

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia – UFRGS

Modelos Experimentais para a
Análise da proteína AKT/PKB em Tecidos de Hiperplasia Prostática
Benigna tratados e não tratados com Insulina e IGF-I.

Patrícia Borba Martiny

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia - UFRGS

Dissertação de Mestrado

Modelos Experimentais para a
Análise da proteína AKT/PKB em Tecidos de Hiperplasia Prostática Benigna
tratados e não tratados com Insulina e IGF-I.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
PPG Ciências Biológicas: Fisiologia como pré-
requisito obrigatório para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

Patrícia Borba Martiny

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, 2012

Dedico este trabalho a toda a minha família e amigos que deram apoio incondicional.

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia; pelo ensino de qualidade e excelência.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum da Silva, minha orientadora, por ter me aceitado na realização desse projeto, pelo exemplo não só como pesquisadora, mas como mulher, e mãe. Pelo constante estímulo, carinho, dedicação, principalmente, pela confiança e amizade.

Ao serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por permitir a realização desse projeto, em especial ao Dr. Brasil Silva Neto e Dr. Milton Berger, pelo grande auxílio prestado, fundamental para a realização deste projeto.

À Prof^a. Dr^a. Maria Flávia Marques Ribeiro, por ter disponibilizado além do seu laboratório em alguns experimentos, a sua paciência e seus conhecimentos.

Agradecimento especial ao Dr. Vanderlei Biolchi, pela amizade e profissionalismo, as quais foram fundamentais pela realização do mestrado.

As amigas, Caroline Hillebrand, Dr^a. Gisele Branchini e Dr^a Lolita Schneider Pizzolato pelo carinho e ajuda emocional no laboratório que foram essenciais.

Aos colegas de laboratório, Ana Paula Santin, Dr^a. Anita Pimentel Pereira, Amanda de Barros Machado, Carlos Flores, Diego Alcoba, Fernanda Seibel, Gabriela

Sant'Anna e Gustavo Ferreira e Joelson Tomedi pela amizade e convívio durante a realização desse trabalho.

Aos colegas de Mestrado, Aline Gonçalves, Bruno Dutra Arbo, Bruno Berger, Christiano Spindler, Camila Ludke Rossetti, Cláudia Marques, Dhâniel Baraldi, Gustavo Escott, Karine Bertoldi e José Pedro Estrella, tornaram o mestrado muito mais divertido e especial pela amizade que levarei para sempre.

Ao colega Bruno Dutra Arbo pela amizade e a ajuda fundamental nos experimentos.

As colegas Aline Gonçalves, Camila Ludke Rossetti, pela amizade e os conselhos.

Aos meus amigos de convívio pessoal, sempre presentes durante o período do mestrado.

Ao PROPG_PROF, FIPE-HCPA e CNPq, pelo financiamento do projeto.

E especialmente meus pais, Neuza Borba Martiny e Raul Avelino Martiny pelo amor incondicional, carinho, ensinamentos e empenho em sempre me proporcionarem educação com ensino de qualidade. Tenho muito orgulho de ter vocês como meus pais.

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	10
Lista de Abreviaturas	11
Lista de Figuras	13
Introdução	15
Hiperplasia Prostática Benigna (HBP).....	16
Receptor de androgênios (AR)	17
Síndrome Metabólica	19
Diabetes Mellitus.....	21
Próstata e Diabetes	23
Receptor de Insulina (IR)	24
Receptor do Fator do Crescimento Tipo Insulina (IGF-R).....	26
Via de sinalização PI3K/AKT.....	28
Objetivo	30
Objetivos específicos.....	30
Materiais e Métodos	31
Delineamento do estudo	31
Amostras.....	31
Cálculo Tamanho da Amostra	31
Critérios de Inclusão	32
Considerações Éticas	32
Exame Anatomopatológico	32
Dados de Hipertensão e Diabetes	32
Avaliação de Peso, Altura e Circunferência Abdominal	33
Dosagem de Insulina, Glicose e Antígeno Prostático Específico (PSA)	33
Coleta das Amostras Teciduais.....	33
Metodologias para estimulação de tecido	33
Metodologia 1. Tecido fragmentado.....	34
Extração de Proteínas.....	35
Metodologia 2. Tecido Dissociado	35

Extração de Proteínas.....	36
Análise da concentração de proteínas	37
Western Blot.....	37
Análise Estatística.....	39
Locais de Realização do Projeto	39
Fontes de Financiamento	40
Resultados	41
Análise da Expressão Protéica.....	42
Resultados da Metodologia 1.....	42
Resultados da Metodologia 2.....	46
Correlações.....	54
Discussão	55
Conclusões.....	60
Anexo 1.....	61
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	61
Referências.....	64

Resumo

Introdução. A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma condição prevalente na senescência masculina, caracterizada pelo aumento não maligno das células do tecido epitelial e principalmente estromal da próstata. Já foi demonstrado que a ligação dos androgênios ao seu receptor (AR) tem papel vital para o desenvolvimento prostático, mantendo não só a função tecidual, mas também sua possível contribuição para a patogênese de doenças prostáticas.

Alguns estudos têm sugerido que o aumento dos hormônios IGF e Insulina circulantes podem afetar direta ou indiretamente a sinalização molecular promovendo o crescimento prostático. Uma proteína importante, componente da via de sinalização dos receptores de Insulina e IGF, é a Akt/PKB. Esta proteína está relacionada com a regulação do metabolismo, apoptose e a proliferação celular.

Entretanto, os eventos moleculares que levam a interação dos receptores Insulina e IGF com o Receptor de Androgênios (AR) ainda foram bem estabelecidos.

Objetivos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma técnica de estimulação pela insulina e IGF-I em tecido prostático e em células provenientes de pacientes com HPB, avaliar a fosforilação da Akt/PKB, e a fosforilação do AR.

Materiais e Métodos. Participaram deste estudo 15 pacientes com HPB oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para análise das proteínas Akt/PKB e AR. A análise proteica foi realizada a partir da técnica de western blot. Os protocolos de estudo e os termos de consentimentos foram aprovados pelo comitê de ética local e nacional.

Resultados. Foram realizadas duas técnicas de estimulação, uma com insulina em fatias de tecido de HPB e outra com insulina e IGF-I em suspensão celular de HPB. Ocorreu um aumento na fosforilação da proteína Akt/PKB nas células de HPB estimuladas com insulina ($P=0,0113$) quando comparadas com a condição controle pelo tempo de 10 minutos. Foi visto um aumento na porcentagem da fosforilação do AR quando as células foram estimuladas com insulina.

Conclusão. É possível avaliar a via de ativação da Akt/PKB em um modelo de células prostáticas derivadas de Hiperplasia Prostática Benigna sob estímulo da Insulina por 10 minutos. Neste modelo, também é possível avaliar a fosforilação do Receptor de Androgênios. A padronização da técnica de estimulação *in vitro* poderá ser útil para novas pesquisas. Estes achados podem vir a elucidar um possível mecanismo intracelular de interação entre a transdução do sinal de Insulina e IGF-I e a fosforilação do Receptor de Androgênios, e assim, possivelmente contribuir para o entendimento da proliferação celular na HPB.

Abstract

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a prevalent disease characterized by high levels of prostate cell proliferation. The interaction of androgen hormone with its receptor (AR) has a central role in the development of prostate growth, maintaining the tissue function as the pathogenesis of the prostate disease. Increased levels of circulating insulin and IGF can directly and/or indirectly affect different signaling pathways and promote prostatic growth. The protein AKT/PKB, member of the insulin/IGF pathway, participates in metabolism, apoptosis and cell proliferation regulation. The molecular events related to the interaction of IGF-I and insulin receptor in BPH have not been defined yet. The aim of this study were to establish an *in vitro* protocol with insulin or IGF-I stimulation in prostatic tissue from BPH and to evaluate both Akt and AR phosphorylation. Samples were obtained from 15 BPH patients and the Akt and AR proteins were analyzed by western blot. Slices of prostatic tissues from BPH patients were stimulated with insulin. Fragmented and dissociated prostatic tissues were stimulated with insulin or IGF-I. BPH cells stimulated with insulin for 10 minutes showed higher percentage of AR and Akt phosphorylation in relation to control ($P=0.0113$). These findings may suggest that insulin and IGF-I signaling pathways may contribute to distinct signals to common downstream components in response to both insulin and IGF-I for BPH development.

Our study has established insulin or IGF-I stimulation of BPH cells and can contribute to elucidate a possible intracellular interaction mechanism of AR phosphorylation.

Lista de Abreviaturas

AR	Receptor de Androgênios
p-AR	Receptor de Androgênio fosforilado
AKT	Serina-Treonina Kinase B/Proteína Kinase B
p-Akt	Serina-Treonina Kinase B/Proteína Kinase B fosforilada
CaP	Câncer de Próstata
DHEA	Dihidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DM	Diabetes Mellitus
DM-1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECL	Quimioluminescência Realçada
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGIR	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High-density lipoprotein</i>)
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HR	Receptores Híbridos
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>heat shock proteins</i>)
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF-I	Hormônio do Crescimento Semelhante a Insulina tipo I (<i>Insulin Growth Factor –I</i>)
IGF- II	Hormônio do Crescimento Semelhante a Insulina tipo II (<i>Insulin Growth Factor –II</i>)
IGF-IR	Receptor de IGF-I
IGF-IIR	Receptor de IGF-II
IGFBP	Proteína Ligadora de IGF (<i>IGF Binding Protein</i>)
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IR	Receptor de Insulina
IR-A	Receptor de Insulina isoforma A
IR-B	Receptor de Insulina isoforma B
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina -1 (<i>Insulin Receptor Substrate-1</i>)
LNCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
PI3K	<i>Phosfoinositol 3 Kinase</i>
PSA	Antígeno Prostático Específico

Lista de Figuras

Figura 1.	Principal via de ativação pelo receptor de insulina (IR)
Figura 2.	Ação da insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada em condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração de 10^{-7} M (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n=11; I5, n= 12).
Figura 3.	Ação da insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada em condição controle (C10) e estimulado com Insulina na concentração de 10^{-7} M (I10) por 10 min. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10, n=10; I10, n=11).
Figura 4.	Ação de alta concentração de insulina na Fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático em pacientes com HPB. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração $1,3 \times 10^{-6}$ M (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n=11; [I5], n= 4).
Figura 5.	Ação de alta concentração de insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada na condição controle (C10) e estimulado com Insulina na concentração $1,3 \times 10^{-6}$ M ([I10]). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP), unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10, n=10; [I10], n=6).
Figura 6.	Porcentagem da fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático em pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.
Figura 7.	Porcentagem da fosforilação da AKT tecido prostático em pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina $1,3 \times 10^{-6}$ M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.
Figura 8.	Ação da Insulina na fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração 10^{-7} M por 5 minutos (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n= 7; I5, n= 9).
Figura 9.	Ação da Insulina fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C10) e estimulada com Insulina na concentração 10^{-7} M por 10 minutos (I10). Dados apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($*P=0.0113$)

	(C10, n= 9; I10, n= 10).
Figura 10.	Porcentagem da fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas estimuladas com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.
Figura 11.	Fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autoradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada na condição controle (C5) e estimulado com IGF-I na concentração $100\text{ng}/\mu\text{L}$ por 5 minutos (IGF5); representada como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n=7; IGF5, n=4).
Figura 12.	Fosforilação da AKT avaliada na condição controle por 10 minutos (C10) e estimulado com IGF-I na concentração $100\text{ng}/\mu\text{L}$ por 10 minutos (IGF10); representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10, n= 9; IGF10, n= 3).
Figura 13.	Fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas provenientes de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica do AR basal e do AR fosforilado. B) Representação gráfica da relação AR fosforilado/AR basal avaliado na condição controle por 5 minutos (C5-AR) e estimulado com Insulina na concentração 10^{-7} M por 5 minutos (I5-AR); representada como média \pm erro padrão, unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5-AR, n=3; I5-AR, n=4).
Figura 14.	Fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas provenientes de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica do AR basal e do AR fosforilado. B) Representação gráfica da fosforilação do AR avaliado na condição controle por 10 minutos (C10-AR) e estimulado com Insulina na concentração 10^{-7} M por 10 minutos (I10-AR); representada como média \pm erro padrão, unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10-AR, n=4; I10-AR, n= 2).
Figura 15.	Porcentagem da fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas de pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Grupo controle (C5 e C10) considerado 100%. Dados apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.

Introdução

As doenças da próstata atingem em média 80% dos homens acima dos 50 anos. As formas mais prevalentes do crescimento anormal da próstata são hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP) (Ho *et al.* 2011; AUA 2012).

Acredita-se que os hormônios androgênicos sejam os principais responsáveis pela proliferação das células prostáticas. No entanto, o tratamento medicamentoso, anti-androgênicos, nem sempre consegue conter o crescimento da próstata, pois muitos tumores reincidem e pode ocorrer a progressão independente de androgênicos (Wu *et al.* 2006; Lee 2009).

