

MARIA FERNANDA DUARTE SILVA

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS ENTRE OBESIDADE E CARCINOMA DA PRÓSTATA

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador –Doutor José M. LaFuente Carvalho

Categoria – professor catedrático convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Coorientador – Doutor Rúben M. P. Fernandes

Categoria – professor adjunto com Agregação

Afiliação – Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto

*Ao meu filho João Pedro,
a luz da minha vida.*

Agradecimentos

Gostaria de deixar o meu profundo agradecimento a todos os que estiveram envolvidos ou contribuíram, de uma forma direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Ao **Professor Doutor La Fuente de Cavalho** por ter aceite tão gentilmente ser orientador, sempre disposto a contribuir e enriquecer este Trabalho, quero expressar o meu mais sentido reconhecimento e admiração pela excelência profissional e humana.

O meu muito obrigada pela partilha do seu conhecimento e sabedoria, estando verdadeiramente grata por ter aceite orientar-me.

Ao **Professor Doutor Ruben Fernandes** por ter aceite orientar este trabalho e por contribuir de forma significativa com o seu conhecimento, enriquecendo este trabalho. E que durante esta minha jornada em busca do conhecimento me fez ser perseverante perante as dificuldades, e que me motivou a concretizar e a concluir esta etapa. Agradeço toda a ajuda, orientação e dedicação. Obrigada por ter acreditado nas minhas capacidades desde o início, por toda a motivação e paciência.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIV
INTRODUÇÃO E RESUMO DA TESE	XVI
INTRODUCTION AND DISSERTATION PLAN	XX
PALAVRAS-CHAVE/KEY-WORDS	XXII
CAPÍTULO 1.....	1
1. CARCINOMA DA PRÓSTATA	3
1.1. EPIDEMIOLOGIA	7
1.2. EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DA PRÓSTATA EM PORTUGAL.....	8
1.2.1. Incidência	8
1.2.2. Prevalência.....	8
1.2.3. Mortalidade.....	9
1.3. ETIOLOGIA.....	11
1.4. FATORES DE RISCO.....	11
1.4.1. Idade	11
1.4.2. Antecedentes familiares	11
1.4.3. Fatores genéticos	12
1.4.4. Etnia	12
1.4.5. Dieta.....	12
1.4.6. Estilo de vida	13
1.5. BIOMARCADORES DO CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	14
1.5.1. PSA, Antígeno específico da próstata.....	14
1.5.2. PSA livre.....	16

1.5.3. PSA complexado	17
1.5.4. Pró-PSA	17
1.5.5. Densidade do PSA	18
1.5.5. Velocidade do PSA	18
1.5.6. PCA 3	19
1.5.7. Sarcosina	19
1.5.8. Influência da obesidade nos níveis séricos no PSA	20
2. OBESIDADE.....	21
2.1. DEFINIÇÃO E PREVALÊNCIA	21
2.2. EPIDEMIOLOGIA DA PRÉ-OBESIDADE E DA OBESIDADE EM PORTUGAL	23
2.3. A RELAÇÃO ENTRE A OBESIDADE E O CANCRO ACONTECE DE VÁRIAS FORMAS	25
2.4. ETIOLOGIA.....	25
2.5. TECIDO ADIPOSEO	26
2.5.1. Tecido adiposo como órgão endócrino.....	28
2.6. ADIPOCINAS.....	29
2.6.1. Leptina.....	30
2.6.2. Grelina.....	32
2.6.3. Adiponectina.....	33
2.7. TECIDO ADIPOSEO E INFLAMAÇÃO	34
2.7.1. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	36
2.7.2. Interleucina 6 (IL6)	37
2.8. OBESIDADE E DISLIPIDEMIA	37
2.8.1. Triglicerídeos	39
2.8.2. Colesterol	39
2.8.3. Lipoproteínas	40
2.9. HORMONAS ESTEROIDES.....	42
2.9.1. Androgénios	42
2.9.2. Testosterona.....	43
2.9.3. Hormona Luteinizante (LH).....	44

2.9.4. Prolactina.....	44
2.9.5. Estradiol	45
3. OBESIDADE E CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	46
3.1. INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NO CARCINOMA DA PRÓSTATA	46
3.2. FATORES METABÓLICOS ENVOLVIDOS NO CAP.....	47
3.3. HORMONAS E CARCINOMA DA PRÓSTATA	48
4.OBJETIVOS	51
CAPÍTULO 2.....	53
1.TIPO DE ESTUDO	55
1.1. POPULAÇÃO DO ESTUDO CLÍNICO	55
1.2. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	55
1.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	55
1.4. QUESTÕES ÉTICAS.....	55
2. COLHEITA DE SANGUE.....	56
3. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	56
3.1. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL - IMC.....	56
4. MÉTODOS ANALÍTICOS	57
4.1. PERFIL BIOQUÍMICO	57
4.1.1. Colesterol Total (CT)	58
4.1.2. Colesterol- HDL.....	59
4.1.3. Colesterol-LDL	60
4.1.4. Colesterol-VLDL	60
4.1.5. Triglicerídeos	61
4.2. PERFIL HORMONAL.....	62
4.2.1 Estradiol e Testosterona.....	62
4.2.2. Prolactina e Hormona Luteinizante	63
4.2.3. Leptina.....	64
4.3. BIOMARCADORES PROSTÁTICOS	65
4.3.1. <i>Antígenos específico da próstata total (PSA) e livre (FPSA)</i>	65

4.4. HEMOGLOBINA A1C	66
5. CULTURA CELULAR E TRATAMENTOS <i>IN VITRO</i>	68
5.1. DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS E COLHEITA DE MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS (ACM).....	68
5.2. TRATAMENTOS NAS CULTURAS CELULARES	69
5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	69
5.4. ENSAIO DE LESÃO E ANÁLISE DE ESTEREOLOGIA COMPUTACIONAL....	69
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
CAPÍTULO 3.....	71
1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA.....	73
2. CARACTERIZAÇÃO HORMONAL E METABÓLICA DOS PARTICIPANTES....	73
3. CORRELAÇÕES ENTRE O PERFIL CLÍNICO E BIOQUÍMICO	76
4. CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE ADIPÓCITOS	80
4.1. MEIO CONDICIONADO POR ADIPÓCITOS (ACM) AUMENTA A VIABILIDADE DE PC3.	80
CAPÍTULO 4.....	83
DISCUSSÃO	85
EM CONCLUSÃO.....	89
PERSPECTIVAS FUTURAS	91
CAPÍTULO 5.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	117
ARTIGO.....	119

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Indicadores de mortalidade relativos a tumor maligno da próstata em Portugal. (2008 a 2012)

Tabela 2 – Índice de Massa Corporal

Tabela 3 – Prevalência da pré-obesidade e obesidade em Portugal

Tabela 4 – Estatísticas descritivas para perfis hormonais e bioquímicos

Tabela 5 – Qui-quadrado (χ^2) de Score de Gleason (agressividade tumoral) em relação aos perfis clínicos e bioquímicos

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre perfis clínicos e bioquímicos

Índice de Figuras

Figura 1 – Localização da Próstata

Figura 2 – Estadiamento e localização do carcinoma da Próstata

Figura 3 – Incidência e mortalidade por do Carcinoma da Prostata em 2012 no mundo

Figura 4 – Taxa de Incidência do Carcinoma da Próstata em Portugal.

Figura 5 – Mortalidade por Carcinoma da Próstata em Portugal

Figura 6 – Curvas ROC - PSA

Figura 7 – Evolução da prevalência da obesidade em adultos Portugueses nos últimos quarenta anos

Figura 8 – Incidência Mundial da Obesidade (Fonte: OMS, 2010)

Figura 9 – Funções gerais da Leptina

Figura 10 – Principais adipocinas e suas categorias funcionais

Figura 11 – Hipóteses biológicas para a agressividade do CaP

Figura 12 – Perfil ponderal dos pacientes de Urologia

Figura 13 – Atividade metabólica (A) e agressividade (B) de células cancerosas da próstata PC3.

Figura 14 – Modelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal no Carcinoma da Próstata em doentes Obesos.

Abreviaturas

AR – Recetor androgénico

CaP – Carcinoma da Próstata

CDM – *Clinical Data Management*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

FSH – Hormona Folículo-estimulante

GH – Hormona de Crescimento

HPB - Hiperplasia benigna da Próstata

HPC1 – Gene Hereditário-1 do Carcinoma da Próstata

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina

IL6 – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corporal

LH – Hormona Luteinizante

PAI-I – Inibidor do ativador de plasminogénio

PCA 3 – Prostate Cancer Antigen 3

PSA – Antígeno Específico da Próstata

ROC – Receiver Operating Characteristic Curves

SGBH – Globulina ligadora de hormonas sexuais

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo branco

TAC – Tomografia axial compotorizada

TAM – Tecido adiposo castanho

TMN – Tamanho metástases e nódulos

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TR – Toque retal

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Introdução e resumo da Tese

O Carcinoma da Próstata é actualmente uma das patologias oncológicas com grande incidência, mas muito variável em todo o mundo, devido a vários fatores, incluindo o rastreio, deteção precoce de CaP e acesso a cuidados de saúde.

O CaP continua com elevada incidência global, e com uma prevalência igualmente a aumentar, apesar da diminuição da taxa de mortalidade, fruto da melhoria da prestação de cuidados de saúde. Apesar dessa melhoria, continua a ser a principal causa de morte por cancro nos homens.

A evidência epidemiológica sustenta também, de forma crescente e consistente, que a obesidade representa um problema de saúde pública à escala global. Os dados apontam para uma tendência secular no aumento das prevalências de excesso de peso, de forma global.

Apenas recentemente, tem sido direcionado investimento para o estudo da associação entre estas duas condições clínicas. Dados emergentes sugerem que a obesidade aumenta o risco de CaP mesmo o de maior agressividade. A associação entre obesidade e CaP é portanto, complexa. A complexidade dessa relação está intrinsecamente interligada com a diversidade de factores de risco associados a ambas patologias. Estes factores de risco, podem ser de carácter intrínseco, como os factores de risco não modificáveis (exemplo, natureza hereditária) quer extrínsecos, ou factores de risco modificáveis (exemplo, estilos de vida).

Para compreender este paradigma, o objetivo major deste trabalho foi tentar compreender a relação entre a obesidade e CaP uma vez que neste momento ainda não se conhecem completamente as implicações clínicas nem os mecanismos moleculares associados ao Carcinoma da próstata em doentes com alterações ponderais (excesso de peso e obesidade).

Para atingir esse objetivo amplo, seria necessário desenvolver um estudo retrospectivo para avaliar as alterações hormonais e metabólicas dos doentes com patologia tumoral de próstata.

No presente trabalho, fez-se um estudo em doentes do serviço de Urologia do Centro Hospitalar Universitário do Porto. Nestes doentes, avaliou-se entre outros, no momento da biópsia, o índice de massa corporal em relação à gravidade da doença. Analisou-se ainda, um amplo painel metabólico e hormonal nestes indivíduos. Adicionalmente, com base nas alterações metabólicas e hormonais principais apresentadas por este conjunto de doentes, fez-se um estudo experimental *in vitro*, utilizando culturas celulares de uma linha tumoral de Carcinoma de próstata.

No primeiro capítulo desta tese, apresenta-se um estado da arte sobre a relação entre as duas patologias. Posteriormente, apresenta-se um segundo capítulo que descreve em detalhe as metodologias e técnicas utilizadas no presente trabalho, para avaliação dos parâmetros clínicos dos participantes. Descrevem-se os métodos de análise dos parâmetros metabólicos como o perfil lipídico, incluindo o doseamento de Colesterol Total, Colesterol- HDL, Colesterol-LDL, Colesterol-VLDL e Triglicerídeos e ainda a Hemoglobina Glicada (HbA1c). Também se descrevem os parâmetros hormonais analisados nos doentes, tais como o doseamento de Testosterona Total, Prolactina, Estradiol, Hormona Luteinizante e Leptina. Os biomarcadores do CaP utilizados neste estudo foram o PSA Total e o PSA Livre.

O capítulo três assume-se como o capítulo de apresentação dos resultados quer do estudo clínico que avalia o impacto clínico da obesidade nos circuitos hormonais dos doentes bem como o seu estado metabólico. Neste capítulo são ainda apresentados os resultados experimentais relacionados com os estudos *in vitro*, utilizando as culturas celulares sujeitas a diferentes estados metabólicos e hormonais. Os principais resultados encontrados no decurso do desenvolvimento do estudo evidenciam uma forte influência da idade, da obesidade e dos baixos níveis de testosterona na agressividade do Carcinoma da Próstata. Estes resultados clínicos foram corroborados pela evidência experimental.

Os resultados expostos no capítulo três são discutidos e analisados à luz do conhecimento científico atual no capítulo quatro, sendo que a tese termina com um conjunto de conclusões e sugestões de caminhos a explorar no futuro.

Os principais resultados deste trabalho de tese, estão parcialmente publicados no artigo intitulado “Clinical and metabolic implications of obesity in prostate cancer: is testosterone a missing link?” da autoria de Maria Fernanda Duarte e colaboradores publicado na revista Aging Male no volume 24 nas páginas 1 a 13.

Introduction and Dissertation Plan

Prostate cancer is currently one of the oncological pathology with the huge incidence, but widely varying in the world, owing to a number of factors, including screening, early detection of PCa, and access to health care.

PCa continues to have a high global incidence, and with a prevalence also increasing, although the decrease in the mortality rate, as a result of improved health care delivery. Despite this improvement, it remains the leading cause of death in men cancer.

Epidemiological evidence is also increasingly and consistently that obesity is a worldwide public health problem. The data point to a secular trend in the increase of the prevalence of overweight, in a global way.

Only recently, investment has been directed towards the study of the association between these two clinical conditions. Emerging data suggest that obesity increases the risk of even more aggressive PCa. The association between obesity and PCa is therefore complex. The complexity of this relationship is inextricably intertwined with the diversity of risk factors associated with both pathologies. These risk factors may be of an intrinsic nature such as non-modifiable risk factors (e.g., hereditary factors) or extrinsic risk factors, or modifiable risk factors (e.g., lifestyle habits).

In order to understand this paradigm the main objective of this work was to try to acknowledge the relationship between the obesity and PCa, since at the moment the clinical implications and the molecular mechanism associated with prostate cancer are not fully understood in patients with weight changes (overweight and obese).

To achieve this broad goal, a retrospective study should be needed in order to evaluate the hormonal and metabolic changes of the patients with prostate tumor pathology.

In the present work, a study was performed on patients from the Urology Department of the University Hospital Center of Porto. In these patients, at the moment of the biopsy, the body mass index was evaluated, among others factor, to the severity of the disease. We also analyzed a vast metabolic and primary hormonal panel in these patients. Additionally, based on major metabolic and hormonal changes present by this set of patients, an in vitro experimental study was performed using cell cultures of prostate cancer tumor line.

In the first chapter of this thesis, a state of the art is presented on the relation between the two pathologies. Subsequently, a second chapter is presented describing in detail the methodologies and techniques used in the present study, to evaluate the clinical parameters of the participants. Metabolic parameters analysis methods are described, including the determination of the Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, VLDL-Cholesterol and Triglycerides as well as Glycated Hemoglobin (HbA1c). Also are described the hormonal parameters analyzed in the patients, such as the assay of Total Testosterone, Prolactin, Estradiol, Luteinizing Hormone and Leptin. The biomarkers of PCa used in this study were total PSA and Free PSA.

The third chapter is taken as the chapter presenting the results of either the clinical study that assesses the clinical impact of obesity on patients hormone circuits as well as their metabolic status. In this chapter the experimental results related to the in vitro studies are presented, using cell cultures subject to different metabolic and hormonal states. The main results found in the course of the study show a strong influence of age, obesity and low levels of testosterone in the aggressiveness of PCa. These clinical results were corroborated by the experimental evidence.

The results presented in chapter three are discussed and analyzed in the light of current scientific knowledge in chapter four, and the thesis ends with the set of conclusions and suggestions of ways to explore in the future.

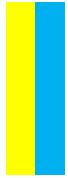
The main results of this thesis are partially published in the article entitled "Clinical and metabolic implications of obesity in prostate cancer: is testosterone a missing link?" By Maria Fernanda Duarte et al. Published in *Aging Male* in volume 24 on pages 1 to 13.

Palavras-chave

Carcinoma da Próstata, Obesidade

Key-words

Prostate cancer, obesity



Doutoramento em Ciências Biomédicas

Capítulo 1

Introdução e Estado da Arte

1. CARCINOMA DA PRÓSTATA

O Carcinoma da Próstata é hoje um importante problema de saúde pública na Europa e em muitos países a nível mundial.(Torre et al., 2015). O número de doentes tem vindo a aumentar, globalmente, ao longo das últimas décadas, correlacionando esta conjuntura não só ao conhecimento dos fatores de risco, mas também ao aumento da esperança de vida, à possibilidade de diagnósticos mais precoces. Atualmente é o segundo carcinoma mais prevalente no homem, tratando-se da 4^a causa de morte por cancro no homem, nos países ocidentais.(Attard et al., 2016) Esta patologia apresenta uma prevalência elevada na população masculina e geralmente manifesta-se como uma doença localizada, mas com um crescimento lento.(Bell, Del Mar, Wright, Dickinson, & Glasziou, 2015)

É provocado pela transformação maligna de células da glândula prostática que adquirem características anómalas e começam a reproduzir-se a um ritmo mais acelerado do que o normal, formando um tumor.(Aaron, Franco, & Hayward, 2016)

Ao contrário do que acontece em caso de hiperplasia benigna da próstata (HPB) as células que constituem este tumor, quando comparadas com as normais, apresentam traços atípicos e perdem facilmente a adesão à restante massa em proliferação. Desta forma, esta perda de adesão celular proporciona a sua infiltração nos tecidos vizinhos e a invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos adjacentes, chegando através da circulação a locais mais ou menos afastados, onde se estabelecem e originam metástases, ou seja, tumores secundários.(Maurizi & Rucci, 2018) A próstata é um órgão de consistência elástica facilmente identificável ao toque retal, no adulto a próstata tem cerca de 3 cm de comprimento, 4 cm de largura e 2 cm de espessura ântero-posterior. O volume varia com a idade, e começa a aumentar na puberdade, estabiliza entre os 25 e 50 anos, a partir dos quais começa a diminuir. Está localizada na escavação pélvica, separada das paredes da sua loca por intermédio do espaço periprostático, ocupado por tecido celular-adiposo, onde se encontra o plexo venoso periprostático.(McKay & Sharma, 2018)

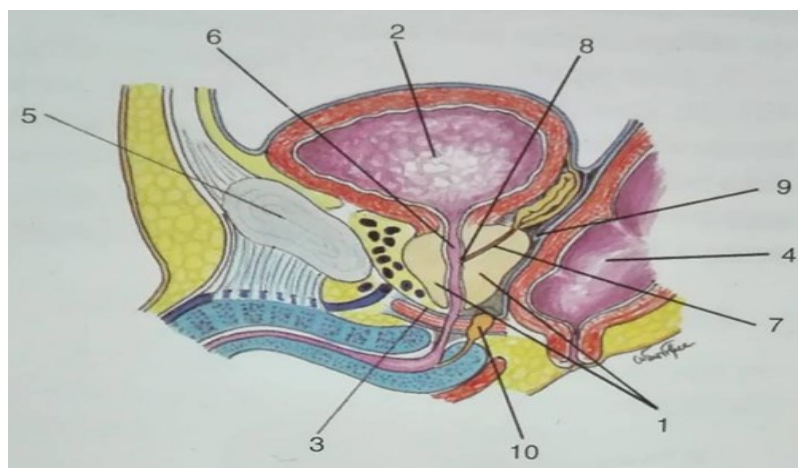


Figura 1 – Localização da próstata.

1. Próstata; 2. Bexiga; 3. Folheto superior da aponevrose perineal média; 4. Recto; 5. Sínfise púbica; 6. Porção prostática da uretra; 7. Canal ejaculador; 8. Utrículo prostático; 9. Aponevrose prostáto-peritoneal; 10. Glândula bulbo-uretral ou de Cowper.

Fonte: Anatomia Humana- (J.A. Esperança Pina)

A próstata pode considerar-se dividida em cinco lobos, apesar de não haver uma delimitação típica da estruturação sectorial existentes noutros órgãos. Essa divisão somente é nítida no período embrionário e no órgão adulto, o limite entre os lobos é impreciso, não existindo septos de tecido conjuntivo que os separem. A próstata, anatomicamente, está envolvida pela cápsula prostática, de onde partem septos fibrosos, separando as glândulas prostáticas que se encontram envolvidas por um estroma conjuntivo-muscular.

Histologicamente é composta por unidades secretoras túbulo-acinares, envoltas por um estroma rico em células musculares lisas. (Hryn, Ustenko, Pilyugin, Sarychev, & Lavrenko, 2018) A próstata é constituída por 30 a 50 glândulas prostáticas do tipo ácino-tubulosas, cada uma com um canal excretor, abrindo-se independentemente na porção prostática da uretra e formando grupos constituindo os lobos prostáticos.

A secreção das glândulas ácino-tubulosas tem como principal função manter a viabilidade dos espermatozoides. As glândulas externas definem a zona periférica, e as internas ou peri-uretrais definem a zona central. As glândulas da zona periférica caracterizam-se por pequenos espaços acinares delimitados por um epitélio colunar secretor, rodeado por um estroma muscular rico em fibras lisas que, durante a ejaculação, auxiliam o esvaziamento das secreções prostáticas na uretra. A zona central, por sua vez, contém ácinos relativamente grandes delimitados por um epitélio colunar baixo. Uma terceira zona pode

ainda ser identificada, a zona de transição, que compreende 5% a 10% da glândula e cujos ductos desembocam na uretra, próximos aos da zona central.

O tecido não-glandular que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras elásticas e músculo e permite mover o fluido prostático para a uretra. A maioria dos CaP ocorrem nas células epiteliais do tecido glandular, pelo que se denomina adenocarcinoma, habitualmente aparece numa primeira fase na zona periférica da próstata. O segundo local mais frequente de ocorrência do CaP é na zona de transição.(Draghi, Denis, Tolédano, & Letellier, 2018)

Com o passar do tempo, as células de carcinoma crescem e dividem-se o suficiente para formar um tumor que pode crescer bastante e afetar toda a próstata. Podem igualmente crescer através da cápsula prostática e invadir os tecidos circundantes. A este crescimento dá-se o nome de extensão extracapsular. O carcinoma da próstata in situ significa que o tumor está limitado à próstata, e não se desenvolveu para outras partes do corpo (Figura 2).

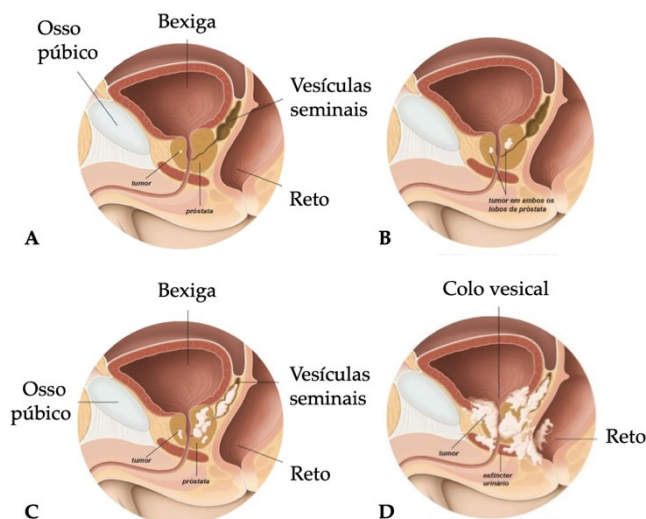


Figura 2 – Estadiamento e localização de um tumor prostático. A- T1; B- T2; C- T3; D- T4.

Fonte: European Association of Urology

Assim o estadiamento maligno do CaP é feito através do sistema TNM (tumor, nódulo, metástase) que avalia o tamanho do tumor, nódulos linfáticos e metástases. Neste sistema T1 e T2 corresponde a tumor confinado à glândula, T3 e T4 se extensão tumoral; N indica nódulos linfáticos regionais positivos e M indica metástases à distância (ESMO, 2015).

Pode ser um tumor T1 ou T2 (Figura 2A e 2B), dependendo das dimensões e da localização na próstata. T1 significa que o tumor é demasiado pequeno, não pode ser palpado no toque retal (TR) e confirmado por biópsia.

