1, D1, MD1 (parametric data), and different capital letters indicate significant differences between groups C2, M2, D2 and MD2 (non-parametric data).

Figure 3 – Proliferation index, evaluated by immunocytochemistry for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Western blotting. A, short-term control (C1); B, short-term control treated with MLT (M1); C, short-term untreated diabetic (D1); D, short-term diabetic treated with MLT (MD1); E, long-term control (C2); F, long-term control treated with MLT (M2); G, long-term untreated diabetic (D2); H, long-term diabetic

treated with MLT (MD2). Captions: e - epithelium, l – lumen, s – stroma, arrow-PCNA-positive cells (brown nuclei). Magnification: 400X, bar = 25 μ m. I, Relative frequency (%) of PCNA-positive cells. J, Western blotting for PCNA in ventral prostate extracts and the respective densitometry analysis. B-actin was used as internal control loading. Light bars; short-term experiment and dark bars; long-term experiment. (N= 5 animals/group). Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups C1, M1, D1, MD1 (parametric data: PCNA protein content; non-parametric data: frequency of PCNA-positive cells), and different capital letters indicate significant differences between groups C2, M2, D2 and MD2 (parametric data: PCNA protein content; non-parametric data: frequency of PCNA-positive cells).

Figure 4 – Apoptotic cells quantified by the TUNEL method (brown nuclei). A, short-term control (C1); B, short-term control treated with MLT (M1); C, short-term untreated diabetic (D1); D, short-term diabetic treated with MLT (MD1); E, long-term control (C2); F, long-term control treated with MLT (M2); G, long-term untreated diabetic (D2); H, long-term diabetic treated with MLT (MD2). Captions: e - epithelium, l – lumen, s – stroma, arrow- PCNA-positive cells (brown nuclei). Magnification: 400X, bar = 25 μ m. I, Relative frequency of apoptotic cells (%). Light bars; short-term experiment and dark bars; long-term experiment. (N= 5 animals/group). Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups C1, M1, D1, MD1 (non-parametric data), and different capital letters indicate significant differences between groups C2, M2, D2 and MD2 (non-parametric data), according to ANOVA followed by the Tukey (*post hoc*) or Kruskal -Wallis test followed by Dunn's test (*post hoc*).

Figure 5 - Tecdial localization of melatonin receptor type 1B (MTR1B) in the ventral prostate of rats. A, short-term control (C1); B, short-term control treated with MLT (M1); C, short-term untreated diabetic (D1); D, short-term diabetic treated with MLT (MD1); E, long-term control (C2); F, long-term control treated with MLT (M2); G, long-term untreated diabetic (D2); H, long-term diabetic treated with MLT (MD2). I, negative control; J, positive control, brain tissue section of rat. K, relative frequency (%) for MTR1B-positive areas. Captions: e - epithelium, l – lumen, s – stroma. Magnification: 400X, bar = 25 μ m. Light bars; short-term experiment and dark bars; long-term experiment. (N= 5 animals/group). Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups C1, M1, D1, MD1 (non-parametric

data), and different capital letters indicate significant differences between groups C2, M2, D2 and MD2 (parametric data), according to ANOVA followed by the Tukey (*post hoc*) or Kruskal -Wallis test followed by Dunn's test (*post hoc*).

Figure 6 - MTT assay (absorbance values) for cell proliferation for PNTA1 (A, B, and C), 22Rv1 (D, E and F) and PC3 cells (G, H and I) under normal conditions (A, D and G), 1 day of pre-incubation with hyperglycemic medium (B, E and H), 7 days of pre-incubation with hyperglycemic medium (C, F and I) and treated with DMSO, 500 μ M, 5 mM or 10 mM of MLT for 1 and 2 days. *represents significant differences among the different concentrations of melatonin exposure for 1 day (parametric data). + represents significant differences among the different concentrations of melatonin exposure for 2 days (parametric data).

Figure 7 - Determination of cell cycle analysis by DNA content using flow cytometry. 22Rv1 (A, B, C, and D), PNTA1 (E, F, G and H) and PC3 (I, J, K and L) cells maintained under normal conditions (A, E and I), treated with MLT (5 mM or 10 mM) for 1 day (B, F and J), incubated with HG medium for 2 days (C, G, and K), and pre-incubated with HG medium for 1 day and then exposed to MLT (5 mM or 10 mM) for an additional 1 day (D, H and L). DNA fragmentation: white peaks; G0/G1: blue peaks; S: green areas and G2/M: red peaks.

Figure 1
[76]

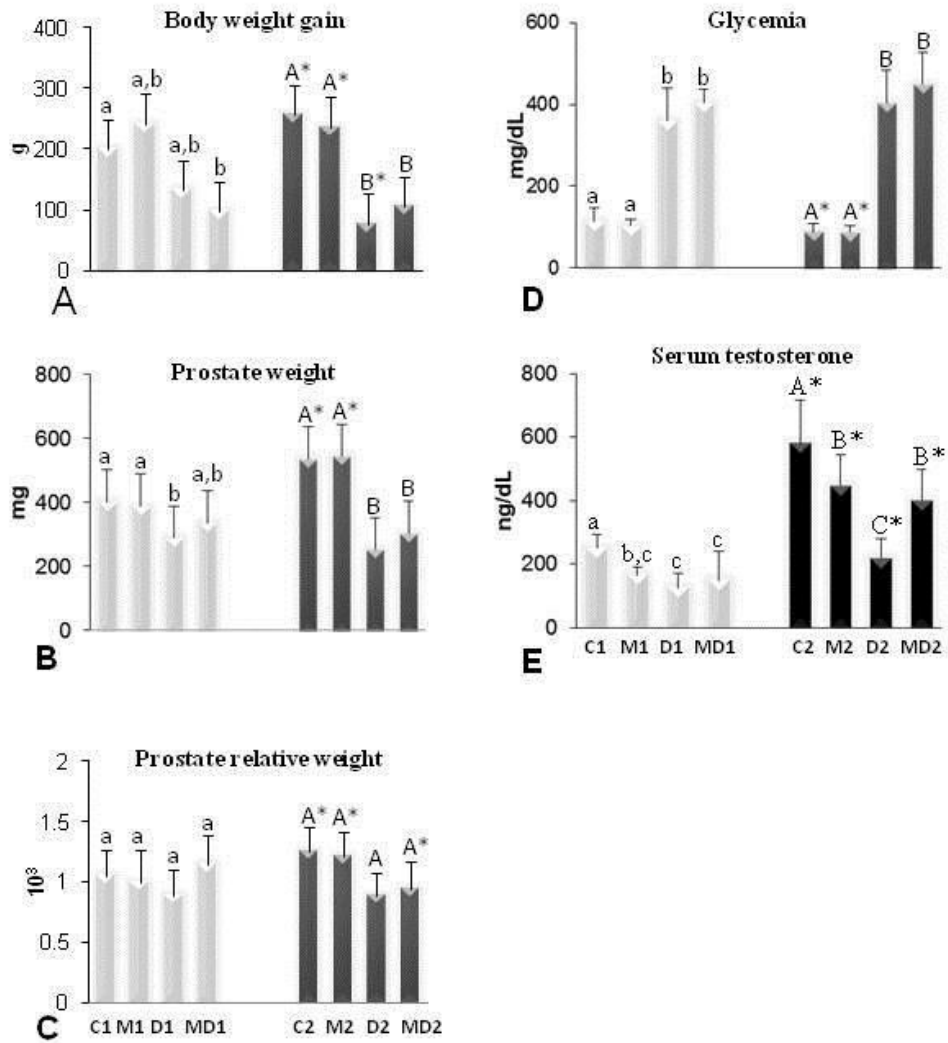


Figure 2
[77]

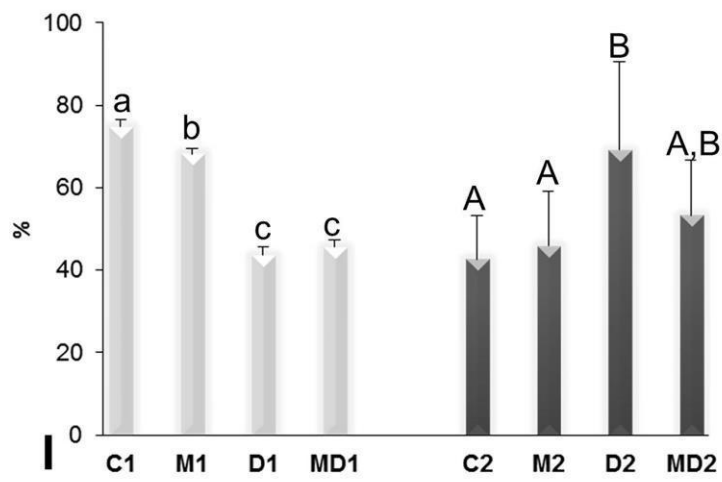
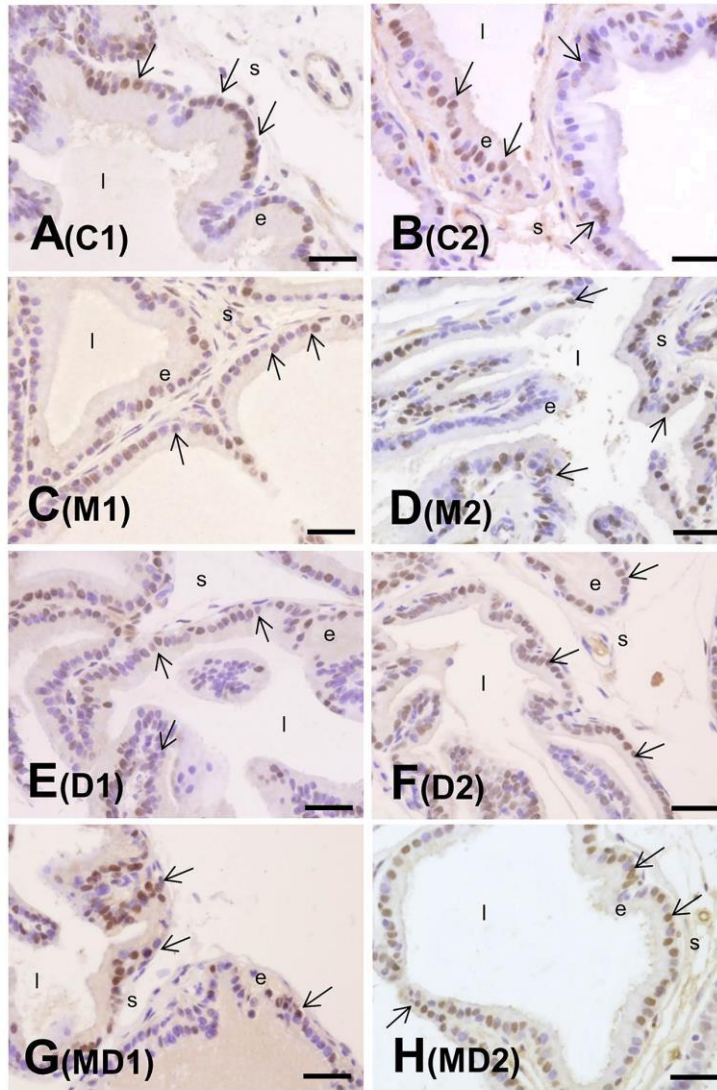


Figure 3
[78]

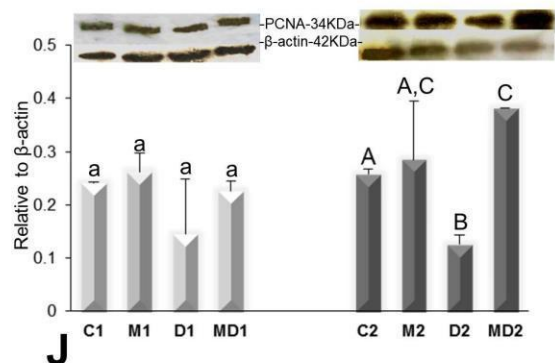
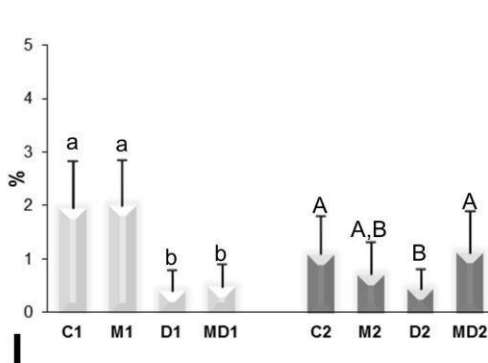
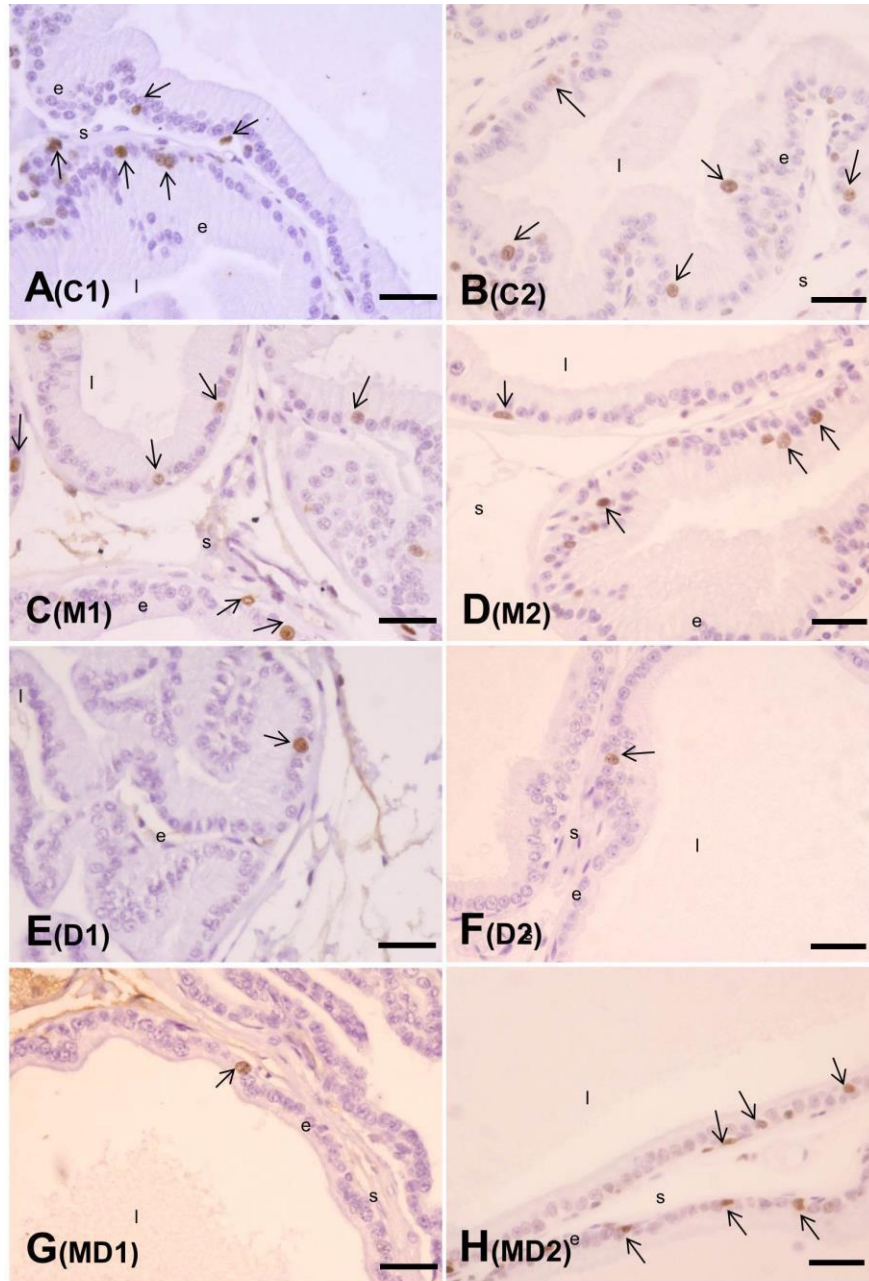


Figure 4
[79]

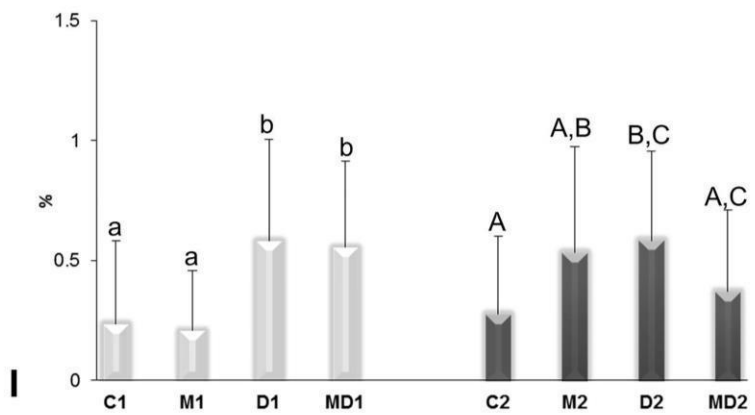
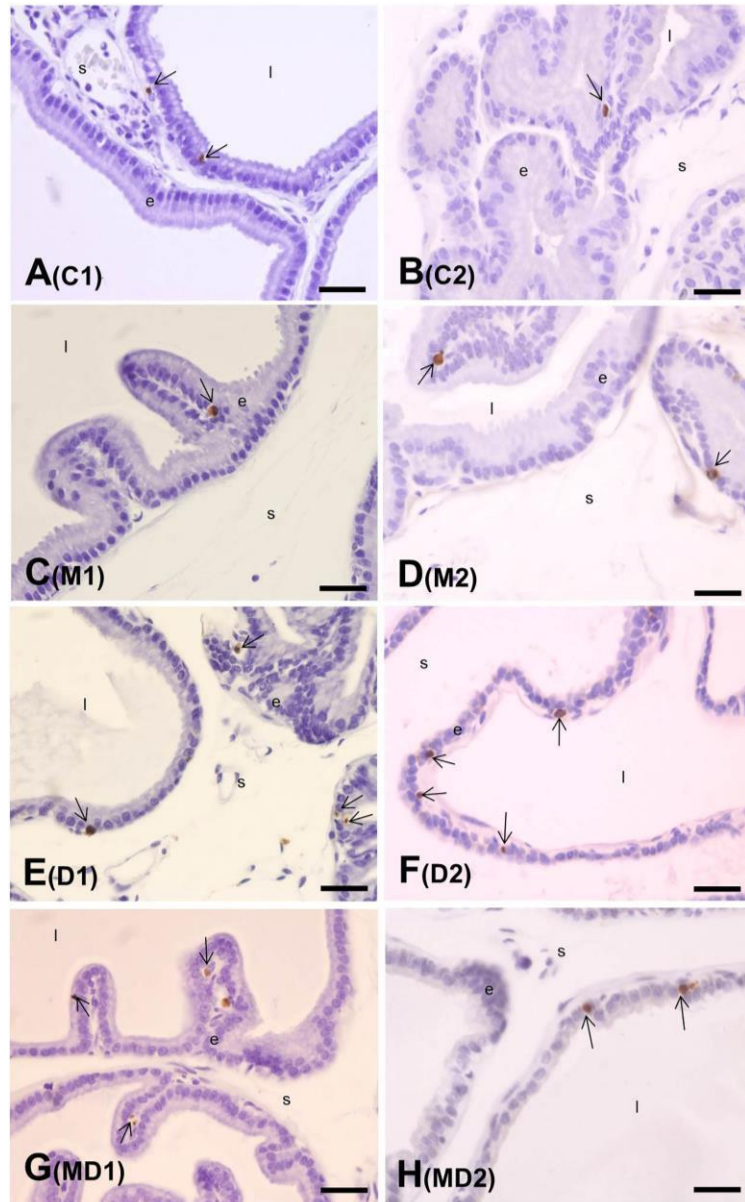