O surgimento e progressão destes tumores, geralmente, são o resultado de um aumento da proliferação celular associado com a inibição da morte celular programada (apoptose) (Berry *et al.* 2008). Muitos autores sugerem que a ativação dos receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin like growth factor* - IGFs-R) e do receptor de insulina (IR), podem alterar a fosforilação do receptor de androgênio (AR), possivelmente levando a um crescimento celular pela hiperinsulinemia, mas a maneira como isto ocorre necessita de mais estudos (Chan *et al.* 1998; Ozkan 2011; Vikram *et al.* 2011).

A elucidação de uma possível via de ativação do AR é de grande importância, não apenas pela mortalidade associada com o CaP, mas também pela morbidade causada pelas formas de terapia que têm impacto diretamente na qualidade de vida do paciente.

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma anormalidade proliferativa caracterizada pelo aumento não maligno das células do tecido epitelial e principalmente estromal da próstata (Stamatiou *et al.* 2009; Ho *et al.* 2011). A interação entre as células epiteliais e estromais parece ser muito importante para a proliferação celular e a tumorigênese, principalmente pela via de sinalização parácrina existente neste tecido (Russell *et al.* 2003). Diferentemente do CaP que geralmente ocorre na zona periférica, a HPB geralmente ocorre na zona de transição (AUA 2012). Os pacientes com HPB apresentam manifestações clínicas, que podem ser divididas como obstrutivas (esforço miccional, hesitação, jato fraco e interrompido, esvaziamento incompleto da bexiga) e irritativas (urgência, polaciúria, nictúria, capacidade vesical reduzida, incontinência de urgência) (Srougi 2008).

Relacionada com a idade e muito frequente no período da senescência (Silva Neto *et al.* 2008). Dados da Associação Americana de Urologia confirmam que aproximadamente 50% dos homens entre idades de 51 e 60 anos e 90% dos homens acima de 80 anos desenvolvem HPB (Rizzo *et al.* 2005; Ho *et al.* 2011; AUA 2012) nesta idade, 23% poderá desenvolver câncer de próstata (CaP) (Rizzo *et al.* 2005). Estes dados corroboram com os índices descritos para o Brasil (Suaid *et al.* 2003).

O aumento da incidência de HPB em pacientes com resistência a insulina tem despertado a atenção de pesquisadores, principalmente pelo efeito da insulina no crescimento celular (Vikram *et al.* 2011). Alguns fatores de risco têm sido descritos como sinérgicos para o desenvolvimento do CaP, como: etnia, histórico familiar e componentes da síndrome metabólica (Mackinnon *et al.* 2009; INCA 2011), no entanto,

dados referentes ao envolvimento de eventos metabólicos e o desenvolvimento de HPB ainda são raros (Dahle *et al.* 2002; Abdollah *et al.* 2011; Vikram *et al.* 2011).

O impacto financeiro desta condição no Brasil é demonstrado pelos custos anuais necessários para o tratamento medicamentoso da HPB, que ultrapassa de 1,9 bilhões de dólares e o custo do tratamento cirúrgico pelo Sistema Único de Saúde é de mais de 350 milhões de dólares anuais (Suaid *et al.* 2003).

A patogênese da formação tumoral está intimamente associada à ação dos hormônios esteróides (Silva Neto *et al.* 2008). No entanto, a ação dos hormônios peptídicos nesse processo é bastante discutida, mas pouco conhecida (Lee *et al.* 2003; Edwards *et al.* 2005).

Receptor de androgênios (AR)

O gene AR humano está localizado no cromossomo X, na posição q11-12, contém 8 exons (Lubahn *et al.* 1988; Gelmann 2002) e um tamanho aproximado de 90kb (Chamberlain *et al.* 1994), sendo um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares (Zhou *et al.* 1994). Porém o AR difere-se da maioria dos outros receptores por ter dois ligantes endógenos, a testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) (Agoulnik *et al.* 2008). Sem o seu ligante, o AR está associado no citoplasma a proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*- HSPs), proteínas do citoesqueleto e outras chaperonas (Bennett *et al.* 2010).

A enzima 5 α -redutase converte testosterona em DHT, um androgênio ativo, com maior afinidade pelo receptor de androgênios. A DHT se liga ao AR no citosol promovendo o recrutamento de proteínas cinase, fosforilação de resíduos de serina e levando a uma translocação nuclear do receptor, ativando a transcrição. Esta

fosforilação protege o AR de degradação proteolítica e estabiliza os homodímeros do AR (Edwards *et al.* 2005; Agoulnik *et al.* 2008; Koochekpour 2010).

Já foram descritos alguns sítios de fosforilação do AR que incluem as serinas 16, 81, 94, 256, 213, 308, 424, 650 e 791. Todos estes sítios fosforilam na presença de androgênios, com exceção da serina 94, que é constitutivamente fosforilada (Gioeli *et al.* 2002; Taneja *et al.* 2005; Ward *et al.* 2009).

A interação da DHT com o AR e seu subsequente complexo de dimerização leva a respostas androgênicas no elemento responsivo do DNA na próstata, promovendo a transcrição de genes que resultam na produção de proteínas importantes na regulação da morfogênese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática (Wu *et al.* 2006; Agoulnik *et al.* 2008; Nicholson *et al.* 2011).

Isto demonstra o papel vital dos androgênios para o desenvolvimento prostático, mantendo não só a função tecidual, mas também sua possível contribuição para a patogênese de doenças prostáticas (Berry *et al.* 2008).

Aproximadamente de 80-90% dos tumores primários de próstata são estritamente dependentes da ação androgênica para o crescimento e desenvolvimento tumoral (Gelman 2002). A via de sinalização do receptor de androgênio é crucial para o desenvolvimento e progressão do CaP e da HPB (Holzbeierlein *et al.* 2004), sendo esta estimulação essencial para o crescimento e resistência a apoptose em aproximadamente 70% dos CaP (Pandini *et al.* 2005). Contudo, a resposta aos androgênios na HPB é bifásica: enquanto doses maiores que níveis nanomolares (10^{-9} M) exercem um efeito antiproliferativo, androgênios em doses menores que níveis nanomolares estimulam o crescimento celular, sendo que a proliferação cessa com a retirada do estímulo. (Brum *et al.* 2003; Chatterjee 2003).

Síndrome Metabólica

Os hábitos alimentares e o estilo de vida têm papel fundamental para o desenvolvimento e a morbidade das doenças que constituem a síndrome metabólica como obesidade central, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina.

A etiologia da síndrome metabólica é desconhecida, o que se sabe é que fatores genéticos, ambientais (como sedentarismo e o excesso de calorias na dieta) e alterações metabólicas devidas ao excesso de gordura abdominal (central) têm relação com a síndrome (Lopes 2007; Abdollah *et al.* 2011).

Algumas definições têm sido usadas para avaliar os pacientes portadores da síndrome. Em 1999, foi sugerido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma definição baseada em dados clínicos e laboratoriais que podem ser aferidos com relativa facilidade (glicemia de jejum, resistência à ação da insulina, pressão arterial, obesidade central, relação cintura quadril, índice de massa corporal (IMC) (Quadro 2), triglicérides ou HDL e microalbuminúria). Já em 2001, o NCEP-ATP-III (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel-III*) propôs uma série de critérios semelhantes, porém mais simples de serem avaliados, os quais incluem: glicemia de jejum, pressão arterial, circunferência abdominal, triglicérides e HDL (Lopes 2007). Para o paciente ser portador da síndrome, é necessário ter três alterações das cinco (Quadro 1) (SBC 2005; IDF 2006; Lopes 2007). As mais utilizadas são as propostas pela NCEP-ATP-III e pela IDF (*International Diabetes Federation*), que consideram como fator principal a obesidade central mensurada pela circunferência da cintura (SBC 2005) (Abdollah *et al.* 2011). Por outro lado, a OMS e a EGIR (*European Group for the Study of Insulin Resistance*) focam principalmente na resistência a insulina.

A única diferença da NCEP-ATP-III para a definição da IDF, é que esta última considera os valores da medida da circunferência abdominal baseado em diferentes grupos étnicos (IDF 2006). Como no Brasil não existem dados específicos em relação à circunferência da cintura para a nossa população, na definição da IDF foi sugerido o uso dos mesmos valores estipulados para os asiáticos do sul, ou seja, 90 cm para homens e 80 cm para mulheres (SBC 2005; IDF 2006; Lopes 2007).

O aumento na circunferência abdominal é relacionado com a HPB por ocasionar mudanças metabólicas e endócrinas (Dahle *et al.* 2002; Abdollah *et al.* 2011; Vikram *et al.* 2011).

Entretanto, por mais que a síndrome metabólica possa vir a predispor pacientes a um maior risco de HPB (Abdollah *et al.* 2011), devemos ter cuidado ao relacionarmos estas duas condições, principalmente por não haver um consenso na definição da síndrome metabólica e também pelo perfil genético, nutricional e ambiental das diferentes populações.

Quadro 1. Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III

Componentes	Níveis
Circunferência Abdominal *	
Homens	> 90cm
Mulheres	> 80cm
Triglicerídeos	≥ 150mg/dL
HDL Colesterol	
Homens	< 40mg/dL
Mulheres	< 50mg/dL
Pressão Arterial	≥ 130mmHg ≥ 85mmHg
Glicemia de Jejum	≥110mg/dL

*Valores definidos pela IDF

Quadro 2. Classificação Internacional de baixo peso, sobrepeso e obesidade relacionado com o índice de massa corpórea (IMC).

Classificação	IMC (kg/m ²)
Baixo Peso	< 18.50
Normal	18.50 – 24.99
Sobrepeso	≥ 25.00
Obesidade	≥ 30.00

*Adaptado OMS, 1995

Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Como já descrito pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (SBD 2011).

Quando os tecidos periféricos se tornam resistentes a ação metabólica da insulina, não há necessariamente uma elevação dos níveis de glicose circulante, pois as células betas do pâncreas têm uma capacidade muito grande de aumentar a produção e a secreção de insulina, mantendo por um longo tempo uma situação metabólica de hiperinsulinismo crônico associado à normoglicemia (Lopes 2007).

Portanto, o desenvolvimento da hiperglicemia em pacientes insulino-resistentes é prevenido pelo aumento compensatório dos níveis de insulina, estimulando efeitos no crescimento celular (McKeehan *et al.* 1984).

A hiperinsulinemia que resulta do estado crônico de resistência metabólica à insulina também pode ter um papel importante no estímulo de vias de sinalização celular que continuam a responder a altos níveis do hormônio. Porém, após muito tempo de compensação à má resposta da insulina, o pâncreas entra em exaustão e começa a produzir insulina de forma insuficiente (insulinopenia, diabetes) (Lopes 2007).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Alberti *et al.* 1998) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) (2003) inclui quatro classes clínicas, onde as mais prevalentes são: DM tipo 1 e DM tipo 2.

O DM tipo 1 (DM-1), forma presente em 5%-10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. Na maioria dos casos essa destruição das células beta é mediada por auto-imunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo auto-imune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM-1, que corresponde à minoria dos casos (SBD 2011).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) é a forma presente em 90%-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e a cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições como infecções. O DM-2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado (SBD 2011).

Esta resistência a insulina pode estar associada a mutações no gene do receptor de insulina, estando presente tanto no período neonatal quanto na maioridade, acarretando resistência à insulina e ocasionando efeitos como hiperinsulinemia e hiperandrogenismo. A supressão da secreção de insulina em obesos, indivíduos insulino-resistentes, resultam no aumento da sensibilidade à insulina (Kronenberg 2008).

A sinalização da insulina se inicia através da ligação do hormônio em seu receptor, iniciando os eventos de fosforilação e desfosforilação, geração de segundos

mensageiros, interações proteínas-proteínas que resultam em diversos eventos metabólicos em vários tecidos. Estes eventos são finalizados pela internalização do receptor e desfosforilação por fosfatases de tirosina (Kronenberg 2008).

A cada ano, 7 milhões de pessoas desenvolvem diabetes, o aumento mais significativo é no DM-2, que tem aparecido em populações as quais têm maiores modificações em seu estilo de vida, o que demonstra que estas mudanças são de grande importância para reverter a epidemia global a qual esta doença ocasiona (IDF 2011).

Indivíduos com DM-2 geram de duas a cinco vezes mais custos médicos quando comparadas a pessoas sem esta doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que mais de 15% do orçamento anual de saúde é gasto em doenças relacionadas à diabetes (IDF 2011).

Próstata e Diabetes

Burke e Griffin foram os primeiros a hipotetizar uma associação entre diabetes mellitus (DM) e HBP, observando a alta prevalência de DM em homens que realizaram prostatectomia quando comparado à população masculina em geral (Bourke *et al.* 1966). Hammarsten e colaboradores em 1998 resgataram o interesse de comparar esta associação, e demonstraram que pacientes com sintomas no trato urinário inferior (*low urinary tract symptoms*- LUTs) e DM-2 têm um volume prostático muito maior do que pacientes com LUTs sem DM-2 (Hammarsten *et al.* 1998).

Atualmente sabe-se que pacientes diabéticos sofrem alterações metabólicas e endócrinas as quais contribuem para a incidência de câncer, especula-se que picos de insulina e secreção de IGF-I (fator do crescimento semelhante à insulina – *insulin like growth factor*) estimulam diretamente o crescimento das células cancerígenas (Grothey

et al. 1999) e também sua capacidade de invadir os tecidos vizinhos (Long *et al.* 1998). Outro grupo de trabalho evidenciou um risco até nove vezes mais elevado de desenvolver câncer de próstata em homens com maiores taxas de IGF (Chan *et al.* 1998; Chan *et al.* 2002). Levando em consideração estas informações, podemos assumir que uma alteração da homeostase da glicose em conjunto com a ação da insulina podem ser fatores de grande influência tanto na HPB quanto no CaP (Stamatiou *et al.* 2009).