- T1a – Tumor incidental na histologia encontra-se em 5% ou menos de tecido ressecado;
- T1b – Tumor incidental na histologia encontra-se em mais de 5% de tecido ressecado;
- T1c – Tumor identificado por biópsia (o mais frequente por doente apresentar PSA elevado e toque retal sem lesão perceptível).

Um tumor T2 significa que pode ser palpado durante o TR, mas ainda está limitado à próstata.

- T2a – Tumor envolve metade de um dos lobos ou menos;
- T2b – Tumor envolve mais de metade de um lobo mas não os dois lobos.
- T2c – Tumor envolve ambos os lobos. (Figura 2B)

O CaP localmente avançado refere-se a um tumor que se desenvolveu para fora da próstata.(Mazzone et al., 2018) Poderá ser um tumor T3 o que significa que o tumor se estende através da cápsula da próstata:

- T3a – Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral) incluindo o envolvimento microscópico do colo da bexiga;
- T3b – Tumor que invade vesículas seminais.

No caso de tumor T4 este está fixo ou envolve estruturas adjacentes para além das vesículas seminais, por exemplo esfíncter externo ou reto, músculos elevadores do ânus e/ou parede pélvica. (Figuras 2C e 2D)

Alguns tumores da próstata podem causar o aparecimento de novos vasos sanguíneos e linfáticos para além dos já existentes, de forma a receber nutrientes para conseguir crescer. Se o tumor da próstata invadir os vasos sanguíneos e linfáticos, pode metastizar, sendo a forma mais frequente, afetar

primeiro gânglios linfáticos e os ossos.(Draghi et al., 2018; Maurizi & Rucci, 2018)

A classificação histológica universalmente aceite e utilizada para estes tumores é a Classificação de Gleason (Epstein et al., 2015), elaborada. Este sistema de classificação foi elaborado por Donald Gleason, Anatomo-Patologista norte-americano.

Segundo a Sociedade Internacional de Patologia Urológica de 2014, modificou o *score* de Gleason detetado no material de biópsia e, englobou o padrão presente mais extenso (padrão primário) associado ao padrão mais comum (padrão secundário), se dois estiverem presentes. Se apenas estiver presente um padrão, este deve ser duplicado para se definir o *score* combinado de Gleason. A pontuação de Gleason compreende a nota mais comum e também o grau mais elevado, independentemente da sua extensão. Quando um carcinoma é em grande parte grau 4/5, identificação de glândulas <5% de Gleason grau 2 ou 3, não deve ser incorporado no *score* de Gleason. Um *score* de Gleason ≤ 4 não deve ser dado com base em biópsias da próstata.

O *score* de Gleason ajuda a avaliar o prognóstico de homens com carcinoma da próstata, associado a outros parâmetros, numa estratégia de estadiamento do CaP, permite prever o prognóstico e orientar a terapêutica mais adequada para o doente.(Klein et al., 2016)

1.1. Epidemiologia

Sendo a neoplasia não cutânea mais frequentemente diagnosticada e a segunda causa de morte por cancro nos homens dos Estados Unidos da América (Weiner, Matulewicz, Eggener, & Schaeffer, 2016), estima-se que na Europa, seja a principal causa de cancro não cutâneo no homem e a terceira causa de morte por cancro.(Torre et al., 2015) É pertinente conhecer a prevalência de CaP em Portugal, tendo sido realizados alguns estudos nesse âmbito.(C. Castro, Antunes, Lunet, & Bento, 2016a) Estes estudos demonstram que a incidência do CaP tem vindo a aumentar nas últimas décadas.(Direcção-Geral da Saúde, 2014)

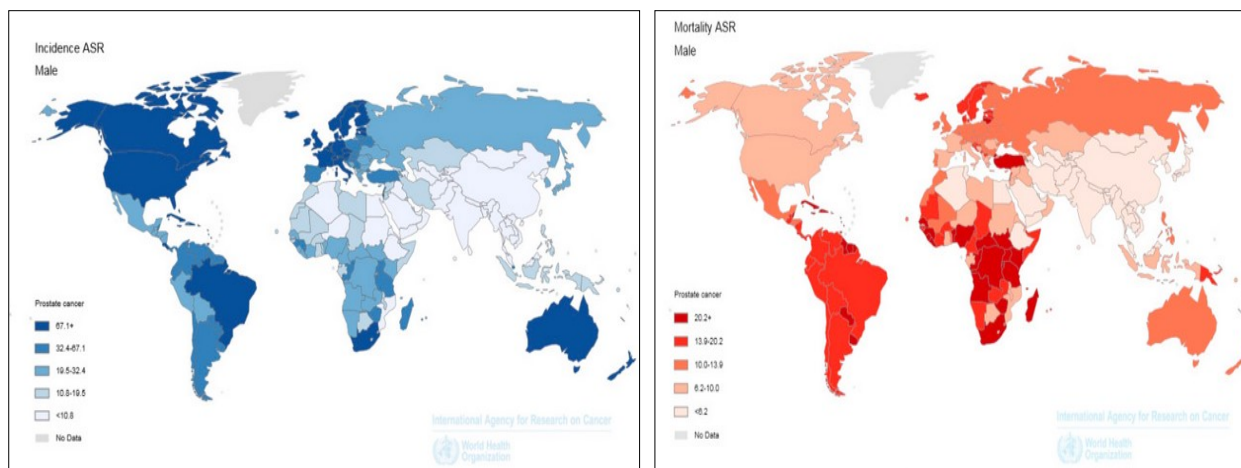


Figura 3 – Incidência (A) e mortalidade (B) por Carcinoma de Próstata em 2012.
Fonte: GLOBOCAN 2012.

Como referido, o CaP é o tipo de cancro mais frequente no homem sendo superior ao cancro da pele e ao cancro do pulmão. Registam-se aproximadamente 4.000 novos casos por ano.(Lima, Bastos, Carvalho, & Guedes de Pinho, 2016)

1.2. Epidemiologia do Carcinoma da Próstata em Portugal

1.2.1. Incidência

No sentido de estimar o número de casos incidentes no norte de Portugal para 2015 e 2020 foram recolhidos pelo Registo de Cancro da Região Norte de Portugal (RORENO) e o número de indivíduos afetados com CaP foram obtidos do INE(C. Castro, Antunes, Lunet, & Bento, 2016b). O objetivo deste estudo foi analisar as tendências de incidência dos principais tipos de cancro. Este estudo contribui para uma melhor compreensão da epidemiologia oncológica no norte de Portugal.

1.2.2. Prevalência

Com o objetivo de estimar a prevalência do CaP em Portugal, foi feito um estudo em 2010, onde foram incluídos 2.465 doentes, entre os 40 e 96 anos, distribuídos por 43 centros. Foi um estudo de registo Nacional, transversal e multicêntrico com recolha retrospectiva de dados de doentes com CaP, incluindo data e método de diagnóstico, *Score* de Gleason, valor de Antígeno Específico

da Próstata (PSA) Total, tratamento anterior e estadió clínico resultante.(Nunes, Pimentel, Pina, & Rolo, 2010)

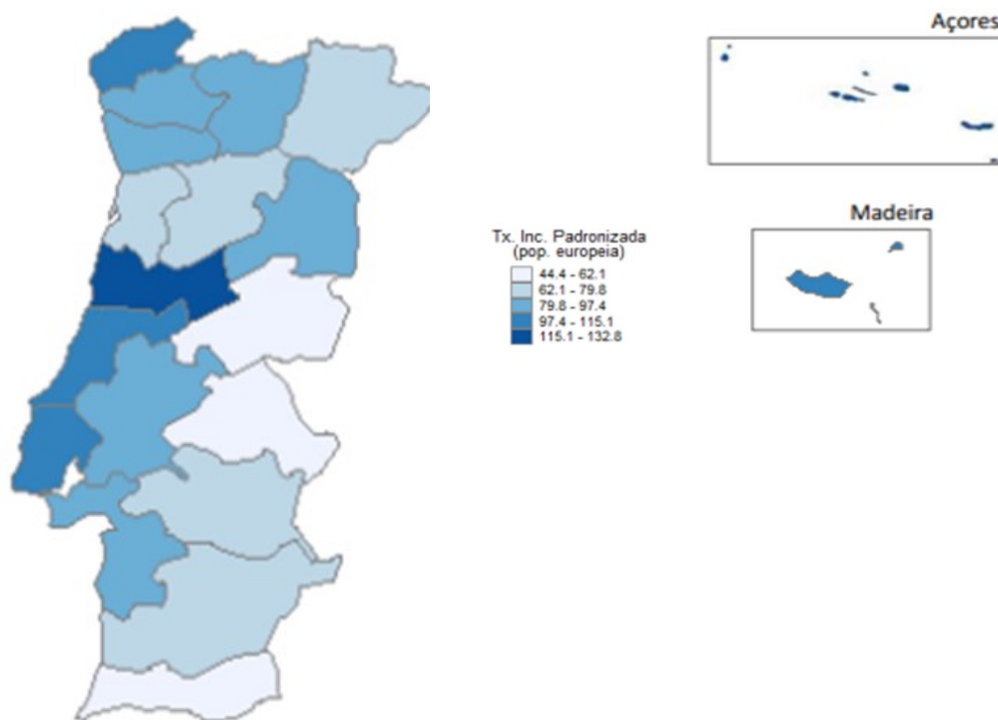


Figura 4 – Taxa de Incidência do Carcinoma da Próstata em Portugal.

Fonte: Registo Oncológico Nacional 2010: Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil – EPE, Porto, 2016.

Em Portugal, o CaP é o de maior incidência, ocupando o terceiro lugar como causa de morte por cancro. A incidência do CaP aumenta com a idade, ou seja, não é uma doença do homem jovem, com o natural aumento da esperança de vida. Estima-se que no futuro quase 50% dos homens com mais de 50 anos virão a sofrer de CaP.(Grönberg et al., 2015) Em Portugal, com base no censo de 2010, para cerca de 1.600.000 homens com mais de 50 anos, faleceram de CaP 1750 homens. (INE 2010)

1.2.3. Mortalidade

O número de óbitos, bem como a taxa padronizada (Tabela 1), relacionados com o CaP, tiveram uma diminuição em 2015, sendo mais marcante a diminuição da taxa de mortalidade.

O Registo Nacional de Cancro da Próstata (ReNaCaP) foi desenvolvido com o objetivo de estimar a prevalência de CaP em Portugal e caracterizar os doentes quanto a evolução clínica e tratamento.(Direcção-Geral da Saúde, 2014)

Tabela 1 - Indicadores de mortalidade relativos a tumor maligno da próstata em Portugal Continental (2008 a 2015) Taxa por 100000 homens. Códigos da CID 10: C61.

Tumor Maligno da Próstata								
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Número de óbitos	1697	1641	1720	1815	1806	1714	1787	1723
Taxa de mortalidade	35,20	34,10	35,70	21,9	21,15	20,0	20,3	19,3

Adaptado de: INE, IP (2014 e 2017)

O CaP mostra uma pequena variação de mortalidade ao longo do País, de acordo com os dados apresentados na Figura 5.(C. Castro et al., 2016b)

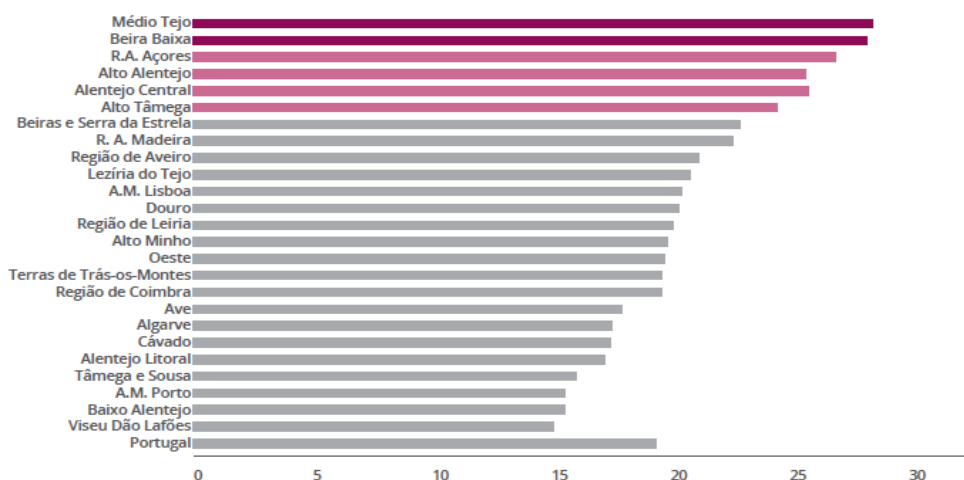


Figura 5 – Mortalidade por Carcinoma da Próstata em Portugal. Fonte: INE 2017.

Com base na Figura 5 podemos concluir a maior mortalidade por CaP ocorre no médio Tejo, Beira Baixa, Açores, Alto Alentejo e Alentejo Central bem como no Alto Tâmega.

1.3. Etiologia

Os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de transformação celular maligna ainda não estão suficientemente clarificados. Mas estão descritos como principais fatores de risco, a idade, etnia, dieta, fatores hormonais, fatores genéticos, fatores geográficos e história familiar.(Hussein, Satturwar, & Van Der Kwast, 2015; Nimptsch et al., 2011)

O CaP raramente surge antes dos 40 anos de idade e a sua incidência vai progressivamente aumentando a partir dos 50 anos de idade, quando a produção de testosterona começa, paradoxalmente a descer, o que sugere a existência de outros fatores tal como algumas hormonas, predisponentes ou precipitantes ainda desconhecidos.(Zhou, Bolton, & Jones, 2015)

Contudo, vários estudos evidenciam que o ambiente ou fatores relacionados com o estilo de vida, como o sedentarismo ou o elevado consumo de gorduras dietéticas, como as gorduras saturadas e a ingestão de elevadas quantidades de proteínas, típicas da dieta ocidental, podem ter um papel importante no desenvolvimento de doença clinicamente significativa.(Mandair, Rossi, Pericleous, Whyand, & Caplin, 2014)

1.4. Fatores de risco

1.4.1. Idade

A idade é o principal fator de risco para CaP, verificando-se um aumento exponencial do número de casos em homens com mais de 65 anos. (Harrison et al., 2016) Após os 65 anos, o risco do homem ter CaP é superior a qualquer outro tipo de cancro.(Grönberg et al., 2015)

1.4.2. Antecedentes familiares

Nos homens com um familiar em 1º grau acometido pela doença o risco é 2 a 5 vezes superior. Se o seu pai ou irmão têm ou tiveram CaP, tem risco de desenvolver a doença, especialmente se o tipo de tumor for o mais

agressivo.(Hemminki, 2012) O seu risco é ainda maior se um deles teve CaP antes dos 55 anos ou se múltiplos familiares tiveram este tipo de cancro.(Giri & Beebe-Dimmer, 2016) A incidência de CaP numa dada família pode ser causada pelo ambiente partilhado, genética ou ambos.(Cooper et al., 2015; Knipe et al., 2014)

1.4.3. Fatores genéticos

Algumas mutações genéticas hereditárias estão associadas com um risco aumentado de mais de um tipo do cancro. Por exemplo, a herança dos genes BRCA1 ou BRCA2 mutado relaciona um risco aumentado para o cancro da mama, cancro do ovário em algumas famílias. Estudos mostraram que as mutações destes genes podem igualmente causar risco de CaP nos homens, embora somente em um pequeno número de casos.(Bancroft et al., 2014)

O *Gene Hereditário 1 do Carcinoma da Próstata* (HPC1) é um exemplo de fator de risco genético para o CaP. Este gene HPC1 possui muitas alterações identificadas e que foram relacionadas com a tendência hereditária do CaP.(Guo et al., 2016) Recentemente outros fatores genéticos foram identificados e relacionados com a hereditariedade do CaP, como é exemplo os micro-RNAs Rs11614913, Rs2910164 e Rs3746444.(Mi et al., 2018)

1.4.4. Etnia

Os homens de raça negra têm maior probabilidade de serem diagnosticados com CaP e apresentarem a forma mais agressiva da doença.(Hsing et al., 2014) As causas para a diferença entre raças não são ainda conhecidas.(Haiman et al., 2011)

1.4.5. Dieta

Embora não se possa estabelecer claramente a importância da dieta acredita-se, também, que pessoas que tem dietas ricas em gorduras, carnes vermelhas ou produtos lácteos tem mais probabilidade de desenvolver este tipo de cancro.(Bull et al., 2016; Jalilpiran et al., 2018) Há estudos que sugerem a relação direta entre o risco de CaP com a quantidade de gordura ingerida, sobretudo a saturada, bem como a forma de preparação dos alimentos, provocando

obesidade, como os fumados, salgados e pickles e outros alimentos processados. (Lin, Aronson, & Freedland, 2015; Masko, Allott, & Freedland, 2013)

Estudos epidemiológicos, em diversas populações evidenciaram que, além dessa relação direta entre o risco de CaP e a dieta, há uma maior frequência de CaP avançado em pacientes com dietas ricas em gorduras no momento do diagnóstico. (Anderson et al., 2015) Foi também demonstrado que os pacientes com CaP, que tinham dieta com alto teor de gordura tiveram maior mortalidade do que aqueles com dietas mais saudáveis (Ruscica et al., 2018).

1.4.6. Estilo de vida

A obesidade é uma doença metabólica, fundamentalmente relacionada com os maus hábitos de vida caracterizada principalmente por um consumo energético superior ao débito. A obesidade é responsável pelo desenvolvimento de múltiplas patologias crônicas (doença arterial coronária, hipertensão arterial, diabetes, etc.), assim como está relacionada com diversos tipos de cancro, entre eles, o CaP. (Booth, Magnuson, Fouts, & Foster, 2015; Harrison et al., 2016)

Estudos efetuados em homens obesos com idade entre 50 a 59 anos, revelaram que tinham um risco 58% maior de desenvolver Carcinoma de próstata. Assim, uma interação entre a idade e obesidade poderia explicar porque alguns estudos encontraram um risco aumentado, enquanto outros não encontraram nenhuma relação entre obesidade e risco de CaP. (Buschemeyer & Freedland, 2007)

No entanto, criar um paralelo entre obesidade e o CaP é uma tarefa complexa, já que esse distúrbio endócrino e metabólico se relaciona com alterações dos níveis séricos de numerosas hormonas, como testosterona, estrogénios, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e leptina. (Nishimura et al., 2012)

Se o índice de massa corporal (IMC) estiver aumentado, os indivíduos têm um maior risco de desenvolver CaP, com crescimento mais rápido e mais agressivo. (Hisanori et al., 2018) Este risco aplica-se neste caso, mesmo com uma dieta saudável e prática de exercício físico. Por outro lado, a falta de exercício e

não ingerir vegetais em doses suficientes aumenta o seu risco de doença, mesmo que em indivíduos normoponderais. Alguns estudos referem que o CaP surgindo neste contexto é mais agressivo.(Vidal et al., 2014)

1.5. Biomarcadores do Carcinoma da Próstata

Atualmente estão disponíveis vários biomarcadores derivados do sangue, urina e tecido que podem auxiliar no diagnóstico do CaP. Vários biomarcadores foram desenvolvidos para apoiar no rastreio e no diagnóstico precoce do CaP.(Dani & Loeb, 2017)

Esses testes são frequentemente indicados em homens com PSA moderadamente elevado ou história de biópsia negativa prévia. A sua utilização facilita a redução de biópsias desnecessárias sem comprometer o diagnóstico precoce de CaP clinicamente significativo.(Filella & Foj, 2018)

1.5.1. PSA, Antígeno específico da próstata

O PSA (*Prostate Specific Antigen*) trata-se de uma glicoproteína com função de enzima, uma protease, produzida quase exclusivamente pelas células epiteliais da próstata, cuja função consiste em liquefazer o esperma, ou seja, tornar o esperma líquido após a formação do “coágulo” no esperma ejaculado. É uma glicoproteína de cadeia simples, com um peso molecular de 34000 Daltons, produzida tanto por células prostáticas normais como em células alteradas.

Os níveis séricos de PSA estão elevados nos doentes com carcinoma da próstata, hipertrofia benigna da próstata e em situações inflamatórias como a prostatite.(Saini, 2016) O uso do PSA, associado ao exame do toque rectal e uma posterior ressonância, é o método que permite hoje em dia o diagnóstico precoce do CaP, sendo complementado por biópsia e estudo histológico para fazer o diagnóstico.(Lima, De Lourdes Bastos, Carvalho, & Guedes De Pinho, 2016)

O PSA não é considerado um marcador tumoral ideal, pois a baixa de especificidade limita a sua aplicação clínica.(Fania et al., 2015) O maior problema tem sido na diferenciação entre doentes com HPB e doentes com

carcinoma, uma vez que ambas as condições são acompanhadas por um aumento de níveis séricos de PSA.(Lacher & Hughes, 2015).

Estima-se que 38 a 48% de indivíduos com valor de PSA normal, apresentam um carcinoma localizado da próstata com significado clínico. Para aumentar a especificidade do PSA, no diagnóstico precoce e diferencial do CaP, têm sido utilizadas, com sucesso, algumas técnicas, tais como a divisão da concentração do PSA pelo volume prostático determinado pela ecografia transretal, conhecida como densidade do PSA (H. A. S. Castro et al., 2018) ou a taxa do aumento do PSA com o tempo denominado de velocidade do PSA.(Mikropoulos et al., 2018)

A especificidade pode ainda ser melhorada, estratificando os valores normais em função da idade em vez de se utilizar 4.0 ng/mL como valor de “cut-off” para todas as faixas etárias (Xu et al., 2018). Com o objetivo de aumentar a especificidade do doseamento de PSA para a detecção de CaP desenvolveu-se a fração livre de PSA. No soro, a maior parte de PSA existe ligado a proteínas como por exemplo a α -1-antitripsina (PSA complexado ou PSAC), enquanto uma pequena parte circula livre (ou PSAL). (Pérez-Lanzac-Lorca et al., 2013; Stephan, Jung, & Ralla, 2015)

Pacientes com PSA entre 4-10 ng/mL têm entre 30 e 45% de hipótese de desenvolverem CaP.(Xu et al., 2018) Contudo pacientes com PSA acima de 10 ng/mL tem mais de 65% de probabilidade de desenvolver CaP e devem sempre ser submetidos à biópsia após exclusão dos processos infecciosos. Autores referem que cerca de 22 a 27% dos homens com PSA entre 2,5 e 4 ng/mL podem ter CaP, por isso, muitos autores preconizam o valor de corte de 2,5 ng/mL, especialmente para indivíduos com menos de 65 anos de idade.(Faria et al., 2012) Contudo os valores da sensibilidade, da especificidade, para todas as formas moleculares são muito baixos, o que indica um fraco poder discriminativo entre os doentes com carcinoma e doentes com doença benigna.

Num estudo efetuado no Serviço de Química Clínica do Centro Hospitalar Porto sobre o biomarcador PSA complexado, verificou-se que este marcador não tem qualquer vantagem/benefício sobre o PSA total, conforme evidencia a figura nº6.

Como se pode verificar a área sob a curva ROC é maior para o rácio PSA livre/total do que o rácio PSA complexado/PSA total.

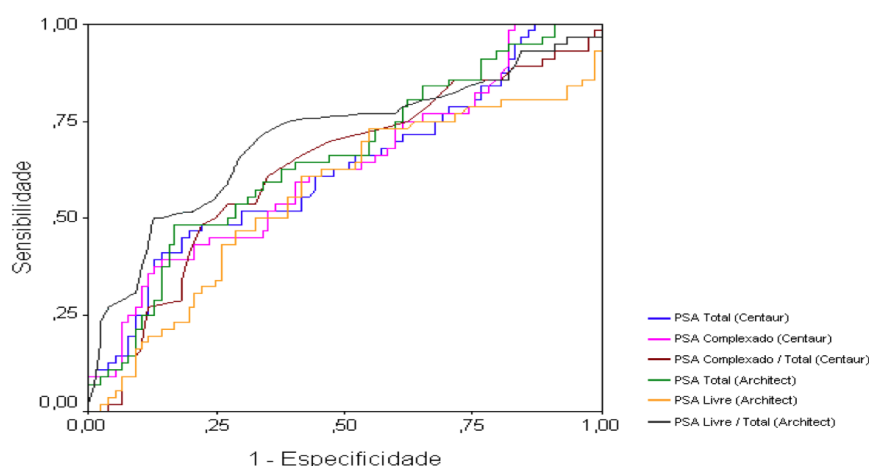


Figura 6 – Curvas ROC- PSA

A determinação do PSA total e PSA livre representa o *state-of-the-art* no diagnóstico precoce e monitorização do carcinoma da próstata. Infelizmente, a percentagem de PSA livre ou complexado não oferece mais valia na discriminação entre CaP e patologia benigna, no intervalo de valores de PSA total de 2,5 a 4 ng/ml.(Catalona, 2018)

1.5.2. PSA livre

A forma livre de PSA (PSAL), e em particular a sua relação com o PSA total, têm sido associadas à patologia benigna da próstata, sendo hoje prática corrente que um doente com valores de PSA total entre 4 e 10 ng/mL e uma relação PSAL/PSAT inferior a 0.25 deve ser submetido a biopsia prostática(Chang et al., 2015).

