

Breno Costa Landim

Ativação de AMPK com o uso de metformina em células normais e tumorais de próstata estimuladas por altas concentrações de insulina e ácido graxo 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

BRENO COSTA LANDIM

**Ativação de AMPK com o uso de metformina em células normais e
tumoriais de próstata estimuladas por altas concentrações de insulina e
ácido graxo**

UBERLÂNDIA

2017

BRENO COSTA LANDIM

Ativação de AMPK com o uso de metformina em células normais e tumorais de próstata estimuladas por altas concentrações de insulina e ácido graxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientadora: Prof^a Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- L257a
2017
- Landim, Breno Costa, 1989
Ativação de AMPK com o uso de metformina em células normais e tumorais de próstata estimuladas por altas concentrações de insulina e ácido graxo / Breno Costa Landim. - 2017.
48 f. : il.
- Orientadora: Daniele Lisboa Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Próstata - Câncer - Teses. 4. Metformina - Teses. I. Ribeiro, Daniele Lisboa. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

RESUMO

Atualmente tem se discutido uma possível relação entre obesidade e câncer de próstata. No entanto, a obesidade está associada a desordens multifatoriais (hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, inflamação) e avaliar o impacto delas em células normais e tumorais é de grande relevância para a elaboração de estratégias terapêuticas. A metformina é uma droga antidiabética que apresenta efeitos antiproliferativos e tem sido apontada como tratamento para o câncer. Entretanto, sua eficiência em condições de intenso estímulo proliferativo ainda é desconhecida. Assim, este estudo objetivou analisar o efeito de altas concentrações de ácido graxo e/ou insulina, com ou sem metformina, em células normais e tumorais de próstata, com ênfase no perfil de proliferação e migração destas células. Foram utilizadas duas linhagens de células epiteliais humanas de próstata, sendo elas normais (PNT1A) e tumorais (PC3). Estas células foram tratadas com altas concentrações de ácido graxo saturado (100 μ M palmitato, HF), e/ou insulina (50 μ U), na presença ou ausência de metformina (100 μ M), por 24hrs ou 48hrs. Posteriormente, estas células foram submetidas às análises de apoptose, viabilidade/proliferação celular (MTT), migração e imunofluorescência para vimentina. Os resultados mostram que, de maneira geral, os tratamentos nas concentrações usadas não causaram morte celular nas células estudadas. O MTT revelou que as células PNT1A e PC3 proliferaram em maior quantidade quando tratadas com altas concentrações de ácido graxos (HF) e de insulina (HI) após as primeiras horas de tratamento. O mesmo resultado não foi observado para o grupo HFI. A metformina por si só estimulou a proliferação celular, mas em associação à HF foi capaz de reduzi-la em ambas as linhagens. Contudo, ela não inibiu a proliferação celular desencadeada por HI nas células normais. As análises de migração mostraram que PNT1A foram estimuladas a migrar para todos os tratamentos, enquanto PC3 foi influenciada somente por HF. A metformina inibiu a migração estimulada por todos eles. Em paralelo à migração, foi observado que os tratamentos HF e HI para PNT1A e HF para PC3 estimularam a maior expressão de vimentina, demonstrando maior transição epitélio mesenquima nessas células, e, conseqüentemente, estimulando a migração celular. A metformina inibiu a expressão de vimentina estimulada pelos meios tanto nas células normais como nas tumorais. Assim, conclui-se que as altas concentrações de ácido graxo saturado e insulina interferem nas células prostáticas estimulando atividades celulares que sabidamente influenciam na carcinogênese, tais como proliferação e migração celular. A metformina foi capaz de reverter boa parte das alterações estimuladas por esses meios, se mostrando uma boa ferramenta no controle da proliferação e migração celular em situações de

hiperlipidemia e hiperinsulinemia. Assim, o potencial dessa droga para a terapia de pacientes obesos que sabidamente apresentam maior risco para câncer de próstata deverá ser investigado.

Palavras-chave: Obesidade. Câncer de Próstata. Metformina

ABSTRACT

A potential association between obesity and prostate cancer has been proposed by several studies. Obesity is related with multifactorial disorders, such as hyperglycemia, hyperinsulinaemia, dyslipidemia, and inflammation. Regarding the impact of such disorders on normal and tumor cells is of great relevance for the development of therapeutic strategies. Metformin, an antidiabetic drug, has antiproliferative effects, being proposed as a cancer treatment. However, under intense proliferative stimulation conditions, its efficiency is still uncertain. The main objective of the present study was to analyze the effects of fatty acid and/or insulin under high concentrations, in the presence or not of metformin, on normal and prostate tumor cells, regarding their proliferation and migration profile. Two human prostate epithelial cell lines were used: non cancer (PNT1A) and tumor (PC3). These cells were treated with high concentrations of saturated fatty acid (100 μ M palmitate, HF), and/or insulin (50 μ U) in the presence or absence of metformin (100 μ M) for 24 or 48 hours. After treatments we performed analyzes for caspase, cell viability/proliferation (MTT), migration and immunofluorescence for vimentin. The results showed that the concentration of all treatments was not cytotoxic. MTT revealed that PNT1A and PC3 cells had higher proliferation when treated with HF and HI after the first few hours of treatment. Similar results were not found for the HFI group. Metformin alone has stimulated cell proliferation, but in association with HF, has reduced it in both cell lines. However it did not inhibit the proliferative action of HI in PNT1A cells. Migration analyzes showed that PNT1A were stimulated to migrate after all treatments, whilst PC3 was influenced only by HF and that metformin inhibited the migration stimulated by all of them. Both HF and HI treatments in PNT1A and HF in PC3 stimulated greater vimentin expression, resulting in a larger epithelium-mesenchymal transition in these cells, which, in turns, has stimulated cell migration. Metformin inhibited vimentin expression in both normal and tumor cells. It is possible to conclude that higher concentrations of saturated fatty acid and insulin influence prostatic cells, stimulating cellular activities that could trigger carcinogenesis and/or sustain cancer progression, such as cell proliferation and migration. Most of these stimuli were inhibited by using Metformin, being efficient in the control of cell proliferation and migration in conditions of hyperlipidemia and hyperinsulinemia. Thus, the efficiency of this drug for obese patients therapy, which is a potential group for prostate cancer risk, should be investigated.

Keywords: Obesity. Prostate Cancer. Metformin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 - Obesidade e a relação com o câncer de próstata | 14 |
| Figura 2- Gráfico quantificação da Caspase 3/7 ativada | 25 |
| Figura 3- Gráfico análise da Proliferação Celular por MTT | 27 |
| Figura 4- Ensaio de Migração celular "Cell Scratch" | 29 |
| Figura 5 A- Imagens representativas do ensaio de migração celular em PNT1A | 30 |
| Figura 5 B- Imagens representativas do ensaio de migração celular em PC3 | 30 |
| Figura 6- Gráfico Quantificação de vimentina | 33 |
| Figura 7A- Imagens representativas da imunomarcção para vimentina na avaliação da transição epitélio mesenquimal em PNT1A | 34 |
| Figura 7B- Imagens representativas da imunomarcção para vimentina na avaliação da transição epitélio mesenquimal em PC3 | 34 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 11 |
| 2.1 | ÁCIDOS GRAXOS | 11 |
| 2.2 | OBESIDADE | 12 |
| 2.3 | CÂNCER DE PRÓSTATA | 13 |
| 2.4 | OBESIDADE E A RELAÇÃO COM O CÂNCER DE PRÓSTATA | 14 |
| 3 | OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS | 20 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 | <i>Cultura primária de células epiteliais prostáticas</i> | 21 |
| 4.2 | <i>Tratamentos das culturas celulares</i> | 21 |
| 4.3 | <i>Determinação da apoptose via ativação de caspase-3/7</i> | 21 |
| 4.4 | <i>Análise de proliferação celular por MTT</i> | 22 |
| 4.5 | <i>Migração celular: Wound Healing/Cell Scratch</i> | 22 |
| 4.6 | <i>Imunofluorescência</i> | 22 |
| 4.7 | <i>Análise estatística</i> | 23 |
| 5 | RESULTADOS | 24 |
| 5.1 | <i>Determinação da apoptose via ativação de caspase-3/7</i> | 24 |
| 5.2 | <i>Análise de proliferação celular por MTT</i> | 26 |
| 5.3 | <i>Efeito do palmitato e da insulina na Migração celular</i> | 28 |
| 5.4 | <i>Avaliação da transição epitélio-mesenquimal</i> | 31 |
| 6 | DISCUSSÃO | 35 |
| 7 | CONCLUSÃO | 40 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 41 |

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida tem aumentado nos últimos anos, e, consequentemente, a incidência das doenças associadas ao envelhecimento (INCA -Instituto Nacional de Câncer José Alencar). Neste contexto, tem-se observado uma forte relação entre a obesidade e o câncer de próstata. Devido a frequência e o valor que este tipo de câncer vem tomando, destaca-se a importância das pesquisas que buscam esclarecer os mecanismos da sua incidência e progressão bem como a elaborar estratégias terapêuticas eficazes.

De acordo com o INCA -Instituto Nacional de Câncer José Alencar, é preocupante a incidência de casos de câncer de próstata no mundo e no Brasil. Ele é o segundo mais comum entre os homens, sendo o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente, representando cerca de 10% do total de cânceres (2015). Deste modo, as pesquisas para entender os mecanismos moleculares e como os tipos específicos de gorduras podem contribuir para a tumorigênese e progressão do câncer são muito relevantes, uma vez que poucos estudos pré-clínicos têm investigado o papel da dieta com ácidos graxos saturados na ocorrência do câncer de próstata e a maioria dos estudos são avaliações clínicas e epidemiológicas que correlacionam a incidência de câncer em indivíduos obesos. Entretanto, considerando que a obesidade está sempre relacionada com diferentes alterações metabólicas, tais como resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia, dislipidemia, hipotestosteronemia, hipertensão além de acentuada inflamação (DEROO & KORACH, 2006; SHEN & ABATE-SHEN, 2010; BARNARD et al., 2002; BERQUIN et al., 2011), torna-se difícil discriminar os mecanismos preponderantes nas alterações patológicas observadas na próstata em humanos e em modelos de estudo *in vivo*. Assim, os estudos *in vitro* são de fundamental importância para o esclarecimento a respeito dos mecanismos desencadeadores das alterações patológicas na próstata, observados nos pacientes obesos. Dessa forma, modificações da dieta associadas às terapias farmacológicas poderão ser delineadas para o potencial tratamento do câncer de próstata. Nesse sentido, este projeto de pesquisa apresenta relevância ao passo que se preocupa em compreender, esclarecer, propor possíveis alternativas e levantar questionamentos acerca da relação do câncer de próstata e as situações metabólicas ligadas à obesidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os alimentos que comemos são divididos em três grupos: os carboidratos, as proteínas e os lipídios. O último grupo, em especial, é de grande interesse para as pesquisas atuais, uma vez que ele é o elemento de maior relevância calórica na alimentação moderna. De acordo com o manual LBC lipídios da USP (2016), os lipídios possuem, no geral, longas cadeias hidrofóbicas que podem ser encontrados nas suas formas saturadas, p. ex. ácido palmítico e esteárico, e as formas monoinsaturadas, p. ex. oleico e linoleico e ainda poli-insaturadas, p. ex. ômega 3 e 6.

As dietas que incluem os ácidos graxos saturados são majoritariamente de origem animal como o leite, a carne e os ovos; e estudos mostram que eles favorecem o risco para o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer, incluindo o de próstata (STROM et al., 2008; PARK et al., 2009; WHITTEMORE et al., 1995). Por outro lado, outros estudos sugerem que cadeias mais curtas de ácidos graxos saturados podem ter um efeito protetor no desenvolvimento do câncer de próstata (DE LOURDES et al., 2007). Além disso, outros autores sugerem que o alto consumo deste tipo de gordura não colabora com a evolução do tumor de próstata (LLOYD et al., 2010). Existe também uma controvérsia em relação aos ácidos graxos monoinsaturados. Alguns autores sugerem um efeito protetor em relação ao câncer (LOPEZ-MIRANDA et al., 2010), enquanto outros descrevem a sua associação com este tipo de câncer (PARK et al., 2009; CROWE et al., 2008). Em colaboração a esses achados, tem sido demonstrado que o papel da SCD-1, enzima responsável pela síntese *de novo* do ácido graxo monoinsaturado, na promoção do câncer de próstata (FRITZ et al., 2010; KIM et al., 2009). Já em relação aos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, tem sido descrito uma ação anticâncer em dietas de baixas razões de ômega 6/ 3 (KOBAYASHI et al., 2008; BERQUIM, et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2006; AKINSETE et al., 2012). Por outro lado, metabólitos bioativos de ômega 6 tem sido investigado por participar na inflamação, proliferação e metástase, enquanto o ômega 3 apresenta um papel oposto (BERQUIM et al., 2011).