Alguns estudos demonstram que a insulina pode influenciar no comportamento da próstata, e a manipulação dietética que aumenta os níveis de insulina leva a um desenvolvimento mais agressivo do CaP (Hammarsten *et al.* 2005; Cox *et al.* 2009). Contudo, existem estudos que afirmam não existir associação entre CaP e a insulinemia (Lacey *et al.* 2001; Hubbard *et al.* 2004; Borugian *et al.* 2007).

Receptor de Insulina (IR)

Localizado no cromossomo 19, o receptor de insulina (IR) contém 22 exons e seu tamanho é de 120 kb (Ullrich *et al.* 1985).

Existem duas isoformas do IR, isoforma A (IR-A), codificada no exon 11 do gene IR difere-se da isoforma B (IR-B) pela falta de 12 aminoácidos no carboxiterminal da subunidade- α do IR (De Meyts 2008; Belfiore *et al.* 2009; Sacco *et al.* 2009). Ambas isoformas são expressas nas células, porém o IR-A é predominante em células fetais e cancerosas tendo mais afinidade pela insulina, afinidade intermediária por IGF-II e baixa afinidade por IGF-I; já o IR-B é comum em células adultas sendo altamente específico para insulina (Godsland 2010). É comum que ocorra, entre as isoformas, uma homodimerização (formando IR-A/IR-A, IR-B/IR-B, IGF-IR/IGF-IR homodímeros) e uma heterodimerização (formando IR-A/IR-B, IGF-R/IR-A e IGF-R/IR-B

heterodímeros). Conhecidos como receptores híbridos (HR) têm como característica diferentes afinidades por ligantes (insulina, IGF's) e estão presentes na maioria das células (Belfiore *et al.* 2009).

Tanto IR quanto IGFs-R são receptores de membrana tirosina quinase heterotetraméricos com duas subunidades α (extracelular) e duas subunidades β (extracelular, transmembrana e intracelular) (Cox *et al.* 2009; Godslan 2010). A subunidade α contém 723 aminoácidos, e uma massa molecular de 130kDa, a subunidade β contém 620 aminoácidos, e uma massa molecular de 95kDa (Lawrence *et al.* 2007; De Meyts 2008).

A ligação ao receptor (nas subunidades α) promove uma mudança conformacional ocorrendo uma autofosforilação dos resíduos de tirosina nas subunidades β , que por sua vez gera a fosforilação do IRS-1 (substrato do receptor de insulina-1; *insulin receptor substrate-1*) e a transmissão do sinal de insulina pelas duas maiores cascatas de fosforilação, que são distinguidas por seus principais mediadores: PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Figura 1) (Cox *et al.* 2009; Godslan 2010).

A insulina ativa a via da AKT/PKB que é uma proteína quinase que fosforila em serina e treonina (Marte *et al.* 1997) atuando como uma importante reguladora de várias funções celulares que incluem sobrevivência, crescimento, diferenciação, transcrição, metabolismo celular e angiogênese (Fayard *et al.* 2005). Essa via de sinalização é importante na transdução do sinal de fatores de crescimento e de outros estímulos extracelulares, regulando essas funções através de alguns substratos.

Defeitos na cascata de sinalização da insulina e alterações na fosforilação dos seus receptores e substratos com ativação atípica da via PI3-K/Akt podem ter um papel importante para o desenvolvimento de resistência à insulina (Sesti 2006).

A expressão do IR tem sido estudada em várias neoplasias humanas. Papa e cols., observaram o aumento na expressão proteica de IR em câncer de mama, onde esta expressão demonstrou-se 6 vezes maior quando comparado com tecidos de mama normal ($P < 0.001$) (Papa *et al.* 1990).

Embora IGF-IRs serem expressos em tecidos HPB e CaP, foi também demonstrado que IRs e receptores híbridos de insulina estão intensamente expressos em tecidos de CaP, e este aumento também está relacionado com o aumento no grau do escore de Gleason (Cox *et al.* 2009).

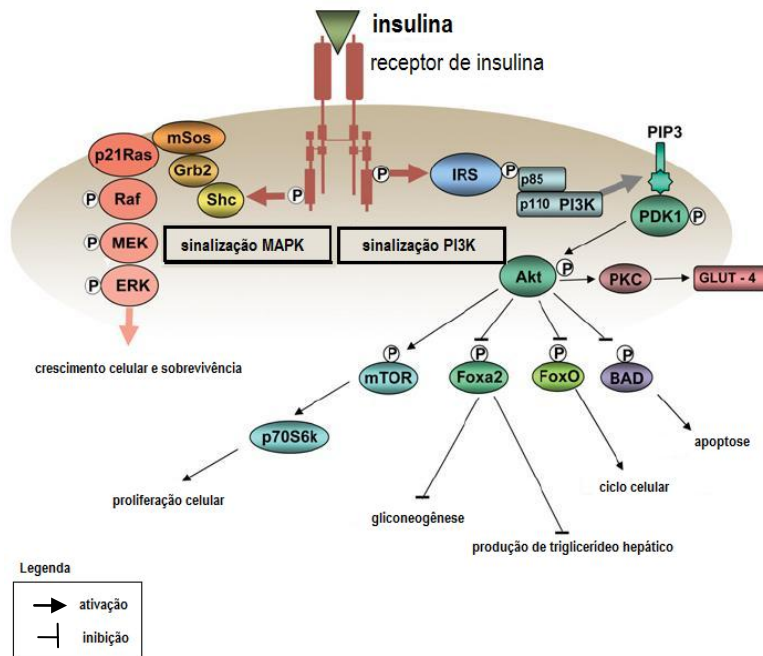


Figura 1. Principal via de ativação pelo receptor de insulina (IR) (Godsland 2010).

Receptor do Fator do Crescimento Tipo Insulina (IGF-R)

O receptor do Fator do Crescimento Tipo Insulina (IGF-R, *insulin-like growth factor*) é um receptor de membrana tirosina quinase. Existe uma homologia entre o IGF e a insulina, portanto a insulina também pode se ligar e ativar o IGF-R (Grothey *et al.* 1999).

Os IGFs exercem múltiplos efeitos no metabolismo da glicose, gorduras e proteínas. IGFs também desempenham importante função na regulação, proliferação, diferenciação, apoptose e transformação celular (Long *et al.* 1998). O aumento da expressão de IGF-IR e sua atividade, têm sido associado com múltiplos aspectos na progressão de cânceres, incluindo um aumento na carcinogênese, tumorigênese, metástases, transformações celulares e resistência a quimioterápicos (Gennigens *et al.* 2006; Knowlden *et al.* 2008). Os efeitos de IGF-I são mediados pelos receptores IGF-IR e IGF-IIR, apresentam uma relação de afinidade do IGF-I maior que IGF-II que por sua vez tem mais afinidade que a insulina (Kojima *et al.* 2009).

O IGF na circulação está 25% ligado a proteínas. Seis IGFBPs (proteínas ligadoras de IGF) já foram identificadas, porém a mais abundante é a IGFBP-3, que se liga em aproximadamente 80% do IGF circulante e têm propriedades intrínsecas anti-tumorigênese (Godsland 2010). Um estudo, evidenciou que homens com altos níveis de IGF-I e baixos níveis de IGFBP-3 circulantes tem maiores chances de apresentar CaP em estágios avançados, supondo que níveis de IGFBP-3 é inversamente relacionado ao risco de CaP (Chan *et al.* 2002). Há evidências que a hiperinsulinemia suprime os níveis de IGFBP-1 (Godsland 2010).

Quando IGF-I livre se liga ao IGF-IR ativando-o, ocorre uma sinalização que ativa a via PI3K/AKT. Um estudo de Wu e colaboradores, afirmam que isto afeta diretamente a função do AR, alterando a fosforilação, e acionando a sua atividade transcricional. Isto indica que mesmo na ausência de androgênios IGF pode induzir a transativação do AR (Wu *et al.* 2006; Lee 2009). Entretanto, um estudo de Lacey e colaboradores, não achou associação entre os níveis plasmáticos de IGF-I e o CaP (Lacey *et al.* 2001). Portanto, a relação exata de como ocorre o fosforilação do AR, e

ativação de diferentes vias ainda está incerta, assim como seu possível envolvimento no desenvolvimento da HPB.

Via de sinalização PI3K/AKT

AKT é uma serina/treonina proteína quinase B, que fosforila proteínas em diversas vias regulando metabolismo, tamanho e crescimento da célula, apoptose e proliferação celular (Ayala *et al.* 2004; Altomare *et al.* 2005; Edwards *et al.* 2005). Em mamíferos, três genes foram codificados e identificados para as isoformas da AKT ou PKB: *Akt-1*, *Akt-2*, e *Akt-3* que dividem 80% de sua homologia (Le Page *et al.* 2006).

AKT pode ser expressa tanto em tecidos não-neoplásicos quanto em tumores de diferentes tecidos, incluindo a próstata. O aumento expressão da AKT-1 em CaP está associado ao alto grau de Gleason (entre 8-10), podendo ser útil em implicações clínicas (Ayala *et al.* 2004). Embora Ayala e cols. afirme que a p-AKT-1 é a mais prevalente, o envolvimento das três isoformas na progressão do CaP ainda não está bem definida (Ayala *et al.* 2004; Le Page *et al.* 2006).

A ativação da AKT/PKB ocorre pela fosforilação na Thr-308 e Ser-473 (Lin *et al.* 2001; McCall *et al.* 2008). A via AKT pode ser negativamente regulada pela PTEN que é a principal fosfatase lipídica que desfosforila o fosfatidil-inositol trifosfato (PIP3), não ocorrendo assim a fosforilação da AKT, que por sua vez ocorrerá a supressão da formação do tumor por restringir a sinalização da PI3K/AKT (Altomare *et al.* 2005; Edwards *et al.* 2005). Em câncer humano, a via PI3K/AKT normalmente está desregulada, devido principalmente pela constante ativação de receptores de fatores de crescimento e perda da função da proteína PTEN. Estas informações evidenciam o

papel central da AKT no desenvolvimento e resposta ao tratamento do câncer (Ayala *et al.* 2004; Le Page *et al.* 2006).

A atividade basal da via PI3K/AKT nos estágios iniciais do CaP é baixa, podendo não estar relacionada a desenvolver um papel no crescimento e sobrevivência do tumor na ausência de androgênios, porém estes tornam-se fatores de menor importância no crescimento nos estágios mais avançados de CaP, pois o aumento da atividade basal da PI3K/AKT neste período pode contribuir para a progressão do CaP e até mesmo na sobrevida do paciente. Lin e cols., também demonstraram em seus estudos que a AKT pode modular a atividade e estabilizar o AR nuclear pela fosforilação na Ser-210 e Ser-213, mediando o desenvolvimento do CaP, podendo promover o tumor independente de androgênios, embora animadores, estes dados ainda são ainda são controversos (Ayala *et al.* 2004; Edwards *et al.* 2005; Le Page *et al.* 2006; McCall *et al.* 2008; Sayeed *et al.* 2011), pois ao contrário dos estudos que demonstram que MAPK e AKT podem vir a fosforilar o AR *in vitro*, Gioeli e colaboradores afirmam que isto não ocorre diretamente *in vivo* (Gioeli *et al.* 2002).

Infelizmente, eventos celulares que levam a progressão do CaP independente de androgênios ainda não estão bem estabelecidos. Ainda não existem marcadores moleculares de confiança que podem prever se o câncer irá progredir para um tumor mais agressivo (Le Page *et al.* 2006).

Contudo, a ativação da AKT parece estar relacionada não só no CaP, mas também na HPB, principalmente pelo seu envolvimento na proliferação celular (Ayala *et al.* 2004). Mas os eventos moleculares que podem estar ocasionando este aumento da glândula prostática precisam ser melhor elucidados.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma técnica de estimulação pela insulina e IGF-I em tecido prostático proveniente de pacientes com HPB e avaliar a fosforilação da proteína AKT e do Receptor de Androgênios.

Objetivos específicos

- Estabelecer uma metodologia de estimulação pela insulina *in vitro*.
- Estabelecer uma metodologia de estimulação por IGF-I *in vitro*.
- Verificar a atividade da AKT em tecido HPB estimulado com insulina e IGF-I comparando com o tecido não estimulado.
- Avaliar a fosforilação AR, em tecido HPB, estimulado e não estimulado pela insulina.

Materiais e Métodos

Delineamento do estudo

O presente estudo será um estudo de intervenção *in vitro*.

Amostras

Os tecidos prostáticos foram coletados de pacientes voluntários, atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes consultados autorizaram a utilização do material para o estudo mediante a um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo1). O tecido prostático foi obtido de pacientes masculinos, submetidos à prostatectomia, por diagnóstico de hiperplasia prostática benigna.

Os respectivos diagnósticos foram confirmados por exame anatomopatológico.