Deste modo, quanto menor for a percentagem de PSA livre sobre o PSA total, maior a probabilidade de a biópsia prostática identificar casos de CaP. Para situações de valores de PSA total entre 4 e 10 ng/mL, a percentagem de PSA livre inferior a 10% identifica CaP em metade dos doentes.(Pérez-Lanzac-Lorca et al., 2013)

1.5.3. PSA complexado

As glândulas prostáticas malignas produzem PSA preferencialmente ligado ou complexado (PSAC). A possibilidade de doseamento do PSA complexado veio lançar a discussão sobre a forma de PSA que teria maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do carcinoma da próstata. (Lacher & Hughes, 2015)

Vários estudos concluíram que o PSA complexado não seria o melhor marcador tumoral para a detecção precoce do carcinoma da próstata, enquanto outros encontraram evidência que contraria tais conclusões. Outros investigadores em estudo realizados também não encontraram mais valia no PSA complexado, devido à sua menor sensibilidade e especificidade. (Strittmatter et al., 2011)

1.5.4. Pró-PSA

Recentes estudos revelaram existir pelo menos três isoformas de PSA livre (chamadas de B-PSA, (“benigna” relacionada à HPB), I-PSA (PSA intacto ou inativo) e pro-PSA (precursores do PSA relacionados com o CaP). (Igawa, Takehara, Onita, Ito, & Sakai, 2014)

As duas primeiras isoformas estão diminuídas em indivíduos com CaP, enquanto o pró-PSA está aumentado, esses estudos mostraram que o pró-PSA poderia ser uma mais-valia para diferenciar CaP e condições benignas, em homens com valores de PSA de 2,5 a 10 ng/ml, podendo dar melhores informações clínicas do que o PSA total, PSA livre ou PSA complexado. (Lacher & Hughes, 2015) Além disso, em alguns estudos o pró-PSA identificou seletivamente as formas mais agressivas de CaP. (Sanchis-Bonet, Barrionuevo-González, Bajo-Chueca, Morales-Palacios, & Sanchez-Chapado, 2018) Assim, alguns afirmam que o pró-PSA poderá ser um biomarcador com maior especificidade para o CaP do que o PSA livre (Sanchis-Bonet et al., 2018).

1.5.5. Densidade do PSA

A densidade de PSA refere-se ao valor de PSA total dividido pelo volume prostático determinado por ecografia.(Roobol, 2014)

O parâmetro da densidade do PSA (PSAD) correlaciona o nível de PSA total, com o volume da próstata para avaliar a probabilidade de uma biópsia positiva.(H. A. S. Castro et al., n.d.) É definido com o PSA total dividido pelo volume da próstata, determinado por ultrassonografia transretal. Níveis $\leq 0,15$ ng/mL/cm³ foram associados a uma baixa probabilidade de Carcinoma de próstata. O PSAD também foi associado à agressividade do tumor.(Aminsharifi et al., 2018) Embora não seja amplamente utilizado, em parte devido à necessidade de medição ultrassonográfica da próstata.

As diretrizes atuais da AUA (American Urological Association) considera o PSAD como um teste secundário, com utilidade potencial para determinar a necessidade de realização de biópsia.(Kotb, Spaner, Crump, & Hyndman, 2018)

1.5.5. Velocidade do PSA

Na determinação da Velocidade do PSA, avaliam-se e comparam-se doseamentos repetidos desta análise, determinando a “velocidade”, o ritmo do aumento do valor do PSA.

Até determinados aumentos, essa subida será aceitável. Acima de determinados limites (o valor geralmente referido é o de 0,75ng/mL/ano), a suspeita é maior. Estes valores, no entanto, foram postos em causa em alguns trabalhos recentes, em que alguns autores afirmaram que mesmo com aumentos mais reduzidos poderíamos estar na presença de um tumor maligno.(Mikropoulos et al., 2018)

Apesar do PSA e as suas variantes serem os biomarcadores mais usados, a procura por um biomarcador prostático ideal tem conduzido a investigação científica no sentido de encontrar melhores biomarcadores. Na atualidade, apesar de haver vários biomarcadores em desenvolvimento, há dois biomarcadores prostáticos emergentes considerados promissores e que passamos a apresentar.

1.5.6. PCA 3

Em 1999, foi descoberto um gene com expressão em células de CaP designado por PCA3 (*Prostate Cancer Antigen 3*). O PCA3 é um mRNA não codificante específico da próstata sendo significativa a expressão no tecido do CaP. O gene (PCA3) está sobre-expresso no CaP.(Birnbbaum et al., 2015)

O teste de PCA3 mede o mRNA PCA3 e o mRNA PSA que também é expresso nas células prostáticas não malignas. A razão entre os dois define um valor que sugere a probabilidade de existir CaP.(Ferro et al., 2013) É sobretudo utilizado para decidir repetir a biópsia prostática em doentes com doseamento de PSA entre 4 e 10 ng/mL, mas com biópsia prévia negativa.(Filella et al., 2013)

O PCA3 não é influenciado por inflamação, idade, volume prostático ou a toma de inibidores da 5 α -redutase. Não dá informações sobre a agressividade do CaP e não tem utilidade nos programas de vigilância ativa. Os níveis urinários de PCA3 foram associados ao grau de CaP, sugerindo um papel significativo no diagnóstico do CaP.(Luo, Gou, Huang, & Mou, 2014).O PCA3 é expresso apenas no tecido da próstata humana, tendo elevada expressão no CaP, devido ao seu perfil de expressão restrita, o RNA de PCA3 é útil como um marcador tumoral.(Mengual et al., 2016)

1.5.7. Sarcosina

A sarcosina é um aminoácido derivado da glicina produzido pelo organismo humano presente na urina, músculos e outras estruturas, que pode ser utilizada como biomarcador para o CaP.(Ferro et al., 2016)

A sarcosina também conhecida como N-metilglicina, com a fórmula química $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$, foi isolada e referida como um biomarcador do CaP. Vários estudos evidenciam uma incidência crescente da sarcosina, como biomarcador relacionado com o CaP. Esta condição confirma o crescente interesse na sarcosina como um potencial marcador de CaP.(Ankerst et al., 2015)

A primeira publicação descrevendo a relação entre alterações do nível de sarcosina e progressão do CaP foi publicada na Nature por Sreekumar et al. em 2009. Desde então, a sarcosina tem sido investigada e descrita como um novo biomarcador de CaP.(Lucarelli et al., 2012)

A sarcosina foi identificada como um metabolito que tem um grande aumento durante a progressão do CaP e do processo metastização que pode ser detetado na urina.(Cernei et al., 2013)

1.5.8. Influência da obesidade nos níveis séricos no PSA

Estudos relatam que homens, obesos e saudáveis, permanecem com níveis mais baixos de PSA, mesmo após ajuste dos níveis séricos do PSA para faixa etária correspondente.(Assel et al., 2018)

Ainda segundo estudos, homens obesos são submetidos a biópsia somente em estádios mais tardios no decurso da doença (CaP), por levar mais tempo para que os níveis de PSA aumentem acima do limite determinado.(Chow et al., 2018a) Há vários aspetos fundamentais que fazem com que cancro nos indivíduos obesos seja diagnosticado mais tardiamente: a diluição do PSA, o aumento de hormonas no organismo (estrogénios), o aumento da próstata no obeso e a dificuldade de se efetuar a biópsia.(Aref et al., 2018a)

Como o PSA é regulado por androgénios, alguns estudos levantaram a hipótese de que a menor concentração de PSA pode resultar da diminuição da atividade androgénica em homens obesos.(Kelly & Jones, 2015a)

Além disso, os homens com IMC mais elevado, também têm maior volume de plasma, o que poderia diminuir as concentrações séricas do PSA – fenómeno conhecido como hemodiluição (Aref et al., 2018b). Assim vários estudos referem que a sensibilidade e especificidade do PSA pioram em condições de obesidade, o aumento do IMC foi significativamente inversamente associado com menor valor de PSA.(Rundle & Neugut, 2008)

Com base em um modelo teórico em que o aumento do volume plasmático nos obesos dilui os níveis do PSA o que leva a questionar os valores de cut-off para estes doentes.(Chow et al., 2018b)

2. OBESIDADE

2.1. Definição e prevalência

A OMS define obesidade como “uma acumulação anormal ou excessiva de gordura corporal que pode ser prejudicial à saúde”. A obesidade é um distúrbio no equilíbrio energético, ocorre quando a energia ingerida excede a energia consumida. (Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013)

A classificação para obesidade atualmente aceita, para fins epidemiológicos, define excesso de peso quando o índice de massa corporal (IMC) é superior a 25 Kg/m² e obesidade quando o IMC é superior a 30 Kg/m². O IMC descreve a relação peso/altura (peso (kg) / altura (m²)) e encontra-se significativamente relacionado com a gordura corporal total, deve ser usado para avaliar excesso de peso e obesidade e monitorizar alterações do peso corporal.

O cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), segue a seguinte expressão.

$$IMC = \frac{Peso}{Altura^2} \text{ (Kg/m}^2\text{)}$$

Este índice mede a corpulência, que se determina dividindo o peso (quilogramas) pela altura (metros), elevada ao quadrado.

Tabela nº2 – Índice de Massa Corporal

Índice de Massa Corporal	
IMC < 18	Normal
18 < IMC < 25 Kg/m ²	
IMC > 25 < 30 Kg/m ²	Excesso de Peso
IMC > 30 < 35 Kg/m ²	Obesidade moderada (grau I)
IMC > 35 < 40 Kg/m ²	Obesidade grave (grau II)
IMC > 40 Kg/m ²	Obesidade mórbida (grau III)

Fonte: Portal da Saúde;

Os valores normais de percentagem de massa gorda são considerados 9-18% do peso corporal nos homens e 14-28% nas mulheres, mas pode atingir valores de 60 a 70% nos indivíduos com obesidade mórbida.

Obesidade é uma condição patológica acompanhada por acúmulo excessivo de gordura quando comparada com valores previstos para dada estatura, gênero e idade. A obesidade é uma doença complexa de etiologia multifacetada, com sua própria fisiopatologia, comorbidades e capacidades debilitantes.(Skrede, Steene-Johannessen, Anderssen, Resaland, & Ekelund, 2018).

A obesidade está associada a um decréscimo da esperança de vida e da qualidade da mesma, estando associada a vários problemas de saúde nomeadamente, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia, doenças metabólicas, respiratórias, cardiovasculares e vários tipos de cancros.(Bray, Kim, & Wilding, 2017)

Aceitar a obesidade como uma doença é fundamental para o seu tratamento.(Pérez-Hernández, Catalán, Gómez-Ambrosi, Rodríguez, & Frühbeck, 2014b) .

Alterações no estilo de vida acompanhadas do aumento do consumo de alimentos com elevada densidade energética e a redução da atividade física levaram a um rápido aumento de excesso de peso e obesidade em todo o mundo.(Burguera et al., 2015)

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a obesidade alcançou as proporções de pandemia, com mais de 1,9 milhões de adultos com excesso de peso ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$). Ainda deste grupo mais de 600 milhões de pessoas são obesas ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$).

2.2. Epidemiologia da pré-obesidade e da obesidade em Portugal

Em Portugal, a prevalência do excesso de peso tem vindo a aumentar, tanto em adultos como em crianças e adolescentes. (Direcção-Geral da Saúde, 2014) Na figura 7, podemos constatar que a prevalência da obesidade nos adultos portugueses aumentou, de forma marcada e consistente nos últimos quarenta anos, em ambos os géneros.

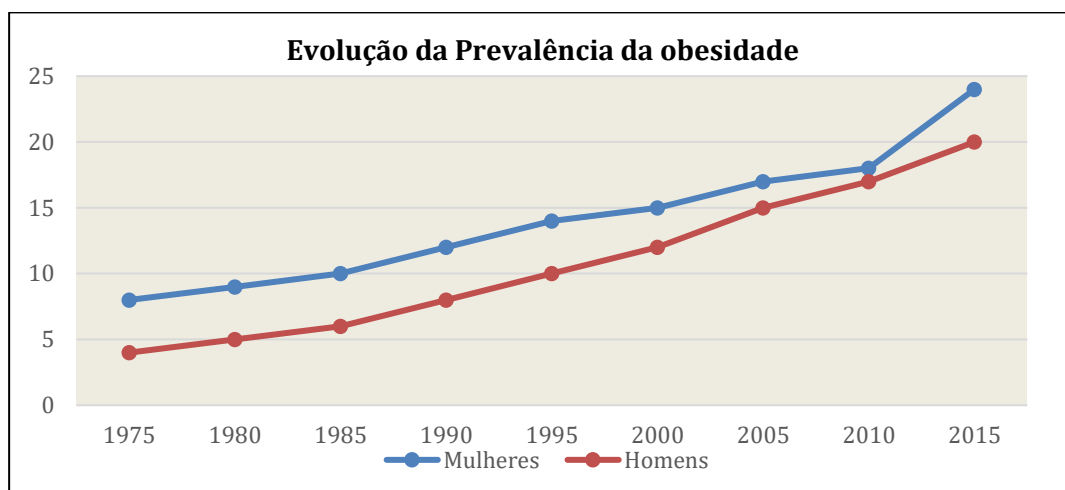


Figura 7 – Evolução da prevalência da obesidade em adultos portugueses nos últimos quarenta anos. Os valores apresentados até 2010 correspondem aos reportados pelo *Non-Communicable Diseases Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)*, com base em estudos epidemiológicos nacionais; os valores de 2015 reportam-se ao Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF).

De acordo com os resultados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, o excesso de peso já atinge mais de um quarto das crianças e adolescentes portugueses e mais de metade da população adulta, destacando-se os indivíduos com mais de 65 anos com uma prevalência de excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) superior a 80% (Tabela 3).

A epidemiologia da obesidade global e a sua associação ao risco acrescido de múltiplas comorbidades, representam um potencial dano da condição clínica de indivíduos e populações, com enorme impacto nos sistemas de saúde e potencialmente traduzido em mortalidade precoce. (Krishna et al., 2018)

Tabela nº 3. Prevalência da pré-obesidade e obesidade em Portugal

Grupo Etário	Pré-obesidade	Obesidade
Crianças (<10 anos)	17,3%	7,7,3%
Adolescentes (10-17 anos)	23,6%	8,7%
Adultos (18-64 anos)	36,5%	21,6%
Idosos (65-84 anos)	41,8%	39,2%

Fonte: DGS

O aumento global da prevalência da obesidade é um problema de saúde pública com grande impacto financeiro para os sistemas de saúde. Estima-se que mais de 20% da população mundial será obesa em 2025 se não forem tomadas medidas de prevenção.(Bray et al., 2017)

A evidência epidemiológica sustenta, de forma crescente e consistente, que a obesidade representa um problema de saúde pública à escala global. Os dados apontam para uma tendência secular no aumento das prevalências de excesso de peso, de forma global.

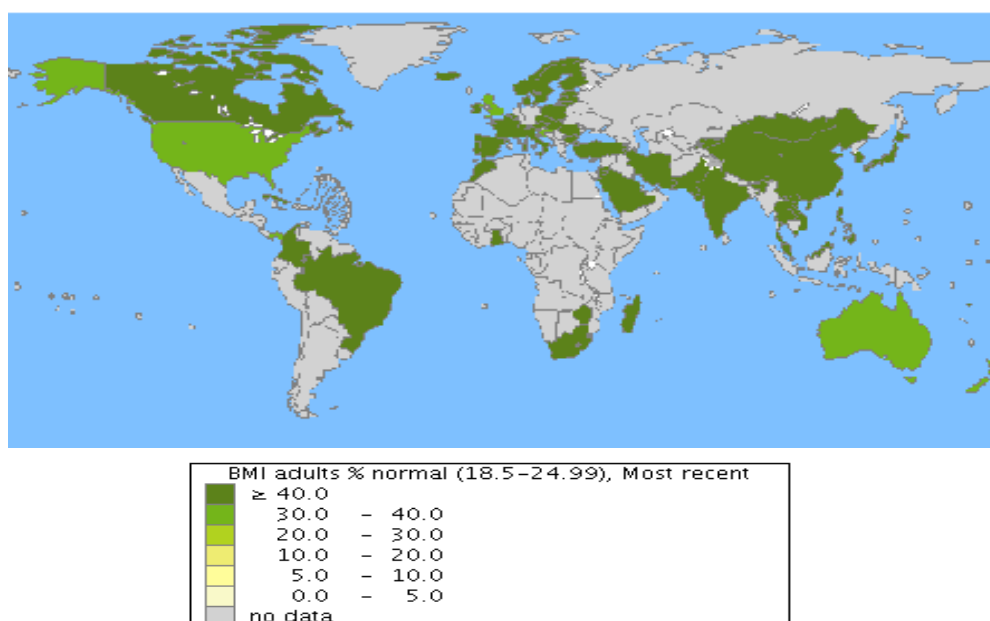


Figura 8 – Incidência Mundial da Obesidade

Fonte: OMS, 2010

Assim, a prevalência de excesso de peso e obesidade têm vindo a aumentar a nível global nos últimos anos (Figura 8).

Nos Estados Unidos, 68% da população tem excesso de peso ou obesidade e dados do estudo de prevalência da obesidade em Portugal (2003-2005) estima que 14,2% da população seja obesa e 39,4% tem excesso de peso (do Carmo et al., 2007).

A obesidade constitui um fator de risco para um vasto numero de tumores do aparelho digestivo, bem como do aparelho reprodutor.(Perez-Cornago et al., 2017b) Por outro lado, a obesidade também afeta negativamente o prognóstico em doentes com determinados estilos de vida, adiposidade, hormonas e inflamação: influência na incidência e progressão em cancro da mama, próstata e cólon-recto.(Deng, Lyon, Bergin, Caligiuri, & Hsueh, 2016)

Consequentemente, a obesidade constitui um fator de risco comum e modificável, de modo que estratégias de intervenção sobre a obesidade poderão ter um impacto importante na redução da incidência do cancro e mortalidade.

2.3. A relação entre a obesidade e o cancro acontece de várias formas

Os indivíduos obesos apresentam maiores níveis de insulina no sangue, o que estimula o crescimento das células, incluindo as cancerosas. A gordura causa, também, um estado de inflamação crónica em todo o organismo, que também favorece o surgimento do cancro.(Allott et al., 2018) Por outro lado, as células adiposas produzem hormonas que provocam desequilíbrios no organismo que podem levar ao desenvolvimento de vários tipos de cancro, nomeadamente da próstata.(Cozzo, Fuller, & Makowski, 2017)

2.4. Etiologia

A etiologia da obesidade não é de fácil identificação, uma vez que a mesma é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, é resultado de uma

complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos.(Hu, Xu, Bai, Jiang, & Ding, 2014) Pode, dessa forma, ser classificada em dois contextos: por determinação genética ou fatores endócrinos e metabólicos, ou então, influenciada por fatores externos, sejam eles de origem dietética, comportamental ou ambiental.(Leitzmann & Rohrmann, 2012) Acredita-se que os fatores externos são mais relevantes na incidência de obesidade do que os fatores genéticos.

2.5. Tecido adiposo

A identificação do tecido adiposo como órgão endócrino conferiu-lhe o *status* de tecido fundamental produtor de uma complexa rede de fatores capazes de influenciar inúmeros processos metabólicos e fisiológicos. Algumas adipocitocinas, como a leptina e a adiponectina, exercem efeitos benéficos sobre o balanço energético, a ação insulínica e a proteção vascular. Contrariamente, a produção excessiva de outras adipocitocinas pode tornar-se nociva ao organismo. TNF- α , IL-6 e resistina podem deteriorar a ação da insulina, enquanto PAI-I e angiotensinogénio envolvem-se em complicações vasculares associadas à obesidade.(Matafome & Seíça, 2017)

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo que se caracteriza por possuir uma grande quantidade de gordura no interior das suas células, que recebem o nome de células adiposas ou adipócitos, tipo de células que acumulam gotículas de lípidos no seu citoplasma. Podemos classificar o tecido adiposo em dois tipos principais, o unilocular e o multilocular. No tecido adiposo unilocular, as células apresentam-se grandes e podemos observar uma única grande gota de gordura no interior de cada célula que acaba se deslocando do núcleo para uma região mais periférica.(Sidossis & Kajimura, 2015)

Os adipócitos seguem duas vias de diferenciação celular, uma via resulta da formação da gordura branca, a outra origina a gordura castanha.(Algire, Medrikova, & Herzig, 2013).Assim é importante considerar que existe uma grande diferenciação fisiológica e heterogeneidade de células adiposas dependendo da localização do tecido. O órgão adiposo é composto por dois tipos funcionalmente distintos – o tecido adiposo castanho (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB).(M. Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013a)

De forma geral, o tecido adiposo (TA) é um órgão heterogêneo composto por uma fração adipocitária e uma fração estromal-vascular. Esta inclui pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, células estaminais, macrófagos e outras células do sistema imunológico.(Suganami, Tanaka, & Ogawa, 2012)

A principal função da gordura branca é armazenar energia, enquanto a função da gordura castanha serve para disseminar energia ao contrário de armazená-la. O tecido adiposo castanho sendo o primeiro mais abundante, e o segundo, que desempenha um importante papel na termogênese, apenas encontrado nos humanos durante a infância quando participa na manutenção do calor corporal(García, Pazos, Lima, & Diéguez, 2018; Sidossis & Kajimura, 2015)

O tecido adiposo tem uma função metabólica bem estabelecida com consequências clínicas muito significativas, o aumento da adiposidade visceral está associado a um alto risco de resistência à insulina, dislipidemia e doença cardiovascular.(Giralt & Villarroya, 2013; Villarroya, Cereijo, Gavalda-Navarro, Villarroya, & Giralt, 2018)

Reconhecido hoje como um órgão endócrino, o TA é uma importante fonte de hormonas e citocinas denominadas adipocinas nomeadamente: TNF- α , IL-6, IL-1 β , inibidor do ativador de plasminogénio (PAI-1) leptina, adiponectina, resistina, entre outros (M. Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013b). A expansão do tecido adiposo é caracterizada pela hipertrofia do adipócito, seguido de infiltração de células imunológicas, superprodução de matriz extracelular e produção de adipocinas pró-inflamatórias. (Suganami & Ogawa, 2013)

O risco de desenvolvimento de complicações relacionadas é proporcional ao grau de obesidade, mais especificamente à acumulação de gordura visceral. Entretanto, a presença desses distúrbios metabólicos varia amplamente entre indivíduos obesos (Kelly & Jones, 2015a)

Diferentes estudos sobre obesos metabolicamente normais têm sido publicados, entretanto, não existe classificação uniforme para esse fenótipo, o que o que reflete em faixa ampla de incidência da população de obesos, de acordo com os

diferentes critérios de classificação, sendo necessário consenso de classificação até o momento não estabelecido(Pataky, Bobbioni-Harsch, & Golay, 2010).