Neste sentido, embora os estudos clínicos têm correlacionado as diferentes dietas de ácidos graxos e o risco tumoral, fica evidente que a associação entre ácido graxo e câncer ainda é muito debatida na literatura científica. Nos estudos pré-clínicos, a dificuldade na

padronização do consumo e na quantidade de ácidos graxos ingeridos na dieta representa um grande problema, uma vez que o comportamento humano não pode ser completamente controlado. Assim, a investigação precisa dos efeitos dos ácidos graxos mais consumidos pelas diferentes populações mundiais se faz urgente.

2.2 OBESIDADE

Os hábitos alimentares exercem grande influência sobre o crescimento, desenvolvimento e saúde geral dos indivíduos. Até o final da década de 80, estudos demonstravam uma relação positiva e consistente da obesidade com a condição socioeconômica, sendo o excesso de peso uma relação exclusiva das elites socioeconômicas (BALL & CRAWFORD, 2004). Mais recentemente, as pesquisas sobre o perfil epidemiológico das doenças passaram a sustentar uma relação entre alimentação e doenças crônicas, como as enfermidades cardiovasculares e diversos tipos de câncer (NIEMAN, 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a alta ingestão de gordura e colesterol exerce efeitos negativos sobre o perfil lipídico e alterações desse perfil constitui um fator de risco para o desenvolvimento de patologias (OMS, 2016; TEIXEIRA et al., 2007). Além disso, o desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, é condição essencial para o estabelecimento da obesidade (WYNNE et al., 2005) que pode ser entendida como uma doença resultante do acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo que causa inúmeros prejuízos à saúde. Além da alimentação, a predisposição genética, o ambiente, e o sedentarismo também contribuem para o desenvolvimento da obesidade (CHEUNG & MAO, 2012; PRIETO-HONTORIA et al., 2011).

No mundo há atualmente 2,1 bilhões de pessoas obesas ou com sobrepeso, o que representa quase 30% da população mundial (MARIE, 2014). Para a OMS, a obesidade em adultos é caracterizada por um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m², e o sobrepeso por IMC entre 24,9- 29,9 kg/m². Apesar das limitações no uso do IMC, existe uma associação positiva entre este parâmetro e o risco de mortalidade (CALLE & KAAKS, 2004). A obesidade está associada com diversas alterações metabólicas que comprometem o funcionamento da maioria dos sistemas orgânicos, levando a doenças como a hipertensão arterial, resistência à insulina, intolerância à glicose, diabetes tipo 2 (DEROO & KORACH, 2006) e a também a dislipidemia (SAAD & GOOREN, 2011). Além disso, em obesos, o

tecido adiposo torna-se disfuncional, refletindo no aumento de várias adipocinas e moléculas sinalizadoras tais como as leptinas, interleucina 6 e fator de crescimento endotelial vascular (PRADO, et al., 2009; RIBEIRO, et al., 2012). Portanto, o acúmulo de gordura branca, proveniente do excesso de lipídios da dieta, oferece um alto risco para o desenvolvimento e progressão de doenças (GUH et al., 2009). Adicionalmente, diversos estudos indicam que a obesidade pode contribuir com a proliferação, migração e invasão celular, aumentando o risco da progressão de muitos tipos de câncer (HSING et al., 2007; PERKS et al., 2016; SLIPICEVIC et al., 2008; LAURENT et al., 2016).

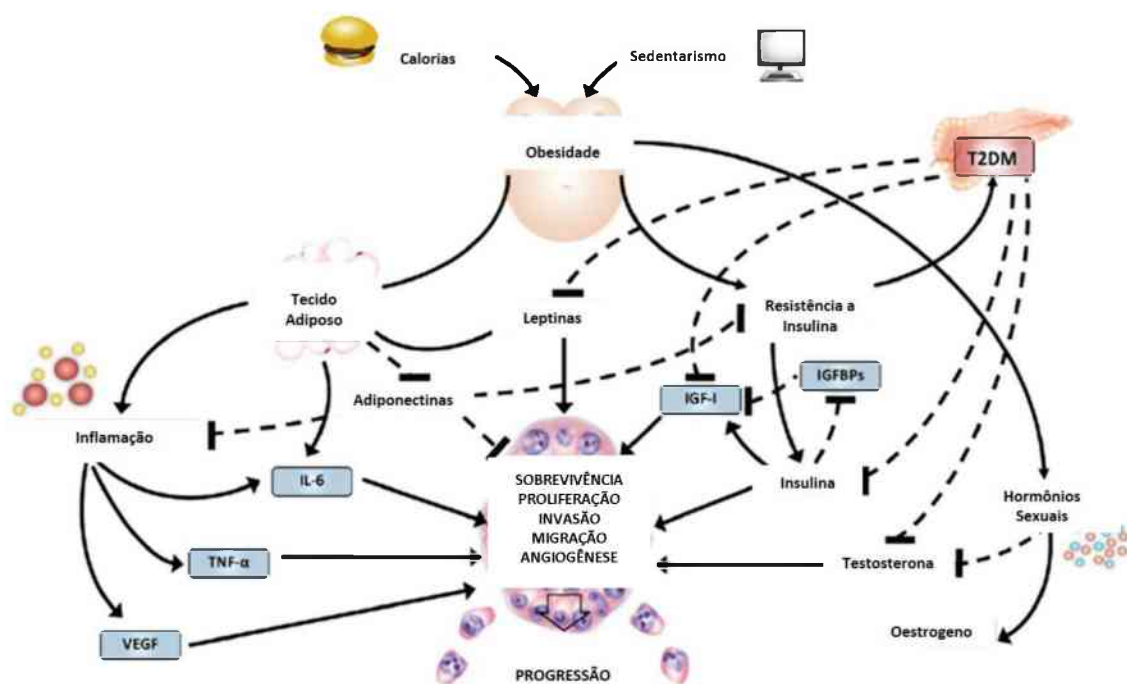
2.3 CÂNCER DE PRÓSTATA

A expectativa de vida tem aumentado nos últimos anos, e, conseqüentemente, um aumento na incidência das doenças associadas ao envelhecimento. Nos homens, por exemplo, as alterações na próstata são muito comuns durante o envelhecimento (MARCELLI & CUNNINGHAM, 1999) sendo o câncer, a terceira maior causa de morte (LANE et al., 2007). Neste sentido, o crescimento prostático, as alterações morfológicas e hormonais são os principais alvos de estudo para compreender os mecanismos da evolução da doença. De acordo com o INCA, no Brasil o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens, sendo o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente, representando cerca de 10% do total de cânceres que acometem os homens (2015).

A hiperplasia prostática e o câncer de próstata são as duas principais alterações patológicas do trato genital masculino após a quinta década de vida (LACORTE, 2008). Já se sabe que o desequilíbrio na interação entre o epitélio e o estroma prostático pode iniciar e promover as lesões na próstata (SUNG & CHUNG, 2002). A dependência aos andrógenos nas etapas iniciais podem também favorecer esse tipo de câncer (KOOCHKEPOUR, 2011). Além disso, as inflamações crônicas (FIBBI et al., 2010), a síndrome metabólica (VIGNOZZI et al., 2012), a idade, o histórico familiar e obesidade (LEITZMANN & ROHRMANN, 2012) também podem implicar na evolução da doença. Outras causas, além das citadas, como os hábitos alimentares e o estilo de vida vêm adquirindo importância no entendimento das alterações da próstata (HAYWARD et al., 1997; HSING et al., 2002; HO et al., 2004). A exposição a contaminantes ambientais, por exemplo, tais como o cádmio ou a ingestão de bebidas contendo cafeína têm sido associados com o aparecimento da hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata (LACORTE et al., 2008).

2.4 OBESIDADE E A RELAÇÃO COM O CÂNCER DE PRÓSTATA

A obesidade tem sido o principal fator para o aumento no risco de desenvolvimento de várias doenças debilitantes, incluindo o câncer (DE PERGOLA & SILVESTRIS, 2013). A relação entre obesidade e câncer de próstata deve-se aos alterados níveis de inúmeros hormônios tais como testosterona, estrogênio, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), leptina e diminuídos níveis de adiponectina, além da hiperglicemia capaz de estimular o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias também presentes em grande quantidade nos indivíduos obesos (Figura 1) (BUSCHEMEYER et al, 2007).



FONTE: Modificado de BURTON et al (2010)

Figura 1 - Visão Geral de diferentes vias que ligam as alterações metabólicas e a progressão do câncer de próstata.

Como já destacado anteriormente, o alto consumo de gordura está intimamente correlacionado com a incidência de câncer de próstata, e o contrário, uma dieta em baixas concentrações deles combinada à atividade física, normaliza os níveis hormonais séricos, diminuindo os riscos para o estabelecimento da doença (TYMCHUK et al., 1998). Deste modo, há uma associação diretamente proporcional entre obesidade e o câncer de próstata (HAMMARSTEN & HOGSTEDT, 2001).

Algumas possíveis consequências da obesidade, apontados na tumorigênese, são o excesso de insulina, IGF-1, ácidos graxos e estresse oxidativo. Além disso, em homens

obesos, há uma redução de andrógenos devido à maior aromatização, ou seja, conversão de testosterona em estrógeno (MACDONALD et al., 2010).

A insulina tem efeito promotor no câncer por ser um importante estimulador do metabolismo, da proliferação celular e da progressão das linhagens celulares do câncer de próstata (BARNARD et al., 2002). Além da sua ação direta, *in vivo*, ela pode agir indiretamente, através da indução à superprodução do IGF-1 que age como um agente mitogênico e anti-apoptótico, favorecendo o desenvolvimento e crescimento do tumor (LAUKKANEN et al., 2004). Nesse sentido, como indivíduos obesos apresentam resistência à insulina, com consequente hiperglicemia e hiperinsulinemia, eles estariam em condição de maior exposição a esse hormônio que potencialmente poderia estimular a progressão maligna tumoral.

Além da insulina, o alto consumo de ácidos graxos saturados e a exposição por tempo prolongado ao ambiente rico em gorduras, também fornece elementos moleculares que estimulam a carcinogênese, como já discutido em sessão anterior. A maioria dos ácidos graxos usados pelo organismo humano é adquirida pela dieta (fonte exógena) que posteriormente são processados pelo organismo e destinados para compor principalmente as membranas celulares, síntese de produtos como colesterol, hormônios sexuais (esteróides), prostaglandinas, entre outros (CASCIO et al., 2012). Assim, por exemplo, os ácidos graxos derivados do estoque de triglicerídeos são usados para a síntese fosfolipídios de membrana, auxiliando células que estão em altas taxas proliferativas (PANDIAN et al., 1999). Neste sentido, pesquisas sugerem que uma dieta pobre em gordura saturada diminui o risco de desenvolvimento do câncer de próstata (TYMCHUK et al., 1998). Em contrapartida, a obesidade resultante da dieta rica em alimentos gordurosos está associada com a incidência desse tipo de câncer (SUBURU CHAN, 2012; CORONA et al., 2014; VIGNOZZI & MAGGI, 2014; VIGNOZZI et al., 2014). Testes realizados em laboratório mostraram uma relação entre consumo de gordura animal, em maior quantidade, com o aumento do volume da próstata, da testosterona, da proliferação celular e do receptor de andrógenos (AR) (ESCOBAR et al., 2009). A quantidade de gorduras saturadas da dieta, como o ácido palmítico, esteárico e mirístico, têm uma relação positiva com risco total de câncer de próstata (CROWE et al., 2008). Esses dados sugerem que a gordura animal, que é rica em ácido palmítico (saturado) e ácido oleico (insaturado), deve apresentar efeitos promotores do câncer. Além disso, outra investigação propôs que os andrógenos aumentam a captura de ácidos graxos pelas células tumorais da próstata, aumentando consequentemente a produção de espécies reativas ao oxigênio pela maior oxidação de ácidos graxos na matriz mitocondrial

(LIN et al., 2010). Todos esses dados apontam o envolvimento dos ácidos graxos na progressão do câncer de próstata, mas eles ainda não mostram os efeitos diretos da exposição aos ácidos graxos em células normais nem, tampouco, esclarecem sobre os mecanismos moleculares que estimulam as vias de proliferação, sobrevivência celular no câncer de próstata.