Cálculo Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra para a análise da expressão protéica foi calculado através do programa PEPI 4, utilizando-se dados de estudo prévio realizado por Sciocia (Sciocia *et al.* 2006) e por dados recentes do nosso grupo de pesquisa com estimulação de tecido placentário. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05; poder estatístico de 90% chegando-se a um n de 9 pacientes por grupo (com tecido estimulado e não estimulado).

Crêterios de Inclusão

Pacientes entre 45 e 80 anos com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, toque retal sem suspeita de neoplasia maligna e que não possuíam diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do HCPA.

Considera es  ticas

O tecido prostático utilizado foi proveniente de material de descarte de pacientes submetidos à cirurgia de prostatectomia. Uma vez que se trata de informa es protéicas específicas, foi garantido aos pacientes o sigilo em relação às informa es obtidas e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (anexo 1).

Este projeto foi submetido ao Comitê de  tica e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), tendo sido aprovado sob o número 11-0283.

Exame Anatomopatológico

O exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos, bem como a confirmação da presença ou ausência de tecido hiperplásico foi realizado através de microscopia pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) no serviço de Patologia do HCPA.

Dados de Hipertensão e Diabetes

Para avaliar a hipertensão e diabetes, foi analisado o prontuário dos pacientes em estudo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Avaliação de Peso, Altura e Circunferência Abdominal

A medida de peso e altura foi feita em balança antropométrica sem sapatos e com roupas leves. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela razão peso (kg)/altura²(m). Para medir a circunferência abdominal, foi utilizado como referência o ponto que fica entre o último arco costal e a crista ilíaca superior (Lopes 2007).

Dosagem de Insulina, Glicose e Antígeno Prostático Específico (PSA)

As dosagens foram realizadas utilizando o soro dos pacientes, de acordo com o manual de instruções dos kits específicos da Siemens[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., UK), pelo ensaio de quimiluminescência. A análise de Insulina foi realizada no equipamento ADVIA Centaur[®] XP, de Glicose no ADVIA[®]1800 e de PSA no IMMULITE[®]2000.

Todas as dosagens foram realizadas no serviço de Patologia Clínica do HCPA.

Coleta das Amostras Teciduais

Após a retirada do espécime cirúrgico, em campo limpo, fragmentos da próstata foram colocados em tubos de 15 mL em solução Hank's com antibiótico (kanamicina 1%), mantidos a 4°C até o experimento.

Metodologias para estimulação de tecido

A coleta das amostras teciduais foi a mesma em ambos os métodos (método 1 e 2 descritos abaixo), a qual foi adaptada de um estudo de Smith e cols., 1974. Os tecidos foram submetidos a diferentes técnicas desenvolvidas em nosso laboratório, para a estimulação do tecido prostático.

Quadro 3. Hormônios utilizados para a estimulação do tecido prostático

Hormônio	Fabricante	Concentração utilizada
Insulina (Humulin® R)	Eli Lilly	10^{-7} M
IGF-I (PMG0075)	Invitrogen	100ng/ μ L

Metodologia 1. Tecido fragmentado

O tecido de próstata (0,2g) foi cortado em pequenas fatias e colocado em micro tubos. As amostras foram subdivididas em seus devidos grupos de estimulação. Nos tecidos que não sofreram a estimulação, foi apenas adicionado a solução Hank's, considerado meio controle, aos que foram submetidos a estimulação com insulina, foi adicionado o hormônio na concentração 10^{-7} M diluída em solução Hank's, pH 7.4 conforme já utilizado em outros estudos (Pederson *et al.* 2001; De Meyts 2008; Belfiore *et al.* 2009; Ferreira *et al.* 2011). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante seus devidos tempos de estimulação. Após, a reação foi interrompida com a adição de 2 volumes de solução Hank's gelada e os tecidos foram colocados no gelo por 1 minuto. Para desprezar o meio de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 1000 μ L de PBS para a lavagem do tecido e novamente centrifugado a 2000 x g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Logo após foi realizada a extração de proteínas.

Para esta técnica, as amostras foram classificadas nos seguintes grupos:

Grupo	n	Denominação dos grupos	Característica do grupo
I	11	C5	Tecido HPB não estimulado (incubado em meio controle) por 5 minutos
II	12	I5	Tecido HPB estimulado com insulina 10^{-7} M por 5 minutos
III	10	C10	Tecido HPB não estimulado (incubado em meio controle) por 10 minutos
IV	11	I10	Tecido HPB estimulado com insulina 10^{-7} M por 10 minutos
V	4	[5I]	Tecido HPB estimulado com insulina $1,3 \times 10^{-6}$ M por 5 minutos
VI	6	[10I]	Tecido HPB estimulado com insulina $1,3 \times 10^{-6}$ M por 10 minutos

Extração de Proteínas

Foi adicionado a cada 0,2g de tecido, 300 μ L de RIPA (uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1mM PMSF, 100mM NaF, 10mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e 2mM de NaVO_4 , 0,1% Triton X-100 e leupeptina. As amostras foram trituradas com o homogeneizador OMNI® por 15 a 30 segundos no gelo para lise celular. A seguir, foram agitadas durante 1 hora a 4°C e centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi e estocado à -20°C.

Metodologia 2. Tecido Dissociado

O tecido de próstata (0,2g) foi cortado em pequenas fatias e submetido a dissociação enzimática com colagenase tipo I (Gibco, Invitrogen Corporation) na proporção 2,5mg/g de tecido prostático a 37 °C por 3 horas em agitação lenta (100 rpm) constante. Após, foi adicionado o dobro de volume de solução Hank's a 37°C para interromper a reação. As células foram filtradas em uma membrana de 100 μ m para

separar os fragmentos maiores (não dissociados), e divididas em microtubos com 500µL cada para posteriormente serem subdivididas nos grupos:

Grupo	n	Denominação dos grupos	Característica do grupo
I	7	C5	Células Hiperplásicas incubadas em meio controle por 5 minutos (não estimulado)
II	9	I5	Células Hiperplásicas incubadas com insulina 10^{-7} M por 5 minutos
III	9	C10	Células Hiperplásicas incubadas em meio controle por 10 minutos (não estimulado)
IV	10	I10	Células Hiperplásicas incubadas com insulina 10^{-7} M por 10 minutos
V	4	IGF5	Células Hiperplásicas incubadas com IGF-I 100µM por 5 minutos
VI	3	IGF10	Células Hiperplásicas incubadas com IGF-I 100µM por 10 minutos

Nas células que não sofreram a estimulação, foi apenas adicionado a solução de Hank's, e as que foram submetidas a estimulação com insulina (10^{-7} M) ou IGF-I 100ng/µL (Gennigens *et al.* 2006; Wu *et al.* 2006; Kawashima *et al.* 2011; Liu *et al.* 2011), foi adicionado o devido hormônio diluído em solução Hank's pH 7.4. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C em seus devidos tempos de estimulação. Após, a reação foi interrompida com a adição de 2 volumes de solução Hank's gelado as células foram colocadas no gelo por 1 minuto. Para desprezar o meio de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 1000µL de PBS para a lavagem do tecido e novamente centrifugado a 2000 x g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Logo após foi realizada a extração de proteínas.

Extração de Proteínas

A cada tubo de suspensão celular, foram adicionados 300µL de RIPA (uma solução tampão de lise contendo 50 mM HEPES, pH 7,5, 1mM PMSF, 100mM NaF, 10mM de Na₄P₂O₇ e 2mM de NaVO₄, 0,1% Triton X-100 e leupeptina. As amostras foram agitadas durante 1 hora a 4°C e centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi e estocado à -20°C.

Análise da concentração de proteínas

A análise da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método modificado de Bradford (Bradford 1976), padronizado com albumina.

Western Blot

Análise de proteínas

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 8% (Orcy *et al.* 2005). Foi utilizado 40µg de proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750mg DTT e 0,001% azul de bromofenol) a 95°C por 2 min (Laemmli 1970), e colocadas em cada poço. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192mM glicina; 25mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por 2h e 30min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência (Semidry Biorad®) em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (25mM Tris,




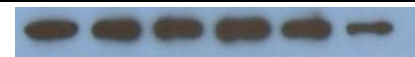
192mM glicina e 10% metanol, pH 8,3). A transferência foi efetuada por 1h, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 25V.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 2h em solução bloqueadora (TTBS), contendo 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris, 0,05% Tween 20, pH 7,4, acrescido de 5% de leite em pó (Molico[®]; Nestlé) para saturar sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por, no mínimo, 16h a 4°C sob agitação constante, com o anticorpo específico para cada proteína. Os anticorpos utilizados neste estudo foram AKT total (sc-8312), p-AKT (sc-7985), AR (PG21-06-680), p-AR (sc-52894) (Quadro 4), diluídos em TTBS e 2,5% de albumina. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo específico por 2 horas. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05%, pH 7,4) (3 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência (ECL) por 1 min.

Revelação das Autorradiografias: Após a incubação com solução para quimioluminescência, as membranas de nitrocelulose foram colocadas em contato com o filme fotográfico (*High Performance chemiluminescence Film – Amersham*) durante 1-5 min. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com água e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, foram realizadas as análises dos resultados. A densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (fotodocumentador Image Station IS 4000MM Pro[®]). A densitometria obtida para cada banda foi avaliada, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

Quadro 4. Anticorpos primários utilizados.

Proteína	Peso Molecular	Fabricante	Código	Imagem
Rabbit anti-AR	110kDa	Upstate	06-680	
Mouse anti-pAR (Ser 210/213)	100kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-52894	
Rabbit anti-Akt1,2,3	60kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-8312	
Rabbit anti-pAkt (S473)	60kDa	Santa Cruz Biotechnology	sc-7985	

Os anticorpos secundários utilizados foram:, rabbit anti-mouse (Invitrogen; e goat anti-rabbit (Millipore).

Análise Estatística

Os resultados de expressão protéica foram avaliados quantitativamente e, para os que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste t de *Student* e os que apresentaram resultados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foi considerado o nível de significância quando $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS versão 18.0 (*Statistical Packages for the Social Sciences*) e para a elaboração dos gráficos foi utilizado *Graphpad Prism* versão 5.04.

Locais de Realização do Projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, instalado no Centro de Pesquisa do

HCPA, que dispõem da infra-estrutura para a execução dos procedimentos para a análise protéica.

Fontes de Financiamento

Este projeto contou com financiamento parcial pelo PROPG_PROF, FIPE-HCPA e CNPq.

Resultados

O presente estudo envolveu 15 pacientes com idade média de 68,5 anos, em sua maioria brancos. Observamos que dos quinze pacientes, sete (46,6%) tinham diabetes tipo 2. Cabe salientar, que todos os pacientes estavam em tratamento para DM-2 e não foi constatado hiperinsulinemia nos pacientes em estudo. Os dados de hipertensão foram constatados em apenas nove prontuários, destes, cinco (55,5%) pacientes eram hipertensos. As principais características da população estudada estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros clínicos e antropométricos dos pacientes incluídos no estudo.

Idade (anos)	
Variação	59 – 79
Raça/cor	
Branco	60%
Negro	20%
Insulina ($\mu\text{U/dL}$)	
Média \pm DP	10,6 \pm 3,9
Glicose (mg/dL)	
Média \pm DP	107,1 \pm 15,77
IMC	
Média \pm DP (Variação)	27,08 \pm 3,15 (23,44 – 32,4)
Peso normal	3 (33,3%)
Sobrepeso	6 (66,7%)
Circunferência Abdominal (cm)	
Média \pm DP (Variação)	107,62 \pm 4,8 (99 – 114)
PSA (ng/mL)	
Mediana (percentil 25-75)	11,55 (3,180 – 24,70)
Volume próstata (cm³)	
Mediana (percentil 25-75)	78,50 (33,75 – 109,3)

Análise da Expressão Protéica

Resultados da Metodologia 1.

Na metodologia 1, o nível de fosforilação da proteína Akt/PKB foi avaliado em fatias de tecido prostático proveniente de pacientes com HPB. Cabe salientar que foi utilizada a Akt total como normalizador para avaliar os resultados. Os resultados são apresentados como a relação Akt fosforilada/Akt total como mediana (percentil 25 - 75) das unidades arbitrárias ou média \pm desvio padrão quando a distribuição dos dados foi normal.

A fosforilação da AKT, avaliada na condição controle (C5), por 5 minutos foi de 0,92 (0,81 – 1,06) e no grupo estimulado com Insulina pelo mesmo tempo (I5) foi de 0,98 (0,88 – 1,18). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 2).

Quando a fosforilação da AKT foi avaliada no tempo 10 minutos, no grupo controle (C10) foi de $0,95 \pm 0,18$ e no grupo estimulado por Insulina (I10) foi de $1,05 \pm 0,31$. Não foram encontradas diferenças entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 3).

Buscando avaliar se a concentração de Insulina utilizada era suficiente para a estimulação, avaliamos também a fosforilação da AKT com alta concentração do hormônio ($1,3 \times 10^{-6} \text{M}$) nos dois tempos estudados.

A análise da proteína AKT fosforilada no grupo controle (C5) por 5 minutos foi de 0,92 (0,81 – 1,06); e do grupo estimulado com Insulina $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ (I5) no tempo de 5 minutos foi de 0,90 (0,86 – 1,16). Os valores foram similares entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 4).