Figure 5
[80]

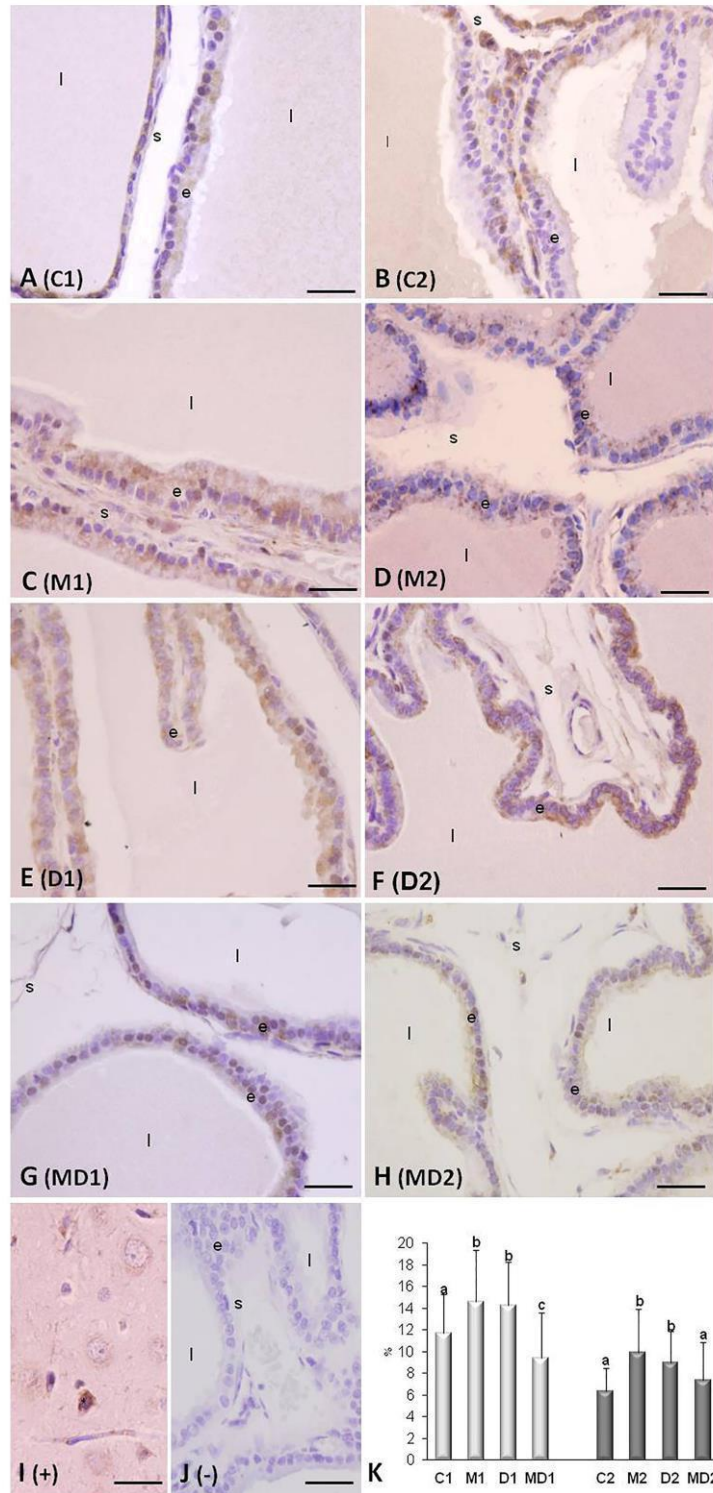


Figure 6
[81]

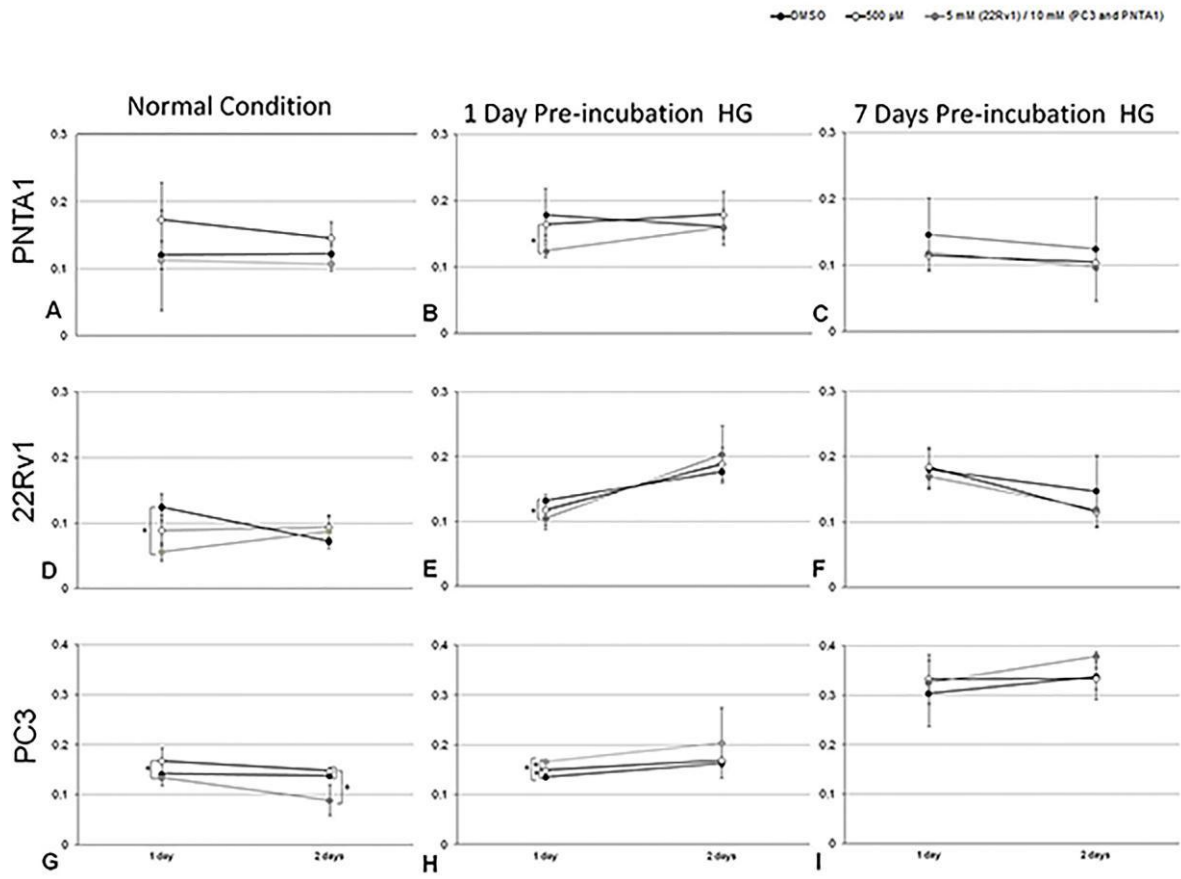
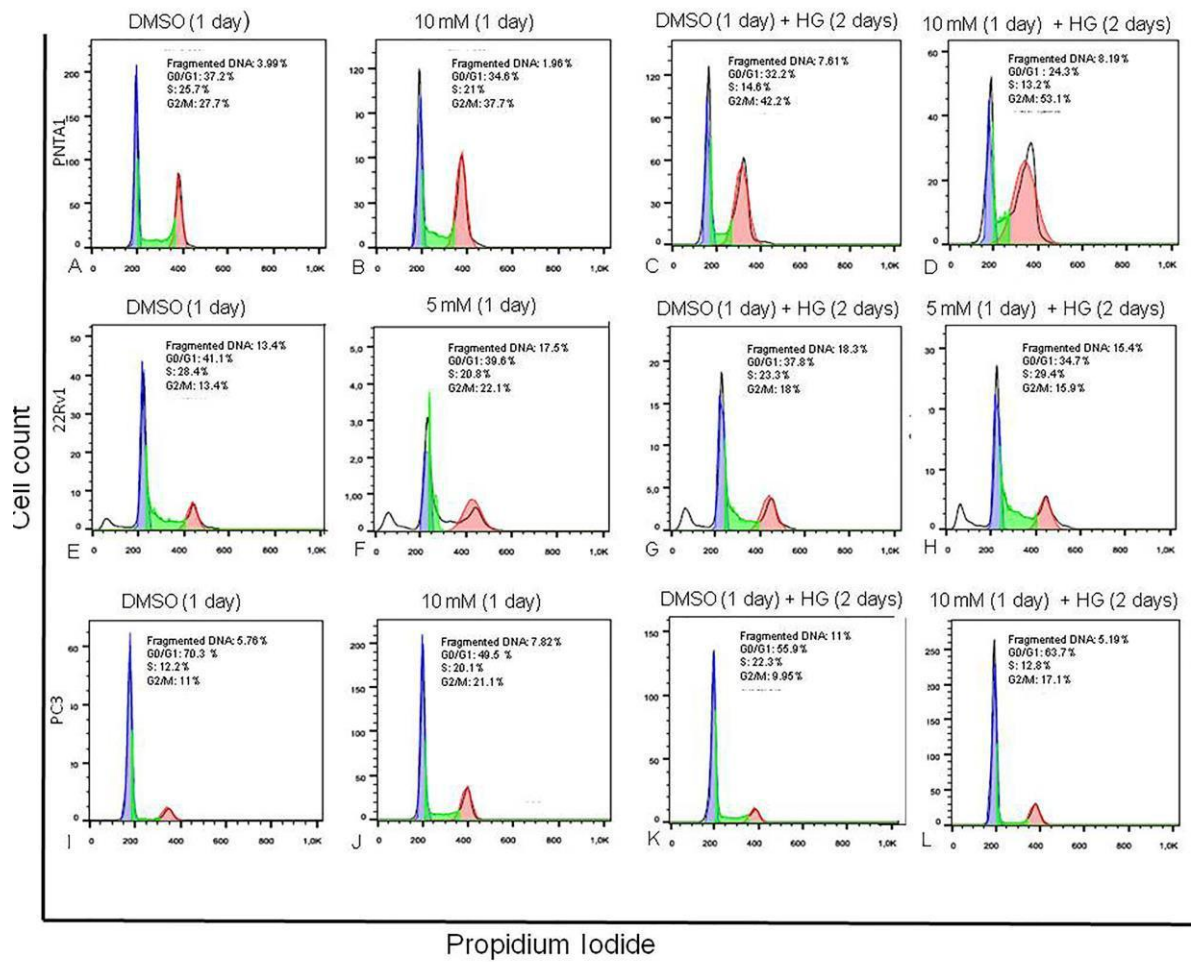


Figure 7
[82]



Capítulo 3

Alterações teciduais e incidência de lesões patológicas na próstata ventral de ratos frente ao diabetes e tratamento com melatonina

Marina G. Gobbo¹, Viviane Sanches Masitéli², Guilherme Henrique Tamarindo²,
Sebastião Roberto Taboga², Rejane Maira Góes².

¹Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica,
IB/UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Palavras-chaves: próstata, diabetes experimental, melatonina, PIN e carcinoma microinvasivo

Resumo

O diabetes crônico induzido por aloxana induz lesões malignas e pré-malignas na próstata de ratos. A hiperglicemia acarreta maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) a qual favorece a carcinogênese em diversos órgãos. Entretanto, a associação entre *diabetes mellitus* (DM) e o câncer de próstata ainda não é bem estabelecida, principalmente no DM do tipo 1 no qual há carência androgênica e insulínica. A melatonina (MLT) é um potente antioxidante, anti-inflamatório e possui propriedades antitumorais. Esta investigação teve como objetivo analisar se o diabetes induzido por estreptozotcina (STZ) acarreta a ocorrência de malignidades na próstata ventral de ratos. Além disso, foi analisado se o tratamento com MLT em baixa dosagem previne as alterações teciduais causadas pelo diabetes experimental em curto e longo prazo e se a ingestão desse hormônio durante o período pré-púbere e seu uso prolongado afetam a histologia prostática. A MLT foi disponibilizada na água de beber (10 µg/Kg de peso corporal/dia) a partir da 5ª semana de idade até o fim do experimento. Na 13ª semana de idade o diabetes foi induzido por STZ (40mg/Kg de peso corporal, ip). A eutanásia dos animais ocorreu na 14ª semana (curto prazo) e na 21ª semana de idade (longo prazo). A próstata foi processada para microscopia de luz e as análises estereológicas do epitélio e componentes estromais foram realizadas em Tricrômico de Tuschmann Blue. As medidas morfométricas e avaliação histopatológica foram realizadas em cortes corados por Hematoxilina-Eosina. Reações de imunohistoquímica foram feitas para α -actina, proliferação celular (PCNA), proteína antiapoptótica bcl-2, glutathione S-transferase pi (GSTpi) e metilação do DNA (5-metil-citidina). A MLT foi mais influente na histologia prostática quando administrada durante a fase pré-púbere. Este hormônio atenuou a atrofia do epitélio e das células musculares lisas, normalizou a distribuição colagênica interacinar e reduziu a incidência de neoplasias intraepiteliais (PIN) de alto grau, infiltrados linfocíticos no estroma e epitélio, prostatite e atrofia proliferativa inflamatória (PIA) nos animais diabéticos. Contudo, não foi eficiente em evitar o desenvolvimento de carcinoma microinvasivo, provavelmente devido à baixa dosagem utilizada. O diabetes induzido por STZ é um modelo experimental pertinente para o estudo da incidência e progressão tumoral na próstata em condições de

hiperglicemia, porém não se podem descartar os efeitos específicos da droga tais como o aumento da metilação do DNA das células epiteliais.

Introdução

O estroma prostático é formado por fibroblastos, células musculares lisas (cml), componentes de matriz extracelular, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias. Algumas evidências indicam que as células estromais são fundamentais no desenvolvimento, na fisiologia assim como instalação de patologias (Chung e Davies, 1996; Cunha et al., 2004; Tuxhorn et al., 2002). Estas células possuem uma plasticidade funcional sendo capaz de alterar seu fenótipo em situações de carência androgênica ou outros tipos de distúrbios hormonais. Conforme evidenciado por análises citoquímicas e ultraestruturais as cml prostáticas em desequilíbrio hormonal podem variar de um fenótipo contrátil para secretório no qual produzem ativamente produtos da matriz extracelular (Antonioli et al., 2004; 2007; Carvalho et al., 1997a,b; Corradi et al., 2004; Vilamaior et al., 2000; 2005). Esse fenótipo celular denominado de miofibroblasto é encontrado no estroma reativo característico do câncer de próstata (Tuxhorn et al., 2002), contudo estudos de nosso laboratório com diabetes induzido por aloxana, mostraram que esse tipo celular não foi encontrado no estroma dos animais diabéticos (Gobbo et al. 2012a). Além disso, a análise dos efeitos em longo prazo do diabetes induzido por aloxana na próstata de ratos demonstram profundo remodelamento estromal envolvendo colágeno e condroitin sulfato, sugerindo a participação das células estromais no desenvolvimento de lesões malignas na próstata ventral de ratos (Ribeiro et al., 2008; 2009). Especula-se que tais eventos de remodelamento estromal facilitem progressão tumoral por proporcionarem um microambiente favorável. Além disso, o desequilíbrio das interações epitélio-estroma está intimamente relacionado ao estabelecimento de lesões malignas nesta glândula.

A associação entre o *diabetes mellitus* (DM) e o câncer de próstata é controversa. Alguns estudos clínicos apontam para um declínio no risco de desenvolvimento do câncer de próstata especialmente no DM do tipo 1 (Fall et al., 2013; Moreira et al., 2011; Xu et al., 2013; Yu et al., 2013), devido à carência de insulina e declínio dos níveis séricos de testosterona (Bhasin et al., 2007). Entretanto, outros estudos apontam para a maior susceptibilidade ao acometimento de tumores

prostáticos em indivíduos diabéticos e com síndrome metabólica (Park et al., 2014; Shiozawa e Horie et al., 2014). Experimentos com diabetes induzido por aloxana de nosso laboratório demonstraram um aumento das neoplasias intraepiteliais (PIN) e da incidência de carcinoma na próstata ventral de ratos após três meses de diabetes sem tratamento com insulina (Ribeiro et al., 2008). Contudo há uma escassez de trabalhos que avaliem a incidência de malignidades na próstata decorrentes do diabetes induzido por estreptozotocina. A ação citotóxica dessas drogas diabetogênicas sobre as células β -pancreáticas são diferenciadas sendo que a aloxana promove a morte celular por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a estreptozotocina promove a alquilação do DNA (Lenzen, 2008).