Os macrófagos são uma parte importante da função secretora do tecido adiposo e são a principal fonte de citocinas inflamatórias, como a resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6). (Moon, Choi, & Kim, 2016)

Os principais mecanismos moleculares e hormonais têm vindo a ser alvo de atenção em particular a sua relação com outros órgãos e sistemas, visando compreender a regulação entre o consumo e o gasto energético.(Grigoraş et al., 2018)

Alterações na quantidade de tecido adiposo, como ocorrem na obesidade, afetam a produção da maioria desses fatores produzidos pelos adipócitos. Ainda que essas alterações estejam frequentemente associadas às inúmeras disfunções metabólicas e ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, permanece sob investigação o envolvimento do tecido adiposo no desenvolvimento de neoplasias. Muitos autores postulam haver uma considerada relação entre obesidade e CaP.(Pérez-Hernández, Catalán, Gómez-Ambrosi, Rodríguez, & Frühbeck, 2014a)

2.5.1. Tecido adiposo como órgão endócrino

Uma das mais importantes descobertas no âmbito da obesidade deu-se em 1994 com a descoberta da leptina. (Francisco, Pino, Campos-Cabaleiro, et al., 2018) Atualmente é-lhe atribuído um papel preponderante na regulação central do apetite, na inflamação crónica, regulação metabólica, entre outras funções endócrinas.(Rhee, Vela, & Chung, 2016)

Entre as segregações do TA contam-se os ácidos gordos, que são libertados durante períodos de balanço energético negativo (particularmente o jejum). Em adição, várias outras moléculas lipídicas bioativas são excretadas pelos adipócitos; entre elas incluem-se as prostaglandinas (derivadas de gorduras polinsaturadas) sintetizadas pelo próprio TA, bem como o colesterol e o retinol, que não são sintetizados no adipócito, porem são armazenados e libertados por esse tecido.(Calder, 2015)

O desenvolvimento de sofisticadas técnicas moleculares tem contribuído de forma considerável para a identificação dos produtos produzidos pelo TA. Atualmente existe forte evidência de que o TA segrega múltiplos peptídeos bioativos, que influenciam não apenas a função adipocitária (função autócrina e parácrina), mas também afetam várias vias metabólicas.(Grigoraş et al., 2018) Cada adipócito produz uma pequena quantidade de substâncias, porém, como o tecido adiposo pode ser considerado o maior órgão do corpo, o *pool* desses fatores produz um grande impacto nas funções bioquímicas.(Suganami & Ogawa, 2013)

Muitos destes fatores parácrinos são citocinas produzidas por adipócitos e macrófagos. A obesidade está associada com o aumento dos níveis circulantes de citocinas, e estes níveis são reduzidos com a perda de peso.(Francisco, Pino, Gonzalez-Gay, et al., 2018)

2.6. Adipocinas

Nas últimas décadas desenvolveu-se grande interesse no estudo da biologia dos adipócitos o que levou a grandes avanços na compreensão mecanicista do tecido adiposo como um órgão endócrino essencial.

O tecido adiposo segrega uma série de hormonas, designadas de adipocinas que sinalizam órgãos-chave para manter a homeostase metabólica, e sua disfunção tem uma relação causal com uma ampla gama de doenças metabólicas.(Murdolo et al., 2013) Além disso, a obesidade induz a produção de citocinas inflamatórias muitas vezes referidas juntamente com adipocinas como adipocitocinas.(Hill, Solt, & Foster, 2018)

A inflamação metabólica tem sido cada vez mais reconhecida como um mecanismo unificador que liga a obesidade a um amplo espectro de condições patológicas. Esta revisão foca em exemplos clássicos de adipocitocinas que ajudaram a incrementar um conhecimento endócrino e inflamatório do tecido adiposo, e também especifica algumas adipocitocinas recém-caracterizadas que fornecem novos conhecimentos sobre a biologia adiposa. Estudos de

adipocitocinas em ambientes clínicos também são discutidos e estudados.(Moreno-Aliaga, Lorente-Cebrián, & Martínez, 2010)

2.6.1. Leptina

Um dos produtos segregados pelos adipócitos é a leptina (do grego leptos= magro) é uma proteína de 16-KDa, composta por 167 aminoácidos, codificada pelo gene ob, sendo produzida principalmente no tecido adiposo.(Francisco, Pino, Campos-Cabaleiro, et al., 2018) Seu pico de liberação ocorre durante a noite e às primeiras horas da manhã, e sua meia-vida plasmática é de 30 minutos, responsável pelo controle da ingestão alimentar, atuando em células neuronais do hipotálamo no sistema nervoso central, envolvidos no apetite e no equilíbrio energético.(Babińska, Pęksa, Świątkowska-Stodulska, Wiśniewski, & Sworczak, 2018) A ação da leptina no sistema nervoso central (hipotálamo), em mamíferos, promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras.(Francisco, Pino, Campos-Cabaleiro, et al., 2018)

A ação da leptina é feita a partir da ativação de recetores específicos presentes nos órgãos alvos. Existem dois tipos de recetores para a leptina, o Ob Rb, de cadeia longa (maior número de aminoácidos), com maior expressão no hipotálamo, e os recetores de cadeia curta (menor quantidade de aminoácidos), Ob Ra, encontrados em outros órgãos como o pâncreas, e mais especificamente nas células α e β das ilhotas de Langerhans.

A expressão da leptina é controlada por diversas substâncias, como a insulina, os glicocorticoides e as citocinas pró-inflamatórias.(Babińska et al., 2018) Situações de stress impostas ao corpo, como jejum prolongado e exercício físico intenso, provocam a diminuição dos níveis circulantes de leptina, comprovando, dessa forma, a atuação do sistema nervoso central na inibição da liberação de leptina pelos adipócitos.(Francisco, Pino, Campos-Cabaleiro, et al., 2018)

No ser humano, o gene da leptina localiza-se no cromossoma 7q31, sendo produzida essencialmente pelo TAB. A concentração plasmática de leptina está parcialmente relacionada ao tamanho da massa de tecido adiposo presente no organismo. Os mecanismos pelos quais o aumento de tecido adiposo é

traduzido em aumento da concentração sérica de leptina, envolvem tanto o número de células adiposas quanto a indução do mRNA ob.

Indivíduos obesos apresentam um aumento do número de células adiposas, o que significa uma maior quantidade de mRNA ob encontrada em seus adipócitos do que em sujeitos eutróficos. A identificação da leptina, hormona produzida pelos adipócitos, cujo efeito sobre o sistema nervoso simpático e a função endócrina confere participação ativa no controle do consumo energético, bem como do apetite, acrescentou às funções do tecido adiposo no organismo humano o papel de órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocitocinas.(Yin & Wang, 2018)

A leptina, tem vindo a ser considerada como importante controlador do peso corporal desencadeando mecanismos fisiológicos diferentes segundo o estadio do equilíbrio energético. Assim, os níveis séricos de leptina, atuando como verdadeiros sensores desse equilíbrio energético, transmitem ao hipotálamo informação respeitante à energia acumulada no tecido adiposo, desencadeando, se altos, os mecanismos necessários ao seu controlo, diminuição do apetite e aumento do consumo energético, ou, inversamente, perante baixa desses níveis séricos (perda de peso), aumento do apetite e diminuição do gasto energético. Todavia, nos indivíduos obesos, estes mecanismos estão comprometidos, pois, embora com elevados níveis séricos de leptina, resistem aos seus efeitos, é a leptina-resistência (Coelho, Oliveira & Fernandes, 2013).

Com a descoberta da leptina, a primeira hormona produzida pelo adipócito a ser identificada que levou a concordância do tecido adiposo como órgão endócrino e após um conhecimento mais aprofundado da função bioquímica da leptina várias outras hormonas produzidas pelo adipócito foram descobertas tais como, a adiponectina, a angiotensina.(Moreno-Aliaga et al., 2010) Os mecanismos fisiológicos ligados à síntese e secreção da leptina, à sua ligação ao recetor, à regulação do apetite e do gasto energético, são complexos, ainda não completamente esclarecidos e envolvem numerosas hormonas e neurotransmissores.(Moreno-Aliaga et al., 2010)

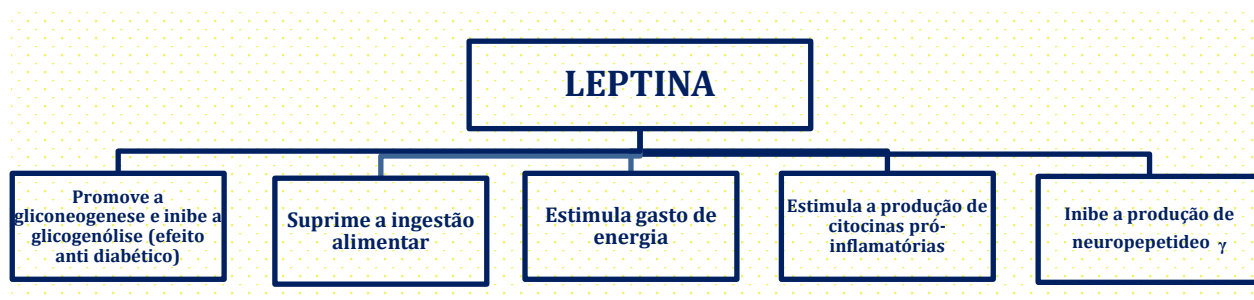


Figura nº 9. Funções gerais da Leptina

2.6.2. Grelina

A grelina é uma hormona gastrointestinal foi identificada no estômago do rato, em 1999, por Kojima et al. O nome grelina tem origem na palavra grow, em inglês, que significa crescimento. Ghre (*grow hormone release*) descreve uma das principais funções desse peptídeo, responsável pelo aumento da secreção da hormona do crescimento (GH). (Ogawa, Liu, Shepherd, & Parhar, 2018) Foi, primeiramente, isolada da mucosa do estômago, sendo produzida, predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal. É também produzida em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e coração.

A hormona grelina é um potente estimulador da libertação de GH, nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo, sendo o ligante endógeno para o recetor secretor de GH (GHS-R). (Ogawa et al., 2018) Assim, a descoberta da grelina permitiu o aparecimento de um novo sistema de regulação para a secreção de GH, já que sua ação estimuladora para a libertação de GH é mais acentuada em humanos do que em animais e é feita a partir da ativação do recetor GHS do tipo 1 (GHS1a). (Lv, Liang, Wang, & Li, 2018a) Além de sua ação como libertadora de GH, a grelina possui outras atividades biológicas importantes. (Lv, Liang, Wang, & Li, 2018b)

A libertação endógena de grelina encontra-se reduzida após ingestão alimentar, retornando progressivamente aos valores basais próximo ao término do período pós-prandial. Estudos prévios envolvendo libertação dessa hormona, em humanos, mostram que são os tipos de nutrientes contidos na refeição, e não o seu volume, os responsáveis pelo aumento ou decréscimo dos níveis

plasmáticos de grelina pós-prandial.(Olabi, Hwalla, Daroub, Obeid, & Cordahi, 2018) Esses achados sugerem que a contribuição da grelina na regulação pós-prandial da alimentação pode diferir dependendo do macronutriente predominante no conteúdo alimentar ingerido.(Giezenaar et al., 2018)

A sua concentração plasmática está diminuída após refeições ricas em carboidratos, concomitantemente à elevação de insulina plasmática. Por outro lado, níveis plasmáticos aumentados de grelina foram encontrados após refeições ricas em proteína animal e lípidos, associados ao pequeno aumento da insulina plasmática. Ao contrário do que é expectável a quantidade de grelina em indivíduos obesos é menor, estes têm uma maior sensibilidade a essa hormona, e um mecanismo que reduz sua produção quando se aumenta de peso.(McHill, Hull, McMullan, & Klerman, 2018) Outras hormonas como a leptina a adiponectina tem maior papel na obesidade.(Paz-Filho, 2011)

2.6.3. Adiponectina

Adiponectina é uma proteína plasmática de 30kDa, codificada pelo gene AdipoQ,(Zou et al., 2018) localizada no cromossoma 3q27. Embora o gene AdipoQ seja expresso principalmente em adipócitos, estudos têm evidenciado que a expressão de adiponectina pode ser induzida em outras células (Yadav et al. 2012).

Em contraste à maioria das adipocinas, a expressão de adiponectina diminui com o aumento da adiposidade, é altamente expressa no tecido adiposo subcutâneo e está reduzida no plasma de obesos (Lenz & Diamond 2008; Ye & McGuinness 2013). A adiponectina tem amplo espectro de efeitos metabólicos e anti-inflamatórios e age principalmente via dois recetores: o AdipoR1 encontrado no músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo e o AdipoR2 encontrado no fígado e TA. (Karnati, Panigrahi, Li, Tweedie, & Greig, 2017)

2.7. Tecido adiposo e inflamação

A origem desse conceito apoia-se no fato de que o nível circulante de muitas citocinas e proteínas de fase aguda associadas a inflamação apresenta-se aumentadas em pacientes obesos.(Villarroya et al., 2018)

Os adipócitos segregam várias citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, aumentam a produção e circulação de fatores relacionados com a inflamação.Existem evidências demonstrando que o estado inflamatório pode ser devido a resistência a ação da insulina e outros distúrbios associados a obesidade, como hiperlipemia e síndrome metabólica.(Doyle, Donohoe, Lysaght, & Reynolds, 2012)

As citocinas são hormonas proteicas tipicamente conhecidas como mediadoras e reguladores de respostas imunes e inflamatórias.(Nicholson, Church, Baker, & Jones, 2018) Tais substâncias inicialmente conhecidas como citocinas, eram definidas como proteínas solúveis sintetizadas por células imunes ou não, que medeiam a comunicação intracelular por transmitirem informações às células-alvo, via de interações com recetores específicos. Muitas citocinas possuem atividades fisiológicas muito além daquelas originalmente descobertas.

O termo inicialmente utilizado foi o proposto foi de adipocitocinas, termo este ainda amplamente usado. Atualmente, o termo mais aceite é adipocina e não se refere apenas a proteínas que pertencem ao mesmo grupo funcional, mas conforme recomendado por Adipocina é um termo universal adotado para descrever a proteína que é excretada (e sintetizada) pelo tecido adiposo, sendo esta proteína uma citocina ou não (Reneau et al., 2018).



Figura 10 – Principais adipocinas e suas categorias funcionais. Embora as adipocinas estejam agrupadas didaticamente em categorias distintas, suas ações ocorrem de forma integrada, ocasionando a participação do TAB na homeostase energética, na imunidade, na resposta inflamatória, na sensibilidade insulínica, na angiogénese e na pressão sanguínea. TNF- α : Fator de Necrose tumoral alfa; IL-6: Interleucina-6; RBP: Proteína ligadora de retinol; CETP: Proteína de transferência de éster de colesterol; PAI-1: Inibidor da ativação de plasminogénio; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

O número de sinalizadores moleculares descritos como produzidos pelo TA tem vindo a aumentar consideravelmente (Figura 10). As adipocinas são altamente diversificadas em termos de estrutura proteica e função fisiológica. Elas incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e outras proteínas sistêmicas; incluem-se também proteínas envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogénese. (Villarroya et al., 2018) Existem, portanto, diversas citocinas tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e fatores de crescimento, como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), o inibidor do ativador do plasminogénio (PAI-1) que participam em processos inflamatórios e hemodinâmicos. (Magno et al., 2018)

Corroborando a importância das adipocinas na mediação das respostas imunes de indivíduos obesos, alguns estudos mostram que baixas concentrações da adipocina anti-inflamatória (adiponectina) estão associadas a ocorrência de diversos tipos de cancro e altas concentrações à inibição do crescimento de tumores. (Mendonça et al., 2015)

2.7.1. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina com diversas funções imunológicas. Foi inicialmente identificado como um polipeptídeo produzido por macrófagos durante infecções, doenças, cancro, condições estas que contribuem para o desenvolvimento de caquexia.(Rodrigues et al., 2017) É também caracterizado por sua capacidade de induzir a necrose em células tumorais, de onde advém o nome fator de necrose tumoral.

A primeira descrição do TNF- α é atualmente conhecida como apenas um dos polipeptídeos da superfamília de 10 ligantes com recetores transmembrânicos glicoproteicos. O TNF- α apresenta grande diversidade de atividades biológicas, as quais incluem: respostas imunológicas, reações inflamatórias, neovascularização.(Rodrigues et al., 2017) O TNF- α é uma citocina pro-inflamatória que pode inibir a proliferação de células tumorais e promover apoptose celular.

Nos seres humanos o TNF- α é sintetizado e segregado pelas células do estroma vascular e frações da matriz, incluindo os macrófagos, apesar de ter seu mRNA expresso no tecido adiposo; uma aparente disparidade entre a presença do mRNA e a secreção da proteína é evidente para várias citocinas. Entretanto, sob condições fisiológicas, o tecido adiposo produz uma quantidade relativamente grande de TNF- α , fato este que o inclui como uma adipocina. Apenas uma parte do TNF- α derivado do tecido adiposo é de origem do próprio adipócito, uma considerável parte pode ser segregada por macrófagos infiltrados no tecido, fato este particularmente importante na obesidade.(Singh et al., 2018)

Outro mecanismo descrito é a inibição da lipase lipoproteica (LPL), e aumento na mobilização de ácidos gordos livres do tecido adiposo para a corrente sanguínea, que acarreta resistência à insulina em tecidos periféricos como o fígado e músculos. Além de estar envolvido no aumento da resistência à insulina.

2.7.2. Interleucina 6 (IL6)

É uma citocina pró-inflamatória que está envolvida em múltiplos processos fisiológicos incluindo lesão tecidual e defesa do hospedeiro. Aproximadamente um terço da IL6 circulante é sintetizado pelo tecido adiposo. (Rodrigues et al., 2017) Níveis aumentados de IL6 estão positivamente correlacionados com obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina e são preditivos para o desenvolvimento diabetes *mellitus* 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. A produção de IL6 pelo tecido adiposo visceral é três vezes maior em comparação ao subcutâneo, e fornece potencial ligação entre gordura visceral e resistência à insulina, bem como gordura visceral e inflamação. (Almuraikhy et al., 2016)

Adicionalmente induz a produção de proteína C reativa no fígado, um importante fator de risco para doença cardiovascular e este foi associado ao aumento dos triglicerídeos relacionado com a obesidade por estimular a secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)(Magno et al., 2018)

2.8. Obesidade e dislipidemia

A dislipidemia é uma condição em que ocorrem níveis elevados de lípidos no sangue, sendo uma das complicações mais frequentes da obesidade.(Yin & Wang, 2018) A obesidade é considerada um factor de risco para várias doenças crónicas tais como hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidémia, existindo também evidências de que seja factor de risco para diversos tipos de cancro.(De Pergola & Silvestris, 2013b) De facto, quase por unanimidade, estudos epidemiológicos evidenciam que a obesidade aumenta o risco para vários tipos de cancro.

Várias teorias fisiopatológicas foram postuladas para explicar esta associação e variam desde factores dietéticos, genéticos ou imunológicos, a produtos de secreção hormonal dos adipócitos (leptina e adiponectina). Além disso, a obesidade pode desempenhar um papel no prognóstico de alguns tipos de cancro.(Ferreira, 2010)

O impacto final da obesidade na mortalidade por cancro é variável, podendo, em certas populações, ir até aos 20%. A dislipidemia trata-se de distúrbio metabólico caracterizado por concentrações anormais de lípidos e/ou lipoproteínas no sangue, sendo determinada por fatores genéticos e ambientais.

Na dislipidemia, as alterações mais comuns são os níveis reduzidos de colesterol-HDL e elevados de Colesterol Total, Triglicerídeos e colesterol-LDL, colesterol-VLDL, com predomínio das subclasses de colesterol com menor peso molecular, que tem maior poder aterogénico. Por esse motivo, torna-se essencial procurar avançar nas medidas de prevenção e diagnóstico adequados de dislipidemias, visando instituir terapêuticas que visem reduzir a morbimortalidade na vida adulta.(Yin & Wang, 2018) O colesterol é o esteroide mais comum no organismo, estando presente em todos os tecidos e também no plasma. Apresenta-se nas formas livres ou combinado com ácidos gordos de cadeia longa na forma de éster de colesterol.

O colesterol pode ser consumido a partir de fontes dietéticas (colesterol exógeno), sendo absorvido lentamente pelo trato gastrointestinal. No entanto, a maior parte é produzida pelo fígado (colesterol endógeno) e circula pelos vasos na forma de lipoproteínas, que permitem solubilização e transporte dos lipídeos, uma vez que são estruturas hidrofóbicas.

A dislipidemia relacionada com a obesidade é caracterizada por aumento dos níveis de Triglicerídeos, queda dos níveis de colesterol-HDL e concentração anormal de colesterol-LDL, com maior proporção de partículas pequenas e mais densas. Essas alterações lipídicas parecem estar intimamente associadas à resistência insulínica, situação em que há comprometimento na atividade da lipase lipoproteica, promovendo menor captação de glicose e maior liberação de ácidos gordos livres e glicerol na circulação, o que proporciona maior produção hepática de triglicerídeos e colesterol-VLDL.(Potočnjak et al., 2017)

Os lípidos têm um papel importante praticamente em todos os aspetos fisiológicos, contudo a relação causal da concentração dos lípidos e lipoproteínas no plasma, tem consequências para a saúde, tendo originado programas de Saúde Pública desenvolvidos para detetar, avaliar e tratar certas alterações dos lípidos no plasma, refletidas em várias comorbidades.

2.8.1. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são ésteres de ácidos gordos de glicerol, representam a maior quantidade de gordura no organismo. Os triglicerídeos circulantes são provenientes da dieta (fonte exógena) e do fígado (fonte endógena). A sua função primária é armazenar e fornecer energia para as células.

A concentração de triglicerídeos do plasma é dada pelo balanço entre as taxas de entrada e de eliminação dessas moléculas no organismo. Estudos clínicos e epidemiológicos mais recentes demonstraram que o aumento das concentrações dos níveis de triglicerídeos pode ser considerado um factor de risco independente para aterosclerose.(LeBlanc et al., 2018)

As medições da concentração de triglicerídeos são usadas no diagnóstico e tratamento de pacientes com diversas comorbidades nomeadamente: diabetes mellitus, nefrose, obstrução hepática, outras doenças envolvendo o metabolismo lipídico e vários distúrbios endócrinos.(Tada et al., 2018)

2.8.2. Colesterol

O colesterol é um componente estrutural essencial das membranas celulares e precursor dos ácidos biliares e de todas as hormonas esteroides. Por tal, o colesterol é o ponto partida de muitas vias metabólicas, nomeadamente, síntese de vitamina D, hormonas esteroides, metabolismo de ácidos biliares, com grande significado para o funcionamento normal do organismo. Embora uma parte do colesterol do organismo seja derivado da ingestão alimentar, a maior parte é sintetizado em muitos tipos de tecido, cerca de 90% da síntese ocorre no fígado e na parede intestinal. Cerca de três quartos do colesterol é formado por síntese e um quarto tem origem na dieta alimentar.

As determinações do colesterol são utilizadas para despistar o risco aterogénico e no diagnóstico e tratamento de doenças que envolvem níveis elevados de colesterol, bem como de perturbações do metabolismo lipídico e lipoproteico.(Morales-Lázaro & Rosenbaum, 2017)

2.8.3. Lipoproteínas

2.8.3.1. Colesterol – HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL - High Density Lipoproteins) são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células periféricas para o fígado. Na sua constituição cerca de 50% são proteínas, 30% fosfolípidos e 20% colesterol. Aqui, o colesterol é transformado em ácidos biliares que são excretados para o intestino através das vias biliares.(Moon et al., 2016)

É clinicamente importante monitorizar o colesterol-HDL no soro, pois existe uma correlação inversa entre as concentrações séricas de colesterol- HDL e o risco de doença aterosclerótica.(Gao et al., 2017) Concentrações elevadas de colesterol-HDL são protetoras contra as doenças coronárias, enquanto que concentrações reduzidas, especialmente em conjunto com triglicéridos elevados, aumentam o risco cardiovascular.(Gao et al., 2017)

2.8.3.2. Colesterol – LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL-*Low Density Lipoproteins*) desempenham um papel fulcral na formação e desenvolvimento da aterosclerose e, especialmente, da esclerose coronária. As LDL derivam das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL - *Very Low Density Lipoproteins*) ricas em triglicéridos através da ação de várias enzimas lipolíticas, sendo sintetizadas no fígado. A eliminação das LDL do plasma ocorre sobretudo através das células do parênquima hepático, por meio de recetores específicos das LDL.(Moon et al., 2016)

Concentrações elevadas de colesterol-LDL no sangue e o aumento do seu tempo de permanência, associados a um aumento da taxa de modificação biológica, resultam na destruição da função endotelial e numa captação superior do colesterol-LDL pelo sistema monócitos/macrófagos e pelas células do músculo liso nas paredes dos vasos sanguíneos. A maior parte do colesterol armazenado nas placas ateroscleróticas deriva das LDL.

