

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise dos receptores esteroidais (AR e ER $\beta$ ) e da sinalização ERK na  
próstata ventral de camundongos tratados com dieta rica em lipídeos e/ou  
submetidos exercício físico

João Vítor Pereira Leite

Monografia apresentada à coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para obtenção do grau Bacharel em  
Biotecnologia

Uberlândia

Julho/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise dos receptores esteroidais (AR e ER $\beta$ ) e da sinalização ERK na  
próstata ventral de camundongos tratados com dieta rica em lipídeos e/ou  
submetidos exercício físico

João Vítor Pereira Leite

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro

Monografia apresentada à coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau Bacharel em  
Biotecnologia

Uberlândia

Julho/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise dos receptores esteroidais (AR e ER $\beta$ ) e da sinalização ERK na  
próstata ventral de camundongos tratados com dieta rica em lipídeos e/ou  
submetidos exercício físico

João Vítor Pereira Leite

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de  
Biotecnologia em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia

Julho/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise dos receptores esteroidais (AR e ER $\beta$ ) e da sinalização ERK na  
próstata ventral de camundongos tratados com dieta rica em lipídeos e/ou  
submetidos exercício físico

João Vítor Pereira Leite

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nota: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro  
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

*Dedico esse trabalho a minha família*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha mãe, Delza, minha guerreira. Sem ela nada disso seria possível. Obrigado por proporcionar essa experiência, por entender minhas ausências e me ajudar nos momentos de dificuldade.

A minha família: Avani, Ciça, Dalva, Denilson, Denilton, Felipe, Madalena, Raul pelo apoio e suporte. Isso também é fruto da ajuda de vocês.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro, que me adotou como orientando e mostrou os caminhos da investigação científica com paciência, humildade e sempre disposta e disponível para me ajudar quando necessário, não poderia ter escolhido uma orientadora melhor.

A banca examinadora por aceitarem o convite e comparecer a defesa.

Aos meus amigos que fiz graças a UFU, Asaph Diniz, Camila Verardo, Clésio Junior, Jéssica Pereira, Géssyca Ferreira, Pedro Machado e Rafael (Catalão) Martins, Matheus Almeida e Fernando William pelos momentos de distração, lazer, companheirismo e apoio.

Aos amigos Jan-Christopher Pien e Hunter Nobbe, pelo auxílio e puxões de orelha em relação ao inglês.

## RESUMO

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que é responsável pela produção do sêmen. O câncer de próstata é o segundo tipo mais frequente em homens no mundo. A obesidade é capaz de promover disfunções metabólicas que afetam o microambiente prostático. O objetivo deste trabalho é elucidar a resposta da próstata frente a grande ingestão de gordura e o papel do exercício físico neste ambiente. Foram usados 20 camundongos machos *Swiss* adultos, divididos em dois grupos: alimentação normal (DN- 4% de gordura) e hiperlipídica (DH- 40% de gordura saturada), sendo estes grupos subdivididos em sedentários (S) e animais exercitados (E) com natação (1hr/dia; 5 dias/semana). A duração da dieta e/ou exercício físico foi de 16 semanas. Foram avaliados parâmetros biométricos e metabólicos dos animais e a próstata foi analisada através de imunoreações (PCNA e receptor de estrogênio- ER $\beta$ ), western blotting (ERK1/2 e receptor de andrógeno-AR) e atividade de caspase-3. Encontramos que a ingestão de gordura foi capaz de promover aumento do peso, da gordura corporal (aumento de 3,75 vezes) e da glicemia (em média 200%), além da diminuição dos níveis de testosterona. Tais alterações promoveram aumento significativo da proliferação celular prostática nos indivíduos obesos e sedentários, assim como a quantidade de ERK. Além disso, a dieta promoveu uma redução pela metade do conteúdo de ER $\beta$  e aumentou os de AR. O exercício físico por si só promoveu efeito anabólico aumentando a testosterona e estimulando a proliferação celular no grupo sedentário. Entretanto, o exercício foi capaz de reverter todas as alterações causadas pela dieta hiperlipídica na próstata dos animais. Em síntese, o somatório de uma dieta hiperlipídica e uma vida sedentária promove séries de modulações capazes de provocar injúrias à próstata e induzi-la a doenças proliferativas, como o câncer e o exercício físico é uma interessante estratégia na reversão de tais efeitos. **Palavras-chave:** obesidade, testosterona, próstata

## ABSTRACT

The prostate is an accessory gland part of the male reproduction system; together, the prostate, seminal vesicle and the testicles are responsible for the semen production. The prostate cancer is the second most frequent cancer among men worldwide. It is known that obesity is able of promoting metabolic dysfunction that affects prostate microenvironment. The objective of this research was to elucidate the prostate response to high-fat diet and the role of physical exercise. We used 20 male adult Swiss mice and they were separated in 2 groups: fed with normal diet (DN – 4% fat), fed with hiperlipidic diet (DH – 40% fat), and within this groups the animals were sedentary (-S) or exercised (E), swimming 1 hour per day and 5 days per week. The duration of the diet and the exercised were 16 weeks. Biometric and metabolic parameters of the animals were evaluated and the prostate was analyzed by immunoreactions (PCNA and estrogen receptor-ER $\beta$ ), western blotting (ERK1 / 2 and androgen receptor-AR) and caspase-3 activity. We found that the fat uptake promoted the weight gain, higher fat-mass (up to 3,7x) and hyperglycemia (average of 200%), besides reducing the testosterone levels. Also, DH stimulated the prostatic cellular proliferation through higher activation of ERK signaling. In addition, the diet promoted a reduction by half of the ER $\beta$  content and increased those of AR. Physical exercise *per se* promoted an anabolic effect by increasing testosterone and stimulating cell proliferation in the prostate of sedentary group. However, exercise was able to reverse all prostate changes caused by the hyperlipid diet. In summary, the association of a hyperlipidic diet and a sedentary lifestyle promotes insults to the prostate stimulating pathways that could trigger proliferative diseases, such as hyperplasia and cancer and physical exercise is an interesting strategy to reverse such effects.

**Key words:** obesity, testosterone, prostate

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Revisão de Literatura.....	1
Próstata.....	1
Câncer de Próstata .....	3
Ação Hormonal e a via MAPK.....	5
Obesidade.....	9
Exercício Físico .....	12
1.2 Justificativa .....	13
1.3 Objetivos.....	14
1.3.1 Objetivos específicos .....	14
2.0 METODOLOGIA .....	14
2.1 Parâmetros metabólicos e bioquímicos .....	16
2.2 Western Blotting.....	17
2.3 Análise da apoptose pela atividade de caspase 3.....	18
2.4 Imunocitoquímica .....	18
2.5 Análise estatística .....	19
3.0 RESULTADOS .....	20
4.0 DISCUSSÃO.....	27
5.0 CONCLUSÃO .....	33
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## 1. Introdução

### 1.1. Revisão de literatura

#### *Próstata*

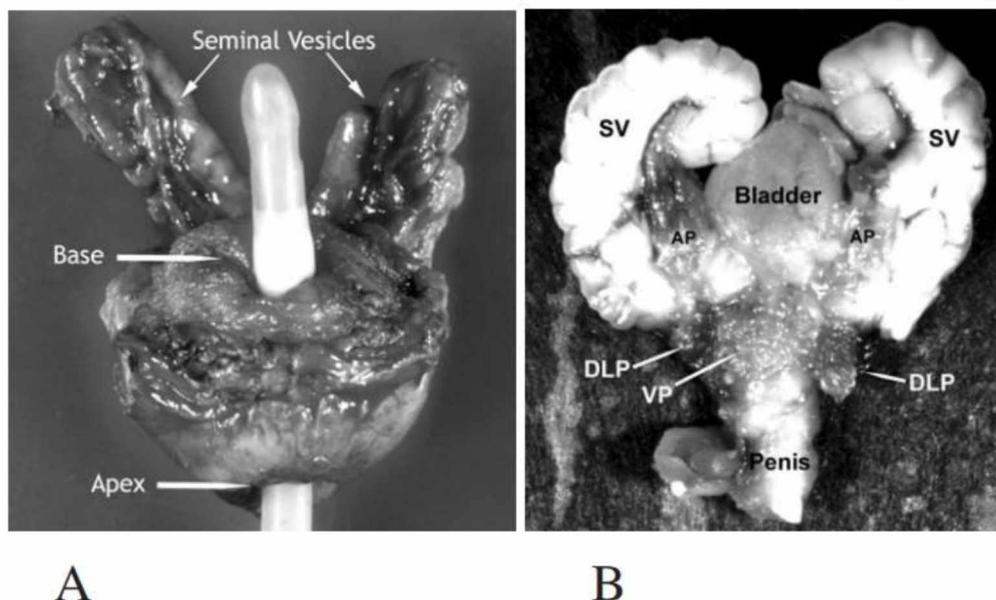
A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que, junto com a vesícula seminal e o testículo, é responsável pela produção do sêmen. Segundo, Marieb e Hoehn, (2009), a próstata produz um fluido rico em enzimas, citrato e o PSA (Antígeno Prostático Específico). Esse líquido corresponde a um terço do total do sêmen, sendo eliminado durante a ejaculação, proporcionando um ambiente ótimo para sobrevivência dos espermatozoides, assim como a promoção da motilidade dessas células e de elementos facilitadores da fecundação propriamente dita.

Anatomicamente, podemos separar a próstata humana em lobos: o lateral, anterior e posterior. Porém, segundo Billis (2000), essa divisão só pode ser claramente vista durante o período embrionário, dessa forma, na próstata do adulto a linha divisória entre tais lobos não é visível, não havendo feixes separatórios. A próstata também pode ser dividida em grupos glandulares internos e externos. Em que fazem parte do grupo glandular interno as glândulas mucosas e submucosas, e, do externo, as glândulas externas ou prostáticas propriamente ditas (BILLIS, 2000). Embora os lobos não sejam distintos no adulto, de acordo com McNeal, a glândula é classificada em zonas: Central : que rodeiam os ductos ejaculadores; de Transição: normalmente acometida pela hiperplasia benigna da próstata e a Periférica que corresponde a 70% da glândula e local de maior incidência de câncer (MCNEAL, 1981).

Tal glândula cresce lentamente até a puberdade, quando passa a crescer rapidamente até por volta dos 30 anos, assim permanecendo até os 45 anos, podendo apresentar crescimento extra (TORTORA; DERRICKSON, 2012). De acordo com Lee, Kozłowski e

Grayhack (1997), o desenvolvimento e manutenção prostático depende de uma soma de fatores extrínsecos (hormonais, imunológicos, alimentares e genéticos) e intrínsecos (interações moleculares entre epitélio e estroma). Os hormônios andrógenos têm sido apontados como o fator extrínseco de maior importância, atuando na homeostase do órgão maduro e também nos eventos que levam ao seu desenvolvimento embrionário e à maturação funcional (TABOGA; VILAMAIOR; GÓES, 2009). Dentro da glândula ocorre também a transformação de testosterona em diidrotestosterona, responsável pelo crescimento do órgão, devido a alta afinidade com os Receptores de Andrógenos (AR). Assim, segundo estudos de Rhoden e Averbek (2009) os hormônios androgênicos em geral, são essenciais para manutenção das funções da próstata. Vários outros hormônios como os estrógenos, os glicocorticoides, a prolactina e a insulina, também têm sido implicados no controle da histofisiologia prostática (CUNHA *et. Al*, 1987)

Diferentemente da próstata humana, a próstata dos roedores pode ser dividida em lobos claramente distintos. Os lobos são revestidos por uma fina cápsula de tecido conjuntivo que separa os lobos uns dos outros (SHAPPELL *et al.* 2004). Esses lobos são designados de anterior (também conhecido como glândula coaguladora), ventral, dorsal e lateral ou dorsolateral (TIMMS, 2008). O lobo prostático ventral é o mais utilizado em pesquisas hormonais por ser mais responsivos aos tratamentos (ENGLISH; SANTEN; DRAGO, 1985). Embora com diferenças anatômicas (Figura 1), os órgãos de ambas espécies são sensíveis aos andrógenos e suas estruturas desempenham papéis semelhantes. Segundo Shappell (2004), há semelhanças na histologia e funcionamento entre a próstata de roedores e humanos, assim, tornando viável o uso de modelos animais para estudos de alteração molecular na compreensão do desenvolvimento do câncer de próstata e outras patologias da glândula.