As células tumorais requerem alterações metabólicas específicas que cooperam com a ativação de eventos genéticos culminando com a transformação neoplásica e progressão tumoral (HANUN & OBEID, 2002). Com isso, elas precisam de uma produção maior de membranas e alta produção energética pela oxidação de ácidos graxos, processos que estimulam a divisão celular (BARON et al., 2004). Uma vez que a dieta fornece boa parte do ácido graxo requerido para as atividades celulares, a síntese endógena (*de novo*) é mínima. Em contraste, as células tumorais necessitam da síntese *de novo* de ácido graxo mesmo nas situações que grandes quantidades sejam consumidas na dieta. Quando necessário, uma enzima, a ácido graxo sintetase (AGS), produz o lipídio essencial para as funções celulares (BARON et al., 2004). Assim, a expressão de AGS é muito baixa nas células normais, porém é bastante elevada em muitos tipos de tumores (SWINNEN et al., 2002; ROSSI et al., 2003). É interessante notar que, a via de sinalização da AGS é estimulada pelos mesmos processos que estimulam o câncer de próstata. A via da PI3K/AKT/mTOR é o primeiro estimulador da expressão de AGS no câncer de próstata. O bloqueio farmacológico da PI3K reduz o crescimento celular e também a expressão de AGS, o que inibe a proliferação celular (BERQUIN et al., 2011). Em conjunto, esses dados sugerem fortemente que a síntese *de novo* de ácido graxo não é apenas requerida para o desenvolvimento do câncer de próstata, mas tem papel na progressão da doença.

Ainda sobre os fatores que estimulam o câncer durante a obesidade destaca-se a via PI3K/AKT/mTOR. A superexpressão da via de sinalização AKT é uma característica recorrente observada em tumores humanos. As investigações dos últimos 20 anos mostram claramente o papel dessa via para a manutenção do estado tumorigênico. Desta forma, as células tumorais apresentam diversos mecanismos que aumentam a sua ativação (MAIRA et al., 2009). Essa via é ativada quando PI3K é recrutada para a membrana da célula após a ativação dos receptores de insulina ou IGF ali presentes. Ali, fosfotirosinas ativam PI3K que converte fosfatidoinositol-4,5 bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Assim, a AKT é então recrutada para se ligar ao PIP3 onde é ativada (WEE et al., 2008). Após sua ativação, a AKT se desliga da membrana e transloca-se para os compartimentos

celulares como citoplasma, núcleo e mitocôndria, onde ela fosforila muitos substratos. Um desses substratos é mTOR que regula a biogênese da mitocôndria, inibe autofagia e induz a síntese proteica pela regulação de PPAR γ e quinase de proteína ribossomal S6 (S6K) (SCULTZE et al., 2012). Dessa forma, um ambiente rico em insulina como o que ocorre em indivíduos diabéticos tipo 2 e obesos, estimula demasiadamente a via PI3K/AKT/mTOR que pode favorecer o câncer.

Uma outra via que recentemente tem sido apontada relevante no câncer é a da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Esta enzima é um complexo heterotrimérico que consiste da subunidade catalítica e 2 subunidades regulatórias que são codificadas por três genes, e é ativada em situações de estresse celular e condições de redução de energia. A diminuição do estado energético das células é seguida da ativação da AMPK em decorrência do aumento da razão AMP/ATP e também pelo aumento da razão Creatina/Fosfocreatina (WINDER & HARDIE, 1999; ZHENG et al., 2001). É um mecanismo que ajuda a manter a viabilidade das células em situação de estresse, através da ativação de vias que aumentam a produção de ATP (como a beta oxidação de ácidos graxos e glicólise) e inibição de processos que consomem ATP (como a síntese proteica e proliferação celular) (HARDIE, 2003; CARLING, 2004; GRUZMAN et al., 2009). Esses efeitos são de curto prazo e tem o objetivo de manter a homeostasia energética dentro da célula (WINDER & HARDIE, 1999). Assim, estudos mostram que a ativação de AMPK levaria as células para o arresto celular ou ativaria vias de morte celular (HARDIE, 2003; CARLING, 2004; RIOS et al., 2013). A grande concentração de ácidos graxos e glicose encontrada nos obesos pode inibir a atividade de AMPK por estimular a produção de fosfatase 2A, uma enzima que defosforila AMPK, inativando-a (KIM et al., 2009). Dessa forma, não é surpreendente que existam muitas observações relacionadas a deficiência de AMPK aos elementos da síndrome metabólica como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (ABBOTT et al., 2012). Além disso, AMPK tem se mostrado como um importante modulador do metabolismo energético em células cancerosas, e, portanto, regulando o crescimento tumoral. Isso fica evidente nas investigações que mostram que a obesidade, frequentemente associada à resistência à insulina e diminuição da atividade de AMPK, está relacionada com maior risco e/ou mortalidade de muitos tipos de câncer, como mama, cólon, próstata e ovários (XIANG et al., 2004). Nessa mesma linha, nosso grupo demonstrou a exposição prolongada de células epiteliais não-tumorais de próstata ao ácido graxo saturado palmitato estimulou a proliferação através da ativação de AKT e inibição de AMPK, sendo essa proteína um bom alvo para o

tratamento do câncer de próstata (RIBEIRO et al., 2014). Barb et al (2007) também demonstraram que altos níveis de adiponectinas (situação comum em obesos) podem inibir a evolução do tumor através da ativação da AMPK (BARB et al., 2007). Visto que muitos desses fatores são superregulados no câncer de próstata e na obesidade, a ativação de AMPK pode ser um bom alvo para a terapia anticâncer.

Considerando a importância da AMPK no tratamento da síndrome metabólica e no seu papel antiproliferativo, alguns agentes farmacológicos ativadores de AMPK têm sido identificados, como AICAR, estatina, metformina (dimetilbiguanida), tiazolidinediona (TDZ) (SALMINEN et al., 2011). Esses dois últimos são drogas antidiabéticas comuns, usadas para aumentar a sensibilidade à insulina (reduzindo os níveis de glicose, insulina e IGF-1) que medeiam parte de sua ação através da ativação de AMPK. A metformina inibe a gliconeogênese hepática e aumenta a captura de glicose nos músculos esqueléticos após a fosforilação do sítio catalítico da subunidade $\alpha 2$ da AMPK (GRUZMAN et al., 2009). Recentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado outros efeitos benéficos da metformina, dentre eles, melhora das funções endoteliais, redução de peso, redução na taxa do colesterol e LDL, podendo ser interessante no contexto da síndrome metabólica (MARCHETTI, et al., 1988; HAUPT, et al., 1991; DE AGUIAR, et al., 2006; VERMAS, et al., 2000). Adicionalmente, têm-se discutido a possibilidade dessa droga ser eficiente no controle da proliferação celular e supressão do câncer. Estudos sugerem que a incidência de câncer diminuiu em 31% em pacientes que usam metformina quando comparados com demais drogas antidiabéticas (WOJCIECHOWSKA, et al., 2016). A metformina também induz a apoptose, reduz sinalização por fatores de crescimento e inibe a respiração mitocondrial (EL-MIR et al., 2000). Devido seu efeito na ativação de AMPK e pelas reportadas diminuições na incidência de câncer entre pacientes tratados com metformina, muitos estudos têm sido desenvolvidos para determinar se essa droga, tão comumente prescrita, pode ser útil no tratamento de cânceres relacionados ao sistema endócrino (CLEMENTS et al., 2011). Suportando essa hipótese, estudos tem mostrado que a metformina potencializou o efeito de drogas quimioterápicas em estágios iniciais de câncer de mama e diminuiu o risco de câncer de cólon em pacientes não diabéticos, enquanto outros sensibilizadores de insulina como o TDZ não tiveram o mesmo efeito (BROWN et al., 2013). Em relação ao câncer de próstata, foi demonstrado que pacientes que faziam uso metformina tiveram reduzido risco de diagnóstico de câncer em relação aqueles que nunca usaram o medicamento ou que usavam outros tipos de drogas antidiabéticas (PRESTON et al., 2014).

Concluimos com toda essa abordagem que embora os estudos mostrem o sucesso do uso de estimuladores de AMPK na diminuição da progressão de tumores na próstata, a maioria deles trata-se de trabalhos *in vitro* que mostram a metformina na proliferação de linhagens tumorais ou ensaios clínicos e meta-análises que correlacionam o uso da droga com a incidência e/ou mortalidade de câncer de próstata em pessoas diabéticas e/ou obesas. Eles não levam em consideração que a obesidade é multifatorial e que outros fatores metabólicos além da hiperglicemia e hiperinsulinemia, especialmente o excesso de ácido graxo, que podem também estimular a carcinogênese ou reduzir o potencial anticâncer da metformina. Nesse sentido, não há relatos sobre o potencial dessa droga em tumores estimulados por elevados níveis de insulina e/ou ácidos graxos, situação que ocorre em indivíduos obesos, o que auxiliaria muito na busca de abordagens terapêuticas individualmente específicas e mais eficazes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar os efeitos diretos das altas concentrações de insulina e/ou ácido graxo saturado, com ou sem metformina para a ativação de AMPK em células epiteliais normais (PNT1A) e tumorais da próstata (PC3).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

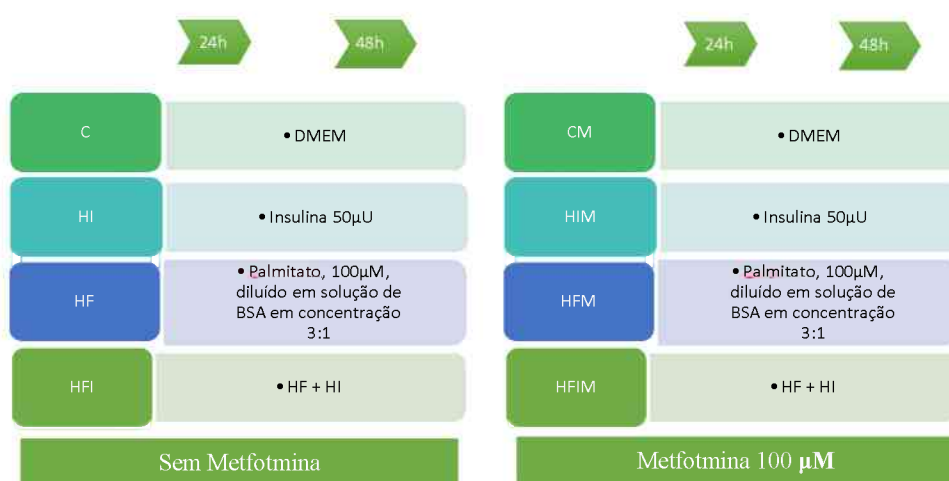
- Avaliar os efeitos das altas concentrações de insulina e/ou gordura saturada, com ou sem metformina, nas de taxas morte celular e proliferação celular;
- Determinar os efeitos desses estímulos na transição epitélio mesenquimal e consequente migração celular nas células normais e tumorais e sua possível inibição com uso de metformina;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura primária de células epiteliais prostáticas

Linhagens de células normais imortalizadas (PNT1A), andrógenos dependentes, e tumorais (PC3), andrógenos independentes, foram utilizadas para os tratamentos abaixo especificados. Essas células foram cultivadas com meio DMEM (*Dulbecco modified Eagle's*) suplementado com soro fetal bovino 10% e penicilina (100 IU/ml) em incubadora sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

4.2 Tratamentos das culturas celulares



O fármaco Metformina (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride) utilizado foi da Sigma Aldrich.

4.3 Determinação da apoptose via ativação de caspase-3/7

A caspase-3/7, que representa um dos mais recentes marcadores descobertos para a morte celular, foi quantificada com o uso do kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as células normais e tumorais foram cultivadas na densidade de 2×10^3 células/poço em placa de 96 poços e depois tratadas com palmitato e/ou insulina, na presença ou não de metformina por 24 e 48 horas. O substrato da caspase, Z-DEVD conjugado com FITC foi adicionado nas células em proporção 1:1 com o meio de cultura. Após 4 horas de incubação em temperatura ambiente, a atividade da caspase 3/7 foi medida em leitora de microplacas, sendo a fluorescência das amostras diretamente proporcional a atividade das caspases. Esse experimento foi realizado em triplicata e cada leitura também foi feita em triplicata dentro de cada experimento.