Entre todos os parâmetros isolados, o colesterol-LDL tem um valor preditivo clínico muito importante em relação à aterosclerose coronária.(Gao et al., 2017) Habitualmente, o cálculo da concentração de colesterol-LDL é feito de acordo com a fórmula de Friedewald:

$$LDL = CT - HDL - \left(\frac{TG}{5}\right),$$

quando o valor dos triglicerídeos for inferior a 400 mg/dL. (Martin et al., 2013)

2.8.3.3. Colesterol-VLDL

O colesterol-VLDL é produzido no organismo pelo fígado, e tem como função o transporte de triglicerídeos através da corrente sanguínea, sendo estes então armazenados nas células e utilizados para fornecer energia ao organismo. Este tipo de colesterol (o VLDL, assim como o LDL) é considerado um colesterol prejudicial, porque, se os seus níveis estão elevados no sangue, eles provocam uma acumulação de gordura nas artérias e a formação de placas ateroscleróticas, sendo extremamente perigoso para a saúde, pois esta condição aumenta o risco de ocorrência de doenças cardíacas ou metabólicas.(Gao et al., 2017) O colesterol-VLDL pode ser calculado pela fórmula:

$$VLDL = \frac{TG}{5}$$

Contudo, esta fórmula torna-se imprecisa na presença de hipertrigliceridemia (triglicerídeos > 400mg/dL).

2.8.3.4. Lipoproteínas de densidade intermédia- IDL

As VLDL são hidrolisadas pela lipoproteína lipase (LPL), formando-se uma lipoproteína de densidade intermédia IDL, de vida curta, parcialmente desprovida de triglicerídeos. A IDL contém quase a mesma quantidade de colesterol e triglicerídeos, tendo um papel importante no processo catalisador

das IDL para as LDL, para captação e degradação pelo fígado.(Kidawa et al., 2018)

2.9. Hormonas esteroides

A obesidade também pode levar ao aumento da produção de hormonas esteroides. Algumas destas hormonas e fatores de crescimento produzidos pelo adipócito estão associados com a carcinogénese.(Pérez-Hernández et al., 2014b) Por exemplo, estrogénios e androgénios aumentam com o aumento do tecido adiposo. Tanto os androgénios como os estrogénios têm demonstrado aumentar o stress oxidativo em células de CaP, e os mecanismos de defesa antioxidante foram expostos para anular o início do processo de cancro.(Castelli et al., 2016)

Além de alterações nos androgénios, a obesidade está associada a um aumento dos níveis séricos de insulina, fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e leptina, e diminuição dos níveis de adiponectina.(Murdolo et al., 2013)

As hormonas esteroides são um grupo de hormonas derivadas do colesterol segregadas pelas glândulas adrenais e gónadas. Estas hormonas são classificadas de acordo com os órgãos que as sintetizam: os esteróides adrenais são assim designados uma vez que são segregados pelo córtex adrenal e os esteroides sexuais são produzidos pelos ovários e testículos, sendo responsáveis por diversas funções nos organismos, incluindo controle metabólico e características sexuais.(Moon et al., 2016)

2.9.1. Androgénios

Os androgénios são as hormonas sexuais masculinas. O principal androgénio, a testosterona, é produzido principalmente pelos testículos e em menores quantidades pelo córtex adrenal e ovários (nas mulheres). Os androgénios são os principais responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da função reprodutiva, bem como pela estimulação das características sexuais secundárias do sexo masculino.

Estas hormonas são sintetizadas por três glândulas que são, córtex adrenal, testículos e ovários.(Grosman et al., 2016a) Os androgénios desempenham um

papel importante na regulação da distribuição do tecido adiposo.(O'Reilly, House, & Tomlinson., 2014) Exercem efeitos sobre a diferenciação de adipócitos, através do recetor androgénico (AR), levando à modulação do tamanho dos adipócitos e da expansão do compartimento de gordura. Os androgénios também afetam diretamente as principais funções dos adipócitos, incluindo a sinalização da insulina, metabolismo lipídico, absorção de ácidos gordos e produção de adipocinas.(O'Reilly et al., 2014)

O excesso e a deficiência de androgénios têm implicações para a saúde metabólica em homens e mulheres, e esses efeitos metabólicos podem ser mediados pelo TA através de efeitos na distribuição de gordura, função dos adipócitos e lipólise. Em geral, os estudos apontam para um efeito estimulador na lipólise, com comprometimento da diferenciação de adipócitos, sinalização de insulina e síntese de adipocinas. O tecido adiposo é um órgão importante do metabolismo androgénico pré-receptor, através do qual a disponibilidade local de androgénio é rigorosamente controlada. A exposição ao androgénio adiposo é rigorosamente controlada pela 5 α -redutase e outras, mas a regulação do equilíbrio entre produção e inativação irreversível permanece pouco compreendida.(O'Reilly et al., 2014)

2.9.2. Testosterona

A testosterona androgénica (17 β -hidroxiandrostenona) tem um peso molecular de 288 daltons. Nos homens, a testosterona é sintetizada quase exclusivamente pelas células de Leydig dos testículos. A secreção da testosterona é regulada pela hormona luteinizante (LH) e está sujeita a um *feedback* negativo através da hipófise e do hipotálamo.

É um esteróide sintetizado a partir o colesterol, regula o metabolismo energético, inibe a adipogénese e modula as funções sexuais e reprodutiva masculina. A testosterona promove o desenvolvimento das características sexuais secundárias nos homens e serve para manter a função da próstata e das vesículas seminais.

A maior parte da testosterona circulante está ligada a proteínas de transporte (globulina de ligação da hormona sexual – SHBG (*sex hormone binding globulin*)).

Nas mulheres, formam-se pequenas quantidades de testosterona nos ovários. Em concentrações fisiológicas, os androgénios não têm quaisquer efeitos específicos sobre as mulheres.

2.9.3. Hormona Luteinizante (LH)

A LH (hormona luteinizante) pertence à família das gonadotrofinas. A LH e a FSH regulam e estimulam o crescimento e o funcionamento das gónadas (ovários e testículos) de modo sinérgico. A LH é uma glicoproteína constituída por duas subunidades (cadeias α e β). Esta hormona, que é constituída por 121 aminoácidos e três cadeias de açúcar, tem um peso molecular de 29500 daltons.

Nas mulheres, as gonadotrofinas atuam dentro do circuito regulador hipotálamo, hipófise, ovários para controlar o ciclo menstrual. A LH e a FSH são libertadas de forma pulsátil pelas células gonadotróficas da hipófise anterior, passando para os ovários através da circulação sanguínea. As concentrações de LH mais elevadas ocorrem durante o pico, a meio do ciclo, e induzem a ovulação e formação do corpo lúteo, cujo principal produto segregado é a progesterona. Nas células de Leydig dos testículos, a LH estimula a produção de testosterona.(Walsh et al., 2018)

2.9.4. Prolactina

A prolactina tem como funções «clássicas» ser fator regulador do desenvolvimento da glândula mamária durante a gravidez e fator de estimulação major para a lactação no período após o parto (efeito lactogénico).

A prolactina apresenta características moleculares e fisiológicas únicas, que lhe permitem desempenhar inúmeras funções. Além do seu papel na lactação e na regulação da função reprodutiva, esta hormona influencia múltiplos processos biológicos e afeta diversos aspetos da homeostasia humana. Porém, nos últimos anos, têm-lhe sido atribuída muitas outras propriedades, parecendo afetar diversos aspetos da homeostasia humana.(Ignacak et al., 2012) Recentemente, tem vindo a atrair a atenção dos investigadores devido às suas funções no metabolismo. Têm sido direcionados estudos de forma a investigar o efeito desta hormona no metabolismo glicídico e no funcionamento do TA, bem como a

eventual associação da hiperprolactinemia patológica com o desenvolvimento de patologias como a diabetes *mellitus* ou a obesidade.(Carré & Binart, 2014)

As concentrações elevadas de prolactina têm uma ação inibidora na gênese dos esteroides dos ovários e na produção e secreção de gonadotrofina pela hipófise.(Grimstad et al., 2018)

Apesar de ser maioritariamente segregada pelos lactotrofos hipofisários, encontram-se identificadas muitas fontes extra hipofisárias de prolactina, incluindo linfócitos, fibroblastos cutâneos, cérebro, glândula mamária, glândula prostática e tecido adiposo. A prolactina e a hormona de crescimento (GH) também estimulam a produção de androgénios tanto nos testículos como nas adrenais, tendo a primeira um efeito mitogénico direto adicional sobre as células epiteliais da próstata.(Guelho, Gomes, Paiva, & Carrilho, 2016)

2.9.5. Estradiol

O estrogénio biologicamente mais ativo é o 17 β -estradiol. É uma hormona esteroide com um peso molecular de 272 daltons. Cerca de 98 % do estradiol liga-se a proteínas de transporte (globulina ligante de hormonas sexuais - SHBG (*sex hormone binding globulin*)).

A presença da hormona tipicamente feminina (estrógeno) em homens deve-se, principalmente à ação da enzima aromatase.(Nielsen & McNulty, 2018)

Essa enzima é responsável pela conversão da testosterona em estradiol, no âmbito intracelular. Assim, quer nos homens e mulheres, podem apresentar diferentes níveis de estradiol no organismo.

3. OBESIDADE E CARCINOMA DA PRÓSTATA

3.1. Influência da obesidade no Carcinoma da Próstata

Uma dieta altamente calórica e um estilo de vida sedentário foram reconhecidos como potenciais fatores de risco para várias doenças crônicas, tais como doença cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 1 e cancro. (Mackenzie et al., 2018)

Diferentes fontes apontam a obesidade como fator de risco para o desenvolvimento de CaP (Draghi et al., 2018). A relação entre o IMC e o risco de CaP foi demonstrada numa coorte multiétnica e em que se concluiu que o aumento do IMC entre a maioridade precoce e tardia, influencia o desenvolvimento de CaP. (Allott, Masko, & Freedland, 2013b; De Pergola & Silvestris, 2013a)

A associação da obesidade, dislipidemia, hiperinsulinemia, pode estar associada com elevada agressividade do cancro de próstata, definida pela classificação de Gleason. (Allott & Hursting, 2015) Contudo, a relação destes parâmetros bioquímicos com a base molecular é ainda pouco conhecida. Assim, existe um número de mecanismos biológicos plausíveis em que a obesidade pode promover o desenvolvimento e progressão do cancro. (Allott, Masko, & Freedland, 2013a) A obesidade tem sido descrita em vários estudos, como fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de cancro. (P. Coelho et al., 2017a; P. Coelho, Almeida, Prudêncio, Fernandes, & Soares, 2016; De Pergola & Silvestris, 2013a; Moreira et al., 2015a) Há uma série de processos biológicos comuns a estas duas condições que podem levar a uma inter-relação causal. (Quagliariello et al., 2017) Muitas hormonas envolvidas na obesidade também desempenham um papel na iniciação e promoção do cancro, tanto a nível, celular parácrina e sistémica (Figura 11). (Grosman et al., 2016b)

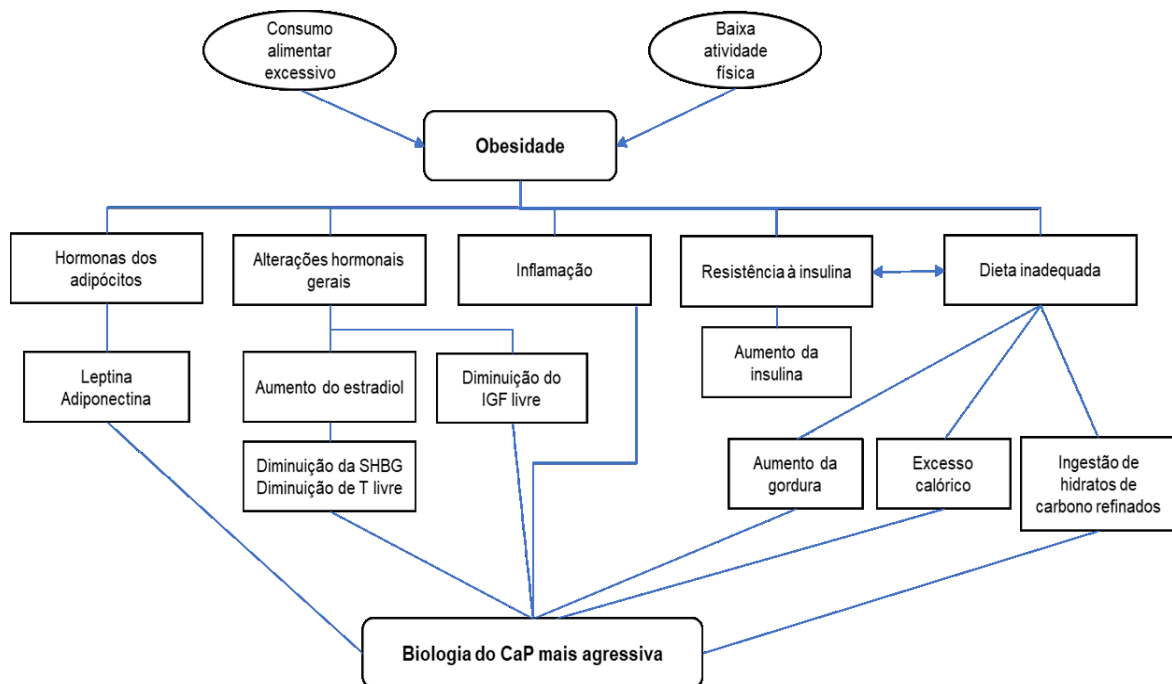


Figura 11 - Hipóteses biológicas para a agressividade do CaP. Várias teorias têm sido propostas para mudanças biológicas que levam a um fenótipo CaP mais agressivo em homens obesos. Essas hipóteses e suas relações entre si, obesidade e biologia do tumor agressivo são descritos acima.

3.2. Fatores metabólicos envolvidos no CaP

Duas grandes linhas de estudos têm emergido levantando hipóteses que correlacionam a ação das hormonas endógenas e a etiologia do CaP.

A primeira grande hipótese afirma que o risco está ligado à concentração intraprostática de androgénios.(Nelles, Hu, & Prins, 2011b) Esta teoria é fundamentada no facto de indivíduos com CaP apresentarem redução no tamanho do tumor, quando são submetidos à orquiectomia ou a privação andrógena. Uma maior incidência de CaP em pacientes obesos explica-se pela redução dos níveis da SHBG. Como já foi referido, a SHBG é uma glicoproteína que se liga às hormonas sexuais, mais especificamente, testosterona e estradiol, além de outras como progesterona e cortisol, tornando-as inativas. Assim sendo, a biodisponibilidade das hormonas sexuais é influenciada pelo nível de SHBG.(Quagliariello et al., 2017) Fisiologicamente, apenas uma pequena fração da testosterona se encontra “livre”, ou seja, biologicamente ativa e capaz de ativar os recetores das células prostáticas. (Nelles, Hu, & Prins, 2011c) Tendo, o paciente obeso, baixos níveis de SHBG, é esperado que encontremos no mesmo,

elevados níveis de testosterona livre (“ativa”), o que, por sua vez, resulta no desequilíbrio de crescimento do tecido prostático. (Kahn et al., 2008)

Outra grande hipótese, por sua vez, sugere que as proteínas e hormonas armazenadas na gordura corporal, como fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e leptina, podem promover o crescimento do tumor em homens obesos. Tal hipótese baseia-se na teoria presente em vários estudos epidemiológicos que têm encontrado uma correlação direta entre a obesidade com aumento sérico de IGF-1 e o risco de CaP. Observou-se que altos níveis séricos de IGF-1 foram encontrados em pacientes, que mais tarde, tiveram o diagnóstico de CaP confirmado, mesmo quando o cancro era clinicamente “silencioso”. (Mora, Fleshner, Klotz, & Venkateswaran, 2015)

Sabe-se que o IGF-1 é um peptídeo com potente ação mitogénica para a linhagem de células humanas de CaP, desempenhando importante papel na proliferação, regulação e diferenciação de tais células e progressão do CaP. (Grosman et al., 2016a)

3.3. Hormonas e Carcinoma da Próstata

As taxas de incidência e mortalidade do CaP variam notavelmente em todo o mundo. Embora vários fatores tenham sido implicados para explicar essa grande variação, o estilo de vida e os fatores dietéticos podem desempenhar um papel dominante, as hormonas sexuais comportam-se como intermediários entre fatores exógenos e alvos moleculares no desenvolvimento e progressão do CaP. O CaP humano é geralmente considerado um exemplo de tumor dependente de androgénios, no entanto, o papel dos estrogénios na próstata normal e maligna parece ser igualmente importante. (Nelles, Hu, & Prins, 2011a)

Evidências similares se aplicam aos estrogénios, embora a proporção de androgénio para estrogénio no plasma diminua com a idade. Uma questão importante é, até que ponto as hormonas circulantes podem ser consideradas representativas dos seus níveis intraprostáticos. Ambos os tecidos e células da próstata humana, normais e malignos, possuem enzimas chave do metabolismo de esteróides, incluindo a desidrogenase de 17-β-hidroxi-esteróides (17-β-HSD),

5- β -redutase, 3- α /3- β -HSD e aromatase. Estrogénios produzidos localmente ou transformados metabolicamente podem distintamente afetar a atividade proliferativa de células de CaP. A expressão e a atividade da aromatase aberrante foram relatadas em tecidos e células tumorais da próstata, o que implica que a aromatização do androgénio aos estrogénios pode desempenhar um papel na carcinogénese da próstata e ou na progressão do tumor. (Carruba, 2007; Nelles, Hu, & Prins, 2011d)

Recentemente vários estudos evidenciam fatores consistentes que sugerem que os estrogénios são potenciais fatores relacionados com o desenvolvimento e progressão do CaP.(Nelles et al., 2011d)

4.OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho, foi investigar a influência da obesidade no CaP e sua agressividade. Dados os múltiplos efeitos da adiposidade (hormonas, inflamação, proliferação) em vários tecidos periféricos é de grande interesse estudar as implicações clínicas e metabólicas entre a obesidade e o CaP.

Assim, pretendeu-se estudar os mecanismos que correlacionam o aumento da obesidade com a progressão e agressividade do CaP em particular:

- | O perfil lipídico dos doentes com CaP;
- | O perfil hormonal dos doentes com CaP;
- | O efeito do tecido adiposo nas células tumorais de CaP *in vitro*;
- | O efeito de hormonas nas células tumorais de CaP *in vitro*.



Capítulo 2

Materiais e Métodos

1. Tipo de Estudo

O presente estudo é um estudo observacional analítico e experimental. Foi avaliado/estudado o impacto da obesidade na progressão tumoral do Carcinoma prostático, estudo clínico em doentes. Complementado com um estudo experimental utilizando modelos celulares de CaP, como complemento ao estudo clínico em doentes.

1.1. População do estudo Clínico

Para este estudo foram incluídos doentes da consulta externa de Urologia do Centro Hospitalar Universitario do Porto, que se apresentaram na referida consulta para efetuarem a biópsia prostática ecodirigida.

1.2. Características da Amostra

A amostra estudada incluiu 181 homens com mais de 45 anos de idade, que foram encaminhados para avaliação urológica de rotina. A indicação para a biópsia da próstata é baseada no exame de sangue, doseamento do antígeno específico da próstata (PSA), sua evolução ao longo do tempo e nas alterações da próstata em relação à consistência ou forma detetada pelo exame direto (toque de próstata) ou ambos. Foram obtidas informações antropométricas dos pacientes e colhidas amostras de sangue para os exames analíticos, do perfil bioquímico e perfil hormonal.

1.3. Critérios de inclusão e exclusão

Apenas foram incluídos os indivíduos com indicação clínica para a realização de biópsia prostática. Foram excluídos todos os pacientes que não cumpriram as indicações clínicas de preparação prévia.

1.4. Questões éticas

O protocolo do estudo foi aprovado pela comissão de ética local e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2. Colheita de sangue

Os pacientes que se submeteram à biópsia de próstata guiada por ultrassonografia foram-lhes colhida uma amostra de sangue venoso antes de qualquer manipulação prostática (exame retal e ecografia transretal) em tubos de vácuo da Vacutainer BD, um tubo com anticoagulante EDTA, e outros sem qualquer aditivo, que foram subsequentemente centrifugados a 3500 r.p.m. e o soro separado para a determinação das hormonas e marcadores bioquímicos mencionados anteriormente.

O soro foi separado para uma alíquota e conservada a uma temperatura de -40°C. As amostras do sangue total podem ser armazenadas até 7 dias a 2-8°C, ou por 1 dia à temperatura ambiente (15-30°C). As recomendações para o manuseamento e conservação das amostras são fornecidas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

3. Avaliação antropométrica

A avaliação antropométrica tem como vantagens, ser de uma forma geral de aplicação simples, segura, não invasiva e dependendo dos parâmetros selecionados, sem custos elevados, porém devemos ter em atenção as limitações inerentes às mesmas. Quanto ao melhor método de avaliação, não existem métodos ideais, todos eles apresentam aspetos positivos e limitações, assim, a nossa seleção foi adaptada à população em causa e às condições disponíveis. O peso e a altura são medidas úteis na avaliação do estado nutricional de adultos e idosos, devendo sempre serem avaliados através de técnicas internacionalmente consideradas.

Neste estudo o equipamento utilizado para a avaliação antropométrica foi sempre o mesmo tendo o cuidado de estar devidamente calibrado.

3.1. Avaliação do Índice de Massa Corporal - IMC

O Índice de Massa Corporal (IMC) é uma medida validada e amplamente utilizada na avaliação do estado nutricional, bastante simples de concretizar e de baixo

custo operacional, sendo útil na avaliação ponderal. Avaliação dos indivíduos com peso normal, excesso de peso, obesidade moderada (grau I), obesidade grave (grau II) e obesidade mórbida (grau III).

Os doentes na altura da colheita de sangue, foram medidos e pesados, utilizando sempre os mesmos procedimentos e equipamentos para todos os doentes.

Aplicando aos resultados obtidos para o cálculo do IMC a seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{Peso}{Altura^2} \text{ (Kg/m}^2\text{)}$$

4. Métodos analíticos

Para a determinação dos parâmetros analíticos em estudo, foram utilizados sistemas comerciais da Roche (Roche Diagnostics). Para a determinação do perfil hormonal usaram-se kits desenvolvidos para utilizar no analisador automático modular E170. O doseamento dos parâmetros bioquímicos foram efectuados com recurso a sistemas enzimáticos/ colorimétrico utilizando o analisador Cobas 8000- ROCHE.

4.1. Perfil bioquímico

O perfil bioquímico do presente estudo inclui o doseamento hemoglobina glicada HbA1c, Triglicerídeos (TG), Colesterol total (CoT) e suas frações, como lipoproteínas de alta densidade (C-HDL), lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (C-VLDL).

Os intervalos de referência para os parâmetros bioquímicos usados no presente estudo são de 4,0-6,0% para HbA1c, 40-160 mg/dL para TG, 0-200 mg/dL para CoT, 35-55 mg/dL para C-HDL mg/dL, 0-130 mg/dL para C-LDL e 3-56 mg/dL para C-VLDL.

Como já foi referido, consideramos os valores inferiores ou superiores ao intervalo de referência como baixo ou alto, respetivamente.

4.1.1. Colesterol Total (CT)

O doseamento do colesterol das amostras foi efetuado pelo enzimático colorimétrico utilizando o analisador Cobas 8000- ROCHE, como referido.

Método colorimétrico enzimático para o CT

Os ésteres de colesterol são clivados através da ação da *colesterol esterase* produzindo colesterol livre e ácidos gordos. A *colesterol-oxidase* catalisa a oxidação do colesterol para colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogénio. Em presença da *peroxidase*, o peróxido de hidrogénio formado afeta o acoplamento oxidativo do fenol e da 4-aminoantipirina, formando um corante vermelho de quinona-imina.

A intensidade do cromogéneo formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Cálculo dos resultados

São determinados medindo o aumento da absorvância e convertida em unidades através de uma curva de calibração. Os sistemas Roche/Hitachi COBAS C calculam automaticamente a concentração de analito de cada amostra.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante (ROCHE Diagnóstics). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o analisador utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard. O doseamento do colesterol da

Roche cumpre o requisito de 1992 do National Institutes of Health (NIH), com precisão e desvio inferior ou igual a 3 %.

4.1.2. Colesterol- HDL

O doseamento do colesterol-HDL das amostras foi efetuado pelo método colorimétrico enzimático homogêneo (utilizando o analisador Cobas 8000-ROCHE).

Método colorimétrico enzimático para o C-HDL

A concentração do colesterol-HDL é determinada enzimaticamente, pela *colesterol esterase* e *colesterol oxidase* acopladas com PEG (*Polyethylene glycol*) aos grupos amino (cerca de 40 %).

Sob a influência da *colesterol esterase*, os ésteres de colesterol são quantitativamente decompostos em colesterol livre e ácidos gordos.