No *diabetes mellitus*, a produção de ROS, decorrente da hiperglicemia prolongada, está aumentada sistemicamente (Ikemura et al., 2013; Wautier et al., 2001; Yan et al., 1994). Isso é devido, sobretudo à formação de produtos finais de glicação não enzimática (AGE), os quais se ligam aos seus receptores específicos (RAGE) e ativam a NADPH oxidase culminando no aumento de produção de ROS. O estresse oxidativo tem sido relacionado a vários estágios de progressão tumoral incluindo a carcinogênese, proliferação e invasão (Evans et al. 2002; Pani et al., 2010; Vincent et al., 2004). Desse modo, os altos níveis de glicose no sangue seriam favoráveis à maior incidência e aceleram a progressão do câncer em pacientes diabéticos.

A melatonina vem sendo utilizada no tratamento de diversas doenças tais como o diabetes e o câncer (Korkmaz, et al., 2009; Pandi-Perumal, et al., 2006; Reiter, 2000). Sua secreção é controlada pelo núcleo supraquiasmático, tendo um pico durante a porção escura do ciclo dia-noite sendo ausente na porção clara devido à ação supressora da luz. Além disso, essa indolamina possui propriedade antioxidante por atuar como um doador de elétrons em processos não enzimáticos, além de inibir enzimas da família P450, sequestrar ROS como hidroxila e peroxila (Cuzzocrea e Reiter, 2001; Montilla et al., 1998; Vural et al., 2001) e regular a atividade de enzimas antioxidantes (Reiter, 2000; Pandi-Perumal et al., 2006). A inibição do crescimento tumoral pela MLT vem sendo bastante descrita para as células prostáticas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Sainz et al., 2005; Shiu et al., 2003; 2013; Siu et al., 2002; Tam et al., 2011; Xi et al., 2000; 2001). O receptor de melatonina do tipo 1 (MTR1) foi identificado em indivíduos com câncer de próstata e o tratamento com melatonina induziu a estabilização de tumores resistentes à ablação hormonal (Shiu et al., 2003). O receptor MTR1 modula a ação

antimitogênica da MLT em células prostáticas atenuando o influxo de cálcio induzido por esteroides (Shiu et al., 2013, Xi et al., 2000; 2001).

Este estudo avaliou se o diabetes induzido por estreptozotocina é um modelo eficiente para se avaliar o acometimento e progressão de lesões malignas e pré-malignas na próstata ventral de ratos em condições de hiperglicemia prolongada. Além disso, foi analisado se o tratamento com MLT em baixa dosagem interfere nas alterações teciduais causadas pelo diabetes experimental em curto e longo prazo e se a ingestão desse hormônio durante o período pré-púbere e seu uso prolongado afeta a histologia prostática.

Material e métodos

Animais e delineamento experimental

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, recém-desmamados (5 semanas da idade), obtidos do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu. O experimento regeu-se de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e os procedimentos envolvidos foram acompanhados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP (Protocolo 051/2011 CEUA). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno com substrato de maravalha, adaptadas com acesso à ração (Presence, Invivo, Paulinia, SP, Brazil) e água filtrada “ad libitum”, e submetidos às condições de luz (regime de 14h claro e 10h escuro) e temperatura em torno de 22°C. Após um curto período de adaptação, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em dois experimentos, totalizando 8 grupos (n=10/grupo). O experimento de curto prazo foi constituído pelo grupo controle (C1), controle tratado com melatonina (M1), diabético por uma semana não tratado (D1) e diabético por uma semana tratado com melatonina (MD1). O experimento de longo prazo foi constituído pelo grupo controle (C2), controle tratado com melatonina (M2), diabético por dois meses não tratado (D2) e diabético por dois meses tratado com melatonina (MD2). A administração da MLT (Sigma ChemicalCo. St Louis, MO, USA) foi executada com base nos procedimentos estabelecidos por Wolden-Hanson e colaboradores (2000), sendo dissolvida em etanol p.a. e armazenada em alíquotas a – 70°C. As alíquotas de MLT foram dissolvidas em 0,01% de etanol e disponibilizadas aos animais na água de beber, com três trocas semanais. As garrafas contendo MLT foram adaptadas com o

objetivo de proteger o hormônio da luz, pois se trata de uma molécula fotossensível. Com base no cálculo de ingestão de água diário a MLT foi disponibilizada de maneira a resultar na ingestão de 10 µg/Kg de peso corpóreo/animal/dia. A MLT foi fornecida aos grupos M1, M2, MD1 e MD2 a partir da 5ª semana de idade. Tais condições de administração foram padronizadas a partir da aplicação de vários testes de consumo preferencial e teste de aversão e as análises indicam que este modelo é eficiente na indução da elevação dos níveis de MLT durante o período noturno (Wolden-Hanson et al., 2000), e não influenciaram a quantidade de água ingerida pelos ratos. Embora a disponibilização da MLT na água de beber não garanta a mesma quantidade com exatidão de água ingerida pelos animais, é mais adequada para experimentos de longa duração para evitar o viés do estresse decorrente da gavagem diária.

Na 8ª semana de tratamento com melatonina (13ª semana de idade), realizamos a indução do diabetes (grupos D1, D2, MD1 e MD2), por meio da injeção intraperitoneal de 4,5mg/100g de peso corporal de estreptozotocina (Sigma, Louis, MO, USA), diluída em 1mL de tampão citrato 0,01M. A solução contendo a droga foi injetada nos animais após 24 horas de jejum e anestesia prévia do indivíduo com quetamina e xilasina (0,1 mL/100g de peso corporal). Os animais do grupo controle receberam apenas injeção com tampão citrato. No mesmo dia da indução do diabetes, o peso corpóreo foi mensurado. A glicemia dos animais foi avaliada dois dias após a indução com estreptozotocina, com o uso de punção capilar e do aparelho Accu-chek (Roche) de fitas *one touch*. Os animais com glicemia superior a 220 mg/dL, foram considerados diabéticos. Durante todo o experimento o peso corpóreo, a ingestão de ração e de água foi acompanhada. Os grupos C1, M1, D1 e MD1 foram sacrificados na 14ª semana, enquanto os grupos C2, M2, D2 e MD2 foram sacrificados na 21ª semana. Os ratos foram decapitados após a inalação de CO₂.

Processamento para microscopia de luz

A próstata ventral foi retirada e pesada, seus fragmentos foram imersos em solução de Karnovsky (formaldeído 2,5% recém-preparado, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2) para serem fixados durante 12 a 24 horas. Os cortes histológicos (4 µm de espessura) foram submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para estudo morfológico geral. Os fragmentos destinados às análises imunohistoquímicas foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% recém-preparado em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 e metacarn (1:3:6 de ácido acético,

clorofórmio e metanol) e seus respectivos cortes foram aderidos em lâminas previamente silanizadas. O material obtido foi documentado através da captura de imagem pelo microscópio de campo claro (Olympus CH30) e digitalizado pelo microscópio Olympus acoplado com câmera CCD e Sistema de aquisição de Imagens.

Análises estereológicas

As análises estereológicas foram realizadas em cortes corados por Tricrômico de Tuschmann Blue (Delbès et al., 2006). Essa técnica citoquímica cora em marrom o epitélio acinar, em azul os componentes colagênicos e em laranja as células musculares lisas (cml) e vasos sanguíneos, permitindo, portanto a distinção desses componentes estromais. Foram capturados 30 campos contíguos no aumento de 40X e 5 animais por grupo. Após a quantificação dos componentes prostáticos pelo retículo de pontos (Weibel, 1963), os valores obtidos em frequência relativa foram calculados em relação ao peso prostático em mg (frequência absoluta ou peso relativo). As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se o sistema de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics, versão 6.0 para Windows, Bethesda, MD, USA).

Análises morfométricas

Análises morfométricas da espessura da camada de cml e da altura do epitélio acinar foram efetuadas. Para isso foram utilizados fragmentos prostáticos de 5 animais de cada grupo e 30 campos microscópicos diferentes foram escolhidas ao acaso, no aumento de 1000X. Para cada campo foram realizadas 3 medidas (μm) de cada um desses parâmetros.

Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada apenas para o experimento de longo prazo. Foram determinadas a incidência (número de indivíduos) e a multiplicidade de lesões (número de focos de cada lesão por área de tecido) sendo 10 animais para C2; 12 animais para M2; 15 animais para D2 e 10 animais para MD2. A classificação das lesões patológicas foi efetuada com base no sistema proposto por Shappel et al. (2004) para próstata de roedores, aplicado anteriormente para ratos (Ribeiro et al., 2008). Referências adicionais foram usadas para caracterização da atrofia acinar (Borowsky et al., 2006), padrões inflamatórios (Sciarra et al., 2007) e morte celular por descolamento

(Rosa-Ribeiro et al., 2014). A atrofia acinar foi identificada por epitélio achatado, com células exibindo largura maior que a altura por todo o perímetro do ácino. A metaplasia foi identificada por regiões de epitélio prostático as quais deixam de ser cilíndricas e passam a ser cúbicas ou pavimentosas. Os focos inflamatórios foram diferenciados segundo a localização das células do sistema imune em estromais, em contato com o epitélio glandular e no interior luminal (prostatite), segundo classificação de Sciarra et al. (2007). A atrofia proliferativa inflamatória (PIA) foi reconhecida pelas três características em conjunto – atrofia epitelial, associação de células inflamatórias e alta proliferação celular (De Marzo et al., 1999). As neoplasias intraepiteliais (PIN) foram reconhecidas pela presença de hiperplasia e atipia nuclear (núcleos aumentados, diminuídos ou alongados, hiper cromasia e nucléolo proeminente), sendo diferenciadas em baixo grau (tipo papilar) de alto grau (cribiforme e microácinos). As regiões hiperplásicas focais foram caracterizadas por focos proliferativos no epitélio sem as atipias nucleares encontradas na PIN. O adenocarcinoma foi identificado com base nas características histológicas, em especial na atipia nuclear, rompimento da membrana basal e expressão de bcl-2. Para verificar o rompimento da membrana basal e a organização das fibras colagênicas adjacentes às lesões malignas e pré-malignas foi realizado a coloração por Reticulina de Gomori (Vilamaior et al., 2000). Também foram quantificados os macrófagos estromais unitários e a descamação epitelial segundo Rosa-Ribeiro et al., 2013. Para essas análises foram utilizados três fragmentos da próstata por animal para os quais foram obtidos, por fragmento, cortes histológicos em parafina em três diferentes profundidades. Cada corte histológico foi digitalizado em scanner de lâminas Olympus Virtual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200X. A área total dos cortes histológicos foi quantificada com o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics version 4.5 for Windows, MD, USA) e toda sua extensão foi examinada para detecção e quantificação do número de focos de cada lesão acima mencionada.

Reações de imunohistoquímicas

Os cortes histológicos foram submetidos às reações de imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteína antiapoptótica bcl-2, glutathione S-transferase pi (GSTpi) e 5-metilcitosina, marcador para metilação do DNA. Resumindo-se o processo, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (10 mM, pH 6) durante 20-40 minutos, seguido de bloqueio de

peroxidases endógenas com H_2O_2 3% em metanol. Em seguida os cortes foram incubados em soro bovino normal 3% em PBS (PCNA, GSTpi e bcl-2) e leite desnatado 5% (5-metilcítidina) durante 1 hora para bloqueio de proteínas inespecíficas. Após lavagem em PBS foi feita incubação com os anticorpos primários diluídos em BSA 1%: PCNA (sc56, mouse monoclonal, 1:100, 1 h a 37°C, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), bcl-2 (sc-783, rabbit, policlonal, 1:70, overnight a 4° C, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), GSTpi (ARP48487, rabbit policlonal, 1:75, overnight a 4° C, Aviva Systems, San Diego, CA) e 5-metilcítidina (sc-56615, mouse monoclonal, 1:75, overnight a 4°C, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A detecção foi realizada com polímero (NovolinkPolymer, Novocastra) para PCNA, bcl-2 e 5-metilcítidina e com anticorpo secundário biotilado universal seguida de ABC Staining System para GSTpi. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Os controles negativos foram feitos omitindo-se os anticorpos primários. Os núcleos das células epiteliais marcadas com 5-metilcítidina foram estimados contando-se o número de células marcadas no epitélio dividido pelo total de células do campo visual. Para ambas as contagens foram utilizadas 30 campos contíguos fotografados na objetiva de 40X de 5 animais por grupo e 3 fragmentos prostáticos por animal.

Imunofluorescência para α -actina

Após passarem pelos mesmos procedimentos descritos acima, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo primário em BSA 1% (sc-32251, mouse monoclonal, 1:100, overnight a 4°C, Santa Cruz Biotechnology, CA). Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário IgG-FITC (sc-2010, goat anti-mouse, fluorescein conjugated, 1:200, 2 h RT, Santa Cruz Biotechnology, CA). Os núcleos foram corados com DAPI blue (UltraCruz™ Mounting Medium, sc-24941 for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology, CA) e as lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência Zeiss Imager M2 (Zeiss, Alemanha) acoplado ao software AxioVision (Zeiss, Alemanha).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas entre os grupos do mesmo período experimental utilizando o software Statistica 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os dados foram testados considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os

grupos que assumiram esses pressupostos (dados paramétricos) foram comparados aplicando teste one-way ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*). Os dados que não se enquadraram nesses pressupostos (dados não paramétricos) foram comparados aplicando o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

Resultados

Análises morfológicas: estereologia e morfometria

As análises histológicas e esterológicas (Figs 1 e 2) indicaram que a ingestão de MLT por ratos saudáveis na fase pré-púbere ocasionou aumento do compartimento epitelial (10% em frequência absoluta e 20% na altura) e as cml se tornaram mais espessas (Fig. 1C; 2C e 3). O consumo prolongado deste hormônio não alterou a morfologia prostática dos animais adultos (Fig. 1D; 2D e 3A). Nos animais diabéticos de curto prazo (Fig. 1E; 2E; 3A) houve atrofia epitelial (redução de 30% da frequência absoluta), menor peso relativo das fibras colagênicas e cml periacinares se mostraram menos espessas (~ 33%) e com pontos interrupção (Fig. 3B,C). Em fases mais tardias da doença a atrofia do compartimento epitelial foi mais drástica (Fig. 1F; 2F e 3A), com decréscimo do peso relativo em 60% e menor espessura ($p < 0.001$). As fibras colagênicas e os demais componentes estromais também tiveram menor peso relativo e a atrofia das cml foi mais conspícua após dois meses de diabetes, com redução de 40% do seu peso relativo e espessura (Fig. 1F; 2F e 3A). O tratamento com MLT aos animais diabéticos de curto prazo aumentou a proporção tecidual do componente epitelial (Fig. 1G; 2G e 3A) bem como a frequência absoluta das fibras de colágeno e a espessura das cml ($p < 0.001$). Em fases mais tardias da doença, a terapia com MLT aumentou apenas a distribuição colagênica e a espessura das cml (Fig. 1H, 2H e 3).

A vascularização do tecido prostático não foi influenciada tanto pelo diabetes experimental quanto pelo consumo de melatonina (Fig. 2I).

Incidência e densidade de focos de lesões e alterações teciduais

A figura 4 ilustra as principais alterações teciduais, lesões malignas e pré-malignas aqui observadas. A ocorrência de células de *signet* foi um evento pontual (Fig. 4A), ocorrendo apenas em um animal do grupo diabético não tratado. As neoplasias

intraepiteliais mais frequentes foram as do tipo papilar (Fig. 4D e E) e cribiforme (Fig. 4F, G e H).

Os animais saudáveis tratados com MLT por quatro meses apresentaram um aumento de 20% na incidência de atrofia acinar, 37% de PIN de alto grau, ocorrência de prostatite (8%) e redução de 8% da incidência de PIN de baixo grau, de 10% células inflamatórias no epitélio e estroma (Tabela 1). Com exceção da ocorrência de PIN de alto grau, esses achados foram corroborados por respectivas variações numéricas, mas não significativas na densidade de focos (Fig. 4P). Embora tenha sido constatada a ocorrência de prostatite para esse grupo, houveram poucos ácinos com infiltrados linfocíticos.

A exposição prolongada ao diabetes induzido aumentou a incidência e a densidade de atrofia (~55% e $p < 0.0007$, respectivamente) e os focos de metaplasia epitelial prostática ($p = 0.0018$) de acordo com a Tabela 1 e Fig. 4P. A menor ocorrência de PIN de baixo grau foi acompanhada da redução não significativa dos focos de hiperplasia. Entretanto, esse distúrbio metabólico aumentou em 37% a incidência de PIN de alto grau e foram encontrados animais com carcinoma microinvasivo. Os animais desse grupo apresentaram também aumento da incidência e densidade de infiltrados inflamatórios no epitélio e no estroma e ocorrência de PIA e prostatite. Houve um aumento marginal (37%) na densidade de descamação epitelial (Fig. 4P).

O tratamento dos animais diabéticos com MLT reduziu a incidência de metaplasia (~10%), de PIN de alto grau (~45%), de infiltrados inflamatórios (~34%) e de descamação epitelial (13%). A menor incidência desses parâmetros foi acompanhada de redução não estatisticamente significativa da densidade dos respectivos focos. Nesses animais também não houve a ocorrência de PIA e prostatite, contudo houve ocorrência de carcinoma microinvasivo e incremento de 25% na incidência de PIN de baixo grau e 33% na densidade de focos hiperplásicos (Tabela 1, Fig. 4P).

A incidência e a densidade de macrófagos não foram influenciadas pela MLT e pelo diabetes induzido (Tabela 1, Fig. 4P).

Immunolocalização de bcl-2, PCNA, GSTpi

Uma grande quantidade de células PCNA-positivas foi detectada nos remanescentes acinares e estroma do carcinoma microinvasivo (Fig. 5A e C) e em menor quantidade nas PIN papilares de baixo grau (Fig. 5E e F). As PIN de alto grau e

carcinoma mostraram áreas de intensa marcação para a proteína antiapoptótica bcl-2 (Fig. 5B e D). Essa marcação não foi encontrada em áreas não comprometidas (Fig. 5G).

A marcação para GSTpi nos animais sem comprometimento da histologia prostática ocorre nas células basais (Fig. 5I) sendo que em ratos com prostatite a expressão de GSTpi apresentou o mesmo padrão (Fig. 5L). Entretanto, em áreas com carcinoma microinvasivo, a marcação das células basais desaparece e é possível localizar áreas positivas tênues para GSTpi nos locais onde anteriormente estavam os epitélios íntegros. As células cancerígenas não são se apresentaram marcadas para GSTpi. (Fig. 5J e K).