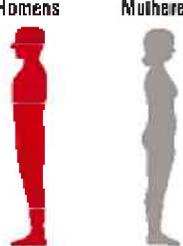


**Figura 1:** Nesta imagem é mostrada as diferenças anatômicas entre a próstata humana (A) e a próstata de camundongo (B). Em A, uma visão ventral de uma próstata fresca, mostra o tubo, que evidencia o canal por onde se passa uretra. A bexiga urinária é situada ao topo, em “base”, e na parte inferior, no “Apex”, é situado o diafragma urogenital. Em B, é exposto uma próstata de camundongo fixada em formol. O pênis se localiza na parte inferior, logo encima pode-se ver os lobos dorsais e laterais (identificados juntos em DLP), o lobo ventral (VP), próstata anterior (AP) e a vesícula seminal (SV). (ROY-BURMAN, 2004)

### *O câncer de próstata*

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais frequente em homens no mundo, com cerca de 1,1 milhão de novos casos diagnosticados, segundo um levantamento feito em 2012 (TORRE *et al.*, 2015). No Brasil, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, ele é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, com maiores índices nas regiões Sul e Sudeste (DAMIÃO *et al.*, 2015). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2016), o câncer de próstata é responsável por cerca de 61,200 novos casos a cada 100.000 homens (figura 2). Sua ocorrência é maior nos países desenvolvidos do que nos em desenvolvimento (LIMA; HAHN, 2016). Acredita-se que esse tipo de câncer possa estar relacionado à obesidade e diabetes tipo 2, pois estudos

epidemiológicos mostram uma maior incidência de câncer de próstata em indivíduos obesos. Essa associação é fundamentada por várias razões, dentre elas a hiperinsulinemia, a hiperglicemia, excesso de ácidos graxos, leptina e adipocinas secretadas pelo tecido adiposo além da hiperestimulação de vias de proliferação e sobrevivência celular (SUBA *et al.*, 2007).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%	
Próstata	61.200	28,6%		<b>Homens</b>	Mama feminina	57.960	28,1%	
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			<b>Mulheres</b>	Côlon e Reto	17.620	8,6%
Côlon e Reto	16.660	7,8%				Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%				Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%				Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%				Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%				Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%				Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%				Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%				Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

**Figura 2.** Incidência de casos de câncer no ano de 2016 no Brasil, com exceção do melanoma (Fonte: INCA, 2016).

Os efeitos da hiperinsulinemia podem ser mediados diretamente pela presença de receptores de insulina nas células (pré) neoplásicas, estimulando o crescimento ou mediando sua gênese por mecanismos comuns que ocasionam a resistência à insulina (CARVALHEIRA; SAAD, 2006). Como já se sabe, esse hormônio é um importante estimulador do metabolismo e da proliferação celular, favorecendo também o crescimento de linhagens celulares de câncer de próstata e sendo, também, utilizado em muitos meios de cultura para estimular a proliferação celular (ANTONIOLI, 2003). Além disso, os níveis de insulina têm sido considerados um marcador do prognóstico e agressividade de tumores (HAMMARSTEN; HOGSTEDT, 2005). Dentre as vias de sinalização desencadeadas pela insulina destaca-se a via AKT/Mtor bem conhecida por estimular, além da captação de glicose pelas células, a proliferação celular e também MAPK/ERK

responsável também por desencadear crescimento e divisão celular, (CHO *et al.*, 2001). Muitos estudos mostram a superexpressão dessa via em diversos tipos de cânceres.

### *Ação Hormonal na próstata e a via MAPK/ERK*

Os andrógenos (testosterona e di-hidrotestosterona, DHT) são os hormônios sexuais masculinos que promovem o desenvolvimento do aparelho reprodutivo do homem e suas características sexuais secundárias. É sabido que a próstata, como um órgão do sistema reprodutor masculino, é andrógeno-dependente. Assim presume-se que alterações malignas da próstata se desenvolvem sob estimulação androgênica anormal (SCHALKEN, 2005). Essa presunção ganha mais força com observações de eunucos que nunca desenvolvem câncer de próstata (WILSON, MCPHAUL, 1994) e de homens que usam agentes anabólicos terem uma maior incidência de câncer de próstata (ROBERTS; ESSENHIGH, 1986).

Há uma série de fatores e enzimas que determinam a ativação e inativação da testosterona. Estes, podem se relacionar com a função a ser desempenhada por tal hormônio. Porém, os andrógenos exercem seus efeitos na próstata através da ligação em receptores específicos, os AR (CORRÊA *et al.*, 2005), que pertencem ao grupo de receptores nucleares de hormônios esteroides, junto com os receptores de estrógeno (ER), receptores de glicocorticoide (GR), receptores de progesterona (PR) e outros.

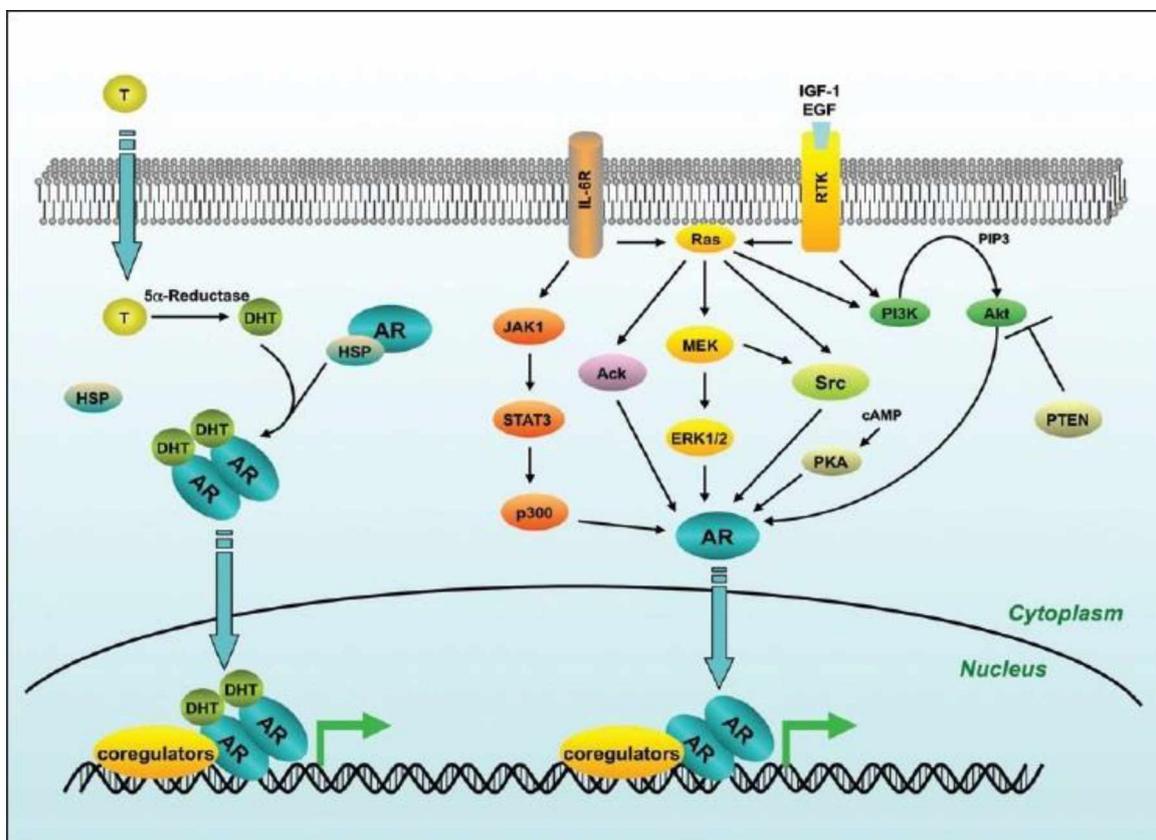
Segundo Schalken (2005), na próstata, as células epiteliais secretórias são andrógeno-dependentes para a secreção glandular e manutenção da viabilidade celular. Assim, o AR detém o maior papel no desenvolvimento e funcionamento da próstata, pois quando ativados medeiam todas as principais respostas glandulares ao hormônio (ZEIGLER-JOHNSON *et al.*, 2011).

Como em qualquer órgão, o crescimento da glândula prostática depende de um balanço de células em proliferação e em apoptose. E, na próstata, tal balanço é mediado por andrógenos. A testosterona promove diretamente a diferenciação das células epiteliais da glândula e indiretamente influencia na proliferação transiente mediados por fatores de crescimento contido no estroma. (SCHALKEN, 2005)

O gene AR está localizado no cromossomo X e é expresso em uma grande gama de tecidos, apresentando ações biológicas nos ossos, músculo, próstata, tecido adiposo e sistemas cardiovascular, imune, neural e hematopoiético. (TAN *et al.*, 2014). O receptor é um fator transcricional ligante-dependente e controla a expressão de alguns genes específicos que sinalizam para a manutenção do estado diferenciado da glândula, bem como estimulam a secreção prostática (Figura 2). Na ausência de ligante, o AR é citoplasmático e associado com proteínas de choque térmico e quando há a ligação com seu agonista ocorre uma mudança conformacional que promove a translocação do complexo ao núcleo onde, através da interação com os AREs (elementos responsivos aos andrógenos), modulam a transcrição gênica. Além disso, o complexo andrógeno/AR pode funcionalizar vias sem a ligação necessária com o DNA, ativando vias secundária de mensagens como ERK, AKT e outras MAPK, efeito este que ocorre em segundos após o tratamento com andrógeno (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Segundo Taboga, Vilamaior e Góes (2009), a testosterona promove estímulos de crescimento diretos na próstata, regulando o ciclo celular, ao se ligar com seu receptor, ativando a via AKT. Segundo, Zugasti *et al.* (2001), a AKT e sua via *downstream* é de extrema importância, pois é responsável direto da sobrevivência celular. A via AKT pode tanto reprimir quanto ativar a MAPK/ERK e seus efeitos na célula. Quando a via é plenamente ativada, é estimulado fatores de transcrição importantes para entrada do ciclo celular. Sendo assim, essas proteínas são como um interruptor ligado/desligado para

proliferação, alguma mutação ocorrida nessas pode levar ao estancamento no “ligado” ou “desligado”, causando sérios transtornos celulares.



**Figura 3:** meios de ativação do AR com a presença ou ausência de testosterona. (TINDALL; LONERGAN, 2011)

O estroma prostático também apresenta células que expressam AR. No entanto, a ligação do andrógeno a esses receptores, em vez de estimular a secreção como ocorre nas células epiteliais, ativam a transcrição de fatores de crescimento solúveis. Tais fatores são responsáveis pela estimulação parácrina, assim como sua inibição, do crescimento epitelial. (SCHALKEN, 2005). O epitélio estimulado, por sua vez também produz fatores que atuam no estroma estimulando o estado diferenciado das células como fibroblastos e musculares lisas. Tal fenômeno é conhecido como interação epitélio- estroma e é fundamental para manutenção adulta da glândula e seu desequilíbrio pode causar transtornos estruturais e funcionais para a próstata. (CUNHA, *et al.* 2003) Dessa forma, os

AR são os principais estimuladores da próstata e modulam papéis positivos ou negativos frente às situações que envolvam desequilíbrios hormonais, como a diabetes e obesidade por exemplo.