Na presença de oxigénio, o colesterol é oxidado pela *colesterol oxidase* a Δ^4 -colesteno e peróxido de hidrogénio.

Na presença da peroxidase, o peróxido de hidrogénio gerado reage com a 4-aminoantipirina e a HSDA (N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina de sódio) para formar um corante púrpura-azulado.

A intensidade do cromogénio formado é diretamente proporcional à concentração de colesterol e é medida fotometricamente.

Cálculo dos resultados

São determinados medindo o aumento da absorvância e convertida em unidades através de uma curva de calibração. Os sistemas Roche/Hitachi COBAS C calculam automaticamente a concentração de analito de cada amostra.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante (ROCHE Diagnóstics). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o analisador utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard.

4.1.3. Colesterol-LDL

A determinação do colesterol-LDL foi calculada através da fórmula de Friedwald:

$$LDL (mg/dL) = CT - HDL - \left(\frac{TG}{5}\right)$$

Esta fórmula traduz resultados inválidos quando o valor dos triglicéridos é superior a 400 mg/dL.

Para assegurar a correta execução dos ensaios foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o analisador utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard.

4.1.4. Colesterol-VLDL

Não existe um método simples de calcular diretamente o C-VLDL, normalmente é inferido a partir dos outros números referentes ao colesterol no soro. A primeira fórmula básica para estimar o C-VLDL é a seguinte (Genest et al., 2009):

$$VLDL (mg/dL) = CT - HDL - LDL$$

Esse cálculo é uma boa estimativa, mas não é preciso, pois o C-VLDL pode se transformar em tipos menos comuns de colesterol, como o IDL (lipoproteína de densidade intermédia), o VLDL nascente e o VLDL remanescente que, algumas vezes, são inclusos nos valores de C-LDL.

Normalmente, um nível elevado de C-VLDL corresponde a uma grande concentração de triglicerídeos no sangue, em qualquer momento, há aproximadamente um quinto de moléculas de C-VLDL do número de moléculas de triglicerídeos no seu sangue. Isso explica a segunda fórmula de calcular o valor de C-VLDL que consiste no valor dos Triglicerídeos:

$$VLDL (mg/dL) = \frac{TG}{5}$$

Esta foi a fórmula utilizada nas amostras deste estudo.

4.1.5. Triglicerídeos

O doseamento dos triglicerídeos das amostras biológicas foi efetuado pelo método enzimático colorimétrico (analisador Cobas 8000- ROCHE)

Método colorimétrico enzimático para os triglicéridos

Teste enzimático colorimétrico, utilizando a *lipoproteína lípase* para a hidrólise rápida e completa dos triglicerídeos para glicerol, seguida de oxidação para fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio produzido reage depois com 4-aminofenazona e 4-clorofenol sob a acção catalítica da *peroxidase*, para formar um corante vermelho (reacção de ponto final de Trinder). A intensidade cromática do corante vermelho formado é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos, determinada fotometricamente.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante (ROCHE Diagnóstics). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o analisador utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard.

4.2. Perfil hormonal

O método utilizado para o doseamento hormonal foi o ensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA) por meio de técnicas competitivas ou tipo sanduíche. Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante e, quando necessário, foram realizadas calibrações e os calibradores utilizados foram os recomendados pelos respetivos fabricantes. Para cada série de determinações, foram inseridos os soros de controlo. Essas matérias de referência foram adquiridas no mercado, com três níveis de concentração (baixa, normal e alta). As determinações analíticas só foram efetuadas após a validação dos resultados do Controlo de Qualidade, que estavam sempre dentro dos valores definidos pelo Programa de Controlo de Qualidade.

O perfil hormonal do presente estudo foi realizado nos pacientes que realizaram biópsia de próstata guiada por ultrassonografia e foram definidos no início do estudo, sendo constituído pelas seguintes hormonas: Leptina, Prolactina, Estradiol, Hormona Luteinizante e Testosterona Total.

Os valores de referência considerados no presente estudo foram de 0,7-5,3 ng/mL para Leptina, 4,04-15,2 ng/mL para Prolactina, 7,63-42,6 pg/mL para Estradiol (E2), 1,7-8,6 mUI/mL para Hormona Luteinizante, e 2,8-8,0 ng/mL para testosterona total. Valores abaixo ou acima do intervalo de referência, são considerados baixos ou altos, respetivamente.

4.2.1 Estradiol e Testosterona

O doseamento do estradiol nas amostras foi efetuado pelo ensaio de electroquimioluminescência (*electrochemiluminescence immunoassay* ou

“ECLIA”) foi concebido para ser utilizado nos analisadores modulares E170 – ROCHE.

Método de ECL de competição

1.ª Incubação: Através da incubação da amostra (25 µL) com dois tipos anticorpos biotinilados (um marcado outro não marcado com ECL que competem entre si) específicos anti-estradiol ou anti-testosterona (conforme o analito), formam-se imunocomplexos, cuja quantidade depende da concentração de analito na amostra.

2.ª Incubação: Após a adição das micropartículas revestidas com estreptavidina e de um derivado de estradiol marcado com um complexo de ruténio, os locais ainda vazios dos anticorpos biotinilados são ocupados, formando-se um complexo anticorpo-hapteno. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo.

Os elementos não ligados são então removidos com ProCell/ProCell M.

A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimiluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador.

4.2.2. Prolactina e Hormona Luteinizante

O doseamento da prolactina ou da LH nas amostras foi efetuado pelo ensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”) do tipo *sandwich*, concebido para ser utilizado nos analisadores modulares E170 – ROCHE.

Método de ECL de *sandwich*

1.ª Incubação: 10 µL de amostra e um anticorpo de captura monoclonal biotinilados específico anti-prolactina ou anti-LH (conforme o analito) formam um primeiro complexo.

2.^a Incubação: Após a adição de um anticorpo monoclonal específico de anti-prolactina ou anti-LH marcado com um complexo de ruténio e micropartículas revestidas com estreptavidina, forma-se um complexo *sandwich* que se liga à fase sólida através da interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell/ProCell M.

A aplicação de uma corrente elétrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador.

4.2.3. Leptina

O doseamento da leptina nas amostras foi efetuado por método de ELISA, (Mercodia) um método para determinação quantitativa da leptina humana no soro e plasma.

Princípio do método de ELISA

O Mercodia Leptin ELISA é um imunoensaio enzimático de dois passos em fase sólida. Baseia-se na técnica sanduíche em que dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra antígenos separados, determinantes da molécula de leptina. Durante a incubação, a leptina da amostra reage com anticorpos anti-leptina conjugados com peroxidase e anticorpos anti-leptina ligados aos poços do microtitulador. Um simples passo de lavagem remove o anticorpo marcado com enzima não ligado, o conjugado ligado é detectado por reação com 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

A reação é interrompida pela adição de ácido, originando um produto final colorimétrico que é lido espectrofotometricamente a 450 nm.

Método de ELISA para a Leptina

Adicionar 25 µL Calibradores, controlos e amostras
Adicionar 100 µL de solução conjugada enzimática
Incubar 2 horas no agitador à temperatura ambiente
Lavar a placa 6 vezes
Adicionar 200 µL de Substrato TMB
Incubar 15 minutos à temperatura ambiente
Adicionar 50 µL de Solução de paragem da reação
Agitar por aproximadamente 5 segundos no shaker
Efetuar a leitura espectrofotométrica a 450 nm

Reagentes

Os reagentes, calibradores e controlos utilizados foram os indicados pelo fabricante (Mercodia). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o equipamento utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard.

4.3. Biomarcadores prostáticos

4.3.1. Antígenos específico da próstata total (PSA) e livre (FPSA)

O doseamento do PSA e do FPSA nas amostras foi efetuado pelo ensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou “ECLIA”).

Concebido para ser utilizado nos analisadores modulares E170 – ROCHE.

Princípio do teste de ECL de *sandwich*.

1.^a Incubação: 20 µL de amostra, um anticorpo monoclonal biotinilados específico anti-PSA e um anticorpo monoclonal específico anti-PSA ou anti-FPSA marcados com complexo de ruténio reagem entre si e formam um complexo *sandwich*.

2.^a Incubação: Após a adição das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

A mistura de reação é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo.

Os elementos não ligados são então removidos com ProCell/ProCell M. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

Os resultados são determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador.

Reagentes.

Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante (ROCHE Diagnóstics). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o analisador utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo adequados e utilizados no Laboratório, adaptados às exigências específicas do laboratório, cumprindo as regras de WestGard.

4.4. Hemoglobina A1c

O doseamento da Hemoglobina A1c foi efetuado em amostras de sangue total, em tubo de vácuo contendo EDTA, foram efetuadas pelo ensaio da Bio-Rad VARIANT™ II TURBO HbA1c Kit - 2.0, destinado para a determinação da

percentagem da hemoglobina A1c no sangue total humano, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência por troca iónica (HPLC).

Cromatografia líquida de alta performance por troca iónica (HPLC).

O Kit - 2.0 da Bio-Rad VARIANT II TURBO HbA1c, utiliza o princípio da cromatografia líquida de alta eficiência por troca iónica (HPLC). As amostras são diluídas automaticamente na VARIANT II TURBO Sampling Station (Estação de Amostragem) (VSS) e injetadas na coluna analítica. As bombas duplas da VARIANT II TURBO *Chromatographic Station* (Estação Cromatográfica) (VCS) distribuem um gradiente programado do tampão de resistência iónica elevada na coluna, onde as hemoglobinas são separadas com base nas suas interações iónicas com o material da coluna. Em seguida, as hemoglobinas separadas atravessam a célula de fluxo do fotómetro do filtro, onde as alterações da absorção a 415 nm são medidas. Um filtro adicional, a 690 nm, corrige a absorção num segundo plano.

O software VARIANT II TURBO *Clinical Data Management* (CDM™) realiza a redução dos dados brutos obtidos em cada análise. A calibração de dois níveis é usada no ajuste dos valores calculados da HbA1c. Um relatório da amostra, incluindo os tempos de retenção dos picos detetados e um cromatograma, é gerado pelo CDM para cada amostra. O pico da A1c é sombreado. Essa área é calculada utilizando um algoritmo Gaussiano exponencialmente modificado (EMG) que exclui a A1c lábil e as áreas de pico carbamiladas da área de pico da A1c.

Reagentes

Os reagentes utilizados foram os indicados pelo fabricante (BioRad). Para assegurar a correta execução do ensaio foram cumpridas as instruções fornecidas pelo fabricante para o equipamento utilizado.

Controlo da qualidade

Para o controlo da qualidade, foram utilizados os materiais de controlo recomendados pelo fabricante, Diabetes Bio-Rad *Lyphochek*, em três níveis de concentração (baixo, normal e alto). Foram cumpridas as instruções de uso recomendadas.

5. Cultura celular e tratamentos *in vitro*

Para o presente trabalho, 3T3-L1 (adquirido da *American Type Culture Collection*), as células foram cultivadas em DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco com 4,5g/L de Glicose e L-Glutamina, sem Piruvato de Sódio (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), suplementado com 10% de FBS e 1000 unidades/mL de solução de gentamicina, mantidos em frascos de cultura de tecidos T-25 em 5% de CO₂ /95% de ar a 37°C em incubadora humidificada.

As linhas de células de CaP humano, PC3 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Life technologies, 52400-025, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, Life technologies, 10270, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, Life technologies, 10270, EUA). As células foram mantidas em câmara humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. As células foram utilizadas entre as passagens 2 e 8.

5.1. Diferenciação de adipócitos e colheita de meio condicionado de adipócitos (aCM)

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram proliferados e permitiram atingir a confluência. Após 2 dias (dia 0), a diferenciação foi iniciada pela adição de uma mistura hormonal composta por 2 µM de insulina, 1 µM de dexametasona e 0,25 mM de isobutilmetilxantina. Três dias após (dia 3), o meio de indução foi substituído por completo por meio suplementado apenas com insulina. No dia 6 as culturas foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato e incubadas em meio isento de soro. Após 24 h (dia 7), o meio foi colhido das culturas de adipócitos, centrifugado por 3000 g durante 5 minutos e o sobrenadante (meio condicionado de adipócitos maturados) foi armazenado a -80°C para os tratamentos subsequentes. Este meio condicionado (CM) é rico em adipocinas que são globalmente referenciadas como secretoma.

5.2. Tratamentos nas culturas celulares

Posteriormente, as células da próstata foram divididas em dois grupos distintos. De um lado, células de CaP PC3 foram cultivadas sob a influência do secretoma de adipócitos maturados. Por outro lado, o grupo controle consistiu nas células

PC3 cultivadas na ausência de meio condicionado 3T3-L1 com baixos níveis de glicose (LG).

Os tratamentos foram realizados utilizando Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), sem suplementação. Para testar os efeitos hormonais no crescimento celular, as células foram cultivadas durante 24h em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com diferentes concentrações de hormonas, testosterona (Fluka), e 17 β -estradiol (E2) (Sigma-Aldrich) dissolvido em 0,1% de DMSO. A concentração mais significativa foi usada para realizar um ensaio de lesão.

5.3. Ensaio de viabilidade celular

Após 24h de incubação de 1×10^5 células / mL com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi substituído por PBS e 20 μ L do reagente MTT (Abcam, EUA), foram adicionados a cada poço de 96 placas seguidamente um período de incubação de 3h. A intensidade da cor foi determinada medindo a absorvância a 550/650nm (cdo).

5.4. Ensaio de lesão e análise de estereologia computacional

Monocamadas PC3 confluentes em poços de 24 placas foram feridas com uma pipeta de 10 μ L. 24 h após o tratamento, a distância migrada foi fotografada sob um microscópio invertido (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) com uma ampliação de 200x e o encerramento da lesão foi determinado medindo-se a largura da lesão por meio de análise de bioinformática, usando o software Image J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) com uma macro especialmente concebida para ensaios de lesões designados como Wound Healing Tool.

6. Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado *a priori* usando G*Power versão 3.1.9.3 (Parikesit, Mochtar, Umbas, & Hamid, 2016), (Faul, Erdfelder, Buchner, & Lang, 2009), concebido para detetar Coeficientes de Correlação de Pearson estatisticamente significativos de 0,5 para nível de significância erro α de 5% e um poder de 90% (1-3) a amostra deve ser de pelo menos 86 indivíduos controlo e 86 pacientes com Carcinoma de próstata (PCa).

A amostra foi estratificada em dois grupos, de acordo com a presença/ausência de carcinoma de próstata. O teste t de Student foi usado para comparar médias de duas amostras diferentes. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar dados categóricos. O teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene foi usado para determinar a normalidade das populações e variâncias. Todas as variáveis estudadas são distribuídas normalmente. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média (SEM), salvo indicação em contrário.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL). Todos os testes estatísticos com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e representados graficamente utilizando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.)



Doutoramento em Ciências Biomédicas

Capítulo 3

Resultados

Como referido foram efetuados a 181 doentes, doseamentos dos seguintes parâmetros analíticos: Leptina, Colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL, Triglicerídeos, PSA Total, PSA Livre, LH, Estradiol, Prolactina, Testosterona, HbA1c.

1. Caracterização clínica e antropométrica.

O presente trabalho expõe um estudo analítico transversal, incluindo 181 homens do Serviço de Urologia do CHUP (Centro Hospitalar Universitário do Porto) em que 78 dos participantes sem CaP e 103 pacientes com CaP.

A faixa etária varia entre 46 a 85 anos de idade. A média global de idades dos participantes foi de $66,4 \pm 8,5$ (média $\pm$ desvio padrão) estratificada por $68,1 \pm 8,4$ versus $64,1 \pm 8,1$ tendo em consideração ao grupo dos participantes com e sem Carcinoma, respetivamente (Tabela 4).

Todos os participantes consentiram a serem submetidos à avaliação antropométrica (peso e estatura) para determinar o Índice de Massa Corporal (IMC) de acordo com as recomendações da OMS (Parikesit et al., 2016). Assim, o IMC geral dos participantes foi de $26,75 \pm 3,88$ kg/m² classificando essa amostra geralmente com excesso de peso. Analizando o IMC por grupos, foi estabelecido como $28,51 \pm 3,88$ kg/m² versus $24,41 \pm 2,34$ kg/m² no grupo de participante com e sem Carcinoma respetivamente. (Tabela 4).

A indicação para biópsia de próstata foi baseada principalmente no exame de sangue do PSA e/ou nas alterações da próstata por exame direto, complementado com ressonância magnética, assim média global do tPSA (PSA total) foi de $17,18 \pm 29,58$ ng/mL, sendo diferente entre os participantes com e sem Carcinoma, variando de $24,65 \pm 37,30$ ng/mL e $7,19 \pm 4,13$ ng/mL, respetivamente (Tabela 4)

2. Caracterização hormonal e metabólica dos participantes

Foram doseadas várias hormonas aos participantes no estudo. O eixo testicular do hipotálamo hipofisário foi medido utilizando a hormona luteinizante (LH) e a testosterona total (TT). Estradiol (E2), uma forma aromatizada de testosterona

também foi analisada. Considerando médias (média $\pm$ SD) de ambos os grupos com ou sem CaP não foram observadas alterações significativas de tais hormonas. Os valores de LH global foi de de $7,11 \pm 6,09$ mUI/mL, sendo de $7,94 \pm 7,21$ mUI/mL e $5,99 \pm 3,92$ mUI/mL nos indivíduos com e sem CaP respetivamente. Além disso, em relação à TT, os valores globais deste androgénio foram de $3,67 \pm 1,90$ ng/mL e os valores nos indivíduos com e sem CaP foram de $3,27 \pm 1,84$ ng/mL e de $4,21 \pm 1,85$ ng/mL, respetivamente.

O estradiol (E2) é um produto final da Aromatase usando testosterona como substrato, foi globalmente de $22,89 \pm 10,56$ pg/mL, mas também muito similar entre os dois grupos variando de $22,93 \pm 11,17$ pg/mL a $22,84 \pm 9,75$ pg/mL em pacientes com e sem CaP, respetivamente.

Finalmente, a Prolactina, uma hormona relacionada tanto com a saúde sexual como com o metabolismo (Bolyakov & Paduch, 2011) também foi avaliada. Homens com CaP têm níveis mais baixos de Prolactina. Assim, esses valores variaram de $8,55 \pm 3,83$ ng/mL a $11,63 \pm 11,10$ ng/mL em pacientes com e sem CaP (Tabela 4).

No que diz respeito ao perfil metabólico dos participantes, os homens com CaP apresentam níveis mais elevados de leptina do que os homens sem CaP. Nesses grupos, a média $\pm$ SD da leptina foi de $15,26 \pm 23,60$ ng/mL nos homens com CaP e de $11,93 \pm 19,45$ ng/mL nos homens sem CaP.

Foi determinada a percentagem de hemoglobina glicada HbA1c. A média deste produto final de glicação avançada (AGE) foi muito semelhante em ambos os grupos: $5,74 \pm 0,70\%$ e $5,70 \pm 0,58\%$ para os indivíduos com e sem CaP. Em relação aos triglicéridos (TIG), os pacientes com CaP apresentaram níveis mais elevados desses lípidos. Assim, comparando pacientes com CaP com indivíduos sem CaP, as variações desses lípidos foram de $168,40 \pm 90,87$ mg/dL e $142,82 \pm 58,65$ mg/dL, respetivamente (Tabela 4).

Considerando o perfil das lipoproteínas, como já mencionado, doseamos todas as frações de colesterol. Em primeiro lugar, o colesterol total (CoT) não apresenta diferenças entre os dois grupos em estudo. Os valores de colesterol variam de $192,96 \pm 38,62$ mg/dL a $191,35 \pm 36,95$ mg/dL em indivíduos com e sem CaP respetivamente.

Além disso, a fração C-LDL foi doseada e não foram encontradas diferenças significativas, no entanto, homens sem Carcinoma apresentaram valores médios mais elevados.

Tabela 4: Estatísticas descritivas para perfis hormonais e bioquímicos

Variáveis	Total de participantes		Pacientes com CaP		Pacientes sem CaP	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
Idade (Anos)	66,38	8,53	68,12	8,45	64,06	8,12
IMC (kg/m ²)	26,75	3,88	28,51	3,88	24,41	2,34
tPSA (ng/mL)	17,18	29,58	24,65	37,30	7,19	4,13
LH (mUI/mL)	7,11	6,09	7,94	7,21	5,99	3,92
TT (pg/mL)	3,67	1,90	3,27	1,84	4,21	1,85
E2 (pg/mL)	22,89	10,56	22,93	11,17	22,84	9,75
PROL (ng/mL)	10,33	8,90	8,55	3,83	11,63	11,10
LEPT (ng/mL)	13,84	21,93	15,26	23,60	11,93	19,45
HbA1c (%)	5,72	0,65	5,74	0,70	5,70	0,58
TRIG (mg/dL)	157,46	79,54	168,40	90,87	142,82	58,65
CHOT (mg/dL)	192,27	37,82	192,96	38,62	191,35	36,95
HDL (mg/dL)	52,53	14,53	54,02	14,92	50,53	13,83
LDL (mg/dL)	104,15	33,07	101,40	31,52	107,83	34,91
VLDL (mg/dL)	31,24	15,40	32,43	17,66	29,66	11,64

Legenda: IMC - Índice de massa corporal; tPSA- total - Antígeno específico da próstata; LH - Hormona Luteinizante; TT - Testosterona Total; E2- Estradiol; Prol - Prolactina; Lept- Leptina; Hb A1c - Hemoglobina glicada A, fração 1c; TRIG - Trilglicerídeos; CHOT- Colesterol, total fração; HDL- Lipoproteína de alta densidade; LDL- Lipoproteína de baixa densidade; VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade; SD - Desvio padrão.

Os pacientes com CaP apresentaram uma média de valores de $101,40 \pm 31,52$ mg/dL dessa lipoproteína e os pacientes sem Carcinoma, apresentaram um valor médio de $107,83 \pm 34,91$ mg/dL. Da mesma forma, em relação ao C-HDL, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos do estudo, contudo os pacientes com CaP apresentaram valores mais elevados. Assim, os pacientes apresentaram uma média de $54,02 \pm 14,92$ mg/dL de C-HDL, contrastando com indivíduos saudáveis que apresentaram $50,53 \pm 13,83$ mg/dL dessa lipoproteína. Da mesma forma, a fração C-VLDL foi de $32,43 \pm 17,16$ mg/dL em pacientes com CaP opondo-se à média de $29,66 \pm 11,64$ mg/dL pertencente a indivíduos saudáveis (Tabela 4).

3. Correlações entre o perfil clínico e bioquímico

A correlação entre variáveis contínuas foi determinada pelo Coeficiente de Correlação de Pearson ou CCP. PCC que é representado pelo símbolo ρ (rho ou r). O valor de PCC tem um valor entre +1 e -1, em que 1 é uma correlação linear positiva total, 0 não é uma correlação linear e -1 é uma correlação linear negativa total. A avaliação de variáveis categóricas (por exemplo, *Score* de Gleason) foi determinada por meio de tabulações cruzadas e a estimativa por meio do teste *chi*-quadrado (χ^2).

Ao comparar as categorias de casos negativos / positivos de CaP distribuídos pelo *score* de Gleason e pelo IMC estratificado por peso normal (NP), excesso de peso (EP) e obeso (OB), as diferenças foram significativamente fortes ($p < 0,0001$) estimadas pelo teste χ^2 (Figura 12).

Da mesma forma, evidências mostram que a agressividade do tumor foi correlacionada com a idade. Os valores de idade foram transformados em uma categoria ordinal de cinco classes de 10 anos de idade cada: a primeira classe era de 45 a 54 anos, a segunda de 55 a 64 anos, e sucessivamente até a última classe que incluía todos os participantes com mais de 85 anos (Figura 12).

Além disso, quando os participantes foram estratificados por grupos de acordo com os valores de referência de Testosterona, divididos em três grupos denominados “baixo”, “normal” e “elevado”, foram encontradas fortes diferenças

significativas ($p < 0,0001$) quando os valores foram comparados com o *Score* de Gleason.

Níveis mais baixos de testosterona relacionam-se com CaP com maior agressividade (Figura 12).