Estimativa da Metilação do DNA

Para melhor discriminar os efeitos da droga no acometimento de lesões pré-malignas e malignas foram realizadas reações de imunohistoquímica para 5-metilcitidina, um indicador de metilação de DNA. O diabetes induzido aumenta drasticamente ($p < 0.001$) o número de células positivas para esse marcador e a intensidade da marcação (Fig. 6C,D e G) e a MLT parece não interferir nesse aumento da metilação do DNA. Também foi encontrado um grande número de células marcadas no carcinoma microinvasivo de animais diabéticos tratados com melatonina (Fig. 6E). Contudo, tumores microinvasivos de ratos senis (56 semanas de idade) também apresentaram intensa marcação para 5-metilcitina (Fig. 6F).

Discussão

O presente estudo analisou se o modelo experimental de diabetes induzido por STZ favorece o acometimento de lesões malignas e pré-malignas na próstata ventral de ratos decorridos dois meses após o diagnóstico e mostrou ser eficiente visto que foram encontrados animais com vários tipos de alterações teciduais e diferentes graus de malignidade dessas lesões. A MLT atenua as alterações causadas pelo diabetes experimental principalmente no componente epitelial e células musculares lisas.

Conforme indicado pelas análises estereológicas, a administração de baixas doses de MLT a ratos saudáveis não altera as proporções dos compartimentos teciduais da próstata em ambas as idades examinadas. Entretanto, as análises morfométricas indicaram que esse tratamento aumenta a altura do epitélio acinar e a espessura da

camada de cml na próstata no início da vida adulta (grupo M1). Embora a histologia prostática não tenha sido drasticamente alterada pela administração de MLT, durante 4 meses, a ratos saudáveis, a incidência da PIN de baixo grau reduziu de 90 para 83% e a de atrofia acinar aumentou de 60 para 75%. A MLT é um hormônio antigonadotrófico, atua diminuindo os níveis do hormônio luteinizante (LH), ou diretamente nas células de Leydig intersticiais (Dubocovich et al., 2005; Yilmaz et al., 2000). Outros dados com o presente delineamento experimental mostram que houve um declínio de 23% dos níveis de testosterona sérica nos animais do grupo M2, bem como da proliferação celular (Gobbo et al., in press). Portanto a redução da testosterona e da atividade proliferativa na próstata, ocasionadas pelo consumo de MLT podem explicar a menor incidência de PIN e maior incidência de ácinos atrofícos. Este efeito também pode ter sido acentuado pela maior imunoposição do receptor MTR1B nesses animais devido ao tratamento com MLT (Gobbo et al., in press). Sabe-se que esse receptor inibe a sinalização do AR por ativação das proteínas quinase A e C (PKA e PKC) e aumento da expressão do gene $p27^{kip1}$ (Shiu et al., 2013), diminuindo a proliferação celular de células tumorais andrógeno-dependentes.

Conforme já previamente estabelecido em estudos anteriores (Cagnon et al., 2000; Fávoro et al., 2009; Ribeiro et al., 2006) o diabetes experimental ocasionou drástica atrofia prostática, indicada pela redução do peso relativo correspondente ao epitélio e lúmen acinar, fibras colagênicas e cml. Estudos prévios de nosso laboratório com animais diabéticos evidenciaram aumento das fibras colagênicas no estroma prostático após uma semana (Gobbo et al., 2012a) e 3 meses (Ribeiro et al., 2009) de diabetes induzido por aloxana e em camundongos diabéticos não obesos (Ribeiro et al., 2006). Porém, esses dados são provenientes de modelos experimentais diferentes e foram expressos em termos da frequência relativa (%) desses componentes. Essas variações na distribuição do colágeno são devidas ao encolhimento da glândula que promove o remodelamento da matriz extracelular e não há indícios que envolva alterações na síntese de colágeno (Gobbo et al., 2012a; Ikeda et al., 2000), destaca-se portanto a importância de se expressar esses dados em relação ao peso prostático. Em Gobbo et al. (2012a), foi verificada alterações na imunoreatividade das cml à calponina e o aumento de caveolas nesse tipo celular, indicadores de uma resposta aguda aos baixos níveis de testosterona sérica e glicose intracelular resultantes da ação diabética da aloxana. As alterações histopatológicas encontradas nos animais diabéticos tais como maior incidência de PIN de alto grau, PIA, atrofia, e carcinoma

microinvasivo também foram encontradas em experimentos prévios de nosso laboratório com diabetes induzido por aloxana em estágio crônico e sem tratamento com insulina (Ribeiro et al., 2008). Naquele estudo foi observada uma incidência de 30% de carcinoma microinvasivo, após três meses de diabetes, enquanto aqui detectamos uma incidência mais baixa (10%), após dois meses de diabetes. Assim, o desenvolvimento de lesões malignas parece ser uma consequência comum para próstata sujeita aos modelos de indução de diabetes por drogas diabetogênicas.

O tratamento dos animais diabéticos com MLT não evitou as alterações na proporção dos componentes teciduais da glândula induzidas pela doença, mas amenizou a atrofia epitelial e das cml e preservou o volume das fibras colagênicas. Também diminuiu a ocorrência de lesões inflamatórias e de PIN de alto grau. A melhora na atrofia prostática pode estar associada à recuperação dos níveis de testosterona circulantes promovida pela MLT nesses animais (Gobbo et al., in press). Essa recuperação da testosterona sérica aliada à restauração da expressão do receptor de melatonina do tipo 1B pode ter culminado no aumento da incidência de PIN de baixo grau. Esses resultados explicam a prevenção da atrofia prostática, sobretudo nos animais diabéticos de curto prazo nos quais a MLT ainda não restaura os índices de proliferação e morte celular tal como ocorre nos animais diabéticos tratados de longo prazo (Gobbo et al., in press). Em experimentos com doses maiores de MLT (10 mg/ kg de peso corporal), administradas a ratos diabéticos não houve aumento das proporções das cml e do colágeno no corpo cavernoso desses animais (Qiu et al., 2012).

O desenvolvimento espontâneo de câncer de próstata em ratos é um evento de incidência baixa (Potracki e Walsh, 1998) e com menor ocorrência no lobo ventral (Pollard, 1998). A incidência de carcinoma microinvasivo foi relativamente alta (1/15 animais), portanto, pode-se dizer que as lesões malignas aqui relatadas são associadas ao diabetes induzido por STZ, pois não foram encontradas nos grupos controles (C2 e M2). A desorganização da estrutura acinar, ruptura das fibras reticulares adjacentes ao epitélio e presença de células cancerígenas no estroma confirmou a natureza invasiva das lesões malignas (Gonçalves et al., 2010; Morrison et al., 2000). A STZ age seletivamente nas células β pancreáticas através do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) (Karunanayake et al., 1976). Efeitos sistêmicos desta droga têm sido reportados apenas no fígado e no rim, pois esses tecidos também expressam GLUT2 (Weiss et al., 1982). Além disso, estudos com células prostáticas LNCaP detectaram níveis de RNAm negligenciáveis de GLUT2 nesta linhagem (Wang et al., 2012),

portanto, é provável que a estreptozotocina não tenha sido internalizada pelas células prostáticas nesta investigação. Conforme já mencionado a hiperglicemia prolongada ocasiona aumento da produção de ROS que são intimamente relacionados à carcinogênese. Entretanto, não podemos desconsiderar os efeitos da STZ que causa depleção das ilhotas pancreáticas por meio de metilação do DNA. Para isso, foi realizado método imunohistoquímico para 5-metilcitosina, um marcador de metilação do DNA, o qual evidenciou maior número de núcleos marcados para os animais diabéticos não tratados. Embora as contagens não tenham sido finalizadas, a MLT parece não influenciar nesses resultados, tanto para os animais diabéticos quanto para os saudáveis. É válido mencionar que foram utilizadas cortes histológicos de próstata ventral de animais de meia-idade contendo carcinoma microinvasivo de origem espontânea, o qual mostrou a mesma intensidade de marcação para 5-metilcitosina observada no tumor encontrado em animais diabéticos tratados com melatonina. Os eventos epigenéticos envolvendo a metilação do DNA no câncer de próstata são bastante complexos e demandam o uso técnicas moleculares pertinentes. Tem sido estabelecido que a promoção tumoral do câncer de próstata acontece por meio de um processo de hipometilação global (Mohamed et al., 2007; Zelic et al., 2015). Entretanto, alguns estudos apontam que esse é um evento inicial da carcinogênese prostática. Deste modo, subsequentemente a hipermetilação de genes específicos ocorreria e inativaria genes envolvidos com a supressão tumoral (Ashour et al., 2014; Brothman et al., 2005).

O diabetes experimental também esteve associado uma maior incidência de infiltrados inflamatórios, PIA e prostatite. A próstata de roedores é muito susceptível aos processos inflamatórios, principalmente devido ao refluxo urinário (Gonçalves et al., 2013), situação que pode ser agravada no caso da condição diabética. O processo inflamatório pode induzir a carcinogênese através de danos genéticos e morfológicos, e criar um microambiente rico em citocinas e fatores de crescimento que podem favorecer o aumento da proliferação (Palapattu et al., 2004; Sciarra et al., 2007). É bem conhecido que a hiperglicemia devido ao diabetes pode bloquear o correto funcionamento das células imunológicas sendo muito comum a recorrência de infecções em indivíduos diabéticos (Calvet e Yoshikawa, 2001). Vale ressaltar que na presente investigação foram encontrados indivíduos diabéticos com inflamação em estágio crônico e agudo. A ingestão de MLT pelos animais diabéticos reduziu os infiltrados inflamatórios no epitélio e no estroma, e não houve ocorrência PIA e prostatite no grupo MD2. O papel antiinflamatório da MLT tem sido bastante elucidado na literatura (Carrilo-Vico et al.,

2005; Mayo et al., 2005), sendo que a ingestão de MLT por indivíduos diabéticos obesos atenuou os níveis de mediadores inflamatórios no plasma (Agil et al., 2013). O efeito direto da MLT na inflamação ocorre por meio de seus receptores (MTR1 e MTR2) ou sítios de ligação nucleares (ROR/RZB) presentes em macrófagos, linfócitos e outras células os quais podem regular a expressão atividade de enzimas cruciais envolvidas no processo inflamatório incluindo a fosfolipase A2, lipoxigenase 5 e cicloxigenase 2, os quais reduzem a produção intracelular de ácido araquidônico, leucotrienos e prostaglandinas (Radogna et al., 2010). Para melhor interpretação dos resultados da densidade de macrófagos é pertinente o uso de marcadores que possam discriminar as classes desse tipo celular. Essas análises se encontram em andamento.

Visando a caracterização das lesões malignas e pré-malignas ilustradas neste estudo, foram realizados métodos imunohistoquímicos com marcadores cuja expressão se altera em processos oncogênicos. Embora, muitas células PCNA-positivas foram encontradas nas áreas de carcinoma e em menor quantidade nas PIN de baixo grau, esta proporção foi abaixo do esperado. Tal achado pode ser devido o marcador para proliferação celular utilizado, PCNA, é expresso apenas na fase G1 e S do ciclo celular. As reações imunohistoquímicas para a proteína antiapoptótica bcl-2, relacionada com a liberação do citocromo c mitocondrial, evidenciaram áreas de intensa marcação tanto em PIN de alto grau quanto no carcinoma. Também consideramos relevante avaliar a expressão de GSTpi visto que estudos anteriores demonstraram que a atividade de glutathione-S-transferase prostática é alterada pelo diabetes experimental (Gobbo et al., 2012b) e normalizada pela MLT (Gobbo et al., in press). Há uma menor expressão de GSTP1 no câncer de próstata devido a processos de metilação do DNA (De Marzo et al., 2003) e maior expressão desta enzima na PIA (De Marzo et al., 1999). Normalmente a GSTpi é expressa pelas células basais epiteliais (Wang et al., 2001), e nossos testes evidenciaram que mesmo nos animais que apresentaram prostatite essas células ainda se mostraram marcadas pela GSTpi. Nas áreas de carcinoma microinvasivo as células basais não são encontradas, fato esperado visto que elas são perdidas durante o processo de invasão tumoral. Nessas áreas verificou-se uma a marcação difusa nos resquícios de epitélio acinar enquanto as células cancerígenas apareceram não marcadas para GSTpi. Esses dados confirmam a natureza cancerígena dessas lesões visto que a maior parte dos tumores de próstata não expressam GSTpi (Sullivan et al., 1998). O tratamento com MLT pareceu não influenciar a distribuição GSTpi na próstata de animais diabéticos ou saudáveis.

A presente investigação mostrou que a MLT é mais influente na histologia prostática, sobretudo no compartimento epitelial e células musculares lisas, quando administrada a ratos na fase pré-púbere. O tratamento com MLT a ratos diabéticos ocasionou aumento da espessura do epitélio e das cml e normalizou a distribuição colagênica interacinar. A indução do diabetes por estreptozotocina mostrou ser um modelo eficiente para o estudo incidência e progressão de malignidades na próstata de ratos em condições de hiperglicemia, entretanto ainda não é possível discriminar a contento os efeitos da droga e o aumento do estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia no estabelecimento dessas lesões malignas e pré-malignas. A MLT diminuiu a ocorrência de PIN de alto grau, infiltrados linfocíticos no estroma e epitélio prostático, prostatite e PIA nos ratos diabéticos, contudo não foi eficiente em evitar o desenvolvimento de carcinoma microinvasivo, provavelmente devido à baixa dosagem utilizada.

Referências bibliográficas

Agil, A., Reiter, R.J., Jiménez-aranda, A., Ibán-arias, R., Navarro-Alarcón, M., Marchal, J.A., Adem, A., Fernández-vázquez, G. (2013). Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*, 54(34),318-388.

Antonioli, E., Cardoso, A.B., Carvalho, H.E. (2007). Effects of Long-Term Castration on the Smooth Muscle Cell Phenotype of the Rat Ventral Prostate. *J. Androl*, (5),777-783.

Antonioli, E., Della-colleta, H.H., Carvalho, H.F. (2004).Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl*, 25(1),50-56.

Ashour, N., Ângulo, J.C., Andrés, G., Alelú, R., González-Corpas, A., Toledo, M.V., Rodríguez-Barbero, J.M., López, J.I., Sánchez-Chapado M, Roperó S. (2014). A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate*, 74(12),1171-1182.

Bhasin, S., Enzlin, P., Coviello, A., Basson, R (2007). Sexual dysfunction in men and women with endocrine disorders. *Lancet*, 369,597–611.

Brothman, AR., Swanson, G., Maxwell, T.M., Cui, J., Murphy, K.J., Herrick, J., Speights, V.O., Isaac, J., Rohr, L.R. (2005). Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet*, 56(1), 31-6.

Borowsky, A.D., Dingley, K.H., Ubick E., Turteltaub, K.W., Cardiff, R.D., Devere-White R. (2006). Inflammation and atrophy precede prostatic neoplasia in a PhIP-induced rat model. *Neoplasia*, 8,708-715.

- Cagnon, V.H., Camargo, A.M., Rosa, R.M., Fabiani, R., Padovani, C.R., Martinez, F.E. (2000). Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue & Cell*, 32(4), 275–83.
- Calvet, H.M., Yoshikawa, T.T. (2001). Infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am*, 15(2), 407-421.
- Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Lardone, P.J., Reiter, R.J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 27(2),189-200.
- Carvalho, H.F., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R. (1997a). Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*, 32(1),27-34.
- Carvalho, H.F., Taboga, S.R., Vilamaior, P.S.L., 1997b. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue & Cell*, 29(2),163-170.
- Corradi, L.S., Goes, R.M., Carvalho, H.F., Taboga, S.R. (2004). Inhibition of 5-alpha-reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle de-differentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation*. 72(5),198-208.
- Chung, L.W.K., Davies, R. (1996). Prostate epithelial differentiation is dictated by its surrounding stroma. *Molec. Biol Reports*, 23(1),13-19.
- Cunha, R.G., Cooke, P.S., Kurita, T. (2004). Role of estromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cyto*, 67(5),417-434.
- Cuzzocrea, S., Reiter, R.J. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 426(1-2),1-10.
- Delbès, G., Levacher, C., Habert, R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 132(4),527-538.
- De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I., Nelson, W.G. (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*, 155(6),1985-1992.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Zha, S., Luo, J., Nakayama, M., Platz, E.A., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. (2003) Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*, 6(25),55-62.
- Dubocovich, M. L., Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2),101-110.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev*, 23,599–622.

Fall, K., Garmo, H., Gudbjornsdottir, S., Stattin, P.; zethelius, B. (2013). Diabetes Mellitus and Prostate Cancer Risk; A Nationwide Case-Control Study within PCBaSe Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 22(6),1102-1109.

Fávaro, W. J., Padovani, C.R., Cagnon, V.H. (2009). Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue & Cell*, 41(2),119–32.

Gobbo, M.G., Costa, C.F.P., Silva, D.G.H., Almeida, E.A., GÓES, R.M. Biomarkers of oxidative stress in rat male reproductive organs under experimental diabetes and interference of melatonin treatment. *Oxid Med Cell Longev*, in press.

Gobbo, M.G., Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., Goes, R.M. (2012a). Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and influence of insulin replacement. *Micron*, 43(2),326-333.

Gobbo, M. G., Ribeiro, D. L., Taboga, S.R., de Almeida, E.A., Góes, R.M. (2012b). Oxidative stress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats and the influence of vitamin C treatment. *J Cell Biochem*, 113(7),2223–2233.

Gonçalves, B.F., de Campos, S.G., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Falleiros, L.R. Jr, Amorim, R.L., Góes, R.M., Taboga, S.R. (2013). A new proposed rodent model of chemically induced prostate carcinogenesis: distinct time-course prostate cancer progression in the dorsolateral and ventral lobes. *Prostate*. 73(11),1202-1213.

Gonçalves, B.F., Zanetoni, C., Scarano, W.R., Góes, R.M., Vilamaior, P.S., Taboga, S.R., Campos, S.G. (2010). Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Exp Mol Pathol*, 88(1),96-106.

Ikeda, K., Wada, Y., Foster, H.E.Jr, Wang, Z., Weiss, R.M., Latifpour, J. (2000). Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factorbeta. *J Urol*, 164,180–185.