Os efeitos dos estrógenos na próstata foram, por muito tempo, pouco estudados ou subestimados. Entretanto, a próstata apresenta receptores de estrógenos (ER) bastante atuantes na glândula. De acordo com Scarano *et al.* (2005), o estrógeno está associado ao crescimento prostático, à hiperplasia benigna e até mesmo neoplasias, isso porque a quantidade de testosterona tende a diminuir com a idade, mas os níveis de estrógeno se mantem.

Existem dois tipos de ER, designados de  $\alpha$  e  $\beta$ . O ER $\beta$  é homólogo ao ER $\alpha$ , entre as duas estruturas, o domínio ligante do DNA tem 96% de conservação, diferentemente do domínio ligante em que apenas 58% é conservado (KUIPER *et al.*, 1996). Ambas as formas são encontradas na próstata (OMOTO; IWASE, 2015). O  $\alpha$ , é o menos abundante, sendo encontrado primordialmente no estroma, tendo papéis fundamentais no desenvolvimento prostático (PRINS *et al.*, 2001) e dos ductos epiteliais, neste último o receptor aparece apenas quando há a necessidade de ramificação (OMOTO, 2008). O ER $\beta$  é o mais comum, sendo encontrado nas células epiteliais prostáticas (OMOTO; IWASE, 2015). Ambos receptores são associados ao câncer de próstata. Segundo Corey *et al.* (2002), a expressão de ER $\beta$  em células de próstata cancerígenas mostrou caráter antiproliferativo, anti-invasivo e pró-apoptótico, inibindo a estabilização e o crescimento tumoral. Evidências mostram que as versões  $\alpha$  e  $\beta$  tem efeitos contrários, logo o ER $\alpha$  tem caráter oncogênico, promovendo proliferação e sobrevivência celular (DEY *et al.*, 2003).

### *Obesidade*

A obesidade é uma doença considerada crônica que envolve o acúmulo excessivo de gordura corporal, causando uma série de efeitos colaterais prejudiciais à saúde. Segundo Almeida *et al.* (2017) a obesidade pode ser considerada a mais importante desordem nutricional no mundo, tendo em vista o aumento de sua incidência: acredita-se que 10% da população mundial seja obesa (Organização Mundial da Saúde, 2016). Além disso, a obesidade apresenta-se fortemente associada à mortalidade, uma vez que dados mundiais mostram que pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem por eventos relacionados ao sobrepeso e/ou à obesidade (MARTINS, 2017). Esta desordem é muito comum e vem crescendo em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No Brasil, segundo pesquisa do levantamento oficial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016) divulgado pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica, quase 60% da população tem excesso de peso, dos quais 18,9% são considerados obesos (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2016)

O Índice de Massa Corporal (IMC) é um dos principais indicadores da obesidade. O IMC correlaciona-se bem com indicadores antropométricos de gordura não visceral (prega cutânea subescapular e prega cutânea triéptica e de gordura abdominal ou visceral - circunferência da cintura), além de ter relação direta com a massa de gordura corporal total (NAVARRO; NARCHINI, 2000). O índice é calculado através da razão do peso atual (kg) e o quadrado da estatura (m<sup>2</sup>) (SAMPAIO; FIGUEREDO 2005). Segundo o Ministério da Saúde, o indivíduo é obeso quando o IMC ultrapassa 30.

Segundo, Carlucci *et al.* (2013) o desenvolvimento da obesidade está correlacionado com distúrbio alimentar e falta de exercício físico ou sedentarismo. A gordura desempenha várias funções essenciais no organismo, a principal delas é atuar como fonte

de energia. Os ácidos graxos da gordura são armazenados como triacilgliceróis na forma de reserva energética de longo prazo organismo (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014). Quando a energia é ingerida em maior quantidade do que o seu gasto, o saldo positivo é acumulado na forma de tecido adiposo. Assim, o excesso de ingestão de lipídeos somado à falta de atividade física contribui para o estabelecimento e progressão da obesidade.

Acredita-se que a doença é uma epidemia mundial (ALMEIDA, *et al.*, 2017). A mudança da dieta humana, com a chegada de alimentos processados e *fastfood* alavancaram a incidência de obesidade pelo mundo. Nos estados unidos a ingestão diária de gordura foi estimada em 33,1% em 1994 (FRENCH, HARNACK, JEFFERY 200) O aumento de sua incidência está distribuído em quase todas as raças e sexos, e atinge principalmente a população entre 25 a 44 anos (BLUMENKRANTZ, 1987 *apud* FRANCISCHI *et al.*, 2000).

O excesso de gordura no corpo humano causa outras patologias como: hipertensão arterial, diabetes tipo 2, intolerância à glicose e resistência à insulina (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JUNIOR, 2003). Esta última pode ser descrita pela reduzida sensibilidade de receptores à insulina nos tecidos, com conseqüente aumento do nível de glicose no organismo. A hiperglicemia recorrente aumenta a secreção de insulina pelo pâncreas, causando um estado cíclico de hiperinsulinemia e hiperglicemia em decorrência da insensibilidade à insulina. Com o passar do tempo, uma falência do pâncreas pode culminar com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (FRANCISCHI *et al.*, 2000). O excesso de tecido adiposo e a falta de exercício físico são cruciais para a diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos sendo, por isso, essa desordem muito comum entre obesos.

Além do prejuízo no metabolismo glicêmico, a obesidade acarreta em distúrbios em múltiplos sistemas, sendo os mais conhecidos o cardiovascular, renal e inflamações sistêmicas (SALVE, 2006). Entretanto, a obesidade também promove alterações hormonais importantes, afetando o eixo ganadotrófico e os órgãos dependentes desses hormônios. Sabe-se que a hiperinsulinemia promove inibição da síntese de proteínas específicas transportadoras de testosterona, as SHBG (globulinas ligadoras de hormônios esteroidais), reduzindo o transporte de testosterona (T) no sangue, porém aumentando a T livre (CARVALHEIRA; SAAD, 2006). Assim, seria esperado que homens diabéticos e obesos apresentassem altos níveis de testosterona livre, porém o que ocorre é justamente o contrário. O nível de testosterona no organismo é baixo, e isso decorre de prejuízos no eixo hipotálamo-hipófise gonadal causados pela obesidade, reduzindo a síntese de T pelos testículos. Além disso, os indivíduos obesos apresentam alta expressão de aromatase no tecido adiposo abundante e tal enzima é responsável pela conversão da T livre em estrógeno (DUNGER *et al*, 2005). Assim, fica claro que a obesidade apresenta impacto no equilíbrio dos hormônios sexuais, podendo ter efeito prejudiciais nas glândulas dependentes desses hormônios, como a próstata.

Além da síndrome metabólica, segundo Miyazaki, Bub e Iwamoto (2008) muitos estudos comprovam que a obesidade está claramente ligada com o aumento da mortalidade ou progressão do câncer de próstata ao estado agressivo. Os grandes números de adipócitos presentes no tecido adiposo produzem meio rico em citocinas, fatores de crescimentos e hormônios que condicionam à progressão ao câncer de próstata independente de andrógeno, sendo esse muito agressivo e aumentando consideravelmente o risco de mortalidade. Além disso, como já mencionado, outras alterações da obesidade se interrelacionam com o câncer, como o excesso de glicose e insulina, que são agentes mitogênicos e anabólicos que promovem sinalizações para sobrevivência e proliferação

celular como ativação de AKT, MAPK, cuja expressão é sabidamente aumentada na próstata de indivíduos obesos (ZADRA *et al.*, 2013).

### *Exercício Físico*

O exercício físico é a principal recomendação para o tratamento da obesidade somado a uma reeducação alimentar. Além de prazeroso, a movimentação diária promove melhorias no sistema cardiovascular, diminuição do estresse, fortalecimento dos ossos, aumenta a concentração e a manutenção do sono. A prática de exercício físico como tratamento auxiliar para doenças cardiovasculares e cânceres em geral tem sido muito recomendado na comunidade médica. O exercício contribui para a amenização dos efeitos colaterais do câncer de próstata, através da melhora da força muscular, aumento do fitness cardiorrespiratório, com consequente diminuição do peso e da fadiga (KENFIELD *et al.*, 2011). Segundo Hayes *et al.* (2016), homens que foram diagnosticados com câncer de próstata metastático que se exercitaram com exercícios vigorosos por mais de 3 horas por semana sobreviveram até 4 anos após o diagnóstico, além de haver redução da mortalidade específica pelo câncer. Exercícios leves como a caminhada também mostrou-se capaz de diminuir a mortalidade e a progressão do câncer de próstata. Assim, o exercício físico é um importante objeto de estudo a ser relacionado com lesões na próstata.

Embora a prática de exercício físico seja sabidamente benéfica para o organismo, dados da literatura não trazem informações a respeito do seu impacto na morfofisiologia da próstata, nem tampouco se essa atividade é capaz de reverter os prejuízos metabólicos e morfológicos causados pela obesidade na glândula.

## 1.2. Justificativa

Diante do exposto, fica evidente que a obesidade provoca inúmeras alterações metabólicas, destacando-se o aumento da concentração de glicose, lipídeos e insulina no corpo. Essa combinação desencadeia uma série alterações hormonais, teciduais e moleculares que podem favorecer o surgimento de patologias, disfunções ou até estimular o câncer na próstata. A obesidade é uma doença cada vez mais incidente nos dias atuais e o conhecimento sobre o impacto dessa desordem no sistema reprodutor masculino ainda é incipiente. A busca por informações a esse respeito pode levar ao desenvolvimento de estratégias que ajudem a prevenir maiores complicações da obesidade, incluindo o câncer. Nosso grupo de pesquisa demonstrou os efeitos negativos da obesidade causada por dieta hiperlipídica (20% de gordura saturada) em ratos em curto e longo prazo (RIBEIRO *et al.*, 2009, 2015). Entretanto, não existem relatos na literatura sobre os efeitos de uma dieta ainda mais hiperlipídica (40% de gordura saturada) sobre a morfologia da próstata ou expressão dos receptores de hormônios andrógenos e sua relação com patologias proliferativas. Assim, buscamos elucidar se a doença promove lesões benignas e malignas no órgão, bem como se o exercício físico teria papel regulatório nesse ambiente.

### 1.3. Objetivos

Avaliar o efeito de uma dieta excessivamente hiperlipídica no desenvolvimento da obesidade e seu impacto na próstata de camundongos. Além disso, busca-se elucidar se o exercício físico é capaz de proteger a glândula de possíveis efeitos negativos da obesidade.

#### 1.3.1. Objetivos Específicos

- Elucidar a relação entre modificações teciduais com nível de andrógenos e a expressão de seus receptores que possam estimular a proliferação celular na próstata.
- Estudar a via de sinalização de sobrevivência celular ERK e entender se a obesidade estimula essa via de modo a favorecer o surgimento de lesões na próstata.

## 2. Metodologia

Foram utilizados 20 camundongos Swiss machos adultos (12 semanas de idade), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Esses animais foram mantidos no depositário de animais do ARFIS/ICBIM, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, alimentados com ração “*ad libitum*” e água filtrada, segundo as normas.

Os animais foram divididos em 2 grupos de 10 animais: Dieta normal, 4 % de gorduras saturadas (DN)- tratado com ração convencional; e DH- tratado com ração hiperlipídica contendo 40% de gorduras saturadas. A ração hiperlipídica foi padronizada e preparada semanalmente para administração aos animais. Em cada grupo, após 7 semanas de dieta, 5 animais foram dispostos à atividade física e os 5 remanescentes permaneceram

sedentários, formando assim 4 grupos: DNS- dieta normal e sedentário, DNE- dieta normal e exercitado; DHS- dieta hiperlipídica e sedentário, DHE- dieta hiperlipídica e exercitado.