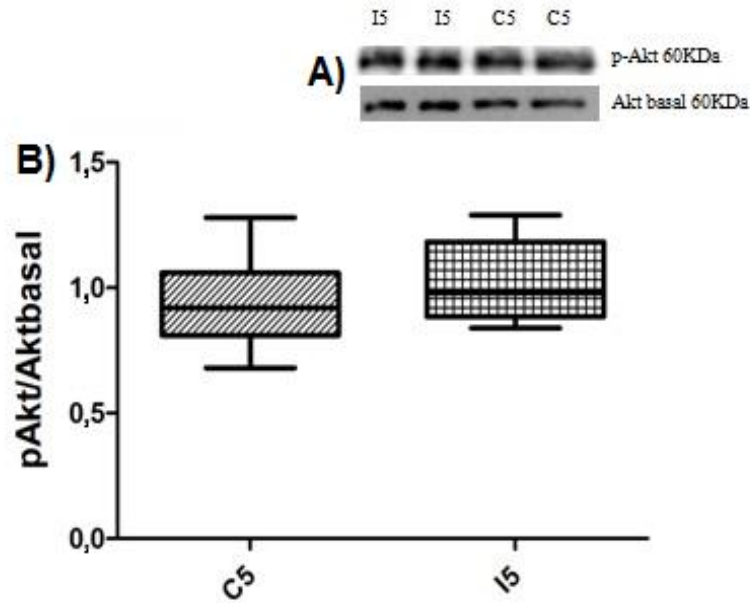


Figura 2. Ação da insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada em condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração de 10^{-7} M (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P > 0,05$) (C5, n=11; I5, n= 12).

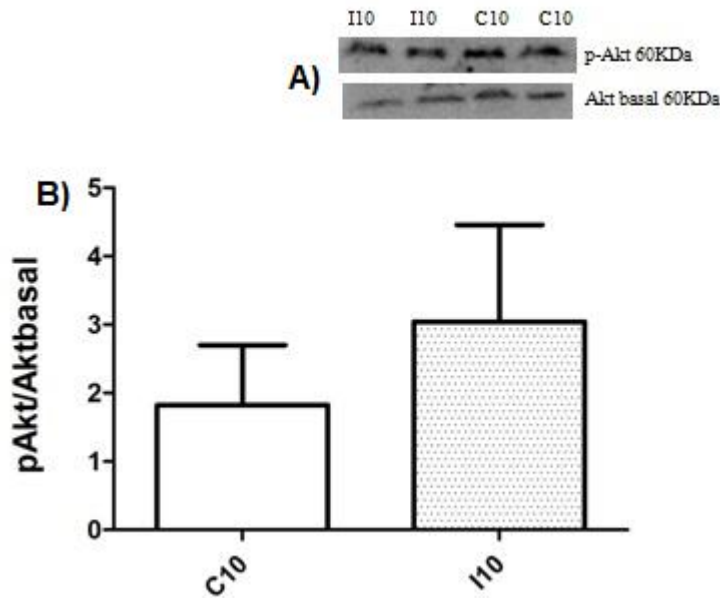


Figura 3. Ação da insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada em condição controle (C10) e estimulado com Insulina na concentração de 10^{-7} M (I10) por 10 min. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP), de unidades arbitrárias ($P > 0,05$) (C10, n=10; I10, n=11).

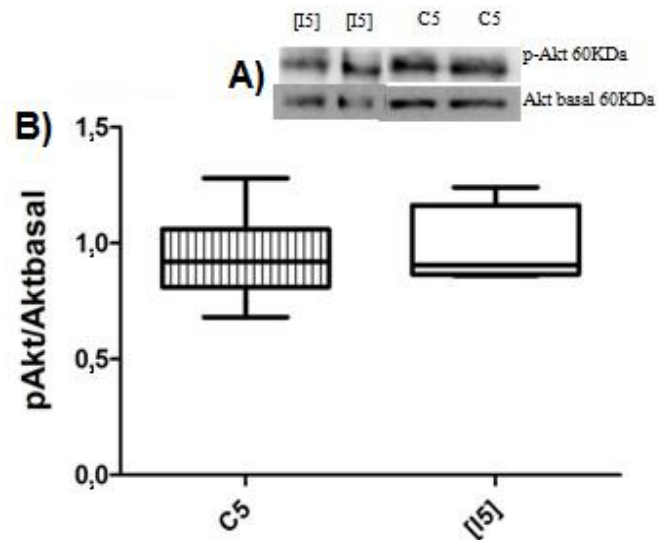


Figura 4. Ação de alta concentração de insulina na Fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático em pacientes com HPB. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P > 0,05$) (C5, n=11; [I5], n= 4).

O nível de fosforilação da Akt/PKB no grupo na condição controle (C10) por 10 minutos foi de $0,95 \pm 0,18$ e do grupo estimulado com Insulina $1,3 \mu\text{M}$ ([I10]) neste mesmo tempo, foi de $1,07 \pm 0,38$. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 5).

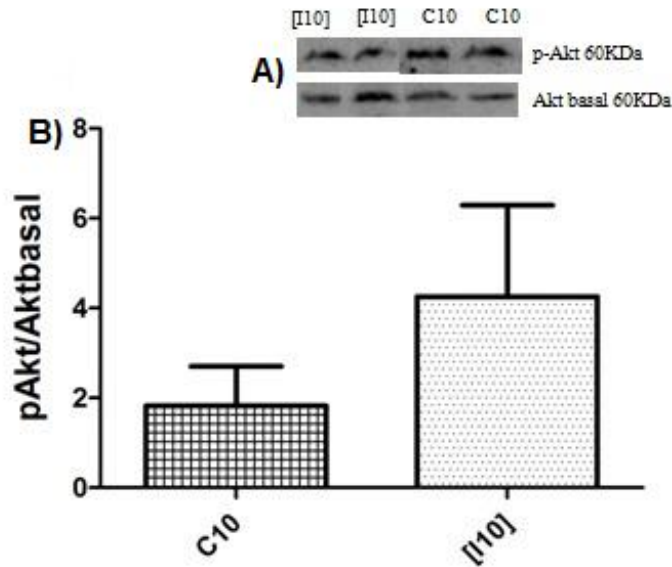


Figura 5. Ação de alta concentração de insulina na fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada na condição controle (C10) e estimulado com Insulina na concentração $1,3 \times 10^{-6} \text{M}$ ([I10]). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP), unidades arbitrárias ($P > 0,05$) (C10, n=10; [I10], n=6).

Quando comparamos a porcentagem de estimulação da Insulina nos tempos de 5 e 10 minutos, considerando a condição controle (C5 e C10) como 100%, a porcentagem de fosforilação da proteína Akt/PKB no grupo estimulado com Insulina (10^{-7}M) por 5 minutos (I5) foi de 105% (92,98 – 131,4); e do grupo estimulado com Insulina (10^{-7}M) por 10 minutos (I10) foi de 100% (89,60 – 124,5). Os valores entre os grupos foram similares ($P > 0,05$) (Figura 6).

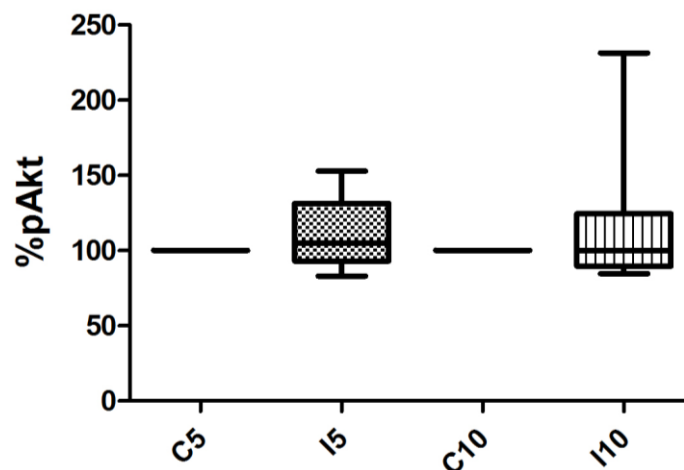


Figura 6. Porcentagem da fosforilação da AKT em fatias de tecido prostático em pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.

Utilizando uma alta concentração de Insulina ($1,3 \times 10^{-6}$ M), ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%, a porcentagem de fosforilação da proteína AKT no grupo estimulado com Insulina por 5 minutos ([I5]) foi de 96,25% (94,02 – 127,04); e do grupo estimulado com Insulina por 10 minutos ([I10]) foi de 98,20% (92,85 – 142). Os valores entre os grupos foram similares ($P>0,05$) (Figura 7).

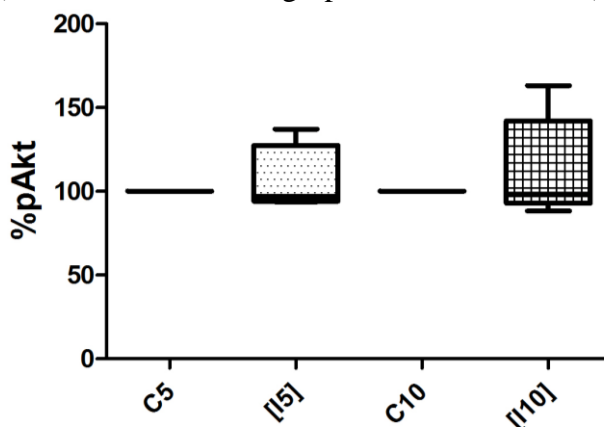


Figura 7. Porcentagem da fosforilação da AKT tecido prostático em pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina $1,3 \times 10^{-6}$ M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.

Resultados da Metodologia 2.

Na metodologia 2, a fosforilação da proteína AKT foi avaliada em suspensão celular, proveniente de pacientes com HPB. Os resultados são apresentados como a

relação Akt fosforilada/Akt total em mediana (percentil 25 - 75) das unidades arbitrárias.

A fosforilação da AKT no grupo controle (C5) por 5 minutos, foi de 0,93 (0,40 – 1,62), e do grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) no mesmo tempo (I5) foi de 0,97 (0,71 – 1,28). Não foram encontradas diferenças entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 8).

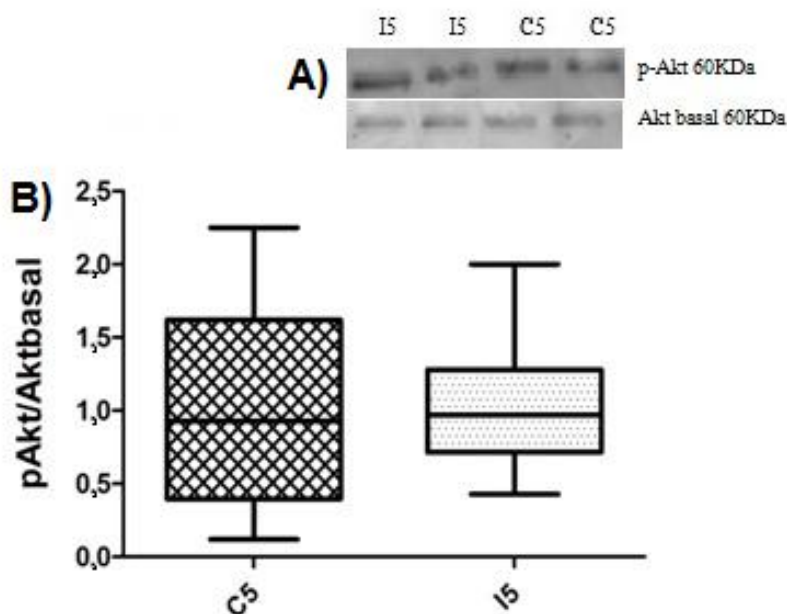


Figura 8. Ação da Insulina na fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C5) e estimulado com Insulina na concentração 10^{-7} M por 5 minutos (I5). Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n= 7; I5, n= 9).

O nível de fosforilação da AKT no grupo controle (C10) por 10 minutos foi de 0,86 (0,74 – 1,02), e do grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) (I10) foi de 1,21 (1,04 – 1,73). A expressão da proteína AKT fosforilada foi significativamente maior ($P=0.0113$) aos 10 minutos de incubação com Insulina quando comparada ao grupo controle. (Figura 9).

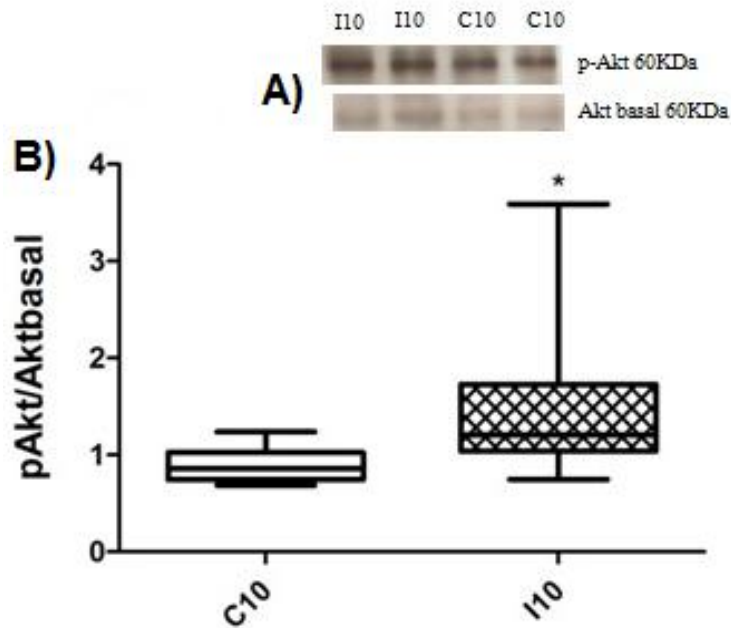


Figura 9. Ação da Insulina fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autorradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total analisada na condição controle (C10) e estimulada com Insulina na concentração 10^{-7} M por 10 minutos (I10). Dados apresentados como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias (* $P=0.0113$) (C10, n= 9; I10, n= 10).