Ikemura, M., Nishikawa, M., Kusamori, K., Fukuoka, M., Yamashita, F., Hashida, M. (2013). Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *J Control Release*, 170(2),191-197.

Karunanayake, E.H., Baker, J.R., Christian, R.A., Hearse, D.J., Mellows, G. (1976). Autoradiographic study of the distribution and cellularuptake of (14C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia*, 12,123–128.

Korkmaz, A., Reiter, R.J., Topal, T., Manchester, L.C., Oter, S., Dun-Xian, T. (2009). Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med*. 15(1-2),43-50.

Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2),216-226.

Mayo, J.C., Sainz, R.M., Tan, D.X., Hardeland, R., Leon, J., Rodriguez C., Reiter, R.J. (2005). Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*, 165(1),139-149.

Mohamed, M.A., Greif, P.A., Diamond, J., Sharaf, O., Maxwell, P., Montironi, R., Young, R.A., Hamilton, P.W. (2007). Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *BJU Int*. 99(4), 908-915.

Montilla, P. L., Vargas, J. F., Túnez, I. F., Muñoz de Agueda, M. C., Valdelvira, M. E., Cabrera, E.S. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*, 25(2),94-100.

Moreira, D. M., Anderson, T., Gerber, L., Thomas, J.A., Bañez, L.L., McKeever, M.G., Freedland, S.J. (2011). The association of diabetes mellitus and high-grade prostate cancer in a multiethnic biopsy series. *Cancer Causes & Control : CCC*, 22(7),977–83.

Morrison, C., Thornhill, J., Gaffney, E. (2000). The connective tissue framework in the normal prostate, BPH and prostate cancer: analysis by scanning electron microscopy after cellular digestion. *Urol Res*, 28(5),304-307.

Palapattu, G.S., Sutcliffe, S., Bastian, P.J., Platz, E.A., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Nelson, W.G. (2005). Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 26(7),1170-1181.

Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P.; Poeggeler, B. (2006). Melatonin – Nature’s most versatile biological signal? *FEBS Journal*, 273,2813-2838.

Pani, G., Galeotti, T., Chiarugi, P., (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress, *Cancer Metastasis Rev*, 29,351–378.

Park, J., Cho, S. Y., Lee, Y. J., Lee, S. B., Son, H., & Jeong, H. (2014). Poor glycemic control of diabetes mellitus is associated with higher risk of prostate cancer detection in a biopsy population. *PloS One*, 9(9).

Pollard, M. (1998). Lobund-Wistar rat model of prostate cancer in man. *Prostate*, 37(1),1- 4.

Poteracki, J., Walsh, K.M. (1998). Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews. *Toxicol Sci*, 45(1),1-8.

Qiu, X.F., Li, X.X., Chen, Y., Lin, H.C., Yu, W., Wang, R., Dai, Y.T. (2012). Mobilisation of endothelial progenitor cells: one of the possible mechanisms involved in the chronic administration of melatonin preventing erectile dysfunction in diabetic rats. *Asian J Androl*, 14(3),481-486.

Radogna, F., Diederich, M., Ghibelli, L. (2010). Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*, 80(12),1844-1852.

Reiter, R. J. (2000). Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci.* 15, 246-250.

Ribeiro, D.L., Candido, E.M., Caldeira, E., Manzato, A.J., Taboga, S.R., Cagnon, V.H.A. (2006). Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*, (5),51-60.

Ribeiro, D.L., Marques, S.F., Alberti, S., Spadella, C.T., Manzato, A.J., Taboga, S.R., Dizeyi, N., Abrahamsson, P.A., Góes, R.M. (2008). Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, 89(4),276-283.

Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., Góes, R.M. (2009). Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulfate proteoglycans of the rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol*, 90(4),400-411.

Rosa-Ribeiro, R., Barbosa, G.O., Kühne, F., Carvalho, H.F.(2014) Desquamation is a novel phenomenon for collective prostate epithelial cell deletion after castration. *Histochem Cell Biol.*, 141(2),213-220.

Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D., León, J., Manchester, L., Reiter, R. J. (2005). Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *The Prostate*, 63(1),29–43.

Sciarra, A., DI, Silverio, F., Salciccia, S., Autran Gomez, A.M., Gentilucci, A., Gentile, V. (2007). Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *Eur Urol*, 52(4),964-972.

Shappel. S.B., Thomas, G.V., Roberts. R.L., Herbert, R., Ittmann, M.M., Rubin. M.A., Humphrey, P.A., Sundberg, J.P., Rozengurt, N., Barrios. R., Ward, J.M., Cardiff, R.D. (2004). Prostate Pathology of genetically engineered mice: Definitions and classification. The consensus report from the bar harbor meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology committee. *Cancer Res.* 61,2270-2305.

Shiozawa, S., Horie, S. (2014). Prostate cancer and metabolic syndrome *Nihon Rinsho.*72(12), 2234-2240.

Shiu, S. Y. W., Law, I. C., Lau, K. W., Tam, P. C., Yip, A. W. C., Ng, W. T. (2003). Melatonin slowed the early biochemical progression of hormone-refractory prostate cancer in a patient whose prostate tumor tissue expressed MT1 receptor subtype. *J Pineal Res*, 35(3),177–82.

Shiu, S. Y. W., Leung, W. Y., Tam, C. W., Liu, V. W. S., Yao, K.M. (2013). Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27(Kip1) in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF-κB): potential implications on prostate cancer chemoprevention. *J Pineal Res.*, 54(1),69–79.

Siu, S. W. F., Lau, K. W., Tam, P. C., & Shiu, S. Y. W. (2002). Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. *The Prostate*, 52(2),106–22.

Sullivan, G.F., Amenta, P.S., Villanueva, J.D., Alvarez, C.J., Yang, J.M., Hait, W.N. (1998) The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 4,1393–1403.

Tam, C.W., Shiu, S.Y.W. (2011). Functional interplay between melatonin receptor-mediated antiproliferative signaling and androgen receptor signaling in human prostate epithelial cells: potential implications for therapeutic strategies against prostate cancer. *Journal of Pineal Research*. 51(3),297–312.

Tuxhorn, J.A, Ayala, G.E., Smith, M.J., Dang, T.D., Rowley, D.R. (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*, 8,2912-2923.

Vilamaior, P.S.L., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F. (2000). Fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: A possible role for smooth muscle cells. *Prostate*. 45(3),235-238.

Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F. (2005). Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Intern*, 29,809-816.

Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E.L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev*, 25,612–628.

Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, S. O., & Aksoy, N. (2001). Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res*, 31(3),193–198.

Wang, D., Chu, P.C., Yang, C.N., Yan, R., Chuang, Y.C., Kulp, S.K., Chen, C.S. (2012). Development of a novel class of glucose transporter inhibitors. *J Med Chem*, 55(8),3827-3836

Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., & Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68(4-5), 270–279.

Wautier, M.P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., Wautier, J.L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280,685-694.

Weiss, R.B. (1982) Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*, 66, 427–438.

Wolden-Hanson, T., Mitton, D.R., Mccants, R.L., Yellon, S.M., Wilkinson, C.W., Matsumoto, A.M., Rasmussen, D.D. (2000). Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinol*.141(2),487- 497.

- Xi, S.C., Tam, P.C., Brown, G.M. (2000). Potential involvement of mt1 receptor and attenuated sex steroid-induced calcium influx in the direct anti-proliferative action of melatonin on androgen- responsive LNCaP human prostate cancer cells. *J Pineal Res* 29,172–183.
- Xi, S.C., Siu, S.W.F., Fong, S.W. et al. (2001) Inhibition of androgensensitive LNCaP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression. *Prostate*, 46,52–61.
- Xu, H., Jiang, H., Ding, G., Zhang, H., Zhang, L., Mao, S., Ding, Q. (2013). Diabetes mellitus and prostate cancer risk of different grade or stage: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 99(3),241–249.
- Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., Stern, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269,9889-9897.
- Yilmaz, B., Kutlu, S., Mogulkoç, R., Canpolat, S., Sandal, S., Tarakçi, B., & Kelestimur, H. (2000). Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro Endocrinology Letters*, 21(4),301–306.
- Yu, O.H., Foulkes, W.D.; Dastani, Z., Martin, R.M., Eeles, R., Richards, J.B. (2013). An assessment of the shared allelic architecture between type 2 diabetes and prostate cancer. *Cancer Epitel Biomarkers Prev*, 8,1473-1475.
- Zelic, R., Fiano, V., Grasso, C., Zugna, D., Pettersson, A., Gillio-Tos, A., Merletti, F., et al. (2015). Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematicreview. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 18(1),1-12.

Tabela – Incidência (%) de lesões prostáticas (malignas e pré-malignas) e alterações teciduais dos grupos controle de longo prazo (C2), controle tratado com melatonina de longo prazo (M2), diabético não tratado de longo prazo (D2), diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). Foram utilizados 10 animais para C2; 12 animais para M2; 15 animais para D2 e 10 animais para MD2.

Grupos	Incidência (%)			
	C2	M2	D2	MD2
Atrofia	60	75	93,3	90
Metaplasia	100	100	100	90
Hiperplasia	100	100	100	100
PIN baixo grau	90	83,3	66,6	88,8
PIN alto grau	10	16,6	20	11,11
Adenocarcinoma	-	-	6,6	10
Células inflamatórias no estroma e epitélio	50	45,8	53,3	35
PIA	-	-	13,3	-
Prostatite	-	8,3	26,6	-
Descamação epitelial	100	91,6	93,3	80

Legenda das figuras

Figura 1 – Morfologia geral da próstata ventral de ratos corados com Hematoxilina-Eosina referentes ao experimento de curto prazo e longo prazo. A, grupo controle de curto prazo (C1); B, grupo controle de longo prazo (C2); C, grupo tratado com melatonina de curto prazo (M1); D, grupo tratado com melatonina de longo prazo (M2); E, grupo diabético não tratado de curto prazo (D1); F, grupo diabético não tratado de longo prazo (D2); G, grupo diabético tratado com melatonina de curto prazo (MD1); H, grupo diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). Legenda: e - epitélio, l – lúmen, s - estroma. A, B, C, D, F, G e H: 400X, barra = 25 μm ; insets: 100X, barra = 100 μm .

Figura 2 – Cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Tuschmann Blue. A, controle de curto prazo (C1); B, controle de longo prazo (C2); C, controle tratado com melatonina de curto prazo (M1); D, controle tratado com melatonina de longo prazo (M2); E, diabético não tratado de curto prazo (D1), F, diabético não tratado de longo prazo (D2); G, diabético tratado com melatonina de curto prazo (MD1); H, diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). I, Análises estereológicas do epitélio, lúmen e componentes estromais (fibras colágenas, células musculares lisas, vasos sanguíneos e demais componentes) expressas em frequência absoluta (mg). (N=5 animais). Letras diferentes minúsculas indicam as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais C1, M1, D1 e MD1 e letras diferentes maiúsculas indicam as diferenças estatísticas entre os grupos C2, M2, D2 e MD2, de acordo com ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) ou Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*).

Legenda: e - epitélio, l – lúmen, s – estroma, cml – células musculares lisas, bv - vasos sanguíneos. A, B, C, D, E, F, G e H: 400X, barra = 25 μm .

Figura 3 – Medidas morfométricas (μm) do epitélio e camada de células musculares lisas periacinares dos grupos controle de curto prazo (C1), controle de longo prazo (C2), controle tratado com melatonina de curto prazo (M1), controle tratado com melatonina de longo prazo (M2), diabético não tratado de curto prazo (D1), diabético não tratado de longo prazo (D2), diabético tratado com melatonina de curto prazo (MD1), diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). Letras diferentes minúsculas indicam as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais C1, M1, D1 e MD1 e letras

diferentes maiúsculas indicam as diferenças estatísticas entre os grupos C2, M2, D2 e MD2, de acordo com ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) ou Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*). (N = 5 animais). Imunohistoquímica para α -actina, células musculares lisas marcadas em verde (B e C) nos animais controle de curto prazo (C1) e diabéticos não tratados de curto prazo (D1) nos quais a camada de músculo liso se apresenta descontínua. Legenda: e - epitélio, l - lúmen, s - estroma, cml – célula muscular lisa. B e C: 200X, barra = 50 μ m.

Figura 4 – Lesões malignas, pré-malignas e alterações teciduais. Cortes corados com Hematoxilina-Eosina (A, B, C, D, F, H, I, J, K, L, M, N) e Reticulina de Gömori (E, G, O). B, E, G – grupo controle tratado com melatonina de longo prazo (M2). A, F, H, I, J, K, L, M, N, O – grupo diabético não tratado de longo prazo (D2); C e D – grupo diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). A – célula em *signet* (seta). B – Infiltrado de células inflamatórias no estroma e em contato com o epitélio (*) e metaplasia (seta). C – descolamento epitelial com núcleos picnóticos (seta). D e inset – neoplasia intraepitelial (PIN) do tipo papilar (*) e detalhe com atipias nucleares (seta). E – fibras colágenas (cf) no interior da PIN com regiões de espessamento (seta). F e G – PIN cribiforme com microócinos (*) associada às fibras colágenas (cf). H – PIN de alto grau com brotamentos (*). I e L – Prostatite, interior luminal preenchido com células inflamatórias mononucleares (inflamação crônica) e polimorfonucleares (inflamação aguda) (*). J e K – atrofia proliferativa inflamatória (PIA) com atrofia epitelial (cabeça de seta), epitélio com múltiplas camadas (seta) e infiltrado inflamatório no interior luminal (*). M, N e O – carcinoma microinvasivo, ruptura da membrana basal e invasão das células tumorais no estroma (*). P, número de focos de lesões e alterações teciduais por área (mm^2) dos grupos controle de longo prazo (C2), controle tratado com melatonina de longo prazo (M2), diabético não tratado de longo prazo (D2), diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). Foram utilizados 10 animais para C2; 12 animais para M2; 15 animais para D2 e 10 animais para MD2. Letras diferentes indicam as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para multiplicidade de acordo com ANOVA seguido de Tukey (*post hoc*) ou Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post hoc*), $p < 0.05$. Legenda: e – epitélio, s – estroma, l – lúmen, bv – vaso sanguíneo. B, I, J: 100X, barra = 100 μ m; A, D, E, F, G, H, K, M, O: 20 X, barra = 50 μ m; L, N = 400X, barra = 25 μ m, C e inset = 1000X, barra = 10 μ m.

Figura 5 – Reações de imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular, PCNA (A, C, E e F), proteína antiapoptótica bcl-2 (B, D e G) e glutational-S-transferase pi, GSTpi (H, I, J, K e L). H e G – grupo controle não tratado de longo prazo (C2), B - grupo controle tratado com MLT de longo prazo (M2), A, C, D, E, F, L – grupo diabético não tratado de longo prazo (D2), I, J e K – grupo diabético tratado com melatonina de longo prazo. Inset – controle negativo pra bcl-2. H – controle negativo para GSTpi. Setas indicam as células PCNA-positivas no carcinoma microinvasivo (A e C) e na neoplasia intraepitelial (PIN) (E e F). Áreas bcl-2 positivas em marrom na PIN de alto grau (B) e no carcinoma microinvasivo (D). No grupo controle (G), não há marcações para bcl-2. I, seta indica célula basal imunomarcada para GSTpi. As células basais perdem a marcação para GSTpi no carcinoma microinvasivo (cabeça de seta, J e K), mas ainda são positivas para essa enzima em áreas com prostatite (seta, L). Legenda: e – epitélio, s – estroma, l – lúmen, * microácino. G e inset: 100X, barra = 100 µm; A, C, D, E, H, I e J: 200X, barra = 50 µm; B, F, K e L: 400X, barra = 25 µm.

Figura 6 – Imunoexpressão de 5-metilcitosina (marcador para metilação do DNA) no epitélio da próstata ventral de ratos do grupo dos grupos controle de longo prazo (C2), controle tratado com melatonina de longo prazo (M2), diabético não tratado de longo prazo (D2), diabético tratado com melatonina de longo prazo (MD2). E, carcinoma microinvasivo de ratos diabéticos tratados com melatonina de longo prazo. Inset, controle negativo. F, carcinoma microinvasivo de ratos com 56 semanas de idade. G, frequência de células epiteliais positivas para 5-metilcitosina dos grupos C2 e D2. * diferença estatística entre C2 e D2 (Teste T de Student, $p < 0.05$). Legenda: e - epitélio, l – lúmen, s – estroma. A, B, C, D, E: 400X, barra = 25 µm; F: 200X, barra = 50 µm.