A atividade física usada no protocolo de treinamento dos animais foi a natação. Para tanto, foi utilizado um aquário com altura de 280 mm, comprimento 900 mm e largura 300 mm, dividido em 12 compartimentos de dimensões 150 x150 mm, a fim de alojar cada camundongo individualmente (adaptado de EVANGELISTA *et al.*, 2003). As sessões de treinamento foram realizadas durante o ciclo escuro, compreendido entre 7hr e 19hr, mantendo regularidade de horário em todo o período do experimento, com temperatura da água variando na faixa de  $32\pm 3^{\circ}\text{C}$  (EVANGELISTA *et al.*, 2003; ANDREAZZI *et al.*, 2009). O exercício teve duração de 1 hr/dia e 5 dias/semana, durante 8 semanas, sendo a primeira semana de natação livre por 10 min com a finalidade de familiarização dos animais com o novo ambiente. No período de treinamento, os animais foram submetidos ao teste de carga progressiva (incremental) semanalmente para a adequação de carga. O teste consistiu em um acréscimo crescente de carga de trabalho correspondente a 2% do peso corporal adicionados a cada 3 min até a exaustão do animal (ALMEIDA *et al.*, 2009). A intensidade do exercício de treinamento foi fixada em 80% do peso máximo obtido no teste progressivo.

Após o período de 16 semanas de dieta e treinamento ou sedentarismo, os animais de todos os grupos foram eutanasiados através de alta dose de ketamina/xilasina (200mg/kg e 40 mg/kg respectivamente).

Os camundongos foram tratados segundo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e esse delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEUA/UFU (035/14).

**Tabela 1:** macronutrientes na dieta normal (DN) e dieta hiperlipídica (DH)

<b>MACRONUTRIENTE</b>	<b>DN(KCAL%)</b>	<b>DH(KCAL%)</b>
<b>PROTEÍNAS</b>	20	20
<b>CARBOIDRATOS</b>	70	35
<b>GORDURA</b>	10	45
<b>TOTAL KCAL/G</b>	3.85	4.73

## 2.1 Parâmetros metabólicos e bioquímicos

- Peso corpóreo

O ganho de peso dos animais foi acompanhado ao longo de todo experimento.

- Peso dos depósitos de gordura

As gorduras epididimal e retroperitoneal foram isoladas e pesadas em todos os grupos, após o sacrifício para auxiliar na caracterização da obesidade.

- Glicemia:

A glicemia de todos os grupos foi dosada semanalmente, no mesmo horário, pelo sistema de fitas (monitor digital) “Accu - Chek Active” (Roche Diagnostics) a partir de gotas de sangue retiradas na região das patas.

- Dosagens hormonais

Após a confirmação da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas através da decapitação, e então centrifugadas e o plasma estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Os níveis plasmáticos de testosterona foram quantificados por método quimioluminescência. A quantificação foi realizada por ensaio de ELISA sistema sanduiche (anticorpo-antígeno-

anticorpo) através de kit comercial (Enzo life Sciences International, PA, USA) e leitura em leitor Epoch Multi-Volume System (Biotek Instruments, VT, USA). 5 animais por grupo foram usados nessa análise e as amostras foram lidas em triplicata. A sensibilidade mínima do teste é de 5.67 pg/ml.

## 2.2 Western Blotting

O conteúdo de receptor androgênico- AR, bem como da proteína ERK 1/2 (normal e fosforilada) foi estimado por western blotting. Para isso, a próstata ventral dos dois grupos experimentais foi homogeneizada em tampão Cell Lysis contendo inibidores de proteases (Coquetel Sigma), reagindo por 30 min a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 18000xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para quantificação do conteúdo de proteínas pelo Método de Bradford. Posteriormente, alíquotas de 100 µg de proteína foram tratadas com solução para corrida de gel (Laemli sample buffer) contendo β-mercaptoetanol 5% a 95°C por 10 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em BSA- albumina bovina sérica 5% em tampão Tris contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) por 60 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas overnight com os anticorpos primários: rabbit anti-AR de humano (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-ERK1/2 e rabbit anti-phospho ERK1/2 de humano (Cell Signaling), rabbit anti-beta actina de humano (Santa Cruz Biotechnology) diluídos 1:500 (AR e beta-actina) ou 1:1000 (ERK1/2) em BSA 3%. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à peroxidase, diluído 1:10000 em TBST por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção quimioluminescente ECL (Pierce Company) e a reação luminosa das bandas foi detectada em fotodocumentador Amersham Imager 600. A

quantidade de cada proteína estudada foi determinada através da densitometria das bandas com auxílio do Image J (version 1.34; Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Os valores foram de densitometria das bandas de ERK1/2 fosforilada foram normalizados em relação a versão total (não fosforilada) da mesma proteína, e, no caso do AR a normalização foi feita em relação à beta-actina.

### 2.3. Análise de morte celular por caspase 3

A atividade proteolítica das caspases 3 foi mensurada por ensaio de fluorescência, através do kit EnzChek Caspase-3 Assay (Molecular Probes), de acordo com as especificações do fabricante. O princípio da técnica reside na propriedade que as caspases-3 exibem em clivar o sítio C-terminal do resíduo de aspartato da sequência DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). Dessa forma, o kit fornece o substrato da atividade de caspase 3 ligado à fluoresceína 7-amino-4-metilcumarina AMC (Z-DEVD-AMC) que em contato com as amostras contendo as enzimas, e ao ser clivado, exibe fluorescência azul que é lida em leitora de microplacas no comprimento de onda de 324/441 nm (excitação/ emissão). O experimento foi realizado com amostras da próstata homogeneizadas (como descrito acima), em duplicata, sendo utilizados 3 animais de cada grupo experimental. Os dados foram representados graficamente através de valores de unidades de fluorescência relativa (RFU) onde o grau de fluorescência é diretamente proporcional à atividade de caspase-3 e conseqüentemente apoptose.

### 2.4. Imunocitoquímica

Ensaio imunocitoquímico foram realizados nas próstatas dos camundongos para detectar a presença e distribuição de receptores de estrógeno beta (ER $\beta$ ) e células proliferativas (PCNA). Para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e

aquecidos a 98°C por 15 minutos para a recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi efetuado tratando-se os cortes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 20 minutos. Posteriormente, o bloqueio de interações proteicas inespecíficas foi realizado através de albumina bovina 4% em PBS por 1 hora. Assim, encubaram-se os cortes nos anticorpos primários por 60 minutos (PCNA) em temperatura ambiente ou “overnight” a 4°C (ERβ) em diluição 1:100 em BSA1%. Após serem lavados em PBS os cortes passaram pela incubação com sistema de detecção Polímero Star Trekk (Biocare Medical, Concord USA) por 2 reações de 1 hora em temperatura ambiente. A revelação foi feita com diaminobenzidina- DAB, com tempo padronizado para cada anticorpo estudado e a contra-coloração com hematoxilina de Harris. No caso de ERβ, a revelação foi feita com uso de anticorpo secundário anti-rabbit (1:500) conjugado com Alexa Fluor 555 (Jackson Laboratories) seguido de contracoloração para núcleos com TO-PRO3 (Thermo Scientific) diluído 1:1000 em glicerol.

As células proliferativas e as que expressavam ERβ foram quantificadas de acordo com a contagem de núcleos positivos para cada marcação. Para isso, foram utilizados 3-4 animais de cada grupo e capturados 15 campos visuais de cada corte histológico de próstata, em aumento de 400X, sendo contadas no mínimo 2000 células. O índice representa o valor de células positivas dividido pelo número total de células contadas em todos os campos, expresso em porcentagem.

## 2.5. Análise estatística

Todos os valores numéricos do trabalho foram avaliados estatisticamente de normalidade de Kolmogorov-Smirnov seguido de teste t-Student para avaliação da significância na comparação das medianas (considerando-se  $p > 0,05$ ) e Mann Whitney para o ensaio de morte celular, como indicado pela distribuição amostral desse parâmetro.

## 3. Resultados

A tabela 2 apresentada abaixo mostra as medidas dos parâmetros metabólicos e bioquímicos. Comparando, houve diferença significativa no peso corporal dos camundongos sedentários com dieta hiperlipídica (DHS), em relação aos camundongos com dieta normal e, também, sedentários (DNS). Dessa forma, comprovamos que o aumento da ingestão de lipídios promove aumento consequente do peso corpóreo, devido à alta ingestão de gorduras e a falta de atividades físicas que auxiliem no gasto da energia ganha, causando um saldo energético positivo e sua consequente estocagem. O saldo positivo energético, é estocado no tecido adiposo em forma de gordura, assim, nos mesmos grupos, em relação ao nível de gordura, houve também aumento significativo, de quase 100%.

Ainda de acordo com a tabela 2, mesmo com a presença de exercícios físicos, houve aumento significativo entre o peso corpóreo dos ratos alimentados com dieta normal (DNE) e os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DHE). O peso corpóreo do grupo DHE foi em média 28% maior que o do grupo DNE. A taxa de gordura entre os mesmos grupos também teve significante diferença, sendo 3,75 vezes maior no DHE do que no grupo DNE. Isso implica que a presença de exercício por si só não é suficiente para reduzir o saldo energético, sendo também necessário a diminuição da ingestão de lipídeos e uma dieta balanceada.

A maior taxa glicêmica registrada foi do grupo DHE, um aumento significativo de 214% em relação ao grupo DNE. Houve aumento também significante entre os grupos DNS e o DHS, de 185,91%. Dessa forma, notamos que a ingestão excessiva de lipídeos na alimentação dos ratos causou hiperglicemia, e pode, a longo prazo, ocasionar um quadro de Diabetes.

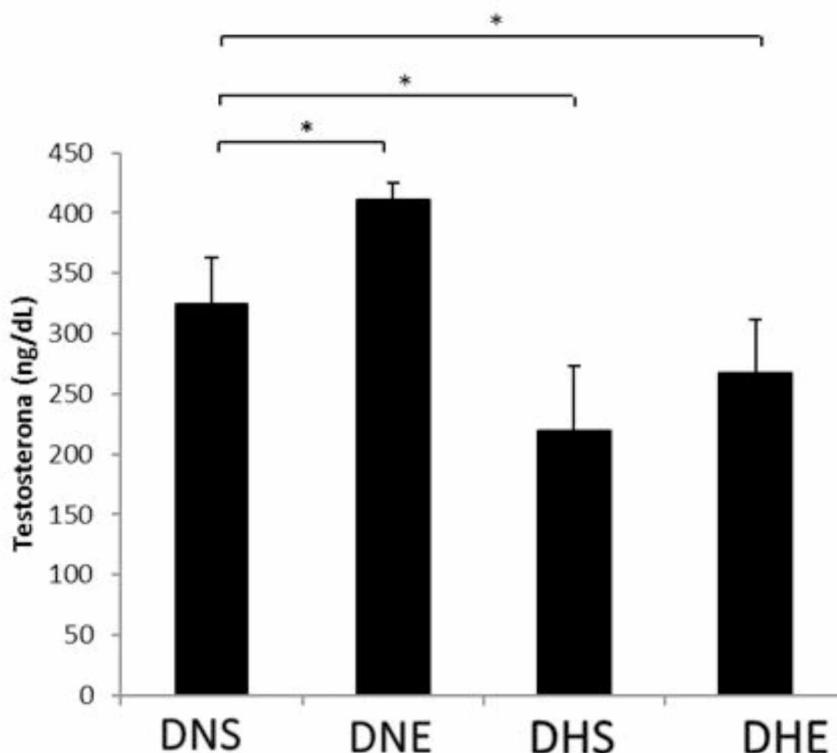
**Tabela 2:** Análise de parâmetros biométricos e glicemia de animais tratados com dieta normal (DN) ou hiperlipídica (DH) sedentários ou submetidos ao exercício físico.