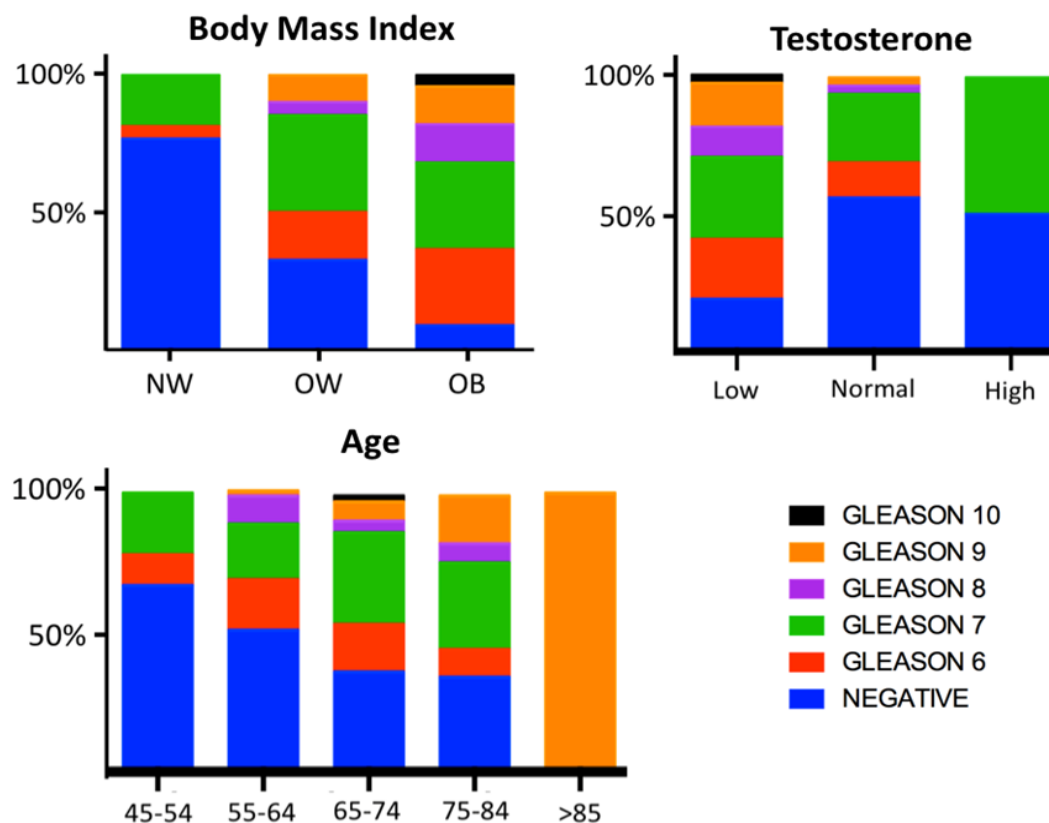


Figura 12 - Perfil ponderal dos pacientes do estudo de Urologia

Formas mais agressivas de CaP estão associadas (χ^2) com excesso de peso e obesidade ($p < 0,001$). NP- peso normal; EP - excesso de peso; OB- obesidade. A idade também foi significativamente associada ($p < 0,001$) à agressividade tumoral, que aumenta com a idade do paciente. Níveis normais de Testosterona que variam de 2,8-8,0 ng/ml. Os níveis inferiores e superiores foram considerados como baixos ou elevados respectivamente. A agressividade tumoral foi significativamente ($p < 0,001$) associada a baixos níveis de testosterona. Sem Carcinoma de próstata (cor azul) e com Carcinoma de próstata (outras cores).

A mesma abordagem foi seguida para várias variáveis clínicas e bioquímicas contínuas. Foi efetuada estratificação em três grupos designados como "baixo", "normal" e "elevado" e foram implementados de acordo com os intervalos de referência da variável. Quando a estatística do *chi-quadrado* (χ^2) foi executada para cada variável em estudo, demonstrou fortes diferenças significativas com a idade e o IMC, com várias hormonas, nomeadamente, hormona luteinizante, testosterona, estradiol e prolactina. Além disso, foi encontrada significância nos valores de lipoproteínas LDL e VLDL (Tabela 5).

Tabela 5: Qui-quadrado (χ^2) de Score de Gleason (agressividade tumoral) em relação aos perfis Hormonal e Bioquímico

Variáveis (estatísticas)	Idade	IMC	Perfil endócrino					Perfil metabólico					
			LH	TT	E2	PROL	LEPT	Hb-A1c	TRIG	CoT	HDL	LDL	VLDL
Score de GLEASON	χ^2		12,26*	92,41**	97,41**	120,0**	8,39	10,7	5,39	8,00	13,34	11,58*	13,20*
	p-valor		0,031	0,000	0,000	0,000	0,136	0,058	0,370	0,152	0,205	0,041	0,014

Legenda: IMC – Índice de massa corporal; LH – Hormona luteinizante; TT – testosterona total; E2 – estradiol; Prol – prolactina; Lep – leptina; HB A1c – Hemoglobina glicada, fração 1C; TRIG – Triglicerídeos; CoT – colesterol total; HDL – Lipoproteína de alta densidade; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade. * nível de significância $p < 0,05$; ** nível de significância $p < 0,001$

Finalmente, as diversas variáveis clínicas e bioquímicas contínuas em estudo foram correlacionadas entre si. Todas as variáveis foram distribuídas normalmente e o coeficiente de correlação de Pearson (PCC) foi determinado para todas as variáveis duas a duas. Os resultados estão sumariados na (tabela 6).

Resumidamente, o tPSA (antígeno específico da próstata total) foi inversamente correlacionado ($p < 0,05$) com os níveis totais de testosterona total (TT).

Da mesma forma, o IMC também foi fortemente inversamente correlacionado com os níveis de TT ($p < 0,0001$). Outra correlação negativa com o IMC foi a associação entre as categorias de peso e os níveis de prolactina ($p < 0,0001$). No entanto, o IMC foi positivamente correlacionado com LH ($p < 0,05$), HbA1c ($p < 0,05$) e TIGs ($p < 0,05$). Com a idade, sabe-se que vários componentes hormonais e metabólicos do organismo estão alterados.

No presente estudo, da amostra de pacientes com CaP, a própria idade também está associada com aumento de LH ($p < 0,0001$), assim como com redução de Triglicerídeos ($p < 0,05$), Colesterol ($p < 0,0001$) e LDL-C ($p < 0,0001$). Todos os

Legenda: IMC – Índice de massa corporal; LH – Hormona luteinizante; TT – testosterona

Tabela 6.

Tabela 6: Correlação de Pearson entre perfis Hormonal e Bioquímico

Variáveis (Estatísticas)		Perfil endócrino					Perfil metabólico					
		LH	TT	E2	PROL	LEPT	HbA1c	Trig	CHOT	HDL	LDL	VLDL
PSA	ρ	,019	-,212*	,031	,008	,177	,188	-,038	,045	-,073	,120	-,036
	p-value	0,850	0,032	0,753	0,934	0,074	0,057	0,704	0,648	0,463	0,226	0,720
IMC	ρ	,183*	-,323**	,034	-,215**	,308**	,152*	,186*	,128	-,042	,058	,133
	p-value	0,014	0,000	0,650	0,001	0,000	0,042	0,012	0,086	0,577	0,440	0,075
IDADE	ρ	,277**	,018	-,055	,051	,011	-,047	-,154*	-,248**	,078	-,220*	-,138
	p-value	0,000	0,816	0,463	0,504	0,889	0,534	0,041	0,001	0,301	0,003	0,068

Legenda: IMC – índice de massa corporal; tPSA-antígeno específico da próstata total; Hormona LH – luteinizante; TT-testosterona total; E2 – estradiol; Prol – prolactina; LEP – leptina; HbA1c –hemoglobina glicada A, fração 1C; Trig – Triglicerídeos; CoT-colesterol, fração total; HDL – lipoproteína de alta densidade; LDL – lipoproteína de baixa densidade; VLDL-lipoproteína de muito baixa densidade.

Tendo em consideração todos os dados mencionados, tentamos dissecar molecularmente *in vitro* o papel de alguns parâmetros que aumentaram a agressividade do CaP, como o IMC e alguns níveis hormonais, em modelos celulares bem estabelecidos de CaP, usando linhas de células PC3.

No entanto, uma boa alternativa celular é cultivar adipócitos *in vitro* e maturá-los para obter e armazenar lípidos e, em seguida, nesta fase, as moléculas secretadas pelos adipócitos, tais como hormonas, citocinas e adipocinas, entre outras, são colhidas (o conjunto de moléculas secretadas de adipócitos são consideradas como secretoma daqui em diante). Isto foi alcançado, como mencionado na secção de materiais e métodos, através da recolha do meio condicionado por adipócitos (aCM) foi adicionado às células cancerígenas em cultura. Na próxima secção de resultados, vamos revelar o efeito de aCM sobre o crescimento celular e agressividade no PC3, foi semelhante ao efeito da testosterona e E2 *in vitro*.

4. Caracterização do secretoma de adipócitos

Numerosos fatores de crescimento, adipocinas, citocinas e moléculas relacionadas com a angiogénese foram secretados pelos adipócitos maturados 3T3-L1 em cultura (secretoma) para o meio. Esse meio condicionado ao adipócito foi recolhido (aCM), analisado e utilizado nas células CaP PC3.

O perfil hormonal do aCM foi de $0,257 \pm 0,09$ mUI/mL para LH, $0,061 \pm 0,004$ ng/mL para TT, $227,6 \pm 30,4$ pg/mL para E2 e $0,047 \pm 0,000$ para Prolactina. Considerando o perfil bioquímico, o secretoma de adipócitos foi composto por $155,1 \pm 27,4$ mg/dL de glicose, $102,0 \pm 35,4$ mg/dL de TIGs e $4,0 \pm 1,8$ mg/dL de CoT.

Analizou-se extensivamente o secretoma de adipócitos em estudos anteriores por abordagens proteómicas, incluindo microarrays.(P. Coelho et al., 2017b) Resumidamente, observou-se no secretoma níveis aumentados de VEGF, TIMP-1 e endocan que controlam a angiogénese. Também aumentaram os níveis da família das interleucinas (IL) de citocinas: IL-6, IL-11 e fator inibitório de leucemia (LIF) também foram significativamente sobreexpressos, bem como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e inibidor do ativador de plasminogénio-1 (PAI-1). Hormonas do tecido adiposo também foram identificadas. Os níveis de expressão relativamente da resistina e da leptina foram maiores no aCM. Curiosamente, porém, uma redução significativa nos níveis de adiponectina foi observada em aCM.

4.1. Meio condicionado por adipócitos (aCM) aumenta a viabilidade de PC3.

As células da próstata PC3 foram tratadas com aCM. O resultado foi uma atividade metabólica aumentada quando o ensaio MTT foi realizado. Além disso, duas curvas dose-resposta foram determinadas para 5 α -di-hidrotestosterona (DHT) e para 17 β -Estradiol (E2). A metade da concentração máxima eficaz (EC50)

para tais hormonas nas linhas celulares PC3 foi de 1 nM para DHT e 0,1 nM para 17 β - Estradiol.

Quando comparado ao grupo controlo (PC3 com meio completo), todos os grupos experimentais foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$). Células cancerosas submetidas *in vitro* a um ambiente enriquecido com secretoma relacionado a adipócitos (aCM) demonstram uma atividade metabólica de $3,21 \pm 0,01$ (*fold increase*) quando comparadas ao grupo controlo. Além disso, as células que cresceram com DHT 1,0 nM e E2 0,1 nM aumentaram a sua atividade metabólica para $2,98 \pm 0,11$ vezes e $2,04 \pm 0,22$ vezes, respetivamente. Da mesma forma, a atividade metabólica também aumentou quando comparada ao grupo controlo quando aCM foi dopada com DHT 1,0 nM e E2 0,1 nM para $3,48 \pm 0,07$ vezes e $2,98 \pm 0,37$ respetivamente (Figura 13A).

O ensaio de lesão (*Wound healing*) ou o ensaio de cicatrização de feridas é um teste *in vitro* baseado no fato de que, em cultura, as células proliferam para zonas livres de células. Experimentalmente, essas zonas são criadas artificialmente removendo um grupo de células de uma cultura confluenta, criando assim uma lesão ou ferida. Quanto mais rápido a ferida é fechada, mais agressivas são as células devido à sua capacidade de invasão. Células de CaP PC3 em cultura 24 horas após a lesão foram capazes de fechar $11,34 \pm 4,41\%$. No entanto, células sob o efeito do aCM que contém todos os fatores de crescimento, moléculas de sinalização, citocinas derivadas do tecido adiposo foram capazes de fechar a ferida até $62,08 \pm 2,43\%$. Da mesma forma, PC3 dentro das mesmas condições do grupo de controlo, mas suplementado com DHT 1,0 nM foram capazes de reparar a lesão até $79,12-3,76\%$. Finalmente, a ferida fechou em $23,75 \pm 8,76\%$. Quando comparados com o controlo, os grupos experimentais aCM e DHT foram significativamente diferentes e tiveram um aumento da taxa de reparação da ferida de $5,5 \pm 0,55$ e $7,0 \pm 0,85$ vezes. Além disso, as células tratadas com E2 também aumentam $2,0 \pm 1,9$ vezes a reparação da lesão, mas de maneira não significativa (Figura 13B).

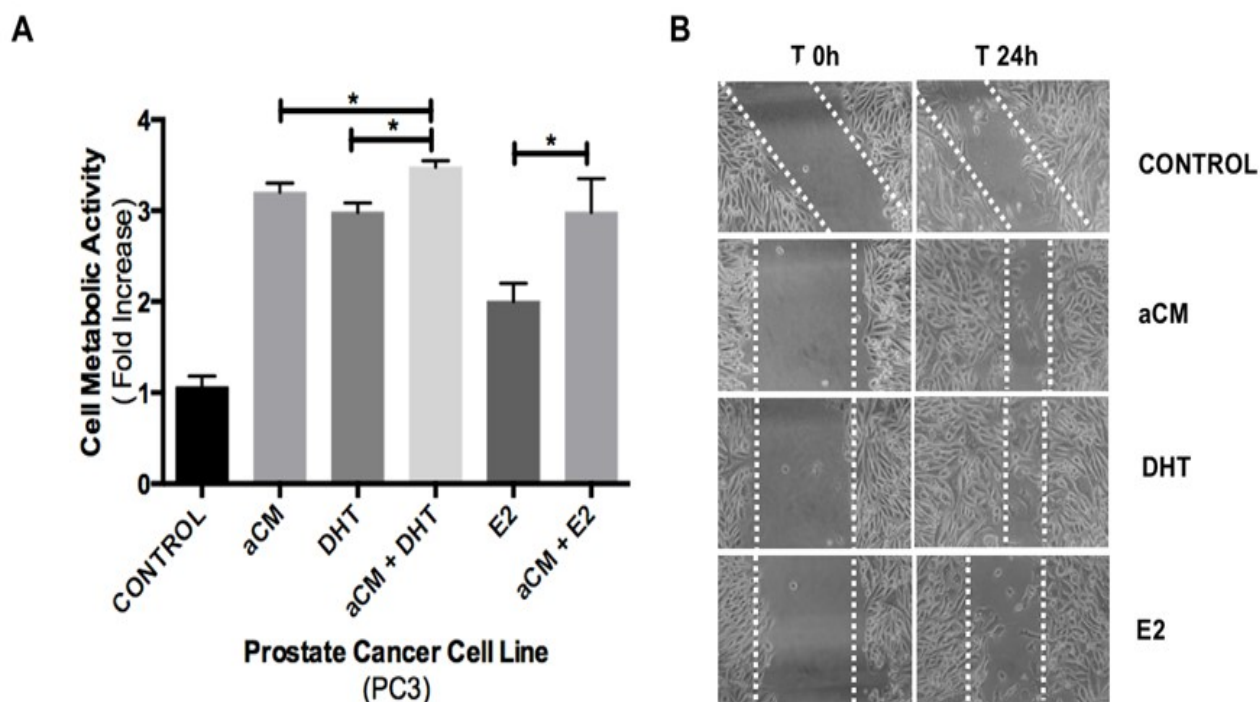


Figura 13 – Atividade metabólica (A) e agressividade (B) de células cancerosas da próstata PC3. A – A atividade metabólica foi medida com o ensaio MTT (espectrofotometria) por aumento da dobra em relação ao controle (PC3 sem qualquer tratamento). Todos os ensaios foram significativamente diferentes por t-test para o grupo de controle ($p < 0.0001$). As diferenças entre outros grupos foram indicadas por (*) o que significa $p < 0,05$. B – Agressividade in vitro foi determinado pelo ensaio de lesão. A área foi calculada com a imagem J com a "ferramenta de cura da ferida" macro e as diferenças foram significativamente ($p < 0.0001$) depois de 24h. aCM – adipócitos-condicionado médio; DHT-5 α -diidrotestosterona; E2-17 β -estradiol.



Doutoramento em Ciências Biomédicas

Capítulo 4

Discussão e Conclusões

Discussão

Entre vários fatores de risco conhecidos para o CaP, a idade é um dos mais relevantes. Não só aumenta a incidência, mas também a agressividade é maior. Além disso, a idade no diagnóstico está relacionada com o pior prognóstico.

Na nossa amostra do estudo, que foi assistida na consulta de Urologia, a idade tem uma relação forte (Figura 11, tabela 5) não só com o seu início e incidência, mas também com a agressividade do tumor que está de acordo com a maioria de outros estudos (Pettersson, Robinson, Garmo, Holmberg, & Stattin, 2018) (Bellier, Colonna, Delafosse, & Seigneurin, 2018). Assim, a idade tem grande impacto no prognóstico, resposta aos tratamentos e taxa de sobrevida (Bechis, Carroll, & Cooperberg, 2011) (Duchesne et al., 2016).

A obesidade tem sido relacionada há muito tempo com implicações na carcinogénese do CaP através de várias vias moleculares que incluem o eixo das hormonas sexuais, a sinalização biológica das adipocinas entre outras. Em relação à obesidade e sua contribuição para o CaP na nossa população, os nossos resultados mostram evidências claras de que o sobrepeso e a obesidade desempenham um papel importante na patogénese do CaP (Figura 11, Tabela 5).

Na nossa amostra do estudo, os doentes com peso normal apenas 22,4% têm CaP e os outros doentes (77,6%) apresentam algum tipo de patologia prostática benigna, como prostatite ou hiperplasia benigna. Curiosamente a nossa amostra evidencia que os *scores* mais altos da escala de Gleason aumentaram em pacientes com excesso de peso e repetidamente em pacientes obesos (Tabela 6) com um forte significado ($p < 0,0001$, χ^2). A contribuição do IMC na nossa população está de acordo com os diversos estudos sobre o tema (Perez-Cornago et al., 2017a) (Vidal & Freedland, 2017).

Grosman et al. discutiram a complexidade do eixo hormonal sexual e do Carcinoma de próstata. (Grosman et al., 2016b) No caso particular da testosterona, isso ganha um novo significado. Como mencionado anteriormente, Muller e colaboradores não identificaram associação de testosterona ou DHT com a incidência de CaP nem com o grau de Gleason. (Grosman et al., 2016b) No entanto, outros autores, como Pierorazio e

cols., não partilham a mesma opinião.(Grosman et al., 2016b) Kim e companheiros de equipa em um trabalho muito recente e crítico sobre o debate dos níveis de testosterona e CaP usando grande número de dados, encontraram uma contribuição significativa da testosterona total (TT) na agressividade do CaP (Score de Gleason).(Grosman et al., 2016b)

Esta equipa descreveu que os baixos níveis de TT têm relação direta com o Score de Gleason. No entanto, a implicação do TT não se limita à agressividade do tumor. Os níveis de TT também se correlacionam independentemente com o PSA e o IMC. Peskoe et al.(Pierorazio et al., 2010) fizeram um estudo sobre esse assunto e encontraram uma correlação positiva entre os níveis circulantes de PSA com TT. Caso contrário, Aref et al. têm evidências de que níveis circulantes de PSA estão correlacionados inversamente com o IMC.

No nosso estudo o conjunto de resultados confirma os achados dos autores que compartilham a opinião de que baixos níveis de TT se correlacionam com a agressividade de CaP (Pierorazio et al., 2010) (Figura 11, Tabela 5) e também os resultados de Arfe e equipa tem forte significância entre baixos níveis de TT e o IMC.

No entanto, os nossos resultados em relação aos níveis de PSA e TT, encontramos uma relação inversa (Tabela 5), que não está concordante com Peskoe e colegas de estudo.(De Cicco et al., 2008) No entanto, Rastrelli e colegas (Sackmann-Sala & Goffin, 2015) descobriram que o PSA pode agir como um preditor da deficiência de testosterona.

Em conclusão, baixos níveis de TT correlacionam-se com a agressividade da CaP. Os baixos níveis de TT podem ter várias causas. Os mecanismos endócrinos moleculares subjacentes a esta observação podem basear-se em hormonas a montante ou a jusante, em particular hormona luteinizante (LH), a montante, ou estrogénios tais como 17p-estradiol (E2) a jusante.(Kelly & Jones, 2015b)

O doseamento da LH sérica é útil, pois o nível dessa hormona pode indicar onde a falha está localizada: no testículo, se o LH sérico estiver alto (primário), ou no hipotálamo ou hipófise, se o LH sérico estiver baixo ou normal (secundário). Na nossa amostra não foi encontrada relação entre os níveis séricos de TT e LH

($p = 0,723$, PCC), embora inversamente relacionados. No entanto, nos nossos pacientes, a LH aumentou com o IMC. Esta observação pode ser justificada pela insensibilidade do receptor de andrógeno e / ou função hipogonadal devido à obesidade.(Morgentaler & Rhoden, 2006)

Devido ao fato de que a testosterona é aromatizada para E2 dentro dos adipócitos e células da próstata, vários estudos pré-clínicos suportam a suposição de que o estrogénio desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do CaP (Bonkhoff, 2018)(Machioka et al., 2015). Na nossa amostra também evidencia uma correlação direta com TT e E2 ($p < 0,0001$, PCC) e que os níveis de E2 estão associados a maiores Scores da escala de Gleason, indicando assim seu papel na agressividade da CaP. Ainda, nenhuma associação foi encontrada independentemente com idade, PSA ou IMC.

O papel fisiológico da prolactina na próstata não é claramente compreendido. Tem sido associado como um mediador sinalizador autócrino / parácrino da próstata que pode atuar no início das células cancerosas. (Ben-Jonathan, Liby, McFarland, & Zinger, 2002)(Sackmann-Sala & Goffin, 2015)Além disso, baixos níveis de prolactina têm sido associado a síndrome metabólica.(Parekh et al., 2015) Na nossa amostra, não encontramos relação entre os dois grupos de pacientes (com ou sem CaP). No entanto, quando os níveis de prolactina foram estratificados em categorias baixas, normais e altas, e comparados com o score de Gleason, sugerem que níveis baixos de prolactina estão relacionados com o aumento da agressividade. Além disso, nossos resultados mostram que, para essa população, os níveis de prolactina se correlacionam independentemente com a obesidade, o que está de acordo com o achado de Corona e colaboradores.(Parekh et al., 2015)

A evidência científica sobre a relação entre a saúde da próstata, androgénios e obesidade vem principalmente através de estudos da terapia de reposição hormonal (TRH). (A. A. Yassin, Saad, & Gooren, 2008)(Kelly & Jones, 2015b)(Canguven et al., 2017)(A. Yassin, Nettleship, Talib, Almeshmadi, & Doros, 2016) Especulamos, de acordo com outros cientistas, que o tecido adiposo deve ser visto como outro órgão endócrino, e não apenas como um mero órgão de armazenamento de energia.(Kershaw & Flier, 2004)(M. Coelho et al., 2013a)

Em relação aos ensaios experimentais *in vitro* sobre cultura de células CaP, foi possível confirmar o papel das hormonas sexuais e o papel do ambiente metabólico nas células tumorais. Comparando os dois achados, o meio condicionado enriquecido com secretoma de adipócitos (aCM) aumentou a atividade metabólica de células cancerígenas medida pelo teste MTT. Da mesma maneira, após o ensaio de lesão, as células cancerígenas sob um ambiente enriquecido pelo secretoma de adipócitos foram capazes de reparar a ferida mais rapidamente (Figura 12). A taxa de cicatrização de feridas *in vitro* é um bom biomarcador celular da capacidade de invadir regiões. Como mencionado anteriormente, estudos *in vitro* também avaliaram os efeitos individuais de DHT e E2. A atividade metabólica das células tumorais também aumentou com o DHT e o E2, mas esse efeito foi mais expressivo no DHT. Além disso, foram encontradas diferenças significativas nas células submetidas a aCM + DHT em comparação com as células submetidas a aCM ou DHT isoladas (Figura 12A).