4.4 Análise de *proliferação celular por MTT*

A atividade proliferativa do tratamentos sobre as células prostáticas foi avaliada pelo do método de MTT com uso do Tetrazole (3-(4,5-Dimetithylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide). As células foram cultivadas em placas 96-poços em uma concentração de 2×10^3 células/poço. Após 24hrs de incubação a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, as células foram tratadas com palmitato e/ou insulina, na presença ou não de metformina por 24 e 48 horas. Após o tratamento, a proliferação foi determinada pela intensidade de coloração em cada amostra. A intensidade de cor é determinada pelo formazan (produto reduzido do MTT após a reação com mitocôndrias ativas das células vivas) e foi quantificada pela absorbância em comprimento de onda de 590nm. Esse experimento foi realizado em triplicata e cada leitura também foi feita em triplicata dentro de cada experimento.

4.5 Migração celular: *Wound Healing/Cell Scratch*

O efeito das altas concentrações de ácido graxo e/ou insulina na migração foi avaliado nas células PNT1A e PC3, usando o ensaio de migração celular. As células foram cultivadas em uma placa de 24 poços a 2×10^3 células até atingir 90% de confluência. Foram feitos dois riscos perpendiculares através do poço com uma pipeta de 100µL para remoção das células nesse local, seguido de duas lavagens em tampão fosfato tamponado (PBS), seguido da adição dos meios palmitato e/ou insulina, na presença ou não de metformina. A migração celular foi avaliada em imagens microscópicas tiradas em tempos de 0, 24 e 48 horas após os tratamentos, medindo a distância entre as bordas da região riscada utilizando o Microscópio Technology Eclipse TI (Nikon). As imagens foram analisadas pelo software *Image-Pro® Plus* version 6.0.

4.6 Imunofluorescência

O conteúdo dos filamentos intermediários de vimentina foi avaliada nas células PNT1A e PC3 através de imunofluorescência. Para isso, as células foram cultivadas em uma placa de 96 poços, a 2×10^3 células/poço e tratadas com os meios descritos durante 24 e 48 horas. Após os tratamentos as células foram fixadas em metanol 10% e, então, foi realizado bloqueio de proteínas por 1 hora com BSA (albumina bovina sérica) a 5%. Sequencialmente, a placa foi incubada overnight com anticorpo primário mouse anti-vimentina de humano diluído 1:500 em BSA 1%, lavadas em TBST (tampão tris-HCl tween 20) e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse Alexa Fluor 594 (Jackson

Laboratory) 1:500 diluído em BSA 1% por 45min. Por fim, após lavagem em TBST foi utilizado DAPI 1:500 diluído em glicerol para marcação dos núcleos.

4.7 *Análise estatística*

Todos os dados numéricos dessa investigação foram avaliados estatisticamente por teste de distribuição amostral e normalidade de Kolmogorov-Smirnov e teste t-student não pareado para comparação de cada tratamento com o seu respectivo controle (C e CM); de cada tratamento na presença ou não de metformina e o efeito do tempo 24 ou 48H em cada tratamento. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prisma.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da apoptose via ativação de caspases-3/7

O perfil de apoptose por caspases-3/7 em suas formas ativadas foi avaliado nas células PNT1A e PC3 após os diferentes tratamentos. Dentre as diversas caspases, as caspases-3 e 7 são consideradas iniciadoras e efetoras, respectivamente, da cascata de morte celular, sendo, portanto, caracterizadas como um importante marcadores da apoptose quando ativadas. Nossa análise mostrou que, em todos os grupos, a via apoptótica não foi demasiadamente ativada, exceto nos grupos HFI 24 horas (PNT1A) e HF 48 horas (PC3) (Figura 2A e B)

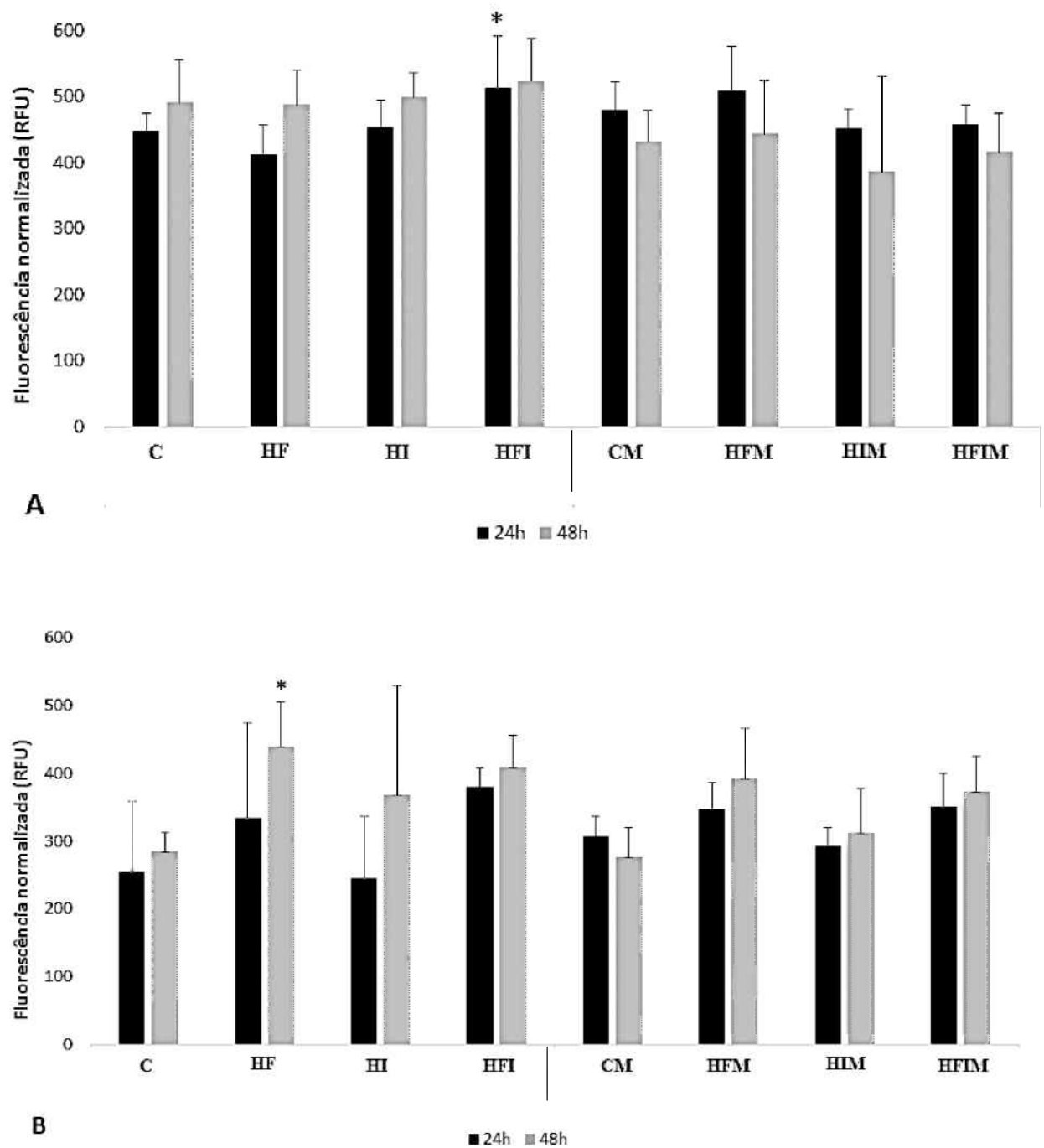


Figura 2. Quantificação da Caspase 3/7 ativada em células PNT1A (A) e PC3 (B) nos grupos controle (C) e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina em 24h e 48h. Os números representam a média do desvio padrão. * Diferença significativa entre os grupos estudados ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação entre os tempos dentro dos mesmos grupos.

5.2 *Análise de proliferação celular*

A capacidade proliferativa das células PNT1A e PC3 foi avaliada através do ensaio de MTT que mostrou que os tratamentos, com ou sem metformina, estimularam a proliferação celular de maneira diferente nas 2 linhagens celulares. Nas células PNT1A, a proliferação celular foi estimulada por todos os tratamentos desde 24h até 48h; exceto o grupo HFI onde a proliferação só foi maior estatisticamente no tempo de 24h (Figura 3A). Já, nas células tumorais, embora haja uma tendência em HI, somente o meio HF foi capaz de aumentar a proliferação celular significativamente (Figura 3B). Em relação ao possível efeito controlador da metformina, encontramos que ela reduziu o estímulo de HF em curto prazo de PNT1A e em todos os tempos de PC3, porém o efeito proliferativo de HI encontrado na PNT1A não foi revertido com o uso da droga (Figura 3A e B).

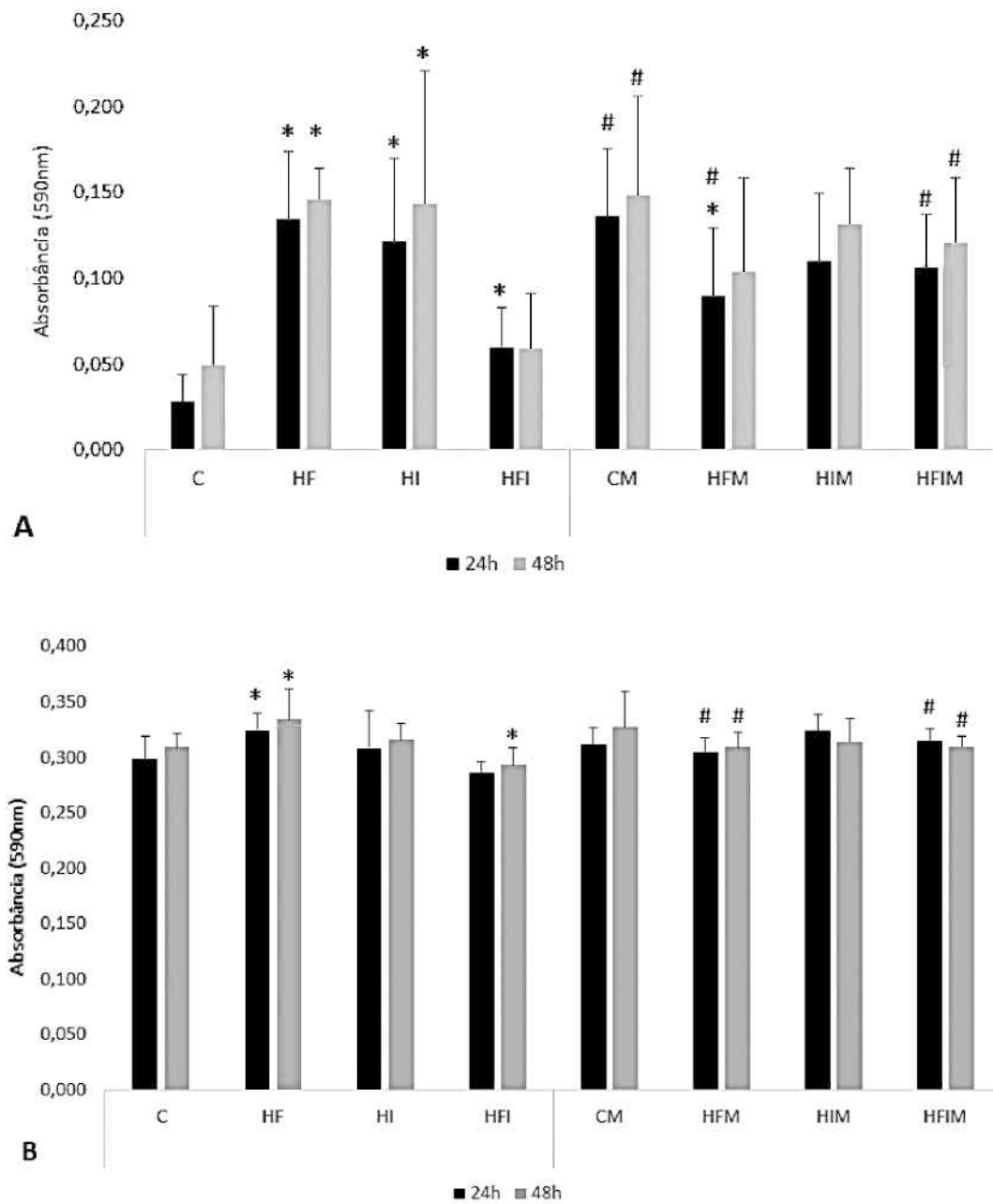


Figura 3. Análise da Proliferação Celular por MTT em células PNT1A (A) e PC3 (B) tratadas com meio controle (C), e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina em 24h e 48h. Os números representam a média \pm desvio padrão. * Diferença significativa entre os grupos estudados comparados ao Controle e # comparados ao par sem metformina ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação entre os tempos dentro dos mesmos grupos.