Ao considerarmos 100% a fosforilação da AKT dos grupos na condição controle 5 e 10 minutos (C5 e C10), observamos uma diferença de apenas de 4% (104,3% (36,4 – 659,7)) no grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) por 5 minutos (I5) e um aumento na p-Akt de aproximadamente 27% (127,5% (98,43 – 231,7)) no grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) por 10 minutos. Esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 10).

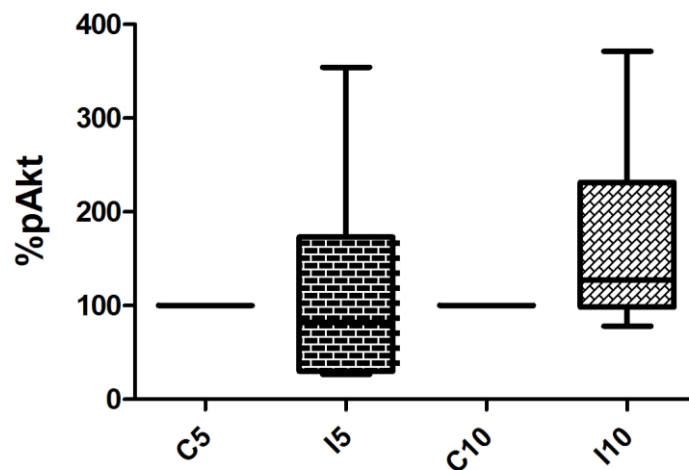


Figura 10. Porcentagem da fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas estimuladas com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Valores obtidos ao considerarmos os grupos na condição controle (C5 e C10) 100%. Apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.

Quando analisamos um possível efeito do hormônio IGF-I ($100\text{ng}/\mu\text{L}$) sobre a fosforilação da AKT, em células prostáticas dissociadas, observamos os valores de 0,93 (0,40 – 1,62) no grupo controle aos 5 minutos de incubação (C5), e no grupo estimulado com o hormônio IGF-I (IGF5) no mesmo tempo, foi de 0,78 (0,56 – 0,96). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 11).

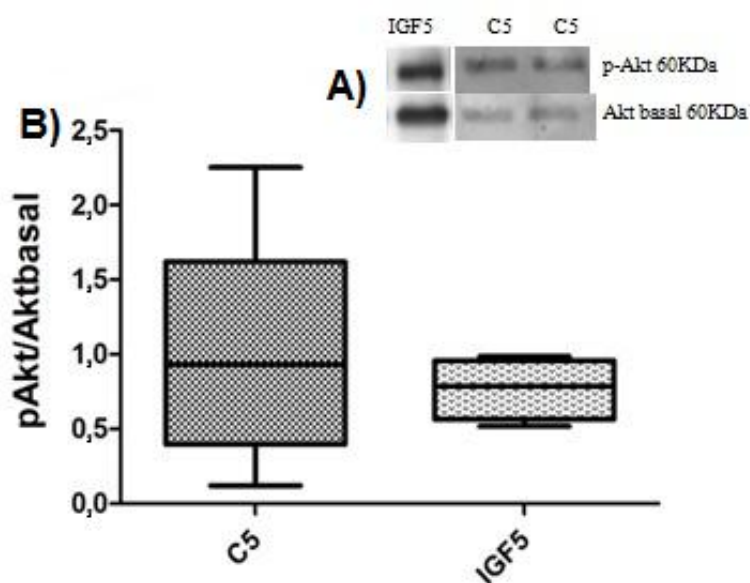


Figura 11. Fosforilação da AKT em células prostáticas dissociadas. A) Autoradiografia da expressão proteica da Akt total e fosforilada. B) Representação gráfica da razão da fosforilação da p-Akt/Akt total avaliada na condição controle (C5) e estimulado com IGF-I na concentração 100ng/μL por 5 minutos (IGF5); representada como mediana (percentil 25 - 75), de unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C5, n=7; IGF5, n=4).

A fosforilação da AKT no grupo controle por 10 minutos (C10) foi de 0,86 (0,74 – 1,02); e no grupo estimulado com IGF-I na concentração 100ng/μL no mesmo tempo (IGF10) foi de 1,32 (0,66 – 1,59). Não houve diferenças entre os grupos ($P>0,05$) (Figura 12).

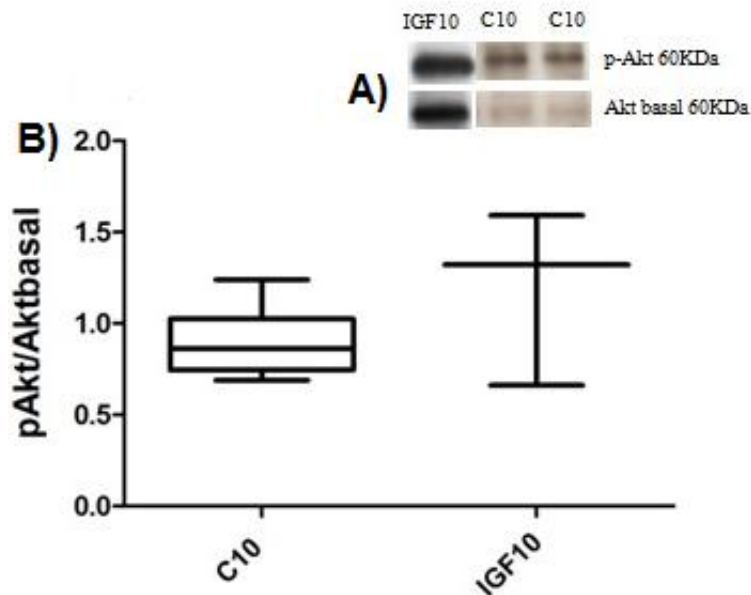


Figura 12. Fosforilação da AKT avaliada na condição controle por 10 minutos (C10) e estimulado com IGF-I na concentração 100ng/μL por 10 minutos (IGF10); representada como mediana (percentil 25 - 75), unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10, n= 9; IGF10, n= 3).

Nas mesmas condições experimentais estudadas para a Insulina e o IGF-I avaliamos a fosforilação do Receptor de Androgênio (AR) em suspensão celular, proveniente de pacientes com HPB. Os resultados são apresentados como a relação AR fosforilado/AR basal em média \pm erro padrão, das unidades arbitrárias.

A fosforilação do AR, na condição controle por 5 minutos (C5-AR), foi de $0,74 \pm 0,04$ e no grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) por 5 minutos (I5-AR) foi de $1,09 \pm 0,33$ ($P > 0,05$) (Figura 13).

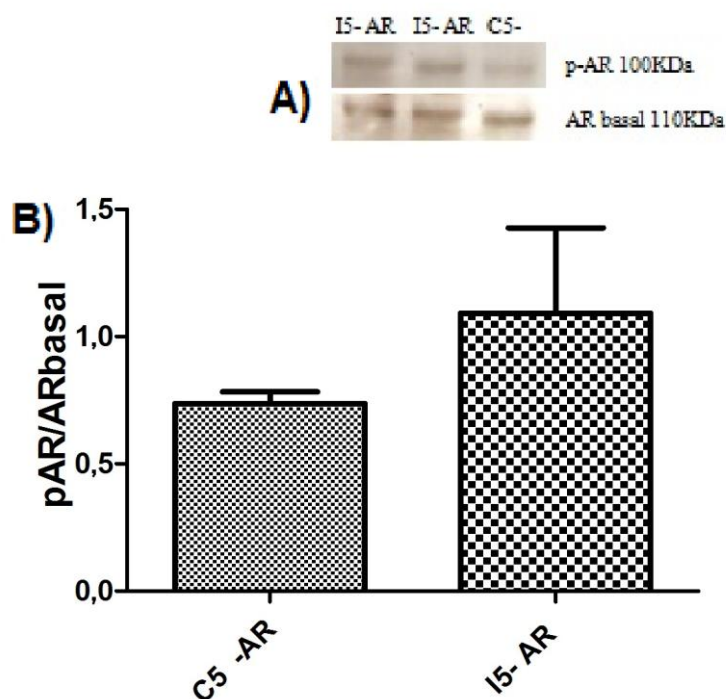


Figura 13. Fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas provenientes de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica do AR basal e do AR fosforilado. B) Representação gráfica da relação AR fosforilado/AR basal avaliado na condição controle por 5 minutos (C5-AR) e estimulado com Insulina na concentração 10^{-7} M por 5 minutos (I5-AR); representada como média \pm erro padrão, unidades arbitrárias ($P > 0,05$) (C5-AR, n=3; I5-AR, n=4).

A análise da fosforilação do AR na condição controle por 10 minutos (C10-AR) foi de $1,05 \pm 0,52$, e no grupo estimulado com Insulina ($10^{-7}M$) por 10 minutos (I10-AR) foi de $1,77 \pm 0,54$ (Figura 14). Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$).

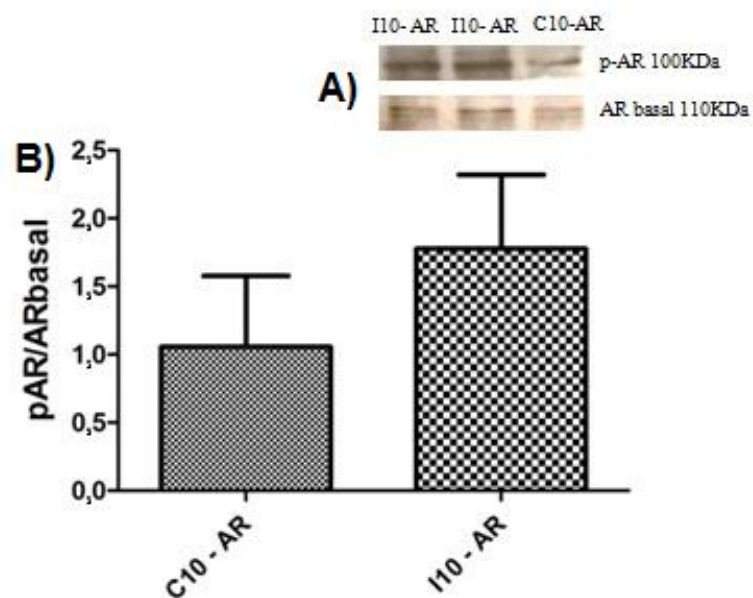


Figura 14. Fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas provenientes de pacientes com HPB. A) Autoradiografia da expressão proteica do AR basal e do AR fosforilado. B) Representação gráfica da fosforilação do AR avaliado na condição controle por 10 minutos (C10-AR) e estimulado com Insulina na concentração $10^{-7}M$ por 10 minutos (I10-AR); representada como média \pm erro padrão, unidades arbitrárias ($P>0,05$) (C10-AR, n=4; I10-AR, n= 2).

Ao considerarmos os grupos na condição controle 5 e 10 minutos (C5 e C10) 100%, analisamos a porcentagem de fosforilação do AR. O grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) por 5 minutos (I5-AR) apresentou uma diferença de fosforilação de 58% (158% (20,54 – 204,7)) em relação ao seu controle, e no grupo estimulado com Insulina (10^{-7} M) por 10 minutos (I10-AR) esta diferença dói de 43% (143% (142 – 144)). Estas diferenças não foram estatisticamente significativas. ($P>0,05$) (Figura 15).

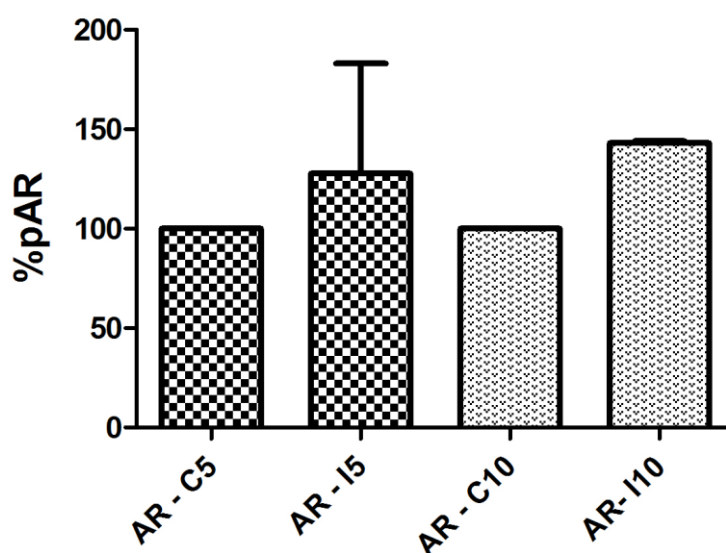


Figura 15. Porcentagem da fosforilação do AR em células prostáticas dissociadas de pacientes com HPB, nos grupos estimulados com Insulina 10^{-7} M nos tempos de 5 e 10 minutos. Grupo controle (C5 e C10) considerado 100%. Dados apresentados como mediana (percentil 25 - 75); unidades arbitrárias. $P>0,05$.