	<i>DNS</i>	<i>DNE</i>	<i>DHS</i>	<i>DHE</i>
<i>Peso corporal (g)</i>	38,4 ± 0,5	35,6 ± 0,4	48,0 ± 1,2*	45,8 ± 0,8**
<i>Peso da próstata (mg)</i>	0,41 ± 0,08	0,47 ± 1,10	0,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01
<i>Gordura (mg)</i>	2,8 ± 0,35	1,5 ± 0,10	5,5 ± 0,50*	5,6 ± 0,46**
<i>Glicemia (mg/dL)</i>	128,8 ± 23,0	159,75 ± 22,2	276,50 ± 27,4*	297,00 ± 22,9**

(\*) diferença significativo ( $p < 0,05$ ) DNS vs. DHS. (\*\*) DNE vs. DHE

Pode ser notado que o peso das próstatas de ambos grupos tratados com dieta hiperlipídica (DHE e DHS) foi consideravelmente reduzido. (Tabela 1) Embora o resultado não seja significativo estatisticamente, a diminuição do peso prostático devido à alta ingestão de gordura não pode deixar de ser destacada. Talvez, se a dieta fosse administrada em maior prazo, o peso de próstata poderia ser ainda menor e a diferença estatística notada.

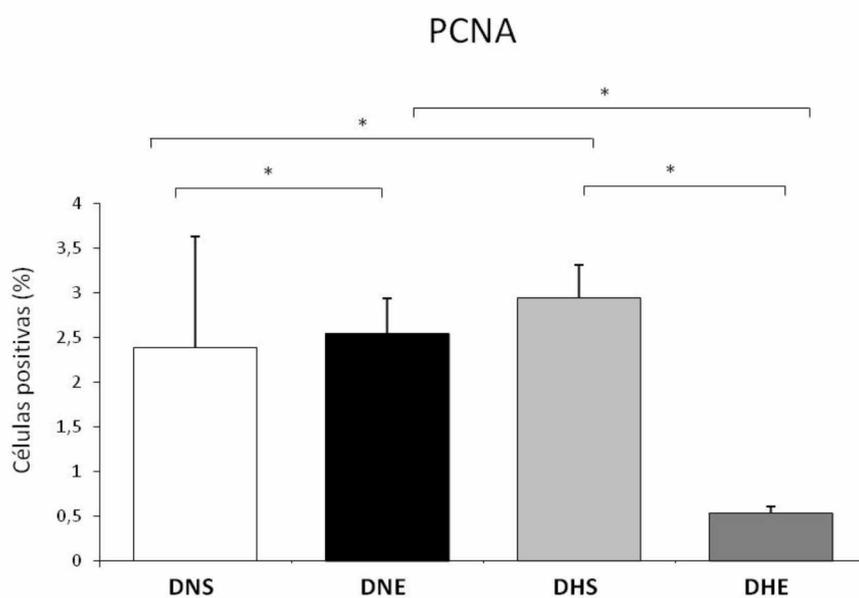
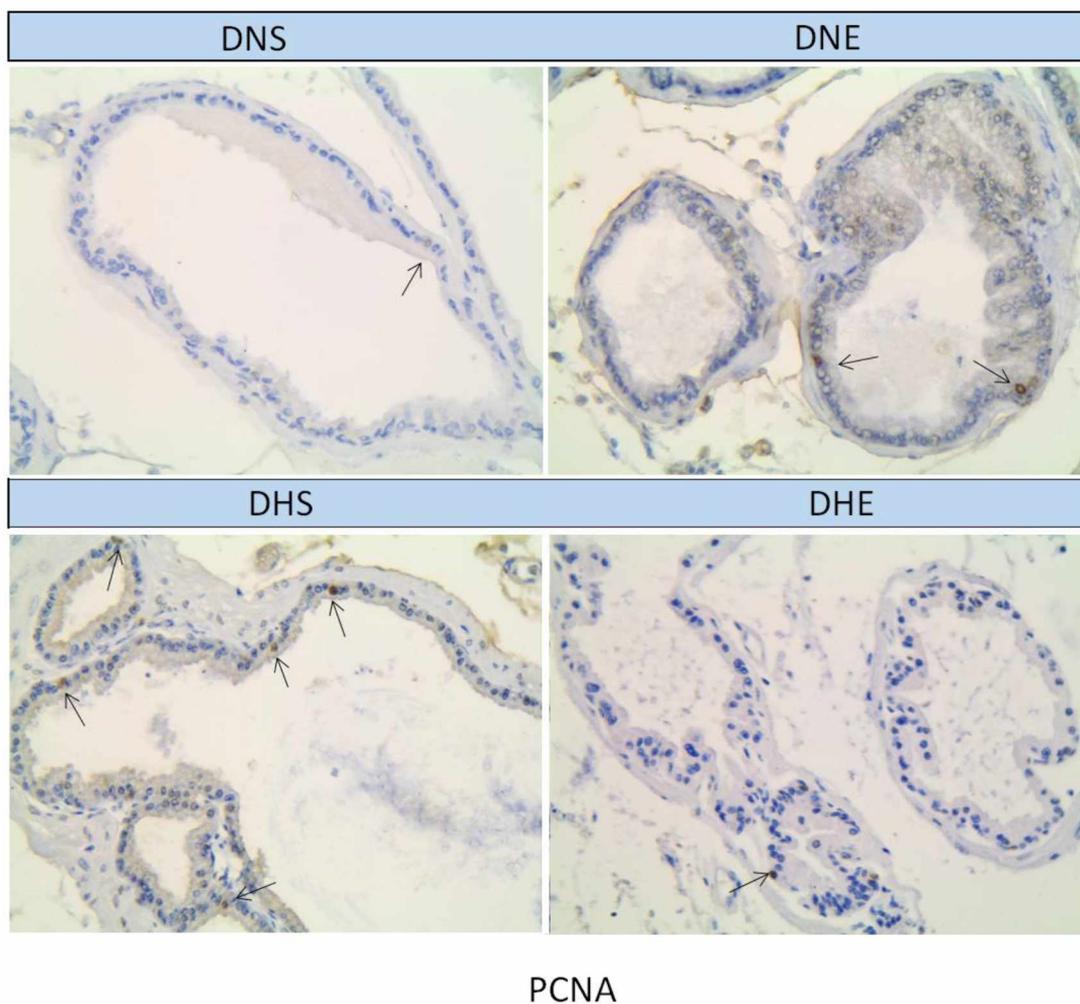
O exercício físico, quando realizado em conjunto com a dieta hiperlipídica, não foi capaz de reverter completamente os efeitos dela no peso da glândula (Tabela 1).



**Figura 1:** Representação gráfica dos níveis de testosterona dos grupos tratados com dieta convencional (DN) ou hiperlipídica (DH), que passaram (E) ou não (S) por atividade física. \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

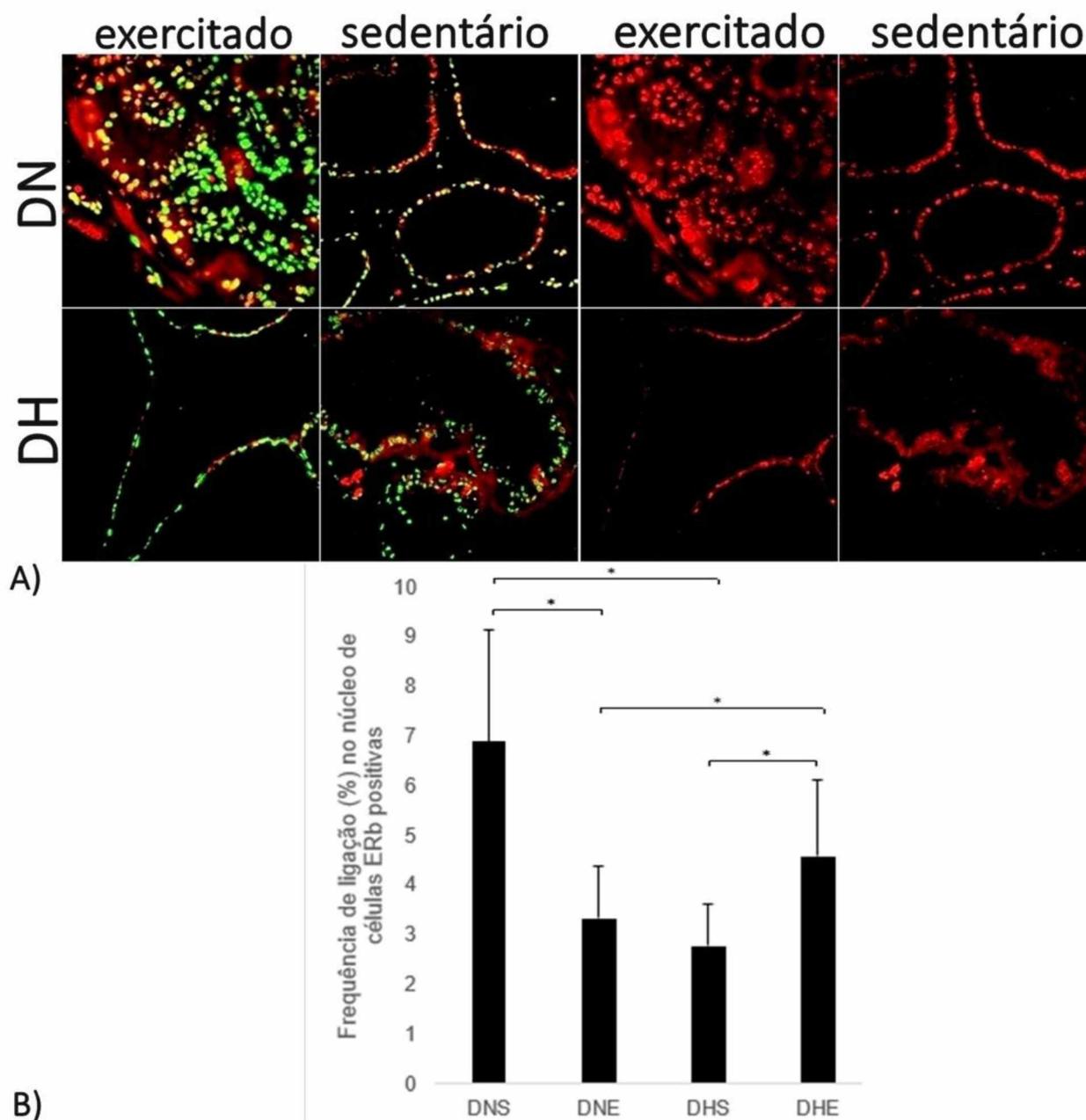
A figura 1 demonstra o nível de testosterona médio de cada grupo. Notamos que os grupos que passaram por exercício físico tiveram maior dosagem de testosterona que os grupos de mesma dieta, porém sedentários. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo DNS e DNE, este último registrou o maior índice de testosterona. Em relação ao grupo dos sedentários, a dieta hiperlipídica mostrou-se um agente capaz de diminuir o nível de testosterona.

A dieta hiperlipídica aumentou significativamente os níveis de proliferação celular mensurados a partir da quantificação de células positivas para o marcador PCNA comparados à dieta normal (Figura 2). O mesmo se observa para exercício físico, visto que os animais DNE também apresentam elevados níveis de proliferação celular. Entretanto há uma redução significativa no grupo tratado com dieta hiperlipídica juntamente com a prática de exercício.