Figure 1

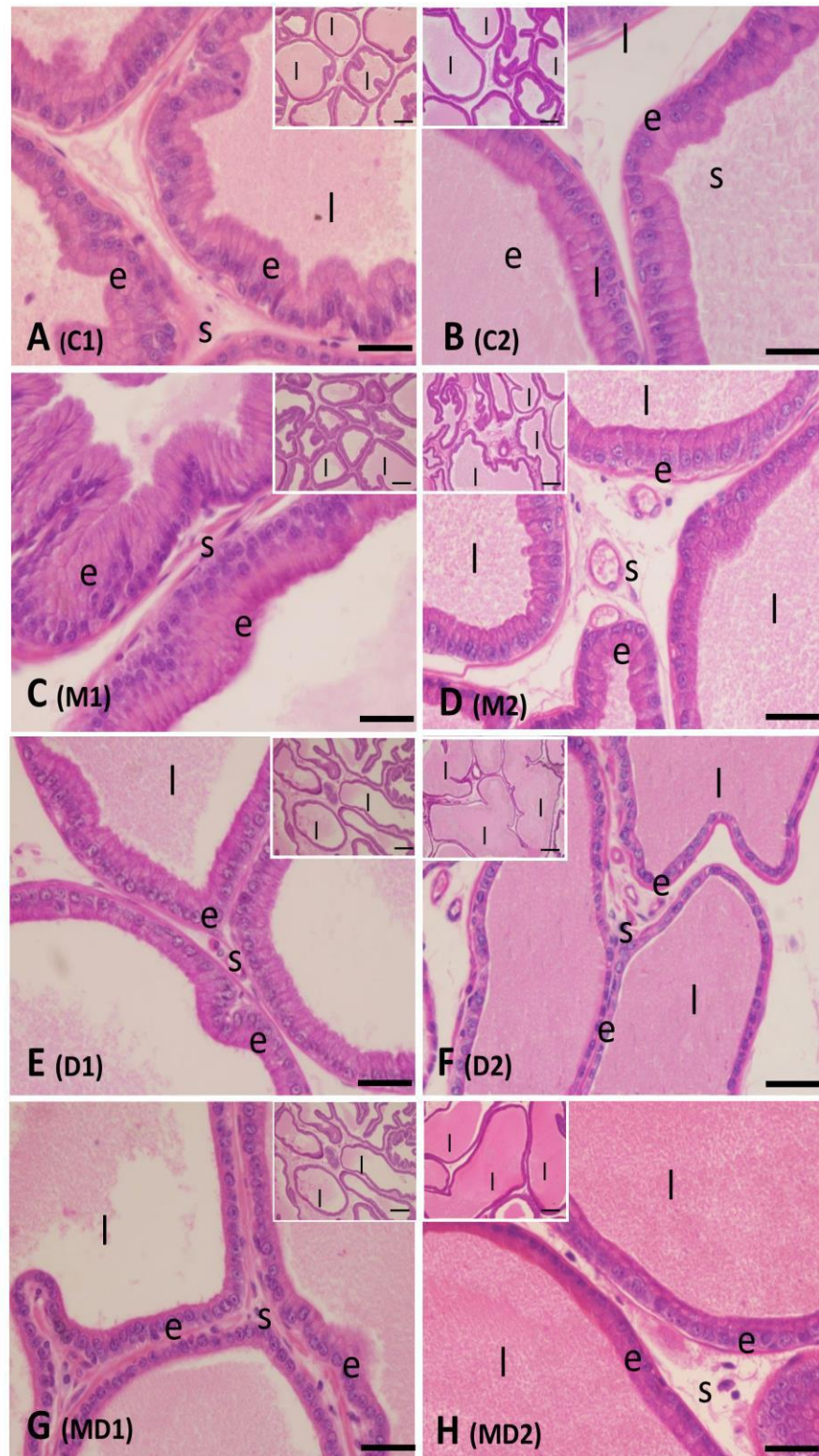


Figura 2

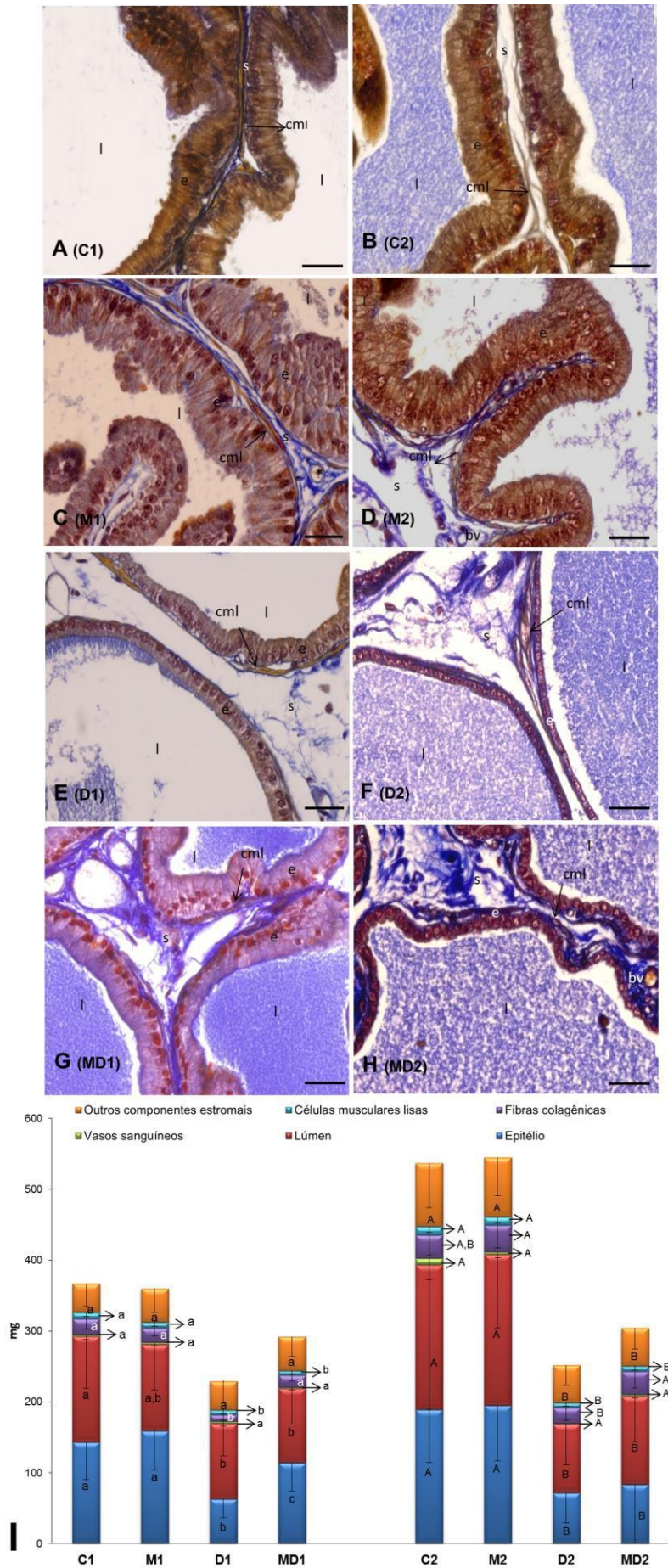


Figura 3

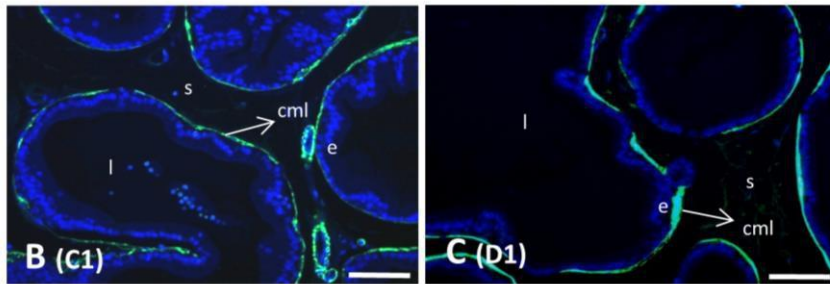
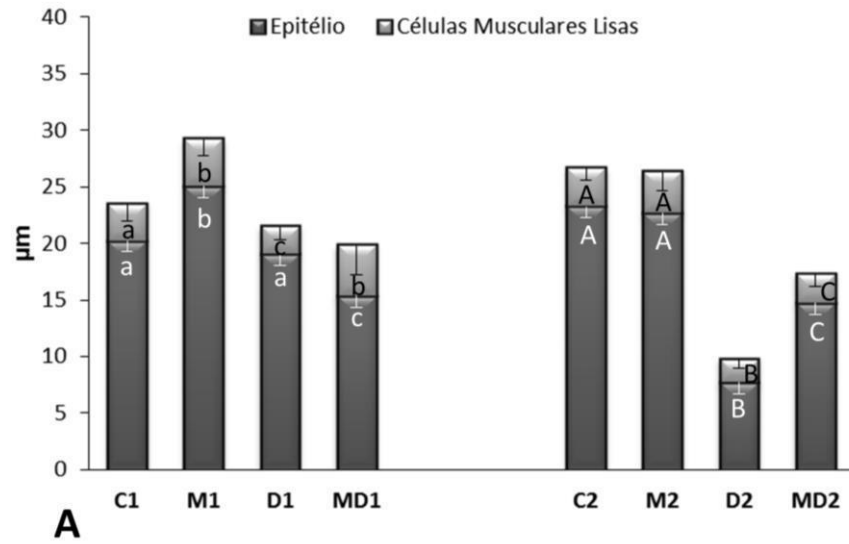


Figura 4

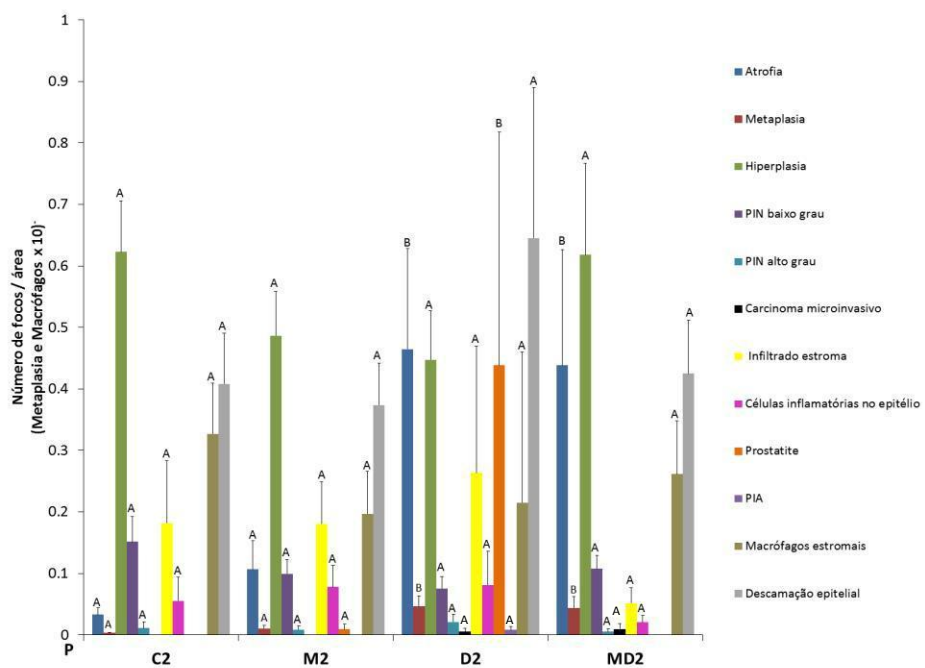
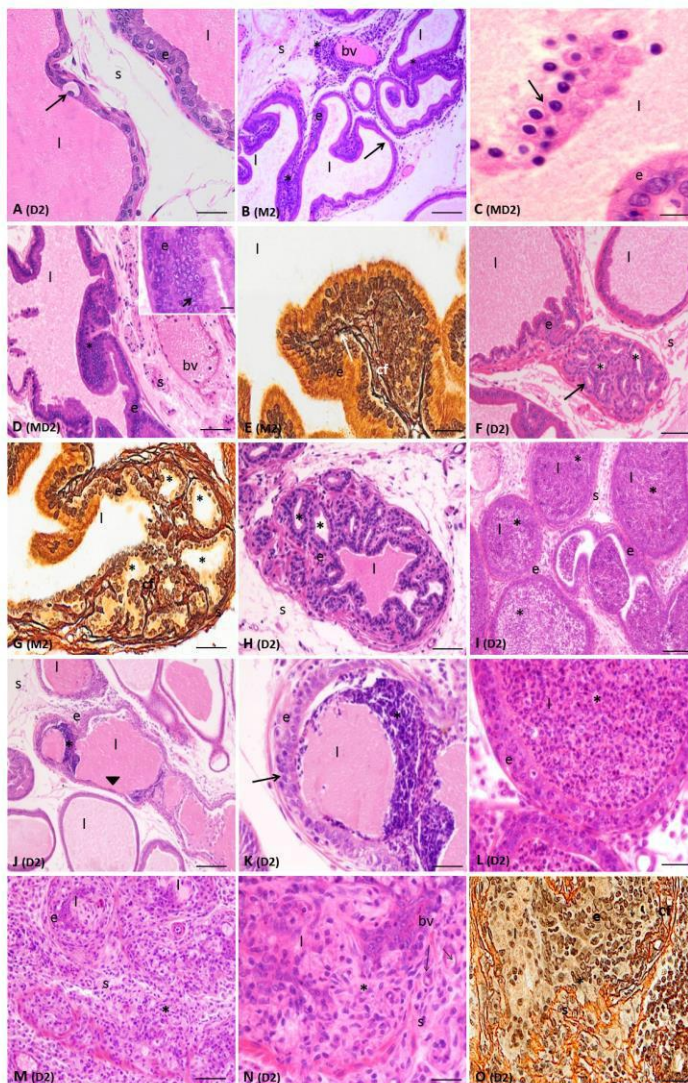


Figure 5

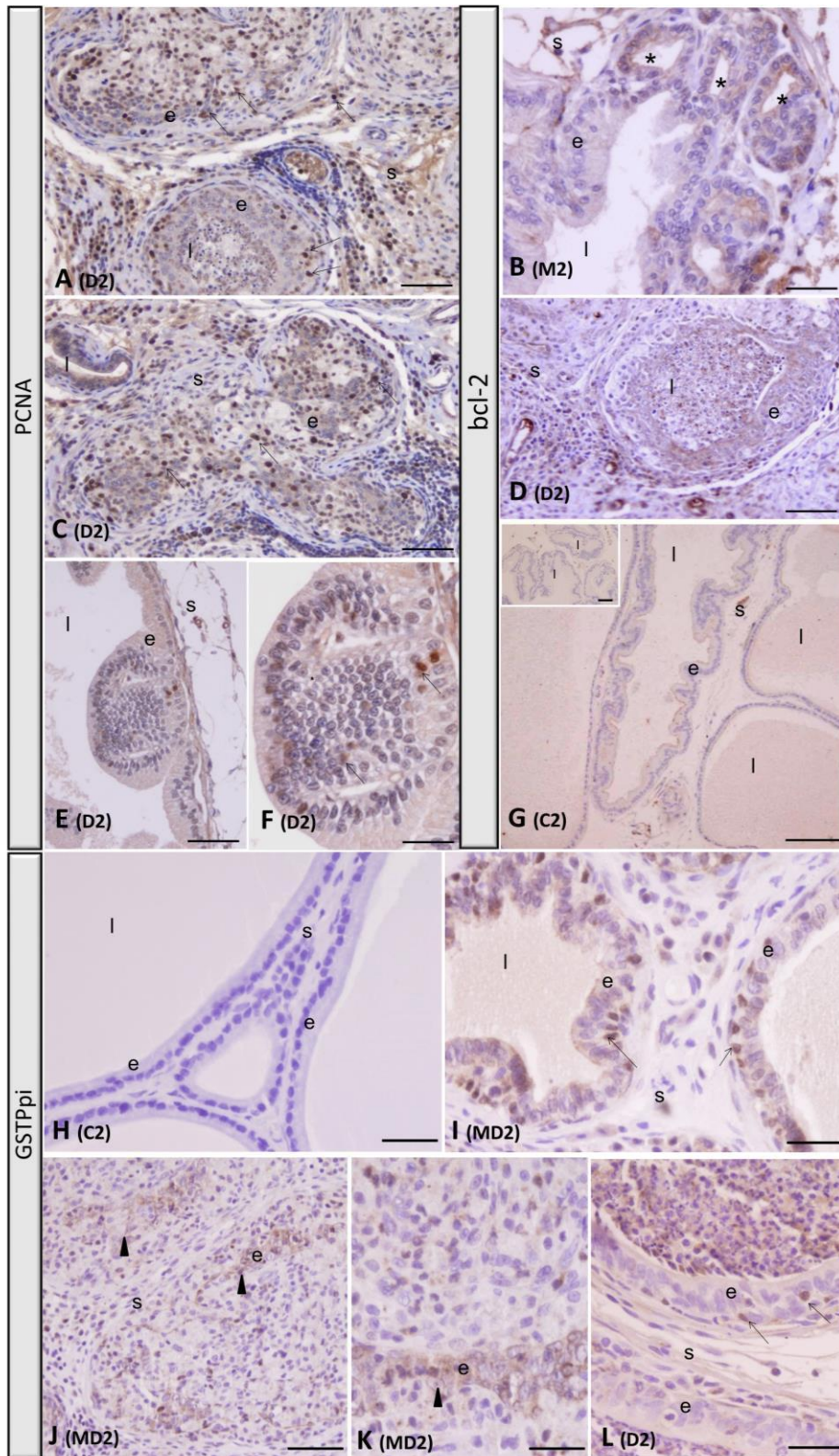
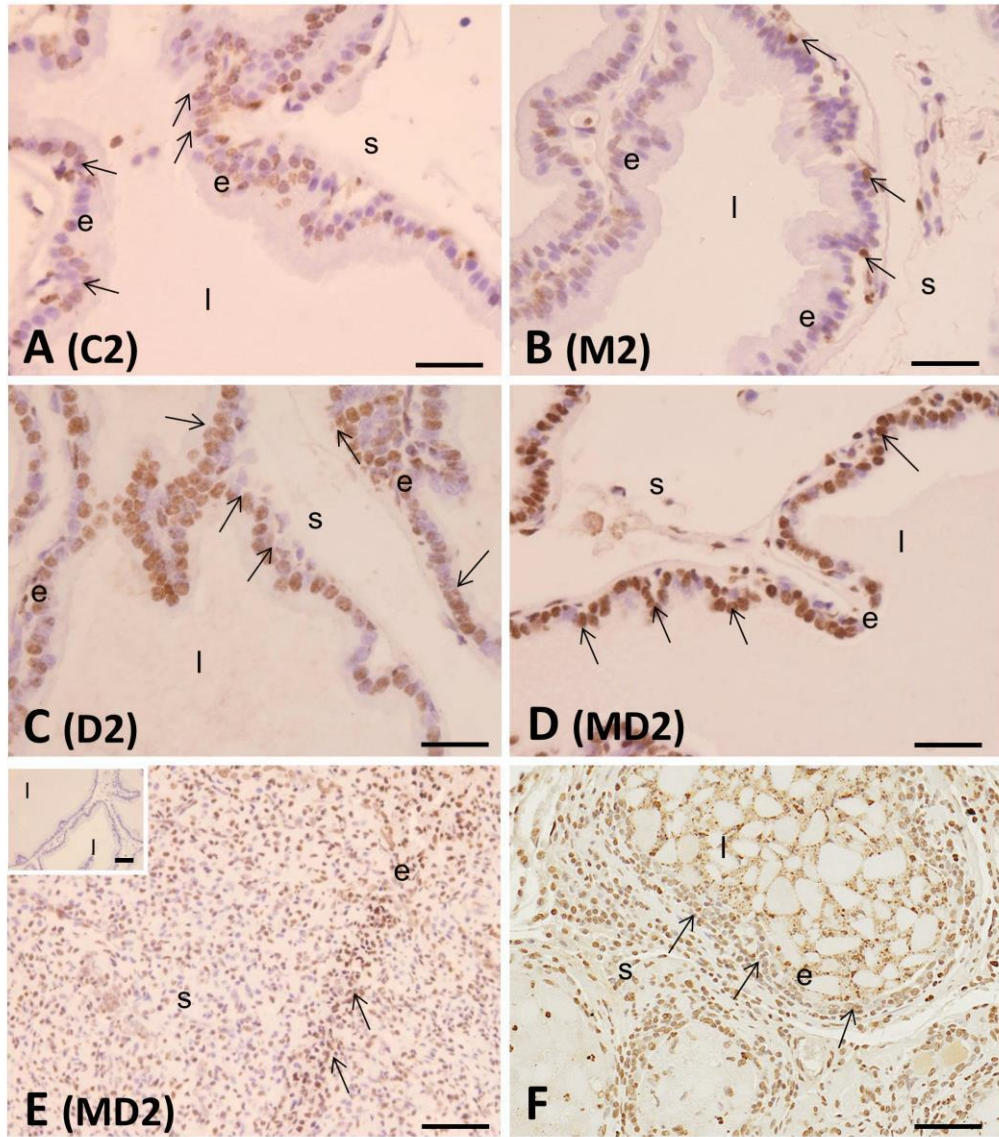


Figura 6



CONCLUSÕES

Capítulo 1

O sistema antioxidante do testículo e epidídimo de ratos é menos vulnerável aos efeitos do diabetes experimental do que a próstata e esses achados podem estar associados às características intrínsecas da histofisiologia e padrão de expressão das enzimas antioxidantes. A MLT exógena em baixas doses aumenta a atividade de GPx epididimal em ratos saudáveis. O tratamento com MLT atenuou o aumento da GST no plasma na fase inicial do diabetes. A MLT foi mais eficiente evitar as alterações do sistema antioxidante prostático decorrentes do diabetes, mesmo em baixa dosagem, principalmente em longo prazo conforme demonstrado pela redução da atividade da CAT, GST e dos níveis de peroxidação lipídica. A GST se mostrou um bom marcador da defesa antioxidante compensatória da próstata ventral corroborando estudos prévios.