5.3 Efeito do palmitato e da insulina na Migração celular

A capacidade de migração das células PNT1A e PC3 foi avaliada através da medida da distância entre as bordas do risco feito nos pocinhos pelo ensaio de *cell scratch*. Nesse sentido, quanto menor a área do risco na placa, maior foi a migração celular.

Os resultados de PNT1A mostram que a migração celular foi significativamente aumentada pela insulina ou a associação de palmitato e insulina (Figura 4A). Surpreendentemente, embora não tenha sido estatisticamente significativo, o tratamento com HF, é importante salientar que a redução da área de scratch nesse grupo foi quase 3 vezes maior que a redução da área do controle. Na presença de metformina, a migração dessas células normais foi consideravelmente menor, haja visto que a área de scratch se manteve mais aberta em CM do que em C. Ainda, a metformina foi capaz de inibir o efeito na migração celular que os tratamentos tiveram nessas células (Figura 4A).

Em PC3, notamos que somente o palmitato desencadeou maior migração celular, diferentemente da PNT1A que aumentou a migração significativamente somente com o tratamento com HI e HFI (embora os resultados de HF tenham relevância como mencionado) (Figura 4B). Nessas células tumorais, a metformina por si só não estimulou migração maior do que a controle. Por outro lado, quando associada HF, a metformina reduz o estímulo da migração celular causado por esse tratamento (Figura 4B).

Assim, como observado para a proliferação celular, a associação HFI não apresenta efeito mais estimulante do que os tratamentos isolados em nenhuma das linhagens celulares (Figura 4 A e B).

O efeito dos tratamentos também pode ser visto nas imagens microscópicas da figura 5A e B.

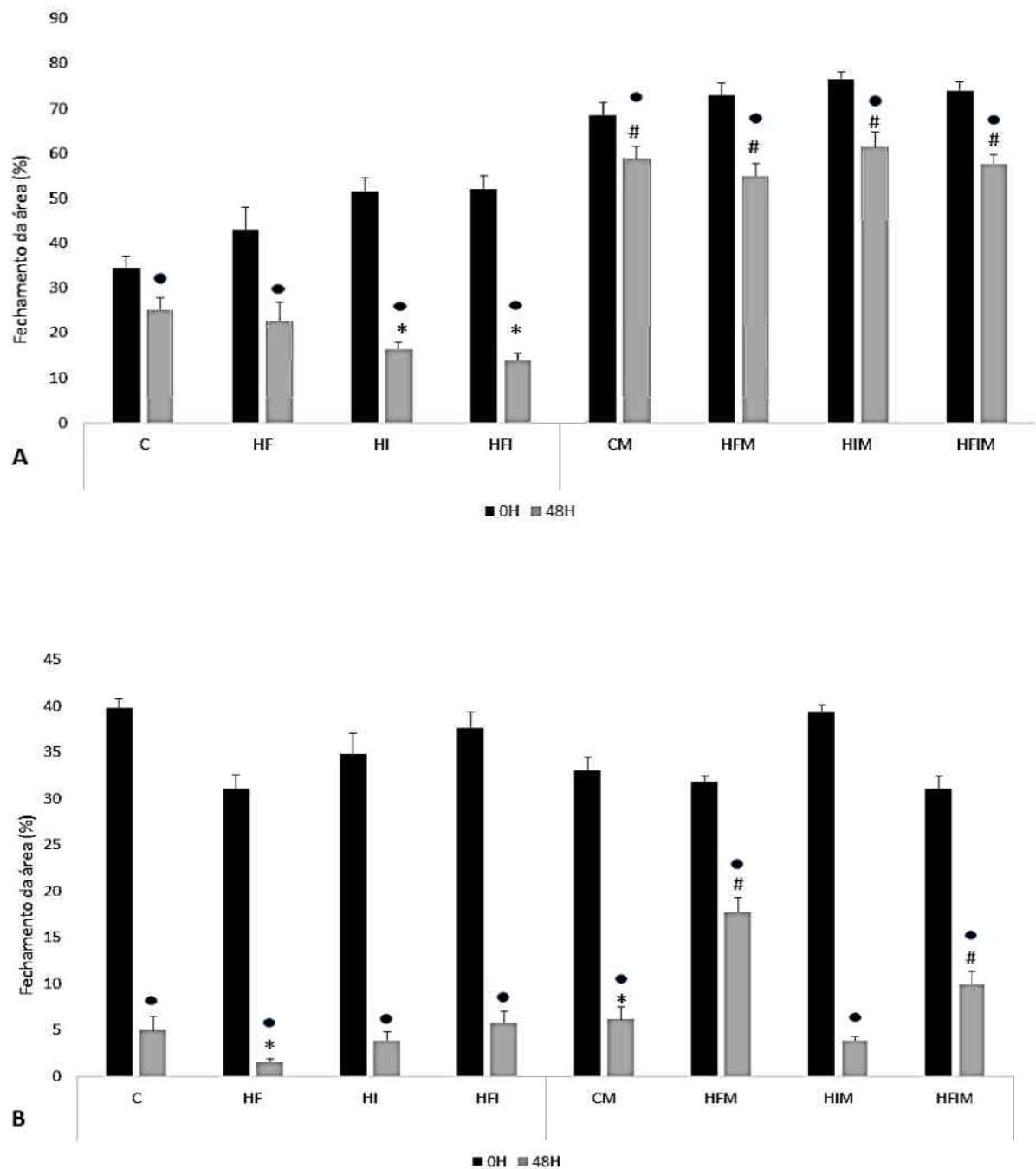


Figura 4. Ensaio de Migração celular "Cell Scratch" em PNT1A (A) e PC3B (B) tratadas com meios controle (C), e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina. Os números representam a média \pm desvio padrão de imagens capturadas nos tempos 0 e 48H após os tratamentos. *Diferença significativa entre os grupos estudados comparados ao Controle; # comparados ao par sem metformina e • em relação ao tempo 0 - ($p < 0,05$).

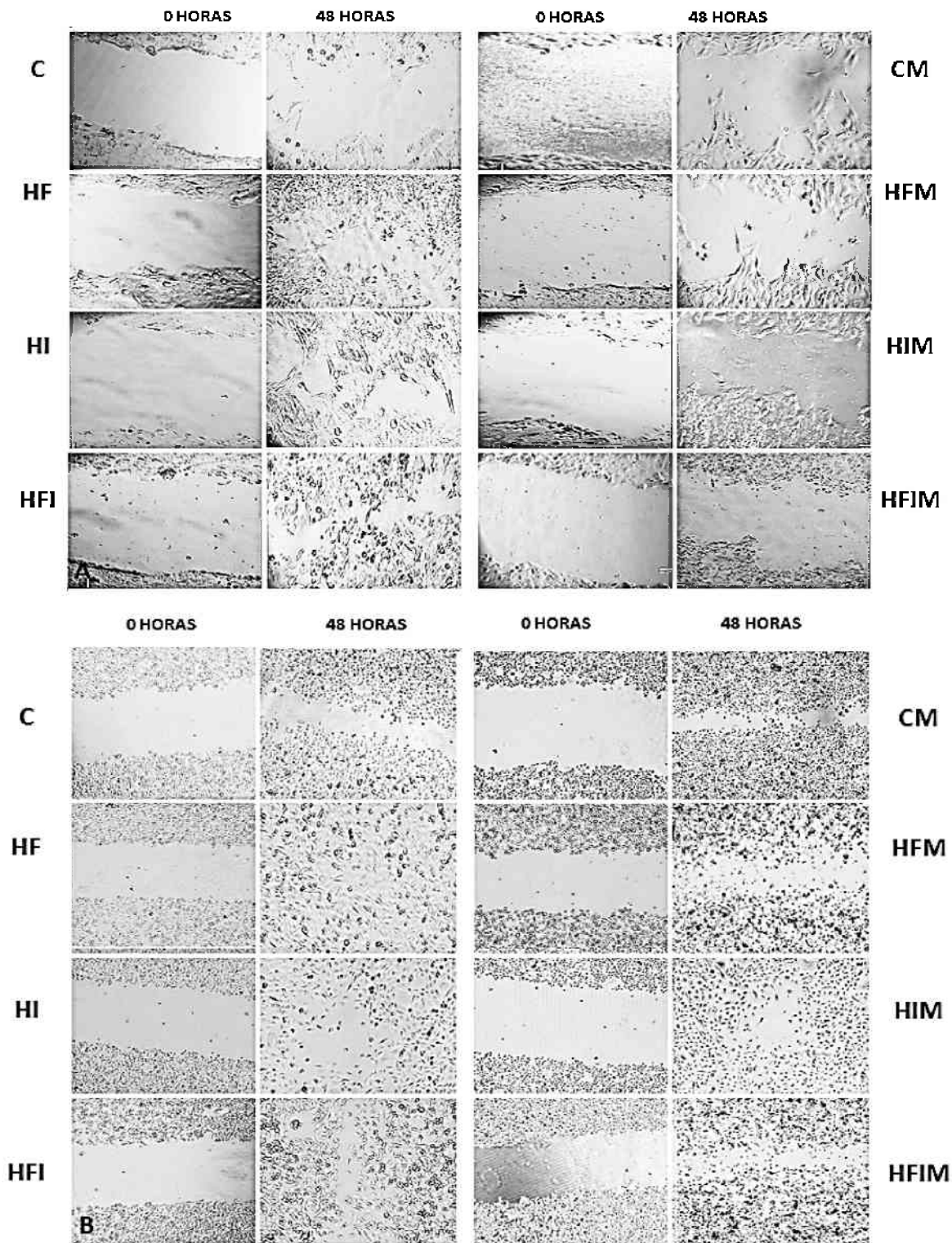


Figura 5. Imagens representativas do ensaio de migração celular em PNT1A (A) e PC3 (B) capturadas no tempo 0 e 48H após os tratamentos com meios controle (C) e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina (M).

5.4 Avaliação da transição epitélio-mesenquimal

Nossa análise mostrou que os tratamentos HF, HI levaram a uma maior expressão de vimentina em 24H e ainda mais acentuadamente após 48H de tratamento nas células PNT1A (Figura 6 e 7A). Notamos que a metformina, por si só, apresenta um efeito estimulante sobre a expressão de vimentina, visto que a quantificação dessa proteína em CM é maior que em C. Entretanto, quando a metformina foi associada aos tratamentos HF e HI, ela só foi capaz de reverter o aumento de vimentina causado por eles após longo prazo (48H). Na avaliação individual em relação ao tempo, todos grupos sem o tratamento com metformina e HFIM apresentaram maior expressão de vimentina após 48H. A associação de palmitato e insulina não potencializa o efeito estimulante que esses meios tiveram isoladamente na expressão de vimentina; e a metformina só foi capaz de reverter esse efeito nos tempos iniciais de tratamento de HFI, voltando a expressão a longo prazo.

No caso das células tumorais, somente o meio HF teve efeito estimulante sobre a expressão de vimentina, enquanto a insulina ou a associação de ambos não mostrou o mesmo resultado (Figuras 6 e 7 B). A metformina sozinha não apresentou o efeito na expressão na vimentina nas células PC3 como o fez nas PNT1A; mas foi capaz de inibir o aumento dessa proteína causado por HF também somente após longo prazo, como observado nas células normais. Já para o tratamento de insulina, observamos que ele, mesmo em longo prazo, não influenciou positivamente na expressão de vimentina das células tumorais. Entretanto, quando a insulina está associada com a metformina, o tratamento reduziu significativamente a quantidade dessa proteína no citoesqueleto após longo prazo. (Figuras 6 e 7B). De forma similar ao que foi observado para as células normais, a associação HFI não altera a expressão de vimentina, mas quando esses meios são administrados juntamente com a metformina, interessante, há um aumento de vimentina nessas células tumorais, tanto em curto quanto em longo prazo.

Traçando um paralelo com os resultados descritos na seção anterior, esses dados corroboram com a maior migração celular encontrada em PNT1A e PC3 após tratamentos com HI e HF respectivamente, e a sua reversão após o tratamento com metformina, mostrando que os meios provavelmente aumentaram a migração através do estímulo à transição epitélio mesenquimal. As células normais tiveram maior expressão de vimentina após todos os tratamentos e também migraram mais do que o controle, ocorrendo o inverso

após o tratamento com a metformina e consequente redução da expressão de vimentina. Já nas PC3 a vimentina esteve maior após o tratamento HF, sendo pouco influenciada pela insulina, e paralelamente a migração celular foi muito mais acentuada em HF. Isso também justifica a menor migração celular encontrada em PC3 após HFI, já que a expressão de vimentina nesse grupo não foi influenciada pelo tratamento combinado como o fez em PNT1A.