De uma forma diferente, foram encontradas diferenças significativas entre as células tratadas com aCM + E2 quando comparadas com E2 sozinho, mas não foram encontradas diferenças significativas entre as células tratadas com aCM + E2 e aCM isoladamente.

Também comparando os padrões de DHT com E2, E2 não é capaz de atingir um grau de resposta como alcançar por TT ou aCM sozinho. Esses resultados estão de acordo com a observação do ensaio de cicatrização de feridas, no sentido de que, além de E2 ser capaz de reduzir a lesão mais expressivamente que o grupo controle, a diferença não é significativa ($p = 0,673$). No entanto, o aCM e o DHT reparam a lesão significativamente mais rápido que o grupo controle, mas sob o efeito do DHT sozinho a célula pode crescer ainda mais rapidamente do que o aCM que contém um grande número de moléculas de sinalização e fatores de crescimento segregados pelos adipócitos.

Os componentes existentes no aCM podem estar relacionados com a carcinogénese e agressividade do CaP, uma vez que são compostos por um elevado número de citocinas inflamatórias de baixo grau, fatores de crescimento e enzimas, que não só promovem o cancro, mas também sua invasão. Alguns

dos componentes são moléculas de macrófagos e metaloproteases cuja matriz abrem caminho para a migração de células cancerígenas, bem como para a

angiogénese.(Moreira et al., 2015b) (Ribeiro et al., 2012) Apoiando essa teoria, podemos referir algumas das adipocinas apresentadas em nosso modelo celular.

Por exemplo, o ESM1 (Molécula Endotelial Específica de Célula 1 ou endocan) que é encontrado em a CM foi referido como correlacionado não somente com o *Score* de Gleason, mas também com a expressão do recetor de androgénio em CaP.(Lai, Chen, Hsu, Hsieh, & Liu, 2017)

Além disso, a nossa caracterização proteómica prévia aCM demonstrou altos níveis de VEGF, TIMP, MCP-1, PAI-1, IL6, entre outros, que têm sido extensivamente associados à patogénese do CaP não apenas em humanos, mas também *in vitro*.(Gucalp et al., 2017)(De Cicco et al., 2008)

Em conclusão

Demonstramos no nosso trabalho que os pacientes com CaP apresentam principalmente excesso de peso e obesidade. Em 2015, na região do Norte de Portugal, foram diagnosticados 2351 pacientes. Uma das principais limitações deste estudo é o fato de que todos os participantes têm doença da próstata desde que foram incluídos no Serviço de Urologia do Centro Hospitalar Universitário do Porto.

Embora todos os participantes tenham doença da próstata, as diferenças entre os dois grupos em estudo adquirem um significado mais considerável. Assim, as diferenças observadas estão relacionadas com o cancro especificamente e não apenas a uma doença benigna da próstata. Além disso, as diversas alterações clínicas, bioquímicas e metabólicas que se relacionam com o CaP e a obesidade em conjunto podem ser explicadas principalmente pela alteração do eixo endócrino sexual envolvendo as hormonas testosterona a montante e a jusante.

Resumidamente, as hormonas e citocinas relacionados com a obesidade são responsáveis pela expansão do volume (hipertrofia) e hiperplasia das células adiposas e tumorais. O aumento do número de células adiposas aumenta a atividade da aromatase, convertendo a testosterona em estrogénios

(principalmente estradiol). Além disso, os adipócitos segregam moléculas inflamatórias de baixo grau que, juntamente com o aumento do estradiol, são responsáveis pela diminuição do LH, reduzindo ainda mais os níveis de testosterona, que também contribuem para a patogénese do CaP. Além disso, não encontramos diferenças significativas entre os resultados da Leptina e a agressividade CaP ou os níveis de TT, e encontramos uma relação significativa entre essa hormona e o aumento do IMC (Figura 14).

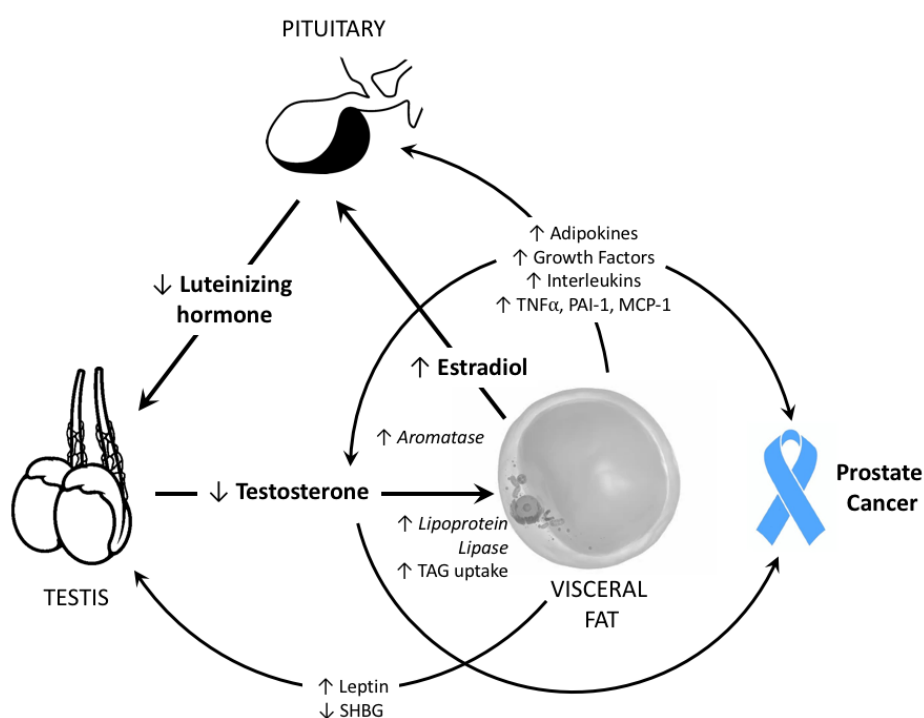


Figura 14 – Modelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal no carcinoma da Próstata em doentes Obesos.

A produção de testosterona pelos testículos também é negativamente regulada pela leptina(Zhao, Zhai, Liu, Wu, & Xu, 2014)Landry, Cloutier, & Martin, 2013), portanto, não podemos realmente excluir sua participação na redução da produção de testosterona no testículo, com base na literatura (Figura 13).

Perspectivas futuras

Chegada a esta fase, e olhando para trás, parece evidente que o trabalho poderia ser solidificado com estudos adicionais.

A nível bioquímico:

Seria interessante incluir outros parâmetros bioquímicos do tecido adiposo em particular a Adiponectina e Resistina;

A nível hormonal:

Gostaríamos de dosear a Insulina e a globulina de ligação da hormona sexual (SHBG);

A nível celular:

Gostaríamos de compreender o papel do meio condicionado da PC3 na presença e ausência do secretoma de adipócitos (aCM) na formação *in vitro* de vasos sanguíneos a partir de células endoteliais;

A nível histopatológico:

Gostaríamos de avaliar a angiogénese e a linfangiogénese nas biópsias prostáticas e avaliar a diferente expressão nos diferentes grupos ponderais de doentes.



Doutoramento em Ciências Biomédicas

Capítulo 5

Bibliografia

Referências bibliográficas

- Aaron, L. T., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
- Algire, C., Medrikova, D., & Herzig, S. (2013). White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(5), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.10.001>
- Allott, E. H., Farnan, L., Steck, S. E., Song, L., Arab, L., Su, L. J., ... Bensen, J. T. (2018). Statin use, high cholesterol and prostate cancer progression; results from HCaP-NC. *The Prostate*, 78(11), 857–864. <https://doi.org/10.1002/pros.23644>
- Allott, E. H., & Hursting, S. D. (2015). Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocrine-Related Cancer*, 22(6), R365–86. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0400>
- Allott, E. H., Masko, E. M., & Freedland, S. J. (2013a). Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *European Urology*, 63(5), 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.013>
- Allott, E. H., Masko, E. M., & Freedland, S. J. (2013b). Obesity and prostate cancer: Weighing the evidence. *European Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.013>
- Almuraikhy, S., Kafienah, W., Bashah, M., Diboun, I., Jaganjac, M., Al-Khelaifi, F., ... Elrayess, M. A. (2016). Interleukin-6 induces impairment in human subcutaneous adipogenesis in obesity-associated insulin resistance. *Diabetologia*, 59(11), 2406–2416. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4031-3>
- Aminsharifi, A., Howard, L., Wu, Y., De Hoedt, A., Bailey, C., Freedland, S. J., & Polascik, T. J. (2018). Prostate-specific antigen density as a predictor of clinically significant prostate cancer when the PSA level is in the diagnostic “grey-zone”: Defining the optimum cut-point stratified by race and body mass index. *The Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.05.016>
- Anderson, A. S., Key, T. J., Norat, T., Scoccianti, C., Cecchini, M., Berrino, F., ... Romieu, I. (2015). European Code against Cancer 4th Edition: Obesity, body fatness and cancer. *Cancer Epidemiology*.

- <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.01.017>
- Ankerst, D. P., Liss, M., Zapata, D., Hoefler, J., Thompson, I. M., & Leach, R. J. (2015). A case control study of sarcosine as an early prostate cancer detection biomarker. *BMC Urology*, 15, 99. <https://doi.org/10.1186/s12894-015-0095-5>
- Aref, A. T., Vincent, A. D., O'Callaghan, M. E., Martin, S. A., Sutherland, P. D., Hoy, A. J., ... Wittert, G. A. (2018a). The inverse relationship between prostate specific antigen (PSA) and obesity. *Endocrine-Related Cancer*, 25(11), 933-941. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0438>
- Aref, A. T., Vincent, A. D., O'Callaghan, M. E., Martin, S. A., Sutherland, P. D., Hoy, A. J., ... Wittert, G. A. (2018b). The inverse relationship between prostate specific antigen (PSA) and obesity. *Endocrine-Related Cancer*, 25(11), 933-941. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0438>
- Assel, M. J., Gerdtsson, A., Thorek, D. L. J., Carlsson, S. V., Malm, J., Scardino, P. T., ... Ulmert, D. (2018). Long-term prediction of prostate cancer diagnosis and death using PSA and obesity related anthropometrics at early middle age: data from the malmö preventive project. *Oncotarget*, 9(5), 5778-5785. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22981>
- Attard, G., Parker, C., Eeles, R. A., Schröder, F., Tomlins, S. A., Tannock, I., ... De Bono, J. S. (2016). Prostate cancer. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4)
- Babińska, A., Pęksa, R., Świątkowska-Stodulska, R., Wiśniewski, P., & Sworczak, K. (2018). Expression of adiponectin and leptin receptors in adrenal incidentaloma patients with subclinical hormone secretion. *Cancer Biomarkers*, 1-8. <https://doi.org/10.3233/CBM-171049>
- Bancroft, E. K., Page, E. C., Castro, E., Lilja, H., Vickers, A., Sjoberg, D., ... Eeles, R. A. (2014). Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the initial screening round of the IMPACT study. *European Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.01.003>
- Bechis, S. K., Carroll, P. R., & Cooperberg, M. R. (2011). Impact of Age at Diagnosis on Prostate Cancer Treatment and Survival. *Journal of Clinical Oncology*, 29(2), 235-241. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.2075>
- Bell, K. J. L., Del Mar, C., Wright, G., Dickinson, J., & Glasziou, P. (2015). Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29538>

- Bellier, A., Colonna, M., Delafosse, P., & Seigneurin, A. (2018). Incidence of prostate cancer and net survival by grade in a geriatric population: A population-based study in a French administrative entity from 1991 to 2013. *Cancer Epidemiology*, 56, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.07.007>
- Ben-Jonathan, N., Liby, K., McFarland, M., & Zinger, M. (2002). Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 13(6), 245–250. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128285>
- Birnbaum, J. K., Feng, Z., Gulati, R., Fan, J., Lotan, Y., Wei, J. T., & Etzioni, R. (2015). Projecting benefits and harms of novel cancer screening biomarkers: A study of PCA3 and prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1224>
- Bolyakov, A., & Paduch, D. A. (2011). Prolactin in men's health and disease. *Current Opinion in Urology*, 21(6), 527–534. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834bdf01>
- Bonkhoff, H. (2018). Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *The Prostate*, 78(1), 2–10. <https://doi.org/10.1002/pros.23446>
- Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., & Foster, M. (2015). Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0037>
- Bray, G. A., Kim, K. K., & Wilding, J. P. H. (2017). Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity Reviews*, 18(7), 715–723. <https://doi.org/10.1111/obr.12551>
- Bull, C. J., Bonilla, C., Holly, J. M. P., Perks, C. M., Davies, N., Haycock, P., ... Martin, R. M. (2016). Blood lipids and prostate cancer: a Mendelian randomization analysis. *Cancer Medicine*. <https://doi.org/10.1002/cam4.695>
- Burguera, B., Jesús Tur, J., Escudero, A. J., Alos, M., Pagán, A., Cortés, B., ... Soriano, J. B. (2015). An Intensive Lifestyle Intervention Is an Effective Treatment of Morbid Obesity: The TRAMOMTANA Study-A Two-Year Randomized Controlled Clinical Trial. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 194696. <https://doi.org/10.1155/2015/194696>
- Buschemeyer, W. C., & Freedland, S. J. (2007). Obesity and Prostate Cancer:

- Epidemiology and Clinical Implications. *European Urology*.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.04.069>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1_suppl), 18S–32S.
<https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Canguven, O., Talib, R. A., El Ansari, W., Yassin, D.-J., Salman, M., & Al-Ansari, A. (2017). Testosterone therapy has positive effects on anthropometric measures, metabolic syndrome components (obesity, lipid profile, Diabetes Mellitus control), blood indices, liver enzymes, and prostate health indicators in elderly hypogonadal men. *Andrologia*, 49(10), e12768.
<https://doi.org/10.1111/and.12768>
- Carré, N., & Binart, N. (2014). Prolactin and adipose tissue. *Biochimie*, 97, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.023>
- Carruba, G. (2007). Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(4), 899–911. <https://doi.org/10.1002/jcb.21529>
- Castelli, T., Russo, G. I., Reale, G., Privitera, S., Chisari, M., Fragalà, E., ... Morgia, G. (2016). Metabolic syndrome and prostatic disease: Potentially role of polyphenols in preventive strategies. A review. *International Braz J Urol*. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0095>
- Castro, C., Antunes, L., Lunet, N., & Bento, M. J. (2016a). Cancer incidence predictions in the North of Portugal. *European Journal of Cancer Prevention*, 25(5), 472–480. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000199>
- Castro, C., Antunes, L., Lunet, N., & Bento, M. J. (2016b). Cancer incidence predictions in the North of Portugal. *European Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000199>
- Castro, H. A. S., Iared, W., Santos, J. E. M., Solha, R. S., Shigueoka, D. C., & Ajzen, S. A. (n.d.). Impact of PSA density of transition zone as a potential parameter in reducing the number of unnecessary prostate biopsies in patients with psa levels between 2.6 and 10.0 ng/mL. *International Braz j Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 44(4), 709–716.
<https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0506>
- Castro, H. A. S., Iared, W., Santos, J. E. M., Solha, R. S., Shigueoka, D. C., & Ajzen, S. A. (2018). Impact of PSA density of transition zone as a potential parameter in reducing the number of unnecessary prostate biopsies in patients with psa levels between 2.6 and 10.0 ng/mL. *International Braz j*

- Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 44. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0506>
- Catalona, W. J. (2018). Prostate Cancer Screening. *Medical Clinics of North America*, 102(2), 199–214. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.11.001>
- Cernei, N., Heger, Z., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Babula, P., ... Adam, V. (2013). Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker--a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13893–13908. <https://doi.org/10.3390/ijms140713893>
- Chang, C.-C., Lee, Y.-C., Tsai, H.-W., Yii, S.-C., Yen, T.-H., & Chu, F.-Y. (2015). Diagnostic Role of Serum Free-to-Total Prostate Specific Antigen (PSA) Ratio in Prostate Cancer with Serum Total Concentration of PSA below 4 ng/mL. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(13), 5261–5264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225663>
- Chow, K., Mangiola, S., Vazirani, J., Peters, J. S., Costello, A. J., Hovens, C. M., & Corcoran, N. M. (2018a). Obesity suppresses tumor attributable PSA, affecting risk categorization. *Endocrine-Related Cancer*, 25(5), 561–568. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0466>
- Chow, K., Mangiola, S., Vazirani, J., Peters, J. S., Costello, A. J., Hovens, C. M., & Corcoran, N. M. (2018b). Obesity suppresses tumor attributable PSA, affecting risk categorization. *Endocrine-Related Cancer*, 25(5), 561–568. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0466>
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013a). State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science*, 2(2), 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013b). State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science*, 2(2), 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- Coelho, P., Almeida, J., Prudêncio, C., Fernandes, R., & Soares, R. (2016). Effect of Adipocyte Secretome in Melanoma Progression and Vasculogenic Mimicry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(7), 1697–1706. <https://doi.org/10.1002/jcb.25463>
- Coelho, P., Silva, L., Faria, I., Viera, M., Monteiro, A., Pinto, G., ... Soares, R. (2017a). Adipocyte Secretome Increases Radioresistance of Malignant Melanocytes by Improving Cell Survival and Decreasing Oxidative Status. *Radiation Research*, 187(5), 581–588. <https://doi.org/10.1667/RR14551.1>
- Coelho, P., Silva, L., Faria, I., Viera, M., Monteiro, A., Pinto, G., ... Soares, R.

- (2017b). Adipocyte Secretome Increases Radioresistance of Malignant Melanocytes by Improving Cell Survival and Decreasing Oxidative Status. *Radiation Research*, 187(5), 581–588. <https://doi.org/10.1667/RR14551.1>
- Cooper, C. S., Eeles, R., Wedge, D. C., Van Loo, P., Gundem, G., Alexandrov, L. B., ... Neal, D. E. (2015). Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3221>
- Cozzo, A. J., Fuller, A. M., & Makowski, L. (2017). Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 8, pp. 237–282). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170008>
- Dani, H., & Loeb, S. (2017). The role of prostate cancer biomarkers in undiagnosed men. *Current Opinion in Urology*. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000384>
- De Cicco, C., Ravasi, L., Zorzino, L., Sandri, M. T., Botteri, E., Verweij, F., ... Paganelli, G. (2008). Circulating levels of VCAM and MMP-2 may help identify patients with more aggressive prostate cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 8(3), 199–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473733>
- De Pergola, G., & Silvestris, F. (2013a). Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of Obesity*. <https://doi.org/10.1155/2013/291546>
- De Pergola, G., & Silvestris, F. (2013b). Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/291546>
- Deng, T., Lyon, C. J., Bergin, S., Caligiuri, M. A., & Hsueh, W. A. (2016). Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>
- Direcção-Geral da Saúde. (2014). Portugal: Doenças Oncológicas em Números (2014). *Programa Nacional Para as Doenças Oncológicas*, 1–83. <https://doi.org/2183-0746>
- do Carmo, I., dos Santos, O., Camolas, J., Vieira, J., Carreira, M., Medina, L., ... Galvão-Teles, A. (2007). Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003–2005. *Obesity Reviews*, 0(0), 071127144959002–??? <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00422.x>
- Doyle, S. L., Donohoe, C. L., Lysaght, J., & Reynolds, J. V. (2012). Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. In *Proceedings of the*

- Nutrition Society*. <https://doi.org/10.1017/S002966511100320X>
- Draghi, C., Denis, F., Tolédano, A., & Letellier, C. (2018). Parameter identification of a model for prostate cancer treated by intermittent therapy. *Journal of Theoretical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.10.004>
- Duchesne, G. M., Woo, H. H., Bassett, J. K., Bowe, S. J., D'Este, C., Frydenberg, M., ... Turner, S. (2016). Timing of androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer with a rising PSA (TROG 03.06 and VCOG PR 01-03 [TOAD]): a randomised, multicentre, non-blinded, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(6), 727-737. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00107-8)
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., Humphrey, P. A., & Grading Committee. (2015). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 1. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Fania, C., Sogno, I., Vasso, M., Torretta, E., Leone, R., Bruno, A., ... Gelfi, C. (2015). A PSA-guided approach for a better diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling and peptide identification. *Clinica Chimica Acta*, 439, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.003>
- Faria, E. F., Carvalhal, G. F., dos Reis, R. B., Tobias-Machado, M., Vieira, R. A. C., Reis, L. O., ... Carvalho, A. L. (2012). Use of low free to total PSA ratio in prostate cancer screening: detection rates, clinical and pathological findings in Brazilian men with serum PSA levels ≤ 4.0 ng/mL. *BJU International*, 110(11b), E653-E657. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11398.x>
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41(4), 1149-1160. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>
- Ferreira, A.-M. da C. (2010). Obesidade e cancro. Retrieved from <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/45906>
- Ferro, M., Bruzzese, D., Perdonà, S., Marino, A., Mazzarella, C., Perruolo, G., ... Terracciano, D. (2013). Prostate Health Index (Phi) and Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) Significantly Improve Prostate Cancer Detection at Initial Biopsy in a Total PSA Range of 2-10 ng/ml. *PLoS ONE*.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067687>
- Ferro, M., Buonerba, C., Terracciano, D., Lucarelli, G., Cosimato, V., Bottero, D., ... De Cobelli, O. (2016). Biomarkers in localized prostate cancer. *Future Oncology*, 12(3), 399–411. <https://doi.org/10.2217/fon.15.318>
- Filella, X., & Foj, L. (2018). Novel Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Prognosis. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 1095, pp. 15–39). https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_2
- Filella, X., Foj, L., Milà, M., Augé, J. M., Molina, R., & Jiménez, W. (2013). PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0739-6>
- Francisco, V., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., ... Gualillo, O. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers in Physiology*, 9, 640. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>
- Francisco, V., Pino, J., Gonzalez-Gay, M. A., Mera, A., Lago, F., Gómez, R., ... Gualillo, O. (2018). Adipokines and inflammation: is it a question of weight? *British Journal of Pharmacology*, 175(10), 1569–1579. <https://doi.org/10.1111/bph.14181>
- Gao, S., Wang, X., Cheng, D., Li, J., Li, L., Ran, L., ... Liu, E. (2017). Overexpression of Cholesteryl Ester Transfer Protein Increases Macrophage-Derived Foam Cell Accumulation in Atherosclerotic Lesions of Transgenic Rabbits. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/3824276>
- García, M., Pazos, P., Lima, L., & Diéguez, C. (2018). Regulation of Energy Expenditure and Brown/Beige Thermogenic Activity by Interleukins: New Roles for Old Actors. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2569. <https://doi.org/10.3390/ijms19092569>
- Genest, J., McPherson, R., Frohlich, J., Anderson, T., Campbell, N., Carpentier, A., ... Ur, E. (2009). 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *The Canadian Journal of Cardiology*, 25(10), 567–579. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812802>
- Giezenaar, C., Luscombe-Marsh, N. D., Hutchison, A. T., Lange, K., Hausken, T., Jones, K. L., ... Soenen, S. (2018). Effect of gender on the acute effects of

- whey protein ingestion on energy intake, appetite, gastric emptying and gut hormone responses in healthy young adults. *Nutrition & Diabetes*, 8(1), 40. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0048-7>
- Giralt, M., & Villarroja, F. (2013). White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1403>
- Giri, V. N., & Beebe-Dimmer, J. L. (2016). Familial prostate cancer. *Seminars in Oncology*. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.001>
- Grigoraș, A., Amalinei, C., Balan, R. A., Giușcă, S. E., Avădănei, E. R., Lozneau, L., & Căruntu, I.-D. (2018). Adipocytes spectrum — From homeostasia to obesity and its associated pathology. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 219, 102–120. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.06.004>
- Grimstad, F., Le, M., Zganjar, A., Flores, D., Gourley, E., May, D., & Nangia, A. K. (2018). An Evaluation of Reported Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Estradiol and Prolactin Reference Ranges in the United States. *Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2018.07.024>
- Grönberg, H., Adolfsson, J., Aly, M., Nordström, T., Wiklund, P., Brandberg, Y., ... Eklund, M. (2015). Prostate cancer screening in men aged 50-69 years (STHLM3): A prospective population-based diagnostic study. *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00361-7)
- Grosman, H., Fabre, B., Lopez, M., Scorticati, C., Lopez Silva, M., Mesch, V., ... Berg, G. (2016a). Complex relationship between sex hormones, insulin resistance and leptin in men with and without prostatic disease. *Aging Male*, 19(1). <https://doi.org/10.3109/13685538.2015.1100600>
- Grosman, H., Fabre, B., Lopez