Capítulo 2

A administração de MLT a ratos saudáveis desde o desmame reduziu o número de células AR-positivas no epitélio. Esse decréscimo pode estar relacionado à ténue diminuição dos níveis séricos de testosterona nesses mesmos animais. Os resultados *in vivo* indicaram que em diabetes crônico a MLT apresentou efeito proliferativo e antiapoptótico na próstata ventral devido a sua ação indireta nos níveis séricos de testosterona e também aumentando a imunoexpressão de seu receptor específico, MTR1B. As células PC3 mostraram um aumento do índice mitótico após longo período de pré-incubação em meio hiperglicêmico concomitante com a exposição à melatonina, semelhante aos resultados *in vivo*. Devido ao fato das células PC3 serem andrógeno-independentes nossos achados indicam que o favorecimento da sobrevivência das células PC3 não está relacionado à modulação do AR.

Capítulo 3

A histologia prostática é mais influenciada pela MLT quando administrada a ratos na fase pré-púbere. O tratamento com MLT a animais diabéticos conteve a atrofia epitelial e das cml, bem como normalizou a distribuição colagênica interacinar. O diabetes induzido por estreptozotocina aumentou a ocorrência de infiltrados linfocíticos; PIN de alto grau, prostatite, PIA e carcinoma microinvasivo corroborados por alterações na imunolocalização de marcadores tais como bcl-2 e GSTpi. Entretanto, não podemos negligenciar os efeitos secundários da estreptozotocina tais como o aumento da

metilação do DNA encontrado nesses animais. A MLT reduziu a incidência de PIN de alto grau, células inflamatórias, prostatite e PIA nos ratos diabéticos, contudo não foi eficiente em evitar o acometimento de carcinoma microinvasivo, provavelmente devido à baixa dosagem utilizada.

Referências bibliográficas

Abdali, D., Samson, S.E., Grove, A.K. (2015). How Effective Are Antioxidant Supplements in Obesity and Diabetes? *Med Princ Pract*, in press.

Acuña Castroviejo, D., López, L.C., Escames, G., López, A., García, J.A., Reiter, R.J. (2011). Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*, 11(2),221-40.

Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-mir, M.Y., Vázquez, G.F. (2011) Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*, 5(2),207-212.

Amaral, F.G., Turati, A.O., Barone, M., Scialfa, J.H., do Carmo Buonfiglio, D., Peres, R., Cipolla-Neto, J. (2014). Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. *J Pineal Res*, 57(1),67–79.

Arcolino, F.O., Ribeiro, D.L., Gobbo, M.G., Taboga, S.R., Góes, R.M. (2010). Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Path*, 91(2),144–54.

Armagan, A., Uz, E., Yilmaz, H.R., Soyupek, S., Oksay, T., Ozcelik, N. (2006). Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl*. 8(5),595–600.

Arrellano-Valdez, F., Urrutia-Osorio, M., Arroyo, C., Soto-Veja, E. (2014). A comprehensive review of urologic complications in patients with diabetes. *Springerplus*. 23(3),549.

Avedano, G.F., Agarwal, R.K., Bashey, R.I., Lyons, M.M., Soni, B.J., Jiothrmayi, G.N., regan, T.J. (1999).Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes*, 48,1443-1447.

Baynes, J.W., Watkins, N.G., Fischer, C.I., Hull, C.J., Patrick, J.S., Ahmed, M.U., Dunn, J.A., Thorpe, S.R. (1989). The Amadori product on protein: structure and reactions. *Prg. Clin. Biol. Res*, 304:43-67.

Banerjee, P.P., Banerjee, S., Lai, J.M., Strandberg, J.D., Zirkin, B.R., Brown, T.R. (1998). Age dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the Brown Norway rat prostate. *Biol Reprod*, 59,1163-1170.

Barbosa-Desongles, A., Hernández, C., De Torres, I., Munell, F., Poupon, M.-F., Simó, R., Selva, D. M. (2013). Diabetes protects from prostate cancer by downregulating androgen receptor: new insights from LNCaP cells and PAC120 mouse model. *PLoS One*, 8(9).

Basaria, S., Muller, D.C., Carducci, M.A., Egan, J., Dobs, A.S. (2006). Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy. *Cancer*, 106,581–588.

Bazwinsky-wutschke, I., Wolgast, S, Muhlbauer E. et al. (2012). Phosphorylation of cyclic AMP-response element-binding protein (CREB) is influenced by melatonin treatment in pancreatic rat insulinoma b-cells (INS-1), *J Pineal Res*, 53,344–357.

Bebakar, W.M.W., Honour, J.W., Foster, D., Liu, Y. L., Jacobs, H. S. (1990). Regulation of testicular function by insulin and transforming growth factor- β . *Steroids*, 55(6),266-270.

Becker-André, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J. H., Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, 269(46), 28531–18534.

Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Antón-Tay, F. (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9(3), 209–20.

Bierhaus, A., Nawroth, P.P. (2009). Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*, 52(11),2251–2263.

Bhasin, S., Enzlin, P., Coviello, A., Basson, R (2007). Sexual dysfunction in men and women with endocrine disorders. *Lancet*, 369,597–611.

Bonnefont-Rousselot D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 561-568.

Cagnon, V.H., Camargo, A.M., Rosa, R.M., Fabiani, R., Padovani, C.R., Martinez, F.E. (2000). Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue & Cell*, 32(4),275–83.

Cagnon, V.H., Fávaro, W.J. (2009). Dystroglycan patterns on the prostate of non-obese diabetic mice submitted to glycaemic control. *Int J Exp Path*, 90(2),156–165.

Calame, S.S., Lostroh, A.J. (1964). Effect of insulin and lack of effect of testosterone on the protein of ventral prostate from castrated mice maintained as organ cultures. *Endocrinology*, 76,451-454.

Cameron, N.E., Cotter, M.A. (1999). Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract*, 45,137–146.

Cáp, J. (2012). Androgen deficit and diabetes. *Vnitr Lek*, 58(3),228-231.

Carvalho, H.F., Camargo, M., Cagnon, V.H., Padovani, C.R. (2003). Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of

C57BL/6J and NOD mice. *Anat Rec, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 270(2),129–136.

Carvalho, H.F., Line, S.R.P. (1996). Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int.*, 20,809-819.

Carvalho, H.F., Vilamaior, P.S.L., Taboga, S.R. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*. 32(1),27-34.

Chandrashekar, V., Steger, R.W., Bartke, A., Fadden, C. T., Kienast, S.G. (1991). Influence of diabetes on the gonadotropin response to the negative feedback effect of testosterone and hypothalamic neurotransmitter turnover in adult male rats. *Neuroendocrinology*, 54(1),30–35.

Champney, t.h., Steger, r.w., Christie, D.S., Reiter, R.J. (1985). Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res*. 338,25-32.

Champney, T.H., Holtou, A.P., Craft, C.M., Reiter, R.J. (1986). Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamster: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. *Comp Biochem Physiol A*, 83,391-395.

Cooke, P.S., Young, P., Cunha, G.R. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*. 128,2867-2873.

Costello, R.B., Lentino, C.V., Boyd, C.C., O'Connell, M.L., Crawford, C.C., Sprengel, M.L., Deuster, P.A. (2014). The effectiveness of melatonin for promoting healthy sleep: a rapid evidence assessment of the literature. *Nutr J*. 7 (13),106.

Culig, Z., Stober, J., Gast, A., Peterziel, H., Hobisch, A., Radmayr, C., Klocker, H. (1996). Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detection and Prevention* 20(1),68–75.

Cunha G.R., Hayward S.W., Dahiya R., Foster B.A. (1996). Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat*. 155,63-72.

Cunha, G.R., Cooke, O.S., Kurita, T. (2004). Role of stroma-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histo Cytol*. 67(5),417-434.

Cuzzocrea, S., Reiter, R.J. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 426(1-2),1-10.

Damasceno, A.A., Carvalho, C.P, Santos, E.M., Botelho, F.V., Araújo, F.A., Deconte, S.R., Tomiosso, T.C., Balbi, A.P., Zanon, R.G, Taboga S.R., Góes,R.M., Ribeiro, D.L. (2014). Effects of maternal diabetes on male offspring: high cell proliferation and increased activity ofMMP-2 in the ventral prostate. *Cell Tissue Res.*, 358(1),257-269.

De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Meeker, A.K., Coffey, D.S. (1998). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol*, 160,2381–2392.

Deyl, Z.; Miksík, I. (1997). Post-translational non-enzymatic modification of proteins. I. Chromatography of marker adducts with special emphasis to glycation reactions. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 699(1-2),287-309.

Denis, U., Lecomte, M., Paget, C., Ruggiero, D., Wiemsperger, N., Lagarde, M. (2002). Advanced glycation end-products induce apoptosis of bovine retinal pericytes in culture: involvement of diacylglycerol/ceramide production and oxidative stress induction. *Free Radic Biol & Medic*, 33,236–247.

Dubocovich, M. L., Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2),101-110.

Doncajour, A.A., Cunha G.R. (1983). Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology*, 131,2342-2350.

Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F. et al. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxideoverproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(22),12222-12226.

Du, X., Stotcklauser-Farber, K., Rosen, P. (1998). Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med*, 27,752–763.

Esquifino, A.I, Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P. (2004). Circadian organization of the imune response: a role for melatonin. *Clin Appl Immunol*, 4,423-433.

Fall, K., Garmo, H., Gudbjornsdottir, S., Stattin, P., Zethelius, B. (2013). Diabetes Mellitus and Prostate Cancer Risk; A Nationwide Case-Control Study within PCBaSe Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 22(6),1102-1109.

Fávaro, W.J., Cagnon, V.H.A. (2010). Effect of combined hormonal and insulin therapy on the steroid hormone receptors and growth factors signalling in diabetic mice prostate. *Int J Exp Path*, 91(6),537–545.

Fávaro, W.J., Padovani, C.R., Cagnon, V.H. (2009). Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue Cell*, 41(2), 119–132.

Feng, Z., Qin, C., Chang, Y., Zhang, J.T. (2006). Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 40(1),101-109.

Fernandes, G.S., Fernandez, C.D., Campos, K.E., Damasceno, D.C.; Anselmo-Franci, J.A., Kempinas, W.D. (2011). Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats. *Reprod Biol Endocrinol*, 9 (100), 1-9.

Gago-Dominguez, M., Castelao, J.E., Pike, M.D. (2005). Role of Lipid Peroxidation in the Epidemiology and Prevention of Breast Cancer. *Can Epid Biom & Prev*, 1,2829–2839.

Garcia-Flórez, M., Carvalho, H.F. (2005). Célula epitelial prostática. In: *Células – uma abordagem multidisciplinar*. Manole, Barueri. p.335-345.

Gobbo, M.G., Dizeyi, N., Abrahamsson, P.A., Bertilsson, P.A., Masitéli, V.S., Taboga, S.R., Góes, R.M. Influence of melatonin on proliferative and apoptotic responses of prostate under normal and hyperglycemic condition. *J of Diabetes Research*, in press.

Gobbo, M.G., Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., de Almeida, E.A., Góes, R.M. (2012b). Oxidative stress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats and the influence of vitamin C treatment. *J Cell Biochem*, 113(7),2223–2233.

Gobbo, M.G., Taboga, S.R., Ribeiro, D.L., Góes, R.M. (2012a). Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. *Micron*, 43(2-3),326–333.

Gilad, E., Laufer, M., Matzkin, H., Zisapel, N. (1999). Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells., *J Pineal Res*, 26(4),211–20.

Gupta, R., Dhakal, B., Thakur, A., Ahnn, J. (2004). Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol Cells*, 17,132-139.

Güven, A., Yavuz, O., Cam, M., Ercan, F., Bukan, N., Comunoglu. C., Gokce, F. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. (2006). *Acta Histochem*. 108(2),85-93.

Harjutsalo, V., Sjöberg, L., Tuomilehto, J. (2008). Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*, 371, 1777-1782.

Hammarsten, J., Hogstedt, B. (2002). Hyperinsulinaemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia. *Eur.Urol*. 39,151–158.

Hardeland, R. Melatonin in aging and disease - Multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. (2012). *Aging and Disease*, 3(2),194-225.

Hayashi, N., Yoshiki, S., Kawamura, J., Doncajour, A.A., Cunha, G.R. (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostate gland. *Biology of Reproduction*. 45,308-321.

Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Foster, B.A., Cunha, A.R., Dahiya, R., Prins G.S., Cunha, G.R. (1996). Stromal development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.*, 155,94-103.

Hevia, D., González-Menéndez, P., Quiros-González, I., Miar, A., Rodríguez-García, A., Tan, D.X., Reiter, R.J., Mayo, J.C., Sainz, R.M. (2015). Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer *J Pineal Res*, 58(2), 234-250.

Hevia, D., Mayo, J.C., Quiros, I., Gomez-Cordoves, C., Sainz, R.M. (2010). Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. *Anal Bioanal Chem*, 397(3), 1235-1244.

Hevia, D., Sainz, R.M., Blanco, D., Quirós, I., Tan, D.X., Rodríguez, C., Mayo J.C. (2008). Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. *J Pineal Res*, 45(3), 247-57.

International Diabetes Federation. Diabetes: facts and figures. IDF. Diabetes Atlas, (2013) 6th edn. International Diabetes Federation, Brussels. Acessado em 16 de setembro de 2013. <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>.

International Diabetes Federation. Diabetes: facts and figures. IDF. Diabetes Atlas (2014). 7th edn. International Diabetes Federation, Brussels. Acessado em 15 de agosto de 2014. <<http://www.idf.org/diabetesatlas/6e/Update2014>>.

Isaacs, J.T., Coffey, D.S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl*, 2, 33-50.

Jena, A.V.G., Ramarão, P. (2010). Insulin-resistence and benign prostatic hyperplasia: The connection. *Eur. J. Pharmacol*, 651, 75-81.

Joo, S. S., Yoo, Y.M. (2009). Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res*, 47(1), 8-14.

Jung-Hynes, B., Huang, W., Reiter, R.J., Ahmad, N. (2010). Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J. Pineal Res*, 49, 60-68.

Kerr, J.F.R., Searle, J. (1973). Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch (B)*, 13, 87-102.

Kolodny, R.C., Kahn, C.B., Goldstein, H.H., Barnett, D.M. (1974). Sexual dysfunction in diabetic men. *Diabetes*, 23, 306-309.

Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D., Kocak, A. (2006). Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Mol Cell Biochem*, 284, 81-85.

Kotrikadze, N., Alibegashvili, M., Zibzivadze, M., Abashidze, N., Chigogidze, T., Managadze, L., Artsivadze, K. (2008). Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors. *Exp. Onc*, 30(3), 244-247.

Koyuturk, M., Yanardag, R., Bolkent, S., Tunali, S. (2006). Influence of combined antioxidant against cadmium induced testicular damage. *Environmental Toxicol Pharmacol*, 21,235-240.

Kuniyasu, H., Oue, N., Wakikawa, A., Shigeishi, H., Matsutani, N., Kuraoka, K., Ito, R., Yokozaki, H., Yasui, W. (2002). Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol*, 96,163–170.

Kyprianou, N., Isaacs, J.T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinol*, 22,552-562.

Leiter, E.H., Schile, A. (2013). Genetic and Pharmacologic Models for Type 1 Diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol*, 3(1), 9-19.

Lenzen, S. (2008), The mechanisms of alloxan- and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia*, 51,216–226.

Liu, A.Y., True, L.D., Latray, L. (1997). Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94,10705-10710.

Lostroh, A.J. (1970). Effect of testosterone and insulin in vitro on maintenance and repair of the secretory epithelium of the mouse prostate. *Notes and Comments* 88,501-503.

Mccance, D.R., Hanson, R.L., Pettitt, D.J., Benett, P.H., Hadden, D.R., Knowler, W.C. (1997). Diagnosing diabetes mellitus – do we need new criteria? *Diabetologia*, 40,247-255.

Macchi, M.M., Bruce, J.N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 25(3-4),177-195.

Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 59,1706–1713.

Marelli, M.M., Limonta, P., Maggi, R., Motta, M., Moretti, R.M. (2000). Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate*, 45(3), 238–244.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., Cunha, G.R. (2003). Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop Biol*, 253,165-174.

Martín-Gallán, P., Carrascosa, A., Gussinyé, M., Domínguez, C. (2003). Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*, 34,1563-1574.