Correlações

Correlações dos fatores clínicos e antropométricos de cada paciente (volume prostático, antígeno prostático específico (PSA), circunferência abdominal (CA), índice de massa corpórea (IMC), Glicose e Insulina) foram avaliados. (Tabela 2). As correlações encontradas foram as esperadas, entre PSA e volume prostático e índice de massa corporal e circunferência abdominal.

Tabela 2. Correlação dos fatores clínicos e antropométricos dos pacientes em estudo

	<i>Volume</i>	<i>CA</i>	<i>IMC</i>	<i>PSA</i>	<i>Glicose</i>	<i>Insulina</i>
PSA						
CC	0,668**	0,131	0,315		-0,057	0,368
Sig.	0,009	0,758	0,409		0,848	0,330
n	14	8	9		14	9
Insulina						
CC	0,562	0,374	0,514	0,368	0,378	
Sig.	0,115	0,361	0,157	0,330	0,316	
n	9	8	9	9	9	
Glicose						
CC	0,083	0,354	0,541	-0,057		0,378
Sig.	0,777	0,390	0,132	0,848		0,316
n	14	8	9	14		9
IMC						
CC	-0,016	0,758*		-0,315	0,541	0,514
Sig.	0,967	0,029		0,409	0,132	0,157
n	9	8		9	9	9
CA						
CC	0,291		0,758*	0,131	0,354	0,374
Sig.	0,484		0,029	0,758	0,390	0,361
n	8		8	8	8	8
Volume						
CC		0,291	-0,016	0,668**	0,083	0,562
Sig.		0,484	0,967	0,009	0,777	0,115
N		8	9	14	14	9

-(CA) Circunferência Abdominal

-(CC) Coeficiente de Correlação

- Sig: Significância (bicaudal)

- n: Número de Pacientes

** p<0,01

*p<0,05

Discussão

Segundo Vikram e colaboradores, a concentração basal de insulina parece ser importante para o funcionamento e integridade da glândula prostática, e o aumento da concentração circulante de insulina pode resultar no aumento da próstata (Vikram *et al.* 2010).

Alguns estudos experimentais e epidemiológicos mostraram um possível envolvimento da resistência à insulina e hiperinsulinemia na Hiperplasia Prostática Benigna (Hammarsten *et al.* 1999;2001; Vikram *et al.* 2010). Contudo, Boucher e cols. evidenciaram que IR e IGF-IR agem por mecanismos idênticos na regulação da expressão gênica, sendo apenas diferente a amplitude do sinal obtida pelas interações ligante (insulina e IGF)-receptor (Boucher *et al.* 2010), porém os eventos moleculares que envolvem estes hormônios na HPB estão longe do completo entendimento.

Os trabalhos atuais têm relacionado os receptores de insulina e IGF-I não somente com a HPB, mas também com o CaP (Nicholson *et al.* 2011; Ozkan 2011; Vikram *et al.* 2011). Alguns estudos inclusive, propuseram a inibição destes receptores como uma possível terapia para o CaP e a HPB (Singh *et al.* 2006; Sutherland *et al.* 2008; Ozkan 2011). Obviamente, o resultado desta intervenção não seria o ideal, principalmente quando avaliamos o papel vital destes receptores no metabolismo humano. Estudos demonstram que a HBP e o CaP, são positivamente associados com os níveis plasmáticos de IGF-I, e inversamente associados com IGFBP-3 quando comparado com pacientes que não apresentavam HPB e CaP (Chokkalingam *et al.* 2002; Roddam *et al.* 2008). Portanto, tentamos neste estudo desvendar a relação da via

dos receptores de insulina e IGF-I, e se o aumento da expressão da proteína p-Akt poderia estar relacionada intimamente com o AR.

Com este estudo foi possível padronizar uma técnica de estimulação *in vitro*, para avaliar o envolvimento intracelular da via do receptor de insulina e do receptor de IGF-I quando submetemos o tecido a uma estimulação por estes hormônios.

Sabe-se que as vias de sinalização do receptor de insulina e do receptor IGF-I, são vias rápidas (Pederson *et al.* 2001; Ferreira *et al.* 2011), portanto escolhemos os tempos de 5 e 10 minutos para analisar a proteína AKT após a estimulação do tecido com insulina e com IGF. Inicialmente na técnica 1, quando avaliamos os controles e os estimulados nos tempos 5 e 10 minutos, constatamos que a concentração hormonal de insulina ideal para ocorrer a estimulação foi de 10^{-7} M, especialmente por estimularmos os tecidos em concentrações de insulina 13 vezes maior ($1,3 \times 10^{-6}$ M) e observarmos que esta não gerou uma maior expressão da proteína AKT fosforilada (p-AKT) quando comparada com o tecido que não foi estimulado (Gráficos 3 e 4).

Mesmo sabendo que a via da insulina é uma via rápida (Pederson *et al.* 2001; Agouni *et al.* 2010; Ferreira *et al.* 2011), foi realizada com a técnica 1, a estimulação nos tempos de 30 minutos e 60 minutos, nos quais não houve diferença entre os grupos que foram estimulados com insulina e os grupos que não foram estimulados com insulina quando avaliada a proteína p-AKT. Desta forma, foi selecionado os tempos de 5 e 10 minutos para a padronização das técnicas.

Cabe salientar, que a fosforilação da AKT na serina 473 é resultado da ativação desta proteína. Em culturas de células, onde ocorre a mutação deste sítio (S473), é evidenciado o comprometimento em sua atividade enzimática (Woodgett 2005). Além do mais, anticorpos específicos que detectam a p-AKT na serina 473 já estão

consolidados como um método para a investigação da atividade da AKT (Ferreira *et al.* 2011; Hers *et al.* 2011; Strittmatter *et al.* 2012).

Quando realizamos a técnica 1, observamos que a estimulação com insulina diretamente no tecido em pequenas fatias, não houve diferença significativa entre os grupos que considerados controle com os grupos que sofreram a estimulação (Gráficos 1 e 2). Em vista disto, na técnica 2, dissociamos o tecido e foi possível observar que nas células estimuladas com insulina no tempo de 10 minutos quando comparada com as células na condição controle, ocorreu uma maior expressão da proteína p-AKT (Gráfico 8). Provavelmente, isto ocorreu pelo fato de que após o tecido ser submetido à dissociação, permitir uma maior superfície de membranas celulares expostas ao hormônio, assim como uma maior exposição dos sítios de ligação do hormônio insulina ao receptor, possibilitando uma ligação hormônio-receptor mais efetiva.

Ao avaliamos a possível ação do hormônio IGF-I na fosforilação da proteína AKT em células dissociadas (técnica 2), não observamos diferença entre as células estimuladas e não estimuladas (Gráficos 10 e 11). Este resultado é preliminar e é possível que o número amostral utilizado não tenha sido suficiente para observarmos a efetiva ação do IGF-I nessas células. No entanto, no trabalho de Taneja e colaboradores, que avaliou o tratamento de IGF-I em linhagem de células renais embrionárias transfectadas com AR, também não observou um aumento da expressão da p-AKT (S473) e nem do p-AR (S213), nos tempos de 5 minutos, 10 minutos e 2 horas (Taneja *et al.* 2005).

Nas amostras submetidas à técnica 2, analisamos também a proteína AR fosforilada (p-AR S210/213) nas células que tiveram a intervenção do estímulo de insulina quando comparadas as células que não foi realizada a intervenção, observamos que não ocorreu diferença significativa entre os grupos, principalmente pelo fato de que

a quantidade de material avaliado tenha sido insuficiente. Seria, portanto, razoável se especular que, não somente a via escolhida para este estudo (PI3K/AKT) pode estar envolvida na fosforilação do AR, mas também outros agentes fosforilantes que fazem parte da via de sinalização dos receptores de insulina e IGF-I.

Alguns estudos sugerem a existência de uma regulação positiva (*up regulation*) entre os androgênios e o IGR-IR, o que pode levar a importantes consequências na transativação do AR (Fan *et al.* 2007; Bidosee *et al.* 2009).

Quando analisamos os parâmetros clínicos e antropométricos em todos os pacientes em estudo, observamos que existiram as correlações esperadas, entre o índice de massa corpórea do e a circunferência abdominal, e também entre o volume prostático e o PSA. Comprovando importância do exame PSA, pois o aumento deste antígeno plasmático é relacionado o aumento da glândula prostática. Interessantemente, a maioria dos pacientes apresentou sobrepeso, e todos os pacientes avaliados possuíam os valores de circunferência abdominal (CA) acima do valor ideal, demonstrando a importância destes fatores na atual predisposição destes fatores na HPB. Em um estudo chinês, que foi avaliado a CA, foi encontrado um risco 3x maior dos pacientes apresentarem CaP (Hsing *et al.* 2001). Além disto, os autores não acham a mesma relação quando avaliado o IMC dos pacientes, sugerindo que a gordura abdominal quando avaliada pela CA expõe uma melhor relação com o CaP do que os outros parâmetros de obesidade.

Ao considerarmos as intervenções realizadas nos tecidos prostático (C5, I5, C10 e I10) com os parâmetros clínicos e antropométricos de cada paciente, em ambas as técnicas não foram encontradas correlações significativas, possivelmente pelo fato de que o número de pacientes neste estudo não tenha sido o suficiente para tal relação.

Sabemos que o melhor modelo para avaliar HPB são humanos, porém diferenças étnicas e a alta variabilidade entre as populações tornam a avaliação dos eventos

moleculares associados com esta doença muito difíceis de serem interpretados. Outra questão que pode aumentar a variabilidade entre os pacientes estudados é a incapacidade de controlar a intervenção ambiental a qual cada indivíduo é exposto. Sem contar o alto custo relacionado com a pesquisa em humanos.

Embora existam estes problemas relacionados com os experimentos de HPB em humanos, processos biológicos e genéticos podem ser inconsistentes quando avaliados em outros modelos animais. Por exemplo, o PSA prostático e os androgênios da adrenal como a dehidroepiandrosterona (DHEA), não estão presentes em roedores, embora sejam importantes na ação androgênica e na pesquisa prostática (Nicholson *et al.* 2011).

Em vista disto, o uso de células e tecidos humanos tornam-se mais vantajosos. Porém, é importante ressaltar que algumas linhagens também não são ideais dependendo do estudo proposto, assim como a linhagem de células de câncer de próstata LNCaP, que possuem uma mutação na proteína PTEN, o que torna a uma constitutiva ativação da proteína AKT (Gioeli *et al.* 2002).

Nosso estudo foi muito importante para um melhor entendimento da relação dos hormônios Insulina e IGF-I na expressão das proteínas AKT e do Receptor de Androgênios nas células prostáticas. A padronização da técnica de estimulação *in vitro* poderá ser útil para novas pesquisas.

Conclusões

- ✓ É possível avaliar a via de ativação da AKT em um modelo de células prostáticas provenientes de pacientes com Hiperplasia Prostática Benigna sob estímulo da Insulina por 10 minutos.
- ✓ A concentração de 10^{-7} M de Insulina foi suficiente para ocasionar a estimulação das células prostáticas, com consequente aumento da expressão da proteína AKT fosforilada.
- ✓ Neste modelo, também foi possível avaliar a fosforilação do Receptor de Androgênios.
- ✓ A padronização da técnica de estimulação *in vitro* poderá ser útil para novas pesquisas. E estes achados podem vir a elucidar um possível mecanismo intracelular de interação entre a transdução do sinal de Insulina e IGF-I e a fosforilação do Receptor de Androgênios, e assim, possivelmente contribuir para o entendimento da proliferação celular na HPB.

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Análise do Receptor de Insulina (IR), Receptor do Fator de Crescimento Tipo Insulina (IGFR) e do Receptor de Androgênio (AR) em Hiperplasia Prostática Benigna tratados e não tratados com Insulina.

Prezado Sr. _____,

Estamos conduzindo um estudo para identificar alterações celulares que possam estar associadas ao surgimento de hiperplasias prostáticas benignas (HPB), que são diagnosticados nas clínicas de urologia. Alterações no receptor de androgênios podem alterar o tecido normal da próstata, podendo estar envolvidas neste tipo de patologia.