Destacamos ainda que a expressão de vimentina foi mais influenciada pelos diversos tratamentos nas células normais do que nas tumorais, haja vista que as células tumorais caracteristicamente já apresentam grande transição epitélio mesenquimal em relação às não tumorais.

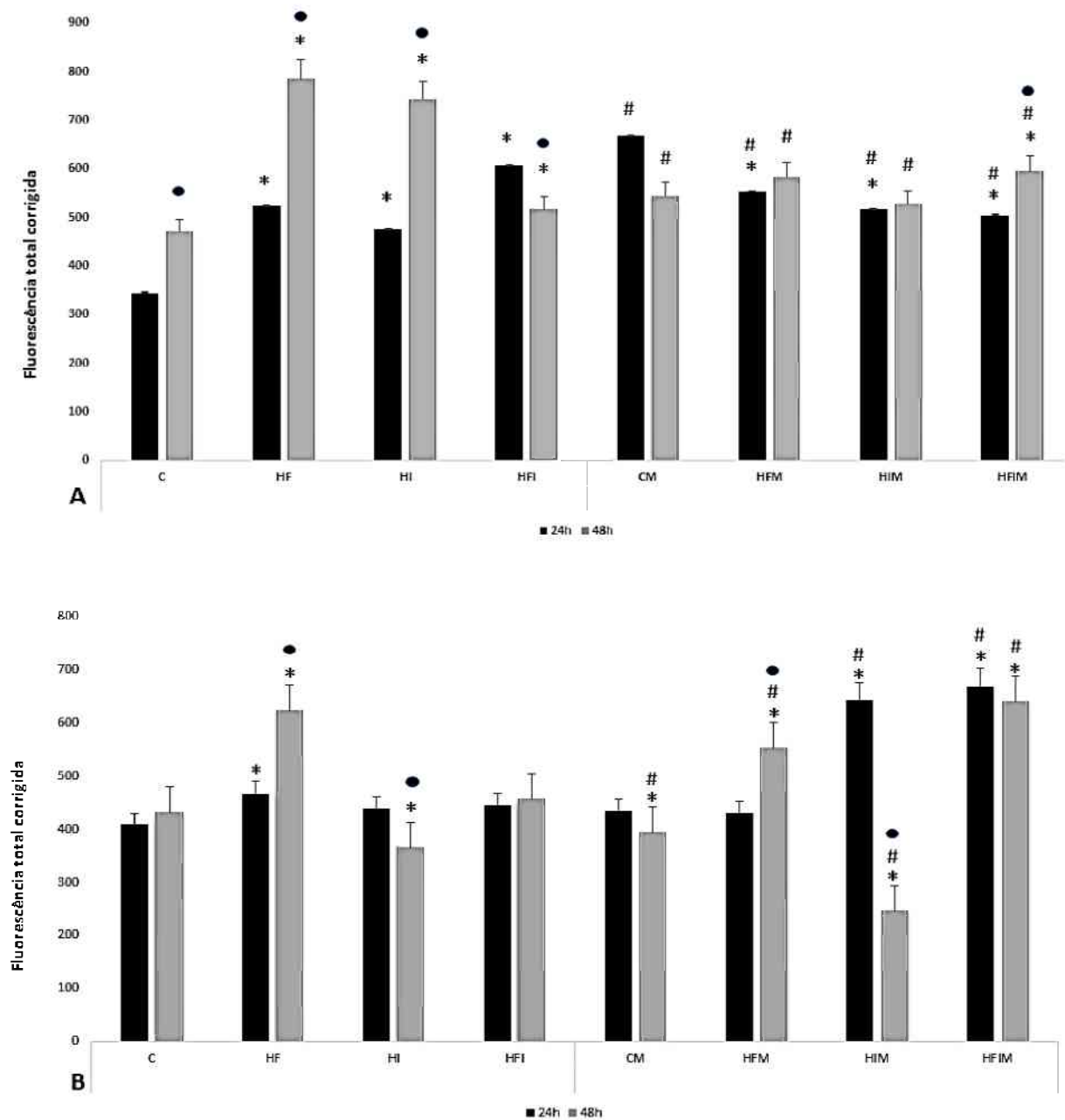


Figura 6. Quantificação de vimentina em PNT1A (A) e PC3 (B) tratadas com meios controle (C), e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina em 24h e 48h.. *Diferença significativa entre os grupos estudados comparados ao Controle; # comparados ao par sem metformina e • em relação ao tempo 24 - ($p < 0,05$).

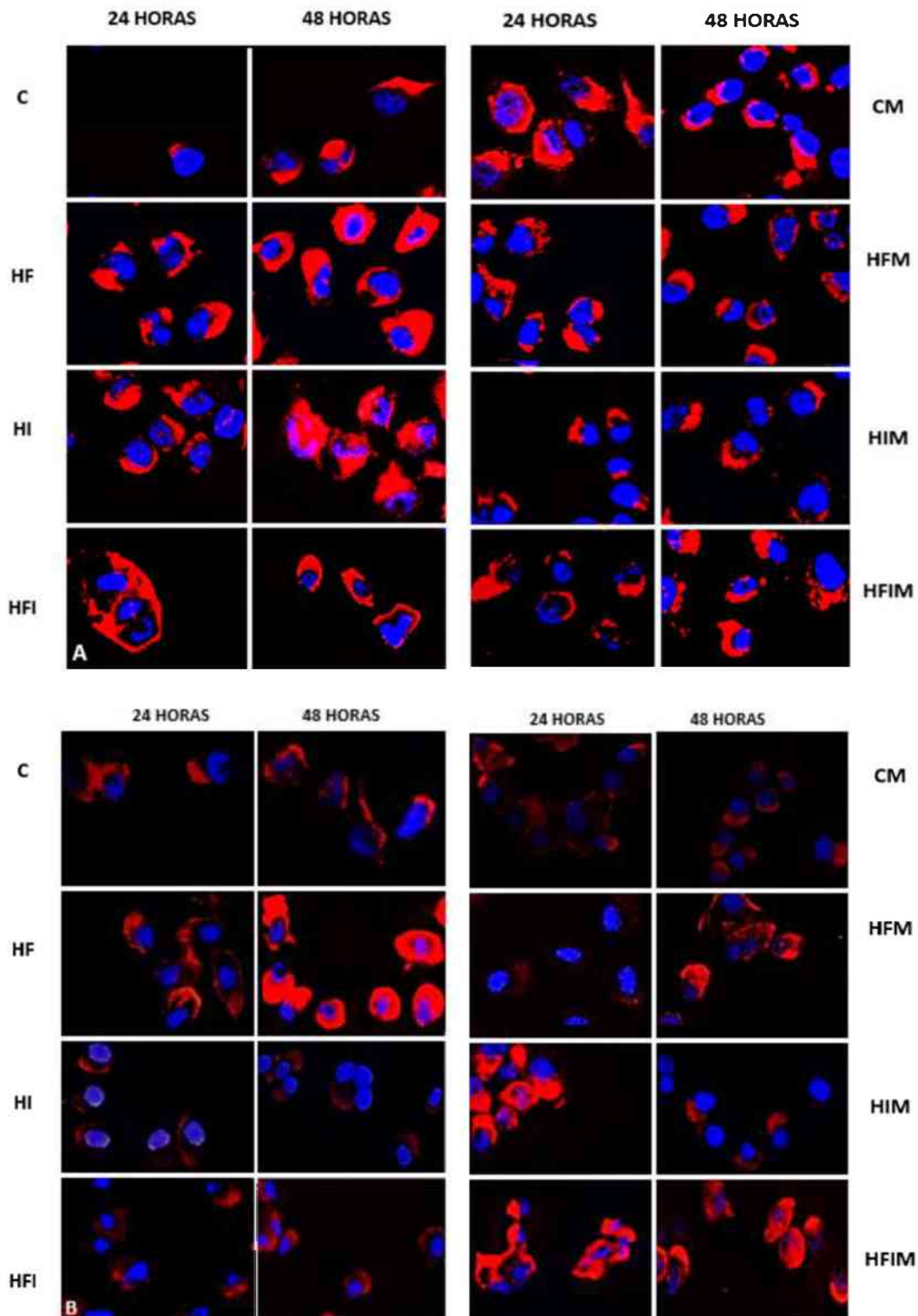


Figura 7. Imagens representativas da expressão da vimentina na avaliação da transição epitélio mesenquimal em PNT1A (A) e PC3 (B) capturadas no tempo 24 e 48H após os tratamentos com os meios controle (C) e altas concentrações de palmitato (HF), insulina (HI) e ambos (HFI), com ou sem metformina (M). Aumento 20x.

6. DISCUSSÃO

Recentemente, estudos epidemiológicos apontam uma relação direta entre a obesidade e o câncer de próstata, porém, os dados são provenientes de estudos clínicos e metanálises e não trazem informações específicas sobre as atividades celulares afetadas pela obesidade, nem tampouco quais, dentre tantos, parâmetros metabólicos são os mais preponderantes no estímulo da obesidade ao câncer que possam ser tratados ou modificados. Nesse sentido, pesquisas recentes têm aumentado significativamente a busca de estratégias preventivas e/ou terapêuticas para o câncer de próstata em obesos. Utilizando camundongos TRAMP (Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) alimentados com uma dieta hiperlipídica, Cho et al (2015) mostraram ganho de peso corporal, que acelerou o crescimento e progressão do câncer de próstata, conduzindo a uma baixa sobrevida. Adicionalmente, em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o tratamento com palmitato em células epiteliais normais da próstata humana (PNT1A) aumentam a ativação da via PI3K/AKT/m-TOR e reduz a de AMPK, o que favorece a proliferação e sobrevida destas células (RIBEIRO et al, 2014). No entanto, os efeitos das elevadas concentrações de ácido graxo e insulina na proliferação e migração de células tumorais prostáticas e ainda uma possível reversão de tais efeitos através do uso da metformina, são inexistentes na literatura, o que evidencia a relevância da presente investigação. Assim, para melhor esclarecimento desse assunto, testamos a atividade da metformina frente aos meios que simulam a obesidade: ricos em ácido graxo (HF), insulina (HI) ou ambos HFI.

Nossos resultados sobre a ativação de caspase 3/7 demonstram que as altas concentrações de insulina e ácido graxos, com ou sem metformina, não aumentaram as taxas de morte celular em nenhuma das 2 linhagens de células, exceto nos grupos HF-48 horas (PC3) e HFI- 24 horas (PNT1A). Embora esses grupos tenham apresentado uma tendência maior para apoptose, esse resultado não é tão relevante, uma vez que estas células mostraram um elevado potencial para proliferação e migração celular, sendo, inclusive HF, superior ao estímulo à proliferação aos demais grupos de tratamentos. Assim, podemos dizer que as concentrações de insulina, palmitato e metformina não foram tóxicas para as células epiteliais prostáticas. Destacamos ainda que o aumento na morte celular notado nos grupos citados não é resultado do tratamento, mas possivelmente mecanismos próprios de controle celular frente às adversidades encontradas em ambiente artificial *in vitro*. Em todo caso, há predominância da proliferação sobre a morte celular que, conseqüentemente, garante a renovação e sobrevivência dessas células.

Com relação ao efeito das altas concentrações de palmitato e/ou insulina na proliferação de células normais e tumorais de próstata. Neste sentido, foi observado que as células PNT1A proliferaram mais após todos os tratamentos enquanto as PC3 apresentaram elevada proliferação somente com o tratamento HF. Os ácidos graxos de cadeia média e longa são usados como substratos para a produção de energia e fosfolipídios de membranas para que as células utilizem em sua atividade proliferativa (PANDIAN et al., 1999). Além disso, o excesso deles pode ser usado como fonte para a produção de ROS, estimulando o estresse oxidativo e favorecendo a progressão tumoral (LIN et al., 2010). Por algum tempo tem sido aceito que as células tumorais dependem da síntese *de novo* de ácidos graxos através da forte expressão de ácido graxo sintetase para a sua alta demanda de lipídios de membrana para proliferação (MENENDEZ et al., 2007). Entretanto, recentemente tem sido demonstrado que a incorporação celular de ácido graxo exógeno tem papel fundamental na patogênese tumoral, dando maior suporte para a relação entre dieta, obesidade e câncer (LOUIE et al., 2013). Nesse contexto, diversas pesquisas têm mesmo mostrado o efeito proliferativo de ácidos graxos saturados em culturas de células epiteliais normais de próstata (Ribeiro et al., 2014); fibroblastos (MAGDALON 2011); endoteliais (CHUNG et al., 2012) e tumorais. Os ácidos graxos ocorrem em excesso no sangue de indivíduos obesos, sendo que 30-40% deles correspondem ao palmitato (WU et al., 2007; CROWE et al., 2008). Estudos mostram que o tratamento de células tumorais com o soro de obesos intensifica a proliferação celular (LAMARRE et al., 2007), além de uma correlação positiva e significativa de maiores índices de câncer de próstata em indivíduos com elevados níveis de palmitato no sangue (CROWE et al., 2008).