**Figura 2.** Frequência relativa de células proliferativas (Marcadas com PCNA) na próstata de camundongos tratados com dieta convencional (DN) ou hiperlipídica (DH), que passaram (E) ou não (S) por atividade física. \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

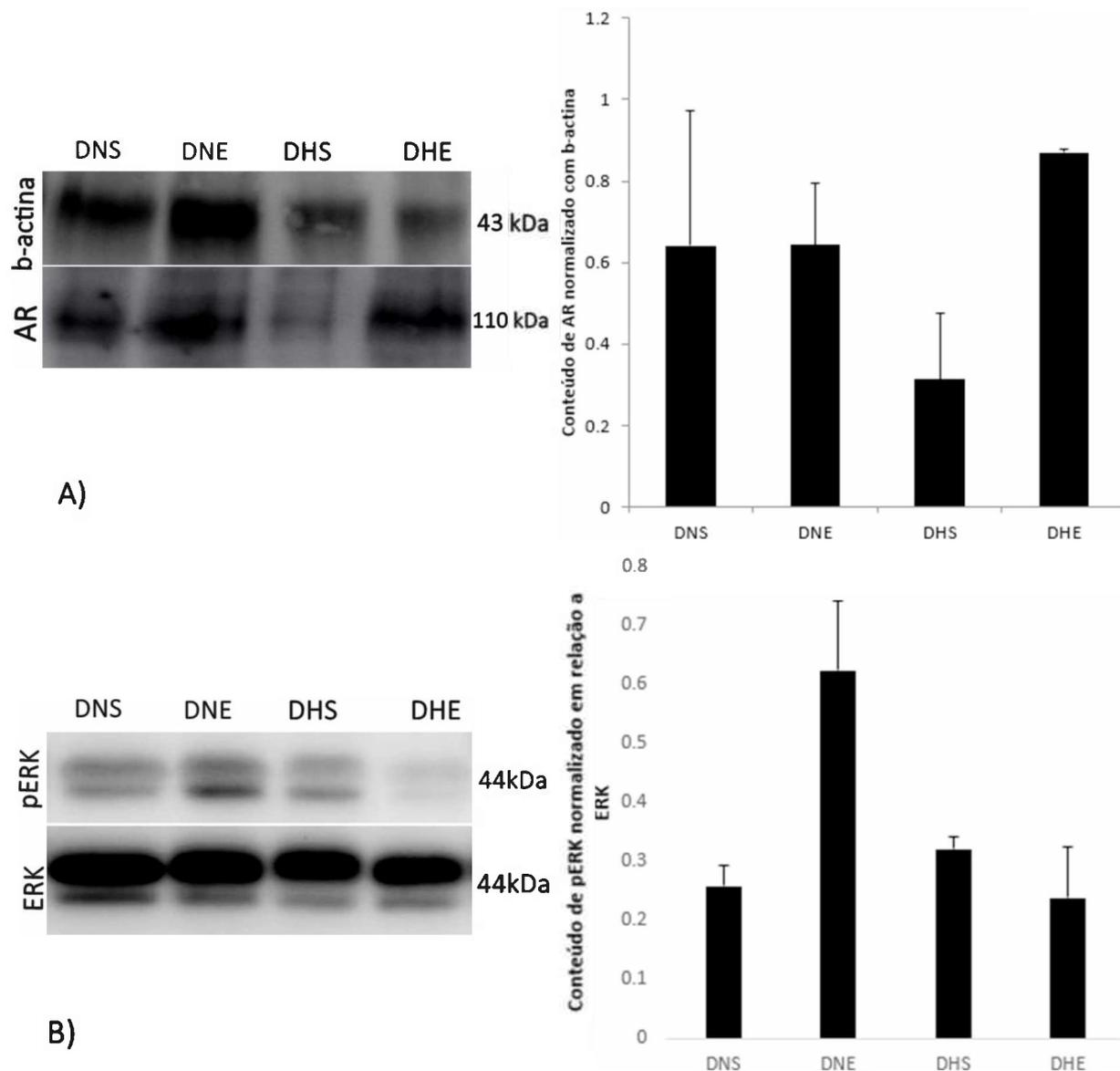
A imunofluorescência, representada na Figura 3, mostrou que após a dieta hiperlipídica a expressão dos receptores de estrógenos diminuiu no grupo sedentário. O grupo de dieta normal sedentário, controle, foi o que mais teve presença de receptores de estrógenos. O exercício físico influenciou positivamente no aumento da expressão de ER no grupo tratado com dieta hiperlipídica. Como mostrado no gráfico 3, a quantidade de ER do grupo DHE foi expressivamente maior que o grupo DHS.



**Figura 3:** A- Imunofluorescência de ER $\beta$  na próstata de camundongos tratados com dieta normal (DN) ou hiperlipídica (DG) sedentários ou exercitados. Esquerda: imagens com marcação de ER (vermelho) e núcleos

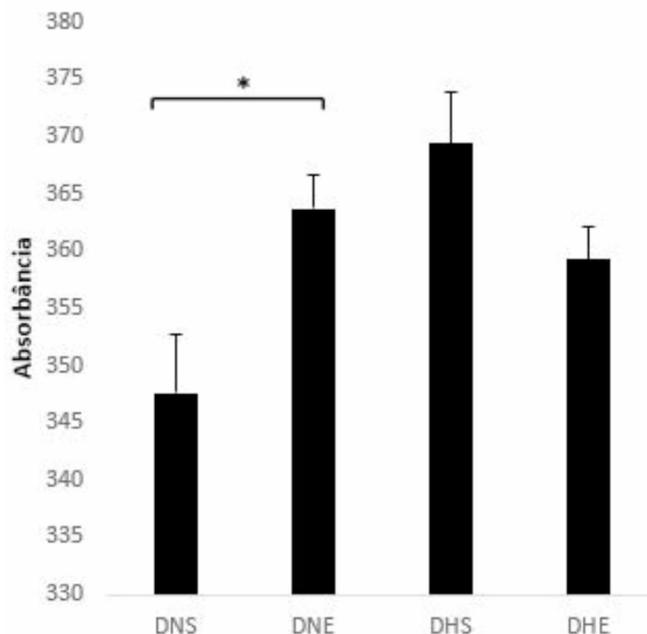
(verde). Direita: Mesmas imagens mostrando somente a marcação de ER (vermelho). **B:** Frequência relativa (%) de células positivas para receptor de estrógeno beta, \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Considerando os níveis reduzidos de testosterona causados pela dieta hiperlipídica e o seu aumento após o exercício físico, avaliamos o conteúdo de receptores androgênico na próstata desses animais. A análise de western blotting revelou bandas de 110kDa correspondente aos AR cuja densitometria foi quantificada e normalizada, como mostra a figura 4. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários tiveram os menores índices de AR. Por outro lado, o exercício físico nesses mesmos animais (DHE) causou a maior expressão de AR de todos os grupos, sendo 2,9x maior que DHS. Entre os grupos DNS e DNE não houve grande diferença, embora nota-se uma tendência do exercício físico aumentar a quantidade de AR, esse incremento em decorrência do exercício foi mais notável apenas no grupo DH, como ilustrado na figura 4.



**Figura 4:** Western blotting (esquerda) e Densitometria das bandas (direita) na próstata de camundongo dos grupos tratados com dieta normal (DN) ou hiperlipídica (DH), sedentários (-S) ou exercitados (-E). A) Receptor de andrógeno (AR) e  $\beta$ -actina. B) ERK1/2 fosforilada (pERK) e conteúdo total de ERK1/2 (ERK).

Ainda na figura 4 é mostrado a quantificação da proteína ERK 1/2. O Western Blotting mostrou que entre o grupo de dieta normal, o exercício físico expõe-se como um agente promotor da via ERK na próstata dos camundongos, que está cerca de 2,5 vezes mais ativa no grupo DNE que DNS. A dieta hiperlipídica e ganho de peso corporal também apresentou efeito promotor na fosforilação de ERK. Entretanto, quando o exercício físico é associado à dieta hiperlipídica nota-se uma redução na ativação da via ERK1/2.



**Figura 5:** quantificação da atividade de caspase-3 entre os grupos de dieta normal (DN) e hiperlipídica (DH), sedentários (-s) ou com prática de exercícios físicos (-E). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O ensaio de morte celular, ilustrado na figura 5, mostrou que há maior presença de caspases no grupo obeso sedentário, porém, o exercício físico foi capaz de promover uma diminuição da quantidade de caspases, que não foi estatisticamente significativo. Entre os grupo sedentários, o conteúdo de caspases foi significativamente maior no grupo exercitado que no grupo sedentário, mostrando que a prática de exercícios físicos tendeu a aumentar bastante a morte celular na próstata.

#### 4. Discussão

Não é segredo que uma dieta desequilibrada, com ingestão exacerbada de gordura provoca um aumento de peso corporal, sendo ela a principal causa da obesidade na atualidade. Nossos resultados ilustram tal efeito e isso é corroborado pelo aumento da quantidade de depósitos gordura nos animais, que foi explicitamente maior nos grupos tratados com DH. Esse ambiente formado por altas quantidades de gordura, promove também série de

transtornos metabólicos nesses animais, desregulando seu funcionamento natural. Dentre tais disfunções, o excesso de tecido adiposo provoca aumento da sensibilidade a insulina, levando ao aumento da glicose livre no sangue, gerando um quadro (pré) diabético (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006). Assim, notamos que glicemia em tais animais DH foi significativamente maior, devido a tais distúrbios. O exercício físico sozinho não foi capaz de reverter tal quadro de peso corporal em excesso, o que sugere que para uma perda de peso é necessária uma reeducação alimentar atrelada a esportes e exercícios.

Embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo, houve uma clara redução no peso da próstata dos ratos devido a dieta rica em lipídeos. Isso pode ser relacionado também com a diminuição dos níveis de testosterona nos mesmos grupos. Com a maior quantidade de tecido adiposo há maiores taxas de aromatização da testosterona em estrógenos, por meio da enzima aromatase, esta enzima é produzida proporcionalmente ao tamanho do/pelo tecido adiposo (COHEN, 1999). Além disso, como também mostrado por Birkeland et al. (1993), a hiperglicemia diminui a produção de globulinas transportadoras de testosterona (SHBG), diminuindo seu transporte no organismo dos animais. Logo, podemos relacionar que a dieta hiperlipídica causou a diminuição da testosterona livre. Uma vez que a próstata é uma glândula andrógeno dependente para sua função e manutenção, a falta deste hormônio levou a uma atrofia glandular de até 50%. O mesmo efeito pode ser notado em trabalhos de castração e diabetes que mostram drástica atrofia da glândula após a redução de testosterona (GÓES *et al.*, 2007, SINGER *et al.*, 2008). Já conhecido que o exercício físico intenso tem papel anabólico, aumentando os níveis de testosterona no sangue (FRANÇA *et al.*, 2006), o que pode ser observado nos camundongos tratados com dieta normal. Naqueles submetidos à dieta hiperlipídica, o exercício físico não foi capaz de reverter a redução causada pela dieta, uma vez que o peso corporal se manteve elevado nesses animais. Assim, demonstramos que a dieta excessivamente lipídica causa redução de testosterona com atrofia

da próstata em camundongos que o exercício físico por si só não é capaz de restaurar os efeitos negativos da dieta nesses animais mostrando a importância da dieta equilibrada associada com redução de peso corporal e a prática de atividade física.