Como o Sr. tem o diagnóstico de Hiperplasia Prostática Benigna, e foi recomendado cirurgia para retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, uma coleta de amostra de sangue no dia da sua cirurgia e a permitir que após retirada da peça cirúrgica dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo. O restante do nódulo da próstata será destinado ao exame histológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após término da cirurgia, e este procedimento não representa nenhum risco para sua saúde. Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 5 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são os

inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras por até cinco anos, para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos do nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, também, será solicitado novo termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver Hiperplasia Prostática e outras doenças na próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Não haverá nenhuma despesa para sua participação neste projeto. O Sr. receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559 ou 99969044), Prof. Dr. Milton Berger (51 33598286) Prof. Dr. Brasil Silva Neto (51 33598286) e a Pós-graduanda Patrícia Borba Martiny (51 84070066). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (51 3359 8304).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi uma via deste termo de consentimento, também a garantia de resposta a dúvidas ou

esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data: _____

Paciente ou responsável (nome legível): _____

Assinatura: _____

Pesquisador _____

Assinatura: _____

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Centro de Pesquisa Experimental

LaGOM (Laboratório 12106)

Rua Ramiro Barcellos, 2350 Bairro Rio Branco- Telefone (51) 3359.7625

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Fisiologia

Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (Laboratório 09)

Rua Sarmiento Leite, 500 - Telefone: (51) 3308 3559

Porto Alegre-RS

Referências

- (2003). "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **26 Suppl 1**: S5-20.
- Abdollah, F., A. Briganti, et al. (2011). "Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: evidence of a potential relationship, hypothesized etiology, and prevention." Korean J Urol **52**(8): 507-516.
- Agoulnik, I. U. and N. L. Weigel (2008). "Androgen receptor coactivators and prostate cancer." Adv Exp Med Biol **617**: 245-255.
- Agouni, A., C. Owen, et al. (2010). "In vivo differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues." Biochem Biophys Res Commun **401**(1): 104-111.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med **15**(7): 539-553.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." Oncogene **24**(50): 7455-7464.
- AUA. (2012). "American Urological Association." Retrieved 03/2012, from www.aua.org.
- Ayala, G., T. Thompson, et al. (2004). "High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence." Clin Cancer Res **10**(19): 6572-6578.
- Belfiore, A., F. Frasca, et al. (2009). "Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease." Endocr Rev **30**(6): 586-623.
- Bennett, N. C., R. A. Gardiner, et al. (2010). "Molecular cell biology of androgen receptor signalling." Int J Biochem Cell Biol **42**(6): 813-827.
- Berry, P. A., N. J. Maitland, et al. (2008). "Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells." Mol Cell Endocrinol **288**(1-2): 30-37.
- Bidosee, M., R. Karry, et al. (2009). "Regulation of growth hormone receptors in human prostate cancer cell lines." Mol Cell Endocrinol **309**(1-2): 82-92.
- Borugian, M. J., J. J. Spinelli, et al. (2007). "Prediagnostic C-peptide and risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(10): 2164-2165.
- Boucher, J., Y. H. Tseng, et al. (2010). "Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription." J Biol Chem **285**(22): 17235-17245.
- Bourke, J. B. and J. P. Griffin (1966). "Hypertension, diabetes mellitus, and blood groups in benign prostatic hypertrophy." Br J Urol **38**(1): 18-23.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brum, I. S., D. M. Morsch, et al. (2003). "Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation." Horm Res **60**(5): 209-214.

- Chamberlain, N. L., E. D. Driver, et al. (1994). "The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function." Nucleic Acids Res **22**(15): 3181-3186.
- Chan, J. M., M. J. Stampfer, et al. (1998). "Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study." Science **279**(5350): 563-566.
- Chan, J. M., M. J. Stampfer, et al. (2002). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer." J Natl Cancer Inst **94**(14): 1099-1106.
- Chatterjee, B. (2003). "The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 89-101.
- Chokkalingam, A. P., Y. T. Gao, et al. (2002). "Insulin-like growth factors and risk of benign prostatic hyperplasia." Prostate **52**(2): 98-105.
- Cox, M. E., M. E. Gleave, et al. (2009). "Insulin receptor expression by human prostate cancers." Prostate **69**(1): 33-40.
- Dahle, S. E., A. P. Chokkalingam, et al. (2002). "Body size and serum levels of insulin and leptin in relation to the risk of benign prostatic hyperplasia." J Urol **168**(2): 599-604.
- De Meyts, P. (2008). "The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors?" Trends Biochem Sci **33**(8): 376-384.
- Edwards, J. and J. M. Bartlett (2005). "The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways." BJU Int **95**(9): 1327-1335.
- Fan, W., T. Yanase, et al. (2007). "Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor." J Biol Chem **282**(10): 7329-7338.
- Fayard, E., L. A. Tintignac, et al. (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5675-5678.
- Ferreira, G. D., R. B. Orcy, et al. (2011). "Insulin stimulation of Akt/PKB phosphorylation in the placenta of preeclampsia patients." Sao Paulo Med J **129**(6): 387-391.
- Gelmann, E. P. (2002). "Molecular biology of the androgen receptor." J Clin Oncol **20**(13): 3001-3015.
- Gennigens, C., C. Menetrier-Caux, et al. (2006). "Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer." Crit Rev Oncol Hematol **58**(2): 124-145.
- Gioeli, D., S. B. Ficarro, et al. (2002). "Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites." J Biol Chem **277**(32): 29304-29314.
- Godsland, I. F. (2010). "Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer." Clin Sci (Lond) **118**(5): 315-332.
- Grothey, A., W. Voigt, et al. (1999). "The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors." J Cancer Res Clin Oncol **125**(3-4): 166-173.
- Hammarsten, J. and B. Hogstedt (1999). "Clinical, anthropometric, metabolic and insulin profile of men with fast annual growth rates of benign prostatic hyperplasia." Blood Press **8**(1): 29-36.
- Hammarsten, J. and B. Hogstedt (2001). "Hyperinsulinaemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia." Eur Urol **39**(2): 151-158.
- Hammarsten, J. and B. Hogstedt (2005). "Hyperinsulinaemia: a prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer." Eur J Cancer **41**(18): 2887-2895.
- Hammarsten, J., B. Hogstedt, et al. (1998). "Components of the metabolic syndrome-risk factors for the development of benign prostatic hyperplasia." Prostate Cancer Prostatic Dis **1**(3): 157-162.

- Hers, I., E. E. Vincent, et al. (2011). "Akt signalling in health and disease." Cell Signal **23**(10): 1515-1527.
- Ho, C. K. and F. K. Habib (2011). "Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH." Nat Rev Urol **8**(1): 29-41.
- Holzbeierlein, J., P. Lal, et al. (2004). "Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance." Am J Pathol **164**(1): 217-227.
- Hsing, A. W., S. Chua, Jr., et al. (2001). "Prostate cancer risk and serum levels of insulin and leptin: a population-based study." J Natl Cancer Inst **93**(10): 783-789.
- Hubbard, J. S., S. Rohrmann, et al. (2004). "Association of prostate cancer risk with insulin, glucose, and anthropometry in the Baltimore longitudinal study of aging." Urology **63**(2): 253-258.
- IDF (2006) "The International Diabetes Federation consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome."
- IDF. (2011, 24/03/2011). "International Diabetes Federation." from www.idf.org/home/index.cfm?node=4.
- INCA (2011). Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. . D. d. T. d. I. (DTI). Rio de Janeiro.
- Kawashima, Y., S. I. Takahashi, et al. (2011). "Familial short stature with IGF-I receptor gene anomaly [Review]." Endocr J.
- Knowlden, J. M., H. E. Jones, et al. (2008). "Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling: implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance." Breast Cancer Res Treat **111**(1): 79-91.
- Kojima, S., M. Inahara, et al. (2009). "Implications of insulin-like growth factor-I for prostate cancer therapies." Int J Urol **16**(2): 161-167.
- Koochekpour, S. (2010). "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer." Asian J Androl **12**(5): 639-657.
- Kronenberg, H. M., Ed. (2008). Williams Textbook of ENDOCRINOLOGY, Saunders Elsevier.
- Lacey, J. V., Jr., A. W. Hsing, et al. (2001). "Null association between insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer in a prospective study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(10): 1101-1102.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lawrence, M. C., N. M. McKern, et al. (2007). "Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor." Curr Opin Struct Biol **17**(6): 699-705.
- Le Page, C., I. H. Koumakpayi, et al. (2006). "Expression and localisation of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients." Br J Cancer **94**(12): 1906-1912.
- Lee, H. J. and C. Chang (2003). "Recent advances in androgen receptor action." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1613-1622.
- Lee, W. J. (2009). "Insulin-like growth factor-I-induced androgen receptor activation is mediated by the PI3K/Akt pathway in C2C12 skeletal muscle cells." Mol Cells **28**(5): 495-499.
- Lin, H. K., S. Yeh, et al. (2001). "Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7200-7205.

- Liu, X., R. Y. Choi, et al. (2011). "Androgen-induced PSA expression requires not only activation of AR but also endogenous IGF-I or IGF-I/PI3K/Akt signaling in human prostate cancer epithelial cells." Prostate **71**(7): 766-777.
- Long, L., R. Navab, et al. (1998). "Regulation of the Mr 72,000 type IV collagenase by the type I insulin-like growth factor receptor." Cancer Res **58**(15): 3243-3247.
- Lopes, H. F., Ed. (2007). Síndrome Metabólica: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo, Atheneu.
- Lubahn, D. B., D. R. Joseph, et al. (1988). "Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome." Science **240**(4850): 327-330.
- Mackinnon, A. C., B. C. Yan, et al. (2009). "Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update." Arch Pathol Lab Med **133**(7): 1033-1040.
- Marte, B. M. and J. Downward (1997). "PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond." Trends Biochem Sci **22**(9): 355-358.
- McCall, P., L. K. Gemmell, et al. (2008). "Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients." Br J Cancer **98**(6): 1094-1101.
- McKeehan, W. L., P. S. Adams, et al. (1984). "Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture." Cancer Res **44**(5): 1998-2010.
- Nicholson, T. M. and W. A. Ricke (2011). "Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future." Differentiation **82**(4-5): 184-199.
- Orcy, R. B., I. Brum, et al. (2005). "Insulin receptor tyrosine kinase activity and substrate 1 (IRS-1) expression in human myometrium and leiomyoma." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **123**(1): 107-110.
- Ozkan, E. E. (2011). "Plasma and tissue insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) as a prognostic marker for prostate cancer and anti-IGF-IR agents as novel therapeutic strategy for refractory cases: a review." Mol Cell Endocrinol **344**(1-2): 1-24.
- Pandini, G., R. Mineo, et al. (2005). "Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells." Cancer Res **65**(5): 1849-1857.
- Papa, V., V. Pezzino, et al. (1990). "Elevated insulin receptor content in human breast cancer." J Clin Invest **86**(5): 1503-1510.
- Pederson, T. M., D. L. Kramer, et al. (2001). "Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation." Diabetes **50**(1): 24-31.
- Rizzo, S., G. Attard, et al. (2005). "Prostate epithelial stem cells." Cell Prolif **38**(6): 363-374.
- Roddam, A. W., N. E. Allen, et al. (2008). "Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies." Ann Intern Med **149**(7): 461-471, W483-468.
- Russell, P. J. and E. A. Kingsley (2003). "Human prostate cancer cell lines." Methods Mol Med **81**: 21-39.
- Sacco, A., A. Morcavallo, et al. (2009). "Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A." Endocrinology **150**(8): 3594-3602.
- Sayeed, A., N. Alam, et al. (2011). "Insulin-like growth factor 1 stimulation of androgen receptor activity requires beta(1A) integrins." J Cell Physiol.
- SBC (2005). I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. S. B. d. Cardiologia, Arquivos Brasileiros de Cardiologia **84**: 3-27.

- SBD. (2011, 21/03/2011). "Sociedade Brasileira de Diabetes." from <http://www.diabetes.org.br>.
- Scioscia, M., K. Gumaa, et al. (2006). "Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2." J Clin Endocrinol Metab **91**(2): 709-717.
- Sesti, G. (2006). "Pathophysiology of insulin resistance." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **20**(4): 665-679.
- Silva Neto, B., W. J. Koff, et al. (2008). "Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population." Cancer Invest **26**(1): 74-80.
- Singh, R. P. and R. Agarwal (2006). "Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention." Endocr Relat Cancer **13**(3): 751-778.
- Srougi, M. (2008). "Prostate diseases." Rev Med (São Paulo) **3**(87): 166-177.
- Stamatiou, K., M. Lardas, et al. (2009). "The impact of diabetes type 2 in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia: a review." Adv Urol: 818965.
- Strittmatter, F., S. Walther, et al. (2012). "Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate." Life Sci **90**(11-12): 446-453.
- Suaid, H. J., M. A. Goncalves, et al. (2003). "Estimated costs of treatment of benign prostate hyperplasia in Brazil." Int Braz J Urol **29**(3): 234-237.
- Sutherland, B. W., S. E. Knoblauch, et al. (2008). "Conditional deletion of insulin-like growth factor-I receptor in prostate epithelium." Cancer Res **68**(9): 3495-3504.
- Taneja, S. S., S. Ha, et al. (2005). "Cell-specific regulation of androgen receptor phosphorylation in vivo." J Biol Chem **280**(49): 40916-40924.
- Ullrich, A., J. R. Bell, et al. (1985). "Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes." Nature **313**(6005): 756-761.
- Vikram, A. and G. Jena (2011). "Role of insulin and testosterone in prostatic growth: who is doing what?" Med Hypotheses **76**(4): 474-478.
- Vikram, A., G. B. Jena, et al. (2010). "Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia." Prostate **70**(1): 79-89.
- Ward, R. D. and N. L. Weigel (2009). "Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation." Biofactors **35**(6): 528-536.
- Woodgett, J. R. (2005). "Recent advances in the protein kinase B signaling pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 150-157.
- Wu, J. D., K. Haugk, et al. (2006). "Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression." J Cell Biochem **99**(2): 392-401.
- Zhou, Z. X., C. I. Wong, et al. (1994). "The androgen receptor: an overview." Recent Prog Horm Res **49**: 249-274.