A insulina também é um importante agente anabólico celular, agindo através de seus receptores (IR) ou dos receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR). O IR é predominantemente metabólico, operando no transporte de glicose para as células, enquanto o IGFR está relacionado ao estímulo da proliferação e inibição da apoptose via Pi3K-AKT (SHUKLA et al., 2009). Weinstein e colaboradores (2014) mostraram o potencial da insulina em estimular a proliferação de forma dose dependente em células tumorais de próstata como LNCaP, C4-2 e P69, mas não obtiveram tal efeito nas PC3. Já, Heidegger et al (2012) mostraram que a insulina apresenta efeito proliferativo em diversas células tumorais de próstata, incluindo a PC3, mas não em células normais (EP156T, RWPE-1). Nossa investigação mostrou que, embora a insulina tenha apresentado efeito significativo apenas na proliferação das células normais, nota-se também um incremento de células PC3, indicando que as células tumorais talvez precisem de um tempo maior para aumentar significativamente

sua proliferação após o tratamento com insulina, diferentemente do palmitato que já estimula a sua proliferação mais precocemente. De qualquer forma, nossos dados apontam o importante papel proliferativo das altas concentrações de palmitato e insulina em células prostáticas, chamando atenção para estratégias de prevenção em indivíduos obesos que apresentam cenário similar e que provavelmente se encontram em maior risco de progressão tumoral.

A migração nas células normais foi estimulada por HF e HI e apenas por HF nas tumorais. O efeito promotor direto do palmitato na migração celular já foi demonstrado previamente em fibroblastos (CHUG et al 2012) e células de hepatocarcinoma (NATH et al., 2015); mas em relação às células prostáticas pouco é sabido. Embora não seja novidade que o palmitato aumenta a migração em outras linhagens de células, as doses usadas nessas investigações são bem mais elevadas que aquelas encontradas no soro de obesos e do que a usada na presente investigação. Em paralelo à elevada migração celular, nossos dados são corroborados pela maior expressão de vimentina nesses grupos, indicando maior transição epitélio mesenquimal desencadeada pelas altas concentrações de ácido graxo. A transição epitélio mesenquimal pode ser designada como um conjunto de modificações bem orquestradas que permitem às células epiteliais a aquisição de um fenótipo mesenquimal, resultando em maior migração celular, invasividade e resistência a apoptose, facilitando a metástase (THIERY et al., 2002). Nesse sentido, Wang et al (2011) mostraram que o tratamento com ácidos graxos saturados diminui a expressão de desmoplaquina, elemento essencial dos desmossomos, facilitando a transição epitélio mesenquimal. Adicionalmente, o excesso de ácido graxos incorporado pelas células é fonte de novos lipídios para formação de "lipidic rafts" que modulam a migração celular por regularem a organização citoesquelética e dinâmica de adesão focal nas células (BELORIBI-DJEFAFLIA et al., 2016). Ainda, estudos recentes demonstram uma grande expressão de lipase monoglicerídeo em células tumorais capazes de quebrar ácidos graxos em lipídios sinalizadores de membrana capazes de modular a capacidade migratória dessas células (BAENKE et al., 2013). Assim, a literatura aponta o efeito estimulante dos ácidos graxos saturados na migração celular e nossos dados mostram, pela primeira vez, esse efeito em células normais e tumorais de próstata desencadeado pelo palmitato em doses mais baixas do que as descritas na literatura para outros tipos celulares. Isso nos abre espaço para a discussão a respeito da prevenção do câncer ou melhor prognóstico através de estratégias dietéticas para a redução do consumo e também da concentração sérica de ácidos graxo. Sabendo do potencial da metformina na ativação de AMPK e consequentemente reduzir vias que demandam gasto energético (como síntese e proteica e proliferação celular), esperávamos

uma reversão da proliferação desencadeada por HF e HI nas células normais e HF nas tumorais da presente investigação. Entretanto, a metformina isoladamente causou maior proliferação em células normais da próstata, e o uso dela em associação aos diversos tratamentos inibiu somente o efeito estimulante de HF em ambas as células, mas não teve o mesmo efeito controlador na proliferação desencadeada por HI em PNT1A.

A metformina é uma droga antidiabética usada para o tratamento do diabetes tipo 2 para melhorar a sensibilidade da insulina, reduzindo a hiperglicemia e hiperinsulinemia, apresentando também efeitos interessantes no contexto da síndrome metabólica (MARCHETTI, et al., 1988; HAUPT, et al., 1991; DE AGUIAR, et al., 2006; VERMAS, et al., 2000). Além disso, devido seu potencial na ativação de AMPK, têm se discutido recentemente a eficiência dessa droga no controle da proliferação celular e supressão do câncer. Estudos sugerem que a incidência de câncer diminui em 31% nos pacientes que usam metformina, quando comparados com demais drogas antidiabéticas (WOJCIECHOWSKA, et al., 2016). Outros estudos têm demonstrado que o risco de câncer diminui com o aumento cumulativo, duração e dose de metformina (ZHANG T, 2013). Por outro lado, também já foi demonstrado que a metformina tem efeito proliferativo em baixas concentrações (SHIAM-WEN, et al., 2016) inibindo a proliferação celular somente em altas concentrações (SHIAM-WEN, et al., 2016). A metformina apresenta citotoxicidade e a sua dosagem sérica deve ser cuidadosamente avaliada pelos médicos para evitar a acidose láctica e falência renal. Segundo Lalau et al (2011) a Associação Internacional de Toxicologistas Forenses determina que a dosagem sérica de metformina é terapêutica entre 1 e 4 mg/L e tóxica acima de 45 mg/L. Muitos trabalhos tem demonstrado o potencial antitumoral da metformina em diversas células, incluindo de próstata; entretanto, a grande maioria utilizou concentrações milimolares da droga, distantes da dose terapêutica usada na clínica médica que fica na concentração micromolar. Nesse sentido, Erices e colaboradores (2012) testaram concentrações que variaram entre micro e milimolar de metformina em células tumorais de ovário e mostraram que somente as doses milimolares foram capazes de reduzir a proliferação celular. Assim, nossos dados mostram que a dose de metformina utilizada na presente investigação é considerada terapêutica e não seria citotóxica se usada na prática médica. Na dose de 100 μ M, a metformina sozinha não reduz a proliferação nas células normais nem nas tumorais de próstata, como demonstrado também por Erices et al (2012), mas em associação com altas doses de palmitato ela inibe o efeito proliferativo estimulado pelo ácido graxo. A mesma reversão não observamos para a insulina, uma vez que seu potencial mitogênico é muito alto,

indicando que o intervalo de 48 horas com a metformina não seja suficiente para as células bloquearem as suas vias de proliferação celular e, que talvez seja necessários períodos de incubações mais longos para que ela consiga exercer seu efeito controlador no estímulo proliferativo da insulina. Trabalhos com períodos de incubações mais longas de insulina e metformina são necessários e esclarecerão esse achado.

Embora a metformina na dose usada só tenha sido capaz de reverter a proliferação estimulada por HF, notamos seu potencial em impedir a migração celular desencadeada por todos os tratamentos. Estudos demonstram que a metformina seria capaz de inibir a transição epitélio mesenquimal através da superexpressão de miR30a (microRNA30a), um supressor de tumor, e bloqueio de SOX-4 (SYR box 4) um fator de transcrição importante para a progressão tumoral e metástase (ZHANG, ET AL., 2014). Recentemente, Chen e colaboradores (2016) demonstraram o efeito inibitório da migração celular da metformina em células tumorais de próstata em doses milimolares. De forma similar, Demir et al (2014) também demonstraram redução da migração em LNCaP e PC3 com o uso da metformina, sendo que o efeito foi muito mais pronunciado nas células andrógeno-dependentes, pois PC3 foram mais resistentes ao efeito da droga, apresentando resultado com doses acima de 1mM (não terapêuticas). Nossos dados corroboram com a literatura, mostrando que sozinha, em dose fisiológica, a metformina não tem efeito antimigratório nas células tumorais de próstata, como teve nas células normais que expressam AR, mas quando associada à situações de altas concentrações de ácido graxo e insulina ela demonstra potencial redutor na migração celular.

7. CONCLUSÃO

O palmitato e a insulina apresentam efeito estimulante na proliferação e migração de células epiteliais normais e tumorais de próstata, sendo as últimas mais responsivas ao palmitato do que a insulina, talvez necessitando de períodos de incubações maiores para que a insulina exerça seu estímulo nessas células. Concluímos também que a associação desses meios não potencializa seus efeitos. Ainda, a metformina em dose fisiológica é capaz de reverter boa parte dos efeitos causados pelos meios HF e HI mostrando seu potencial como terapia adjuvante no câncer de próstata e também protetor para pacientes obesos que apresentam potencial risco para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata.

REFERÊNCIAS

- 1- ABBOTT, M.J.; CONSTANTINESCU, S.; TURCOTTE, L.P. **AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ is an essential signal in the regulation of insulin-stimulated fatty acid uptake in control-fed and high-fat-fed mice.** *Exp Physiol.*, 2012, 97(5):603-17.
- 2- AKINSETE, J.A.; ION, G.; WITTE, T.R.; HARDMAN, W.E. **Consumption of high omega-3 fatty acid diet suppressed prostate tumorigenesis in C3 (1) Tag mice.** *Carcinogenesis*, 2012, 33(1):140–8.
- 3- BAENKE, F. et al. **Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development.** *Dis Model Mech.*, 2013, 6(6):1353-63.
- 4- BALL, K., CRAWFORD, D. **Socioeconomic status and weight change in adults: a review.** *Soc Sci Méd*, 2004, 60:1987-2010.
- 5- BARB, D. et al. **Adiponectin signals in prostate cancer cells through Akt to activate the mammalian target of rapamycin pathway.** *Endocr Relat Cancer*. 2007, 14(4):995-1005.
- 6- BARNARD, R.J. et al. **Prostate cancer: another aspect of the insulin resistance syndrome.** *Obesity Reviews*.2002, 3: 303-308.
- 7- BARON, A.; MIGITA, T.; TANG, D.; LODA, M. **Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer?** *J Cell Biochem*, 2004, 91(1):47-53.
- 8- BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. **Lipid metabolic reprogramming in cancer cells.** *Oncogenesis*, 2016, 25;5: e189.
- 9- BERQUIN, I.M. et al. **Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids.** *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, Vol. 117, N° 7.
- 10-BERQUIN, I.M. et al. **Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer.** *Cancer Metastasis Rev.*, 2011, 30(3-4):295-309.
- 11-BROWN, K, A. SAMARAJEEWA, N.U.; SIMPSON, E.R. **Endocrine-related cancers and the role of AMPK.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003, 366, 170–179.
- 12- BURTON A. J. et al. **Metabolic imbalance and prostate cancer progression.** *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2010, v. 1(4), p. 248-272.
- 13- BUSCHEMEYER W. C.; STEPHEN J. F. **Obesity and prostate cancer: Epidemiology and clinical implications.** *European Urology*, 2007, v. 52, p. 331-343.