McNeal J.E. (1997). Prostate. In: *Histology for Pathologists*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Cap. 42.

Mehta, A., Kaur, G. (2014). Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. *Indian J Dent*, 5(2),86-91.

Montes, G.S. (1992). Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibers in tissues. *Cienc. Cult*, 4(4)224-233.

Monnier, V.M., Sell, D.R., Nagarai, R.H., Miyata, S., Odetti, P., Ibrahim, S.A. (1992). Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes*, 2,36-42.

Moreira, D.M., Anderson, T., Gerber, L., Thomas, J.A., Bañez, L.L., McKeever, M.G., Freedland, S.J. (2011). The association of diabetes mellitus and high-grade prostate cancer in a multiethnic biopsy series. *Cancer Causes Control* , 22(7), 977–983.

Moretti, R.M., Marelli, M.M., Maggi, R., Dondi, D., Motta, M., Limonta, P. (2000). Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells. *Oncology Reports*, 7(2),347–351.

Morré, D.M., Lenaz, G., Morré, D.J. (2000). Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol* 203, 1513-1521.

Muralidhara, S.B. (2007a). Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int J Androl*, 30, 508-518.

Muralidhara, S.B. (2007b). Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol*, 23,578-587.

Naruse, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Nakayama, M.; Chaya, S., Komori, T., Kato, K., Kasuya, Y., Miwa, K., Hotta, N. (2000). Aldose reductase inhibition prevents glucose-induced apoptosis in cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Exp Eye Res*, 71, 309–315.

Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F. et al. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase. *J Biol Chem*, 275,31311–31317.

O'brien, I.A., Lewin, I.G., O'hare, J.P., Arendt, J., Corral, R.J. (1986). Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 24,359-364.

Oldstone, M.B.A. (1988). Prevention of type 1 diabetes in Nonobese Diabetic Mice by virus infection. *Science*, 23,500–502.

Oyenihi, A.B., Ayeleso, A.O., Mukwevho, E., Masola, B. (2015). Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. *Biomed Res Int*. 2015::515042.

- Ordóñez, P., Moreno, M., Alonso, A., Fernández, R., Díaz, F., González, C. (2007). Insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats treated with different doses of 17beta-oestradiol or progesterone. *Exp Physiol*, 92(1),241-249.
- Öztürk, Y., Altan, V.M., Yildizoglu-Ari, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev*, 48,69-104.
- Pande, D., Negi, R., Karki, K., Dwivedi, U.S., Khanna, R.S., Khanna, H.D. (2013). Simultaneous progression of oxidative stress, angiogenesis, and cell proliferation in prostate carcinoma. *Urol Oncol*, 31(8),1561-1566.
- Pani, G., Galeotti,T., Chiarugi,P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev*, 29,351–378.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B. (2006). Melatonin – Nature´s most versatile biological signal? *FEBS Journal*, 273,2813-2838.
- Park, J., Cho, S.Y., Lee, Y.J., Lee, S.B., Son, H., Jeong, H. (2014). Poor glycemic control of diabetes mellitus is associated with higher risk of prostate cancer detection in a biopsy population.*PLoS One*. 8(9),9.
- Park, J.W., Hwang, M.S., Suh, S.I., Baek, W.K. (2009). Melatonin down-regulates HIF-1 alpha expression through inhibition of protein translation in prostate cancer cells. *J Pineal Res*, 46(4),415–21.
- Paschos, A., Pandya, R., Duivenvoorden, W.C., Pinthus, J.H. (2013). Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 16(3), 217-225.
- Paskaloglu, K., Sener, G., Ayançolu-Dülger, G. (2004). Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*, 499(3),345-354.
- Peschke, E., Frese, T., Chankiewicz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., Spessert, R., Mühlbauer, E. (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res*, 40(2),135-143.
- Peschke, E., Mühlbauer, E., Musshoff, U. et al. (2002). Receptor (MT (1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res*, 33, 63–71.
- Peschke, E., Stumpf, I., Bazwinsky, I., Litvak, L., Dralle, H., Mühlbauer, E. (2007). Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res*, 42(4),350-358.

Porto, E.M., Santos, S.A.A., Ribeiro, L.M., Lacorte, L.M., Rinaldi, J.C., Justulin Jr, L.A., Felisbino, S.L. (2011). Lobe variation of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc Res Tech*, 74(11),1040-1048.

Prasad, C., Imrhan, V., Marotta, F., Juma, S., Vijayagopal, P. (2014). Lifestyle and Advanced Glycation End Products (AGEs) Burden: Its Relevance to Healthy Aging. *Aging Dis*.5(3),212–217.

Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A. et al. (2003). Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*, 144,5347–5352.

Radogna, F., Diederich, M., Ghibelli, L. (2010). Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 80(12),1844–1852.

Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., Abdollahi, M. (2005). A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*, 59(7),365-373.

Rasmussen, D.D., Boldt, B.M., Wilkinson, C.W. et al. (1999). Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*, 140,1009–1012.

Rasmussen, D.D., Mitton, D.R., Larsen, S.A., Yellon, S.M. (2001). Antiaging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res*, 31,89-94.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Fuentes-Broto, L. (2010). Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in Brain Research*, 181,127–51.

Reiter, R.J.; Tan, D.X., Korkmaz, A., Erren, T.C., Piekarski, C., Tamura, H., Manchester, L.C. (2007). Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog*, 13, 303–328.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C., Kolakowski, L. F. (1995). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 15(5), 1003–1015.

Ribeiro, D.L., Candido, E.M., Caldeira, E., Manzato, A.J., Taboga, S.R., Cagnon, V.H.A. (2006). Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*, 5, 51-60.

Ribeiro, D.L., Marques, S.F., Alberti, S., Spadella, C.T., Manzato, A.J., Taboga, S.R., Dizeyi, N., Abrahamsson, P.A., Góes, R.M. (2008). Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*, 89(4),276-283.

Ribeiro, D.L., Taboga, S.R., Góes, R.M. (2009). Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulfate proteoglycans of the rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol*. 90(4),400-411.

Rimler, A., Culig, Z., Levy-Rimler, G., Lupowitz, Z., Klocker, H., Matzkin, H., Zisapel, N. (2001). Melatonin elicits nuclear exclusion of the human androgen receptor and attenuates its activity. *The Prostate*, 49(2), 145–54.

Rimler, A., Culig, Z., Lupowitz, Z., Zisapel, N. (2002). Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81(1), 77–84.

Ríos-Lugo, M.J., Cano, P., Jiménez-ortega, V., Fernández-Mateos, M.P., Scacchi, P.A., Cardinali, D.P., Esquifino, A.I. (2010). Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res*, 49(4)342-348.

Rodriguez-Garcia, A., Mayo, J. C., Hevia, D., Quiros-Gonzalez, I., Navarro, M., Sainz, R. M. (2012). Phenotypic changes caused by melatonin increased sensitivity of prostate cancer cells to cytokine-induced apoptosis. *J Pineal Res*, 54(1),1–13.

Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D., León, J., Manchester, L., Reiter, R. J. (2005). Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate*, 63(1),29–43.

Sanai, T., Sobka, T., Johnson, T., Essawy, M.E.I., Muchaneta, K., Gharbia, O.B., Oldroyd, S., Nahas, A.M.E. (2000). Expression of cytoskeletal proteins using the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 14,91-1000.

Schalken, J.A., Van leenders, G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*, 62,11-20.

Schwertner, A., Conceição dos Santos, C., Costa, G., Deitos, A., de Souza, A., de Souza, I., Torres, I., da Cunha Filho, J., Caumo, W. (2013). Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomise, double-blind, placebo-controlled trial. 154,874–881.

Schinner, S., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R., Barthel, A. (2005). Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*, 22,674-682.

Seghrouchni, I., Draï, J., Bannier, E., Rivière, J., Calmard, P., Garcia, I., Orgiazzi, J., Revol, A. (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta*, 321,89-96.

Seraphim, P.M., Sumida, D.H., Nishide, F.Y., Lima, F.B., Neto, J.C., Machado, U.F. (2000). A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 44 (4),331-336.

Simmons, K.M., Michels, A.W. (2015). Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes*, 6(3),380-90.

Singh, R., Barden. A., Mori, T., Beilin, L. (2001). Advanced glycation endproducts: A review. *Diabetologia*, 44,129–146.

Siu, S.W.F., Lau, K.W., Tam, P.C., Shiu, S.Y.W. (2002). Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. *Prostate*, 52(2),106–122.

Shiozaw S., Horie, S. (2014). Prostate cancer and metabolic syndrome *Nihon Rinsho*, 72(12),2234-2240.

Shiu, S.Y. (2007). Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. *J Pineal Res*, 43(1)1-9.

Shiu, S.Y.W., Law, I.C., Lau, K.W., Tam, P.C., Yip, A.W. C., Ng, W. T. (2003). Melatonin slowed the early biochemical progression of hormone-refractory prostate cancer in a patient whose prostate tumor tissue expressed MT1 receptor subtype. *J Pineal Res*, 35(3),177–182.

Shiu, S.Y.W., Leung, W.Y., Tam, C.W., Liu, V.W S., Yao, K.M. (2013). Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27(Kip1) in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF- κ B): potential implications on prostate cancer chemoprevention. *J of Pineal Research*, 54(1),69–79.

Sudha, S., Ravisankar, V., Julie, P.M., Arunakaran, J., Govindarajulu, P., Balasubramanian, K. (2000). Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin replacement on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp. Clin. Endocrinol Diab*, 108, 14-20.

Sugimura, y., Cunha, G.R., Donjacour, A.A. (1986). Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Bio. Reprod*, 34,973-983.

Spector, A. (2000). Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther.*, 6,193–201.

Soudanim, S., Yuvaraj, S., Malinim, T., Balasubramanianm, K. (2005) Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats. *Anat. Rec*, 287,1281–1289.

Staak, A., Kassis, A.P., Olshen, A., Wang, Y., Wu, D., Carroll, P.R., Grossfeld, G.D., Cunha, G.R., Hayward, S.W. (2003). Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo. *Prostate*, 54,212-219.

Stege, R.W., Rabe, M.B. (1997).The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med*, 214,1-11.

- Stefan, S.F. (1996). Definition and classification of diabetes including maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Mellitus, A fundamental and clinical text*. Cap. 27, p. 251-290.
- Stitt, A.W., Li, Y.M., Gardiner, T.A., Bucala, R., Archer, D.B., Vlassara, H. (1997). Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGEs receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol*, 150(2),523–531.
- Suthagar, E., Soudamani, S., Yuvaraj, S., Ismail Khan, A., Aruldas, M. M., Balasubramanian, K. (2009). Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 63(1),43–50.
- Srivilai, W., Withyachumnarkul, B., Trakulrunsi, W. (1989). Stereological changes in rat ventral prostate induced by melatonin. *J Pineal Res*, 6(2),111–119.
- Untergasser, G., Madersbacher, S., Berger, P. (2005). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*, 40,121-128.
- Taguchi, A., Blood, D.C., Del Toro, G., Canet, A., Lee, D.C., Qu, W., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2000). Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 405, 354–360.
- Tam, C.W., Shiu, S.Y.W. (2011). Functional interplay between melatonin receptor-mediated antiproliferative signaling and androgen receptor signaling in human prostate epithelial cells: potential implications for therapeutic strategies against prostate cancer. *J Pineal Res*, 51(3),297–312.
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., et al. (2012). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, 2,181–98.
- Tangvarasittichai S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6(3),456-480.
- Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., Kamada, N, et al. (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem*, 270,30253–30256.
- Tesone, M., Oliveira-filho, R.M., Valle, L.B., Calvo, J.C., Barañao, J.L., Foglia, V.G., Charreau, E.H. (1980). Androgen receptors in the diabetic rat. *Diabetologia*, 18,385-390.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma. N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., Murata, M. (2014).Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*, 16(1), 193-217.

- Tilley, W. D., Bentel, J. M., Aspinall, J.O., Hall, R. E., Horsfall, D. J. (1995). Evidence for a novel mechanism of androgen resistance in the human prostate cancer cell line, PC-3. *Steroids*, 60(1),180–186.
- Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol.*, 36(7), 1083–1100.
- Tsai, H.T., Keating, N.L., Van Den Eeden, S.K., Haque, R., Cassidy-Bushrow, A.E., Yood, M.U., Smith, M.R., Potosky, A.L. Risk of diabetes among patients receiving primary androgen deprivation therapy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*, in press.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Dang, T.D., Rowley, D.R. (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*, 8,2912-2923.
- Varvarovská, J., Racek, J., Stozický, F., Soucek, J., Trefil, L., Pomahacová, R. (2003). Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications*, 17,7-10.
- Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, S.O., Aksoy, N. (2001). Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res*, 31(3),193-198.
- Wan, x., Li, S.Q., Xi, S.M., Wang, J.F., Guo, Y.C., Wang, X.M. (2013). Long-term melatonin administration improves glucose homeostasis and insulin resistance state in high-fat-diet fed rats. *Cent Eur J Biol*, 8(10)958-967.
- Wang, Z.J., Ikeda, K., Wada, Y., Foster jr, H.E., Weiss, R.M., Latifpour, j. Expression and localization of basic fibroblast growth factor in diabetic rat prostate. *BJU Intern*, 85,945-952.
- Watve, M.G., Yajnik, C.S. (2001). Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis. *BMC Evol Biol*, 7,61.
- Wautier, M.P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., Wautier, J.L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE.. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280,685–694.
- Wilson, GL., Leiter, E.H. (1990). Streptozotocin interactions with pancreatic β cells and the induction of insulin dependent diabetes. In: Dyrberg, T., editor. *Current Topics in Microbiology and Immunobiology*. Berlin: Springer Verlag, p. 27-54.
- Wolden-hanson, T., Mitton, D.R., Mccants, R.L., Yellon, S.M., Wilkinson, C.W., Matsumoto, A.M., Rasmussen, D.D. (2000). Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinol*, 141(2),487-497.

Xi, S.C., Siu, S.W., Fong, S.W., Shiu, S.Y. (2001). Inhibition of androgen-sensitive LNCaP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression. *Prostate*, 46(1), 52–61.

Xi, S.C., Tam, P.C., Brown, G.M., Pang, S. F., Shiu, S. Y. (2000). Potential involvement of mt1 receptor and attenuated sex steroid-induced calcium influx in the direct anti-proliferative action of melatonin on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *J Pineal Res*, 29(3),172–183.

Xu, H., Jiang, H., Ding, G., Zhang, H., Zhang, L., Mao, S., Ding, Q. (2013). Diabetes mellitus and prostate cancer risk of different grade or stage: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 99(3), 241–249.

Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., Stern, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269,9889–9897.

Ye, C., Li, X., Wang, Y., Zhang, Y., Cai, M., Zhu, B., Wen, X. (2011). Diabetes causes multiple genetic alterations and downregulates expression of DNA repair genes in the prostate. *Laboratory Investigation; Journal of Technical Methods and Pathology*, 91(9), 1363–1374.

Yilmaz, B., Kutlu, S., Mogulkoç, R., Canpolat, S., Sandal, S., Tarakçi, B., & Kelestimur, H. (2000). Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro Endocrinology Letters*, 21(4), 301–306.

Yono, M., Mane, S. M., Lin, A., Weiss, R. M., Latifpour, J. (2008). Differential effects of diabetes induced by streptozotocin and that develops spontaneously on prostate growth in Bio Breeding (BB) rats. *Life Sciences*, 83(5-6),192–197.

Yono, M., Pouresmail, M., Takahashi, W., Flanagan, J.F., Weiss, R.M., Latifpour, J. (2005). Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 372(3), 251–5.

Yu, O.H., Foulkes, W.D., Dastani, Z., Martin, R.M., Eeles, R., Richards, J.B. (2013). An assessment of the shared allelic architecture between type 2 diabetes and prostate cancer. *Cancer Epitel Biomarkers Prev*, 8,1473-1475.

Zanuto, R., Siqueira-Filho, M.A., Caperuto, L.C., Bacurau, R.F., Hirata, E., Peliciari-Garcia, R.A., do Amaral, F.G., Marçal, A.C., Ribeiro, L.M, Camporez, J.P., Carpinelli, A.R.,Bordin, S., Cipolla-Neto, J., Carvalho,. (2013). Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J Pineal Res*, (2),156-165.

Zephy, D., Ahmad, J. (2014).Type 2 diabetes mellitus: Role of melatonin and oxidative stress. *Diabetes Metab Syndr*, in press.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "A administração de melatonina durante a maturação sexual: influência na histofisiologia da próstata adulta e papel protetor contra os danos causados pelo diabetes experimental",

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

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

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto nº _____, Instituição:

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto nº 051/2011, Instituição: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, SP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

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



Aluna: Marina Guimarães Gobbo




Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

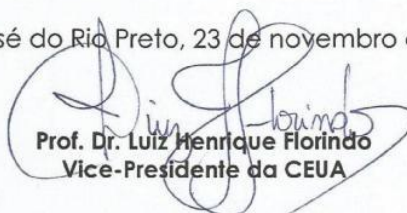
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Administração de melatonina durante a maturação sexual: influência na histofisiologia da próstata adulta e papel protetor contra danos causados pelo diabetes experimental**" (protocolo nº. 051/2011 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Rejane Maira Góes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 23 de novembro de 2011.

CERTIFICATE

UNESP/IBILCE Ethical Committee for Animal Research (CEUA) hereby certify that the scientific investigation entitled "**Melatonin administration during sexual maturation: influence on adult prostate histophysiology and protective role against damages caused by experimental diabetes**" (protocol nº. 051/2011 - CEUA), on Rejane Maira Góes responsibility, is in accordance with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee of this Institute, on november, 23th, 2011.

São José do Rio Preto, 23 de novembro de 2011.



Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Vice-Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – STAEPE
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth
CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil
e-mail: bitonti@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha **Tese de Doutorado**, intitulada "**A ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL: INFLUÊNCIA NA HISTOFISIOLOGIA DA PRÓSTATA ADULTA E PAPEL PROTETOR CONTRA OS DANOS CAUSADOS PELO DIABETES EXPERIMENTAL**", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de abril de 2015.

Assinatura: Marina Guimarães Gobbo
Nome do(a) **Marina Guimarães Gobbo** autor(a):

RG nº 43971686-X

Assinatura: Rejane Maira Góes
Nome do(a) orientador(a): **Rejane Maira Góes**
RG nº 17404810