Ainda sobre a redução de testosterona, em tese, esse ambiente teria um efeito protetor contra patologias proliferativas da próstata, como o câncer. Inclusive, um dos métodos mais utilizados no tratamento do câncer de próstata inicial é a castração química que provoca bloqueio do hormônio no organismo (SHARIFI, 2005). Mas, no caso do nosso estudo, essa proteção não se sustenta sozinha. Isso porque, o aumento do tecido adiposo provoca a síndrome metabólica, com aumento da insulina, glicemia e citocininas próinflamatórias que criam um ambiente mais favorável a ocorrência de mutação e proliferação celular (WISSE, 2004). Desse modo, se o indivíduo nessas condições de dieta e obesidade já tiver desenvolvido câncer, o efeito protetor da redução do andrógeno logo pode servir de ponto para a mudança de um tumor mais brando para um mais agressivo, com a independência de testosterona atingida pela célula.

A ingestão de altas quantidades de gordura provocou a diminuição da expressão dos receptores de andrógeno, e o exercício físico mostrou-se capaz de reverter tal quadro, estimulando a produção desses receptores na próstata. O resultado obtido corrobora com outros trabalhos feitos por nosso grupo de pesquisa. Nossos dados anteriores mostram que ratos tratados com dieta hiperlipídica (20%) tiveram redução significativa da testosterona, AR e aumento expressivo da insulinemia e glicemia. Com dados similares na presente investigação, demonstramos que a redução dos níveis de testosterona levou a uma modulação dos AR na próstata dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Entretanto, nossa experiência mostrou que a diminuição dos níveis de testosterona leva, em curto tempo (15 semanas), a uma diminuição do AR em ratos obesos (RIBEIRO *et al.*, 2012). Isso deve-se a

resposta da glândula ao meio que mudara drasticamente. Porém, a próstata necessita do hormônio para seu desenvolvimento e manutenção, e, a falta desse hormônio causa disfunções no seu funcionamento. Assim, após longo prazo de dieta hiperlipídica e redução androgênica (30 semanas), os níveis de AR tendem a aumentar, em uma tentativa da glândula de conseguir a maior quantidade de andrógenos possível para garantir sua manutenção (SILVA *et al.*, 2015). Precisamos considerar que nesse presente trabalhou os animais são de outra espécie (camundongo) e a dieta 2x mais hiperlipídica (40%). Ainda assim, nossos dados mostram que essa dieta também provoca redução androgênica modulando a diminuição de expressão de AR na próstata de camundongos, favorecendo atrofia da glândula e podendo prejudicar o funcionamento da mesma. O exercício físico, embora não tenha refletido em maior peso prostático, é capaz de restaurar esses efeitos negativos na sinalização androgênica da próstata.

Entre os grupos de dieta normal, o grupo exercitado teve um maior índice de proliferação celular na próstata. Isso pode ser explicado pelos níveis elevados de testosterona e de ativação de ERK1/2 presentes nesse grupo, assim como mostrado por Muller *et al.* (2007) que, em outros tecidos, a prática de exercícios tende a aumentar os níveis de ERK fosforilada (pERK). A ERK1/2, como uma representante da via MAPK relacionada à proliferação celular, é um forte sinal de atividades mitogênica nas células (SUN *et al.*, 2015). O consumo excessivo de gordura associado ao sedentarismo mostrou-se capaz de promover ainda mais a proliferação celular na próstata. O ambiente formado pela obesidade, como a hiperglicemia, a hiperinsulinemia e as citocinas próinflamatórias e altas quantidades de ácido graxo, estimulam a proliferação celular por serem altamente mitogênicos (MISTRY *et al.*, 2007). A via androgênica também é altamente sinalizadora para a proliferação celular na próstata com ativação de AR após estimulação androgênica (DAVEY; GROSSMANN, 2016).

Assim, nossos dados mostram que, mesmo com a testosterona e AR baixos, o microambiente alterado da obesidade se sobressaem sendo este um ponto crítico para a proliferação celular na próstata. Assim, a proliferação é mantida por fatores que independem de hormônios androgênicos, tais como a excesso de glicose, insulina, citocinas, ácidos graxos e também de ERK, que se mostrou mais ativa nos animais DH. Isso é corroborado por Fernandez-twinn *et al.* (2012), que mostrou que também em outros tecidos do corpo, mais precisamente o cardíaco, as disfunções metabólicas da obesidade estão relacionados com a indução da ativação da via ERK e a consequente indução de sobrevivência e divisão celular. O exercício físico, mostrou-se capaz de reverter o aumento da proliferação celular na próstata causado pela DH. Assim, mesmo a prática de exercício físico no grupo DHE não tenha restaurado totalmente os níveis de Testosterona e AR, ele foi capaz de reduzir os elevados níveis de ERK, causando diminuição na proliferação celular na glândula. WANG *et al.* (2018) recentemente demonstraram que a prática de exercício físico aeróbico aumenta a expressão de ERK e AMPK no fígado de camundongos, mas causa redução da via ERK naqueles diabéticos tipo 2, corroborando nossos dados. Assim, nossos resultados apontam que a obesidade e seus distúrbios metabólicos causam proliferação celular na próstata através da ativação da via ERK, mesmo em situação de carência androgênica e que o exercício físico é capaz de reverter tal efeito.

Naturalmente, em humanos e também em roedores, os hormônios estrógenos possuem papel crucial na manutenção da próstata e também no seu desenvolvimento. Além disso, o estrógeno tem papel duplo na próstata, podendo ser protetor contra tumores malignos ou promotor da carcinogênese (HORVARTH *et al.*, 2000; SHAABAN *et al.*, 2008). O ER $\alpha$  é amplamente expresso nas células do estroma, tem papel no crescimento e proliferação celular, implicando na carcinogênese. Por outro lado, o ER $\beta$  tem efeito protetor por dimerizar com ER $\alpha$  (WHEIHUA *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2008), inativando-o e inibindo a proliferação

celular, além de promover a apoptose. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, feito com dieta hiperlipídica de 20% e em ratos, mostrou que no período de 15 semanas do tratamento da dieta, a quantidade de ER $\beta$  expressa aumenta expressivamente (RIBEIRO *et al.* 2012), o que diverge com o resultado encontrado na presente investigação. Porém, nosso grupo também demonstrou que essa expressão de ER $\beta$  foi bastante reduzida quando os ratos foram tratados com a dieta por 30 semanas (SILVA *et al.*, 2015). Armandando um paralelo em nosso estudo presente, o aumento quantidade de gordura saturada da dieta de 20% para 40% pode ter antecipado esse efeito nos ER $\beta$ , diminuindo-os drasticamente já no início do tratamento, pulando etapas que foram observadas com a dieta menos hiperlipídica apenas em longo prazo. Assim, a diminuição da expressão de ER $\beta$  na próstata cria um ambiente desfavorável na próstata que reduz o seu efeito protetor no epitélio glandular. Desse modo, considerando o ambiente estimulante criado pela obesidade decorrente da dieta hiperlipídica (já citado anteriormente), a redução de papel protetor de ER na próstata pode ser crucial na promoção de doenças proliferativas na glândula. Assim como notado para o AR, o exercício físico também reverteu os efeitos da dieta hiperlipídica na expressão de ER $\beta$ , mostrando mais uma vez a influência benéfica dessa atividade na manutenção da homeostasia glândula.

A taxa morte celular no grupo com dieta normal e exercitado foi bastante elevada, porém não houve tanta mudança no peso da próstata em relação ao grupo sedentário. Tal fato deve ser ocorrido pelo balanço quase equivalente entre proliferação celular e morte celular. De fato, a proliferação celular foi maior em DNE do que em DNS, e tal grupo exibiu maior testosterona e maior conteúdo de ERK, que mesmo com redução de AR foi capaz de estimular a proliferação celular na próstata. Entretanto, embora a proliferação celular esteja aumentada nesse grupo, o estresse causado pelo exercício físico intenso dos animais também pode ter estimulado a morte celular. Tal efeito já foi mostrado por Teixeira *et. al* (2012) em seus experimentos, onde o exercício físico extenuante promoveu um aumento na taxa de apoptose

na próstata de ratos. Não podemos deixar de destacar que no presente estudo, os camundongos foram submetidos por treinos diários de natação somado com uma carga de até 80% do peso corporal, levando a um treino intenso, o que explicaria os nossos resultados. A dieta hiperlipídica, em geral, levou ao aumento das taxas de morte celular, no grupo sedentário, e podemos relacionar isso aos baixos níveis de testosterona, muito provavelmente decorrentes da maior aromatização do hormônio pela aromatase presente no abundante tecido adiposo. Além disso, a obesidade influencia no eixo hipotálamo-hipófise gonadal reduzindo a produção de testosterona (MATOS *et al.*, 2003). Sendo a testosterona um hormônio essencial a próstata, é esperado que a falta deste promova um quadro de morte celular devido a falta de sinalização para sobrevivência celular. Isso fica muito claro nos trabalhos clássicos sobre os efeitos da castração na próstata, já discutidos anteriormente (GÓES *et al.*, 2007, SINGER *et al.*, 2008). Dessa forma podemos inferir que o baixo peso prostático encontrado nesses grupos DH são decorrentes da maior apoptose desencadeada pelos reduzidos níveis de Testosterona. O exercício físico reduziu a apoptose mas não foi capaz de reverter todo o efeito da dieta hiperlipídica na próstata. Como a proliferação celular nesse grupo DHE foi a mais reduzida de todos os grupos, o peso da próstata também não foi restaurado pela atividade física no grupo da dieta hiperlipídica. Assim, nossos dados mostram o efeito indutor da apoptose da dieta hiperlipídica e obesidade na próstata de camundongos em decorrência da modulação dos níveis androgênicos e que o exercício físico sem associação com perda de peso não é capaz de reverter tal efeito atrófico na glândula.

## 5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a dieta de 40% de gordura saturada tem efeito negativo na estrutura da próstata de camundongos, atrofiando através da diminuição da sinalização androgênica e consequente apoptose. Aliado a isso, a dieta foi capaz de estimular

maior proliferação celular via aumento da ativação da via ERK1/2 e reduzir os níveis de ERβ. Todos esses dados apontam para um ambiente altamente estimulador de patologias proliferativas que podem acometer a próstata tais como hiperplasia benigna e câncer. Ainda, demonstramos pela primeira vez, que o exercício físico por si só tem efeito anabólico na glândula, mediados principalmente pela testosterona e seus receptores androgênicos, atrelado a dieta hiper lipídica foi parcialmente capaz de restaurar as alterações de atrofia, proliferação e sinalizações observadas na próstata. O exercício físico desgastante atrelado a dieta normal teve caráter maléfico, podendo causar injúrias na próstata se feita em longo prazo. Isso nos ressalta a importância da prática de exercício em conjunto com uma dieta balanceada e consequente perda de peso.

## 6. Considerações finais

A princípio, o projeto inicial tinha como objetivo fazer análise da expressão da proteína AKT na próstata dos grupos estudados, porém devido a quantidade insuficiente de reagentes e a demora da liberação destes na alfândega, foi decidido pela troca de análise para a proteína ERK/pERK que já tínhamos disponível em nosso laboratório. Tal substituição não prejudicou em nada as nossas análises, uma vez que a ERK também faz parte da via de sobrevivência/proliferação celular, trazendo resultados suficientes para a discussão de nossos dados.

## 7. Referências bibliográficas

ALMEIDA, L. M. et al.. Estratégias e desafios da gestão da atenção primária à saúde no controle e prevenção da obesidade. **Revista gestão & saúde**, v. 8, n. 1, p. 114-139, 2017.

ANDREAZZI, A.E., et al.. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, vol.201, pp. 351–359. 2009.

ANTONIOLI, E. Modulação hormonal do comportamento das células musculares lisas prostáticas in vitro e in vivo. 77f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas. 2003.

BERG, J. M; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L. Metabolismo dos ácidos graxos. In: BERG, J.M; TYMOCZKO, J. L; STRYER, L.. **Bioquímica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. Cap. 22, p. 643.

BILLIS, A. Sistema Genital Masculino. In: BOGLIOLO, L. Patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.18. p.514.

BIRKELAND, K I et al. Level of sex hormone-binding globulin is positively correlated with insulin sensitivity in men with type 2 diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.275-278, fev. 1993.

BLUMENKRANTZ, M. Obesity: the world's metabolic disorder . Beverly Hills, 1997. In: FRANCISCHI, R.P.P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.17-28, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v13n1/7919.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

BRASIL (Ministério da Saúde). Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância de doenças e agravos não transmissíveis e promoção da Saúde. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2016.

CARLUCCI, E.M.S et al. Obesidade e sedentarismo:: fatores de risco para doença cardiovascular. **Com. Ciências da Saúde**, Maringá, v. 4, n. 24, p.375-384, set. 2013. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/ccs/obesidade\\_sedentarismo\\_fatores\\_risco\\_cardiovascular.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/ccs/obesidade_sedentarismo_fatores_risco_cardiovascular.pdf)>. Acesso em: 09 abr. 2016

CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.360-367, abr. 2006. FapUNIFESP. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302006000200022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302006000200022)>. Acesso em: 09 abr. 2016.

CHO H., THORVALDSEN J.L., CHU Q, FENG F., BIRNBAUM M.J. Akt1/PKB $\alpha$  is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38349-52.

COHEN, P.G.. The hypogonadal–obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone–estradiol shunt – a major factor in the genesis of morbid obesity. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.49-51, jan. 1999.

COREY, E. et al. Inhibition of Androgen-independent Growth of Prostate Cancer Xenografts by 17 $\beta$ -Estradiol. **Clinical Cancer Research**, Washington, v. 8, n. 4, p.1003-1007, abr. 2002.

CORRÊA, R. V. et al. Insensibilidade completa aos andrógenos em pacientes brasileiras causada pela mutação P766A no gene do receptor androgênico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.98-102, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v49n1/a13v49n1.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

CUNHA G et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev*. 1987;8:338-62.

CUNHA, G. R. et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 107, n. 1, p.1-10, 13 ago. 2003.

DAMIÃO, R. et al. Câncer de próstata. **Revista Hupe**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 14, p.80-86, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/ojs/index.php/revistahupe/article/view/17931/13463>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

DAVEY, R. A; GROSSMANN, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **Clin Biochem Rev**, Heidelberg, v. 1, n. 37, p.3-15, 2016.

DESPRÉS, J.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7121, p.881-887, dez. 2006.

DEY, P. et al. Estrogen Receptors  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 Have Opposing Roles in Regulating Proliferation and Bone Metastasis Genes in the Prostate Cancer Cell Line PC3. **Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.1991-2003, dez. 2012.

DUNGER, D.B.; AHMED, M.L.; ONG, K.K. Effects of obesity on growth and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(3): 375-90. 2005.

DYER, R.G. Traditional treatment of obesity: does it work? *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, London, v.8, n.3, p.661-688, 1994. In: FRANCISCHI, Rachel Pamfilio Prado de et al. *Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. Revista de Nutrição*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.17-28, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v13n1/7919.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2016.

ENGLISH, Hugh F.; SANTEN, Richard J.; DRAGO, Joseph R.. Cellular response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate: Autoradiography and morphometric analysis. *The Prostate*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.41-51, 1985.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-Controlled Swimming Exercise Training Induces Cardiac Hypertrophy in Mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:1751-1759. 2003

FERNANDEZ-TWINN, D. S. et al. The Programming of Cardiac Hypertrophy in the Offspring by Maternal Obesity Is Associated with Hyperinsulinemia, AKT, ERK, and mTOR Activation. *Endocrinology*, [s.l.], v. 153, n. 12, p.5961-5971, dez. 2012

FRANÇA, S. C. A. et al. Resposta divergente da testosterona e do cortisol séricos em atletas masculinos após uma corrida de maratona. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [s.l.], v. 50, n. 6, p.1082-1087, dez. 2006.

FRANCISCHI, R.P.P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Revista de Nutrição*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.17-28, abr. 2000.

FRENCH, Sa; HARNACK, L; JEFFERY, Rw. Fast food restaurant use among women in the Pound of Prevention study: dietary, behavioral and demographic correlates. *International Journal Of Obesity*, [s.l.], v. 24, n. 10, p.1353-1359, out. 2000.

GÓES, R. M. et al. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron*, [s.l.], v. 38, n. 3, p.231-236, abr. 2007.

GOMES, R. et al. A Prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 235-246, jan./fev. 2008.

HAMMARSTEN, J.; HOGSTEDT, B. Hyperinsulinaemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 39 (2 ): 151-8. 2001.

HAYES, B. D. et al. Exercise and Prostate Cancer: Evidence and Proposed Mechanisms for Disease Modification. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 25, n. 9, p.1281-1288, 7 jul. 2016. American Association for Cancer Research (AACR).

HOANG, D.T. et al. Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms driving prostate cancer progression: Opportunities for therapeutic targeting from multiple angles. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.3724-3745, 11 out. 2016. Impact Journals, LLC.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 126p. 2016

KENFIELD, S. A. et al. Physical Activity and Survival After Prostate Cancer Diagnosis in the Health Professionals Follow-Up Study. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.726-732, 20 fev. 2011. American Society of Clinical Oncology (ASCO)

KUIPER, G G et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci Usa**, Huddinge (suécia), v. 12, n. 93, p.5925-5830, jun. 1996.

LEE C, KOZLOWSKI JM, GRAYHACK JT. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. **Prostate**. 1997;31:131-8.

LIMA, R.B.; HAHN, G.V.. Câncer de próstata e sua relação com a sexualidade masculina.. **Revista Destaques Acadêmicos**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.70-86, 30 out. 2016. Editora Univates

MATOS, A. F. G.; MOREIRA, R. O.; GUEDES, E. P. Aspectos neuroendócrinos da síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 4, p. 410-21, 2003.

MARIEB, Elaine N.; HOEHN, Katja. Anatomia e fisiologia. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009

MARTINS, L.C.X. Obesidade e atividade física: uma questão de promoção da saúde. **Revista de Educação Física**, Brasil, v. 4, n. 84, p.300-305, dez. 2017

MAYER-DAVIS, E. J.. Intensity and Amount of Physical Activity in Relation to Insulin Sensitivity. **Jama**, [s.l.], v. 279, n. 9, p.669-674, 4 mar. 1998. American Medical Association (AMA)

MCNEAL, J.E. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate**. v.2, n.1, p.:35-49. 1981

MISTRY, T. et al. Obesity and Prostate Cancer: A Role for Adipokines. **European Urology**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.46-53, jul. 2007.

MIYAZAKI, Toshiaki; BUB, Jeffrey D.; IWAMOTO, Yoshiki. C-Jun NH2-terminal kinase mediates leptin-stimulated androgen-independent prostate cancer cell proliferation via signal transducer and activator of transcription 3 and Akt. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1782, n. 10, p.593-604, out. 2008.

MULLER, A.P. et al. Different Effect of High Fat Diet and Physical Exercise in the Hippocampal Signaling. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.880-885, 22 nov. 2007

NAVARRO, A M.; MARCHINI, J.S. Uso de medidas antropométricas para estimar gordura corporal em adultos. *Nutrire: rev .Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. v.19/20, p.31-47, 2000.

OMOTO, Y.; IWASE, H.. Clinical significance of estrogen receptor  $\beta$  in breast and prostate cancer from biological aspects. **Cancer Science**, [s.l.], v. 106, n. 4, p.337-343, 9 mar. 2015.

OMOTO, Y.. Estrogen Receptor- $\alpha$  Signaling in Growth of the Ventral Prostate: Comparison of Neonatal Growth and Postcastration Regrowth. **Endocrinology**, [s.l.], v. 149, n. 9, p.4421-4427, set. 2008.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P., LANCHETA JR., **Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina**. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. vol.47, n.2, pp.111-127. 2003

PRINS, G.S. et al. Estrogen Imprinting of the Developing Prostate Gland Is Mediated through Stromal Estrogen Receptor  $\alpha$ . **Cancer Research**, Illinois, v. 16, n. 61, p.6089-6097, ago. 2001.

RECINE, Elisabetta; RADAELLI, Patrícia. **Obesidade e Desnutrição**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/obesidade\\_desnutricao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/obesidade_desnutricao.pdf)>. Acesso em: 09 abr. 2016.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de próstata e testosterona: riscos e controvérsias. *Arquivo Brasileiro de endocrinologia metabólica*, v. 53 n. 8. Porto Alegre, 2009

RIBEIRO DL, 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.** 349(2):577-88. 2012

RIBEIRO DL, et al. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. **J Androl.** 33(5):854-65. 2012

ROCHEL SS, et al.. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. **Annat Rec**, 290:1233-1247. 2007

ROBERTS, J.T; ESSENHIGH, D.M. Adenocarcinoma of prostate in 40-yearold body-builder. **Lancet** 1986; v.2 (8509):742.

ROY-BURMAN, P. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine Related Cancer**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.225-254, 1 jun. 2004.

SALVE, M.G.C. Obesidade e Peso Corporal:: riscos e conseqüências. **Movimento & Percepção**, Espirito Santo de Pinhal, v. 6, n. 8, p.29-48, jun. 2006.

SAMPAIO, L.R.; FIGUEIREDO, V.C. Correlação entre o índice de massa corporal e os indicadores antropométricos de distribuição de gordura corporal em adultos e idosos. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.53-61, fev. 2005.

SCARANO, W et al. Tissue remodeling in Guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.778-784, set. 2005

SCARANO, W.R et al. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.25-37, 12 nov. 2007.

SCHALKEN, Jack. Androgen Receptor Mediated Growth of Prostate (Cancer). **European Urology Supplements**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.4-11, nov. 2005.

SHAPPELL, S. B. et al. 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. **The Journal Of Urology**, [s.l.], v. 172, n. 2, p.809-810, ago. 2004.

SHARIFI, N.. Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. **Jama**, [s.l.], v. 294, n. 2, p.238-244, 13 jul. 2005.

SILVA SA, GOBBO MG, PINTO-FOCHI ME, RAFACHO A, TABOGA SR, ALMEIDA EA, GÓES RM, RIBEIRO DL.. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP- 9 and VEGF. **Int J Exp Pathol**. 96(1):21-30. 2014

SINGER, Eric et al. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.211-228, 17 jan. 2008.

SUBA, Z.; UJPAL, M. Correlation of insulin resistance and neoplasms. **Magy Onkol**. 50:127-35. 2007.

SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal Of Receptors And Signal Transduction**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.600-604, 22 jun. 2015

TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S,L; GÓES, R.M. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 53, n. 8, p.946-955, nov. 2009

TAN, M.E et al. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.3-23, 9 jun. 2014.

TEIXEIRA, G. R. et al. Physical exercise on the rat ventral prostate: Steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. **Scandinavian Journal Of Medicine & Science In Sports**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.86-92, 26 jul. 2012.

TIMMS, BG. 2008. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**, 76:565-577

TINDALL, D; LONERGAN, P. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **Journal Of Carcinogenesis**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.20-30, 2011.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia. 8. ed. Porto Alegre, 2012.

TORRE, L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.87-108, 4 fev. 2015.

WILSON CM; McPHAUL MJ, A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91(4):1234–8.

WISSE, B. E.. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.2792-2800, 1 nov. 2004

ZEIGLER-JOHNSON, C. et al. Relationship of obesity, Androgen receptor genotypes and biochemical failure after radical prostatectomy. **The Prostate**, [s.l.], v. 72, n. 9, p.984-990, 24 out. 2011.

ZUGASTI, O. et al. Raf-MEK-Erk Cascade in Anoikis Is Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 21, n. 19, p.6706-6717, 1 out. 2001.