- 14- CALLE, E.E.; KAAKS, R. **Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms.** *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 579-91.
- 15- CARLING, D. **The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control.** *Trends Biochem Sci*, 2004, 29:18-23.
- 16- CASCIO G, SCHIERA G, DI LIEGRO I. **Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases.** *Curr Diabetes Rev*, 2012, 8(1):2-17.
- 17- CHEN, X.et al. **Metformin inhibits prostate cancer cell proliferation, migration, and tumor growth through upregulation of PEDF expression.** *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(5):507-14.
- 18- CHEUNG, W. W.; MAO, P. **Recent advances in obesity: genetics and beyond.** *ISRN Endocrino*, 2012, 536-905.
- 19- CLEMENTS, A. et al. **Metformin in prostate cancer: two for the price of one.** *Ann Oncol*, 2011, 22(12):2556-60.
- 20- CORONA G. et al. **Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease of the aging male and its correlation with sexual dysfunctions.** *Int. J. Endocrinol*, 2014, 329-456.
- 21- CROWE FL, et al. **Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.** *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(5):1353-63.
- 22- DE LOURDES, A.M. et al. **Effects of coconut oil on testosterone-induced prostatic hyperplasia in Sprague-Dawley rats.** *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(7):995–9.
- 23- DE PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. **Obesity as a major risk factor for cancer.** *J Obes*, 2013, 2013:291546.
- 24- DEMIR, U. et al. **Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR downregulation in prostate cancer cells.** *BMC Cancer*, 2014, 31; 14:52.
- 25- DEROO, BJ AND KORACH K.S. **Estrogen receptors and human disease.** *J. Clin. Invest*, 2006, 116:561– 570
- 26- EL-MIR, et al. **Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I.** *J Biol Chem.*, 2000; 7;275(1):223-8.
- 27- ESCOBAR, E.L.; GOMES-MARCONDES, M.C.; CARVALHO, H.F. **Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth.** *Prostate*, 2009, 69(5):548-58.

- 28-FIBBI B.et. al. **Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia.** *Int. J. Androl*, 2010, 33, 475–488.
- 29-FRITZ, V. et al. **Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice.** *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6):1740–54.
- 30-GIBBONS, ANN. **Evolução da Dieta. Seríamos saldáveis ao no alimentarmos na idade da Pedra?** Revista National Geographic, edição nº 174, p. 19-43. Set. 2014.
- 31-GRUZMAN, A.; BABAI, G.; SASSON, S. **Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations.** *Rev Diabet Stud*, 2009, 6(1):13-36.
- 32-GUH, D.P.; ZHANG, W.; BANSBACK, N. et al. **The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis.** *BMC Public Health*, 2009, 9:88.
- 33-HAMMARSTEN, J.; HOGSTEDT, B. **Hyperinsulinaemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia.** *Eur Urol*, 2001, 39 (2): 151-8.
- 34-HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. **The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind.** *J Biol Chem*, 2002, 277:25847–25850.
- 35-HARDIE, D.G. **Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of energy status.** *Endocrinology*, 2003, 144:5179-5183.
- 36-HAUPT, E.; KNICK, B.; KOSCHINSKY, T. **Oral antidiabetic combination therapy with sulphonylureas and metformin.** *Diabetes Metab*, 1991; 17:224-31.
- 37-HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A.; CUNHA, G.R. **Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate.** *Br. J. Urol*, 1997, 2:18-26.
- 38-HEIDEGGER, I. et al. **Diverse functions of IGF/insulin signaling in malignant and noncancerous prostate cells: proliferation in cancer cells and differentiation in noncancerous cells.** *Endocrinology*, 2012, 153(10):4633-43.
- 39-HO, E.; BOILEAU, T.W.; BRAY, T.M. **Dietary influences on endocrine-inflammatory interactions in prostate cancer development.** *Arch. Biochem. Biophys*, 2004, 428:109-117.
- 40-HSING, A.N.; SAKODA, L.C.; JR, S.C.C. **Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer**1– 4. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(suppl):843S–57S.

- 41-HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. **Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions.** *Prostate*, 2002, 52:213-235.
- 42-KIM, K.Y. et al. **Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation.** *Cancer Res*, 2009, 69(9):4018-2.
- 43-KOBAYASHI, N. et al. **Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2.** *Clin Cancer Res*, 2006; 12(15):4662–70.
- 44-KOBAYASHI, N. et al. **Effect of low-fat diet on development of prostate cancer and Akt phosphorylation in the Hi-Myc transgenic mouse model.** *Cancer Res*, 2008, 68(8): 3066–73.
- 45-KOOCHKEPOUR, S. **Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer.** *Iran Red Crescent Med J*, 2011, 13, 80-98.
- 46-LACORTE, L.M. **Efeito da cafeína e do cádmio na próstata do rato *Wistar* púbere: proliferação e morte de células epiteliais e alterações estromais.** 1998. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) Faculdade de Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, 1998.
- 47-LANE, J.A. **Detection of prostate cancer in unselected young men: prospective cohort nested within a randomised controlled trial.** *BMJ*, 2007, DOI: 10.1136/bmj.39381.436829.BE
- 48-LAUKKANEN, J.Á. et al. **Metabolic Syndrome and the risk of prostate câncer in Finish men: a population based study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13: 1646-1650.
- 49-LBC 208 lipídios. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/lipideos.html>. Acesso em: 12 Dez. 2016
- 50-LEITZMANN, M. F. & ROHRMANN, S. **Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates.** *Clin Epidemiol*, 2012; 4, 1-11.
- 51-LIN. H. et al. **Inter-related in vitro effects of androgens, fatty acids and oxidative stress in prostate cancer: a mechanistic model supporting prevention strategies.** *Int J Oncol*, 2010, 37(4):761-6.
- 52-LLOYD, J.C. et al. **Effect of isocaloric low fat diet on prostate cancer xenograft progression in a hormone deprivation model.** *J Urol*, 2010,183(4):1619–24.
- 53-LOPEZ-MIRANDA, J. et al. **Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20(4):284–94.

- 54-LOUIE, S.M. **Cancer cells incorporate and remodel exogenous palmitate into structural and oncogenic signaling lipids.** *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(10):1566-72.
- 55-MACDONALD, A. A.; HERBISON, G.P.; SHOWELL, M.; FARQUHAR, C.M. **The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with metaanalysis.** *Hum Reprod Update*, 2010, 16:293–311.
- 56-MAIRA, S.M. et al. **PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?** *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(Pt 1):265-72
- 57-MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G.R. **Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia.** *J. of Clinical Endoc. & Metabol*, 1999, 84:3463-3468.
- 58-MARCHETTI, P. et al. **Effect of plasma metformin concentrations on serum lipid levels in type II diabetic patients.** *Acta Diabetol Lat*, 1988; 25:55-62.
- 59-MARIE. N.G. et al. **Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013.** *The Lancet Issue*, 2014, 9945, **384**:766 -781
- 60-NATH, A.et al. **Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma.** *Sci Rep*, 2015, 5:14752
- 61-NIEMAN, D. **Exercício e saúde.** São Paulo: Manole, 1999.
- 62-PANDIAN, S.S. **Fatty acids and prostate cancer: current status and future challenges.** *J R Coll Surg Edinb*, 1999, 44(6):352-61.
- 63-PARK, S.Y. et al. **Circulating fatty acids and prostate cancer risk in a nested case-control study: the Multiethnic Cohort.** *Cancer Causes Control*, 2009, 20(2):211–23.
- 64-PERKS, C.L. et al. **Insulin receptor isoform Variations in Prostate cancer cells.** *Frontiers in Endocrinology*, 2016, doi: 10.3389/fendo.2016.00132
- 65-PRADO, W.L et al. **Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription.** *Rev Bras Med Esporte*, 2009, Vol. 15, No 5 – Set/Out.
- 66-PRESTON, M.A. et al. **Metformin Use and Prostate Cancer Risk.** *Eur Urol*, 2014, pii: S0302-2838(14)00408-4. doi: 10.1016/j.eururo.2014.04.027.
- 67-PRIETO-HONTORIA, P. L. et al. **Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach.** *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807, 664-78.

- 68-RIBEIRO, D.L. et al. **AKT and AMPK Activation after High-Fat and High-Glucose In vitro Treatment of prostate Epithelial Cells.** *Horm Metab Res*, 2014, 46:471-476.
- 69-RIBEIRO, D.L. et al. **High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate.** *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2):577-88.
- 70-RIOS, M. et al. **AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors.** *Cancer Res*, 2013, 2628-2638.
- 71-ROSSI, S. et al. **Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer.** *Mol Cancer Res*, 2003, 1:707-715.
- 72-SAAD, J.B.L.A. F. **Bone Health: Prevention of Skeletal-Related Events and Palliative Care.** In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: 2013. A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- 73-SALMINEN, A.; HYTTINEN, J.M.; KAARNIRANTA, K. **AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan.** *J Mol Med (Ber)*, 2011, 89(7):667-76
- 74-Saúde do homem: prevenção é fundamental para uma vida saudável [2015]. Disponível em:http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/saude_do_homem_prevencao_e_fundamental_para_vida_saudavel. Acesso em: 22 jan. 2017
- 75-SCHULTZE, S.M. et al. **PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis.** *Expert Rev Mol Med*, 2012, 11; 14:e1.
- 76-SHUKLA, A. et al. **Analysis of signaling pathways related to cell proliferation stimulated by insulin analogs in human mammary epithelial cell lines.** *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16(2):429-41.
- 77-SLIPICEVIC, A. et al. **The fatty acid binding protein 7 (FABP7) is involved in proliferation and invasion of melanoma cells.** *BMC Cancer*, 2008, 8:276.
- 78-STROM, S.S. et al. **Saturated fat intake predicts biochemical failure after prostatectomy.** *Int J Cancer*, 2008, 122(11):2581-5.
- 79-SUBA, Z.; UJPAL, M. **Correlation of insulin resistance and neoplasms.** *Magy Onkol*, 2007, 50:127-35.
- 80-SUBURU, J. CHEN, Y.Q. **Lipids and prostate cancer.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2012, 98(12):1-10

- 81- SUNG, S.Y.; CHUNG, W. **Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting.** *Differentiation*, 2002, 70: 506-521.
- 82- SWIAW'WEN, C. et al. **Growth Modulation of diabetic factors and antidiabetic Drugs on Prostate Cancer Cell Lines.** *Chinese Journal of Physiology*, 2016, 59(2): 109-118.
- 83- SWINNEN, J.V. et al. **Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer.** *Int J Cancer*, 2002, 98:19–22.
- 84- TEIXEIRA, M.H. et al. **Consumo de Gordura e Hipercolesterolemia em Uma Amostra Probabilística de Estudantes de Niterói, Rio de Janeiro.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2007, 51(1).
- 85- TYMCHUK, C.N. **Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and prostate-specific antigen.** *Nutr Câncer*, 1998, 31: 127-31.
- 86- VERMA, S. et al. **Metformin treatment corrects vascular insulin resistance in hypertension.** *J Hypertens*, 2000, 18:1445-50.
- 87- VIGNOZZI, L. et al. **Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit.** *J. Endocrinol*, 2014, 212: 71
- 88- VIGNOZZI, L.; et al. **Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease?** *J. Endocrinol. Inves*, 2014, 37, 313–322.
- 89- VIGNOZZI, L.; MAGGI, M. **Prostate cancer: intriguing data on inflammation and prostate cancer.** *Nat Rev Urol*, 2014, 11, 369–370.
- 90- WANG, X. et al. **Synergy analysis reveals association between insulin signaling and desmoplakin expression in palmitate treated HepG2 cells.** *PLoS One*. 2011, 6(11): e28138.
- 91- WEE, S., LENGAUER, C.; WIEDERSCHAIN, D. **Class IA phosphoinositide 3-kinase isoforms and human tumorigenesis: implications for cancer drug discovery and development.** *Curr. Opin. Oncol*, 2008, 20, 77–82
- 92- WEINSTEIN, D. et al. **Insulin receptor compensates for IGF1R inhibition and directly induces mitogenic activity in prostate cancer cells.** *Endocr Connect*, 2014, 28;3(1):24-35.

- 93- WINDER, W.W.; HARDIE, D.G. **AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1999, 277:E1-10.
- 94- WOJCIECHOWSKA, J. et al. **Diabetes and Cancer: a Review of Current Knowledge.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124(5):263-75.
- 95- WYNNE, K.; STANLEY, S.; MCGOWAN, B.; BLOMM, S. **Appetite control.** *J Endocrinol*, 2005, 184: 291-318.
- 96- XIANG, X. et al. **AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(1):161-7.
- 97- ZADRA, G.; PHOTOPoulos, C.; LODA, M. **The fat side of prostate cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta 1831*, 2013, 1518–1532.
- 98- ZADRA, G. et al. **New strategies in prostate cancer: targeting lipogenic pathways and the energy sensor AMPK.** *Clin Cancer Res*, 2010, 1; 16(13):3322-8.
- 99- ZHANG, J. et al. **Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells: involvement of the tumor suppressor miR30a and its target gene SOX4.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452:746-52.
- 100- ZHANG, T. et al. **The antidiabetic drug metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*.** *Int J Mol Sci*, 2013, 14:24603-18.
- 101- ZHENG, D. et al. **Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase.** *J Appl Physiol*, 2001, 91:1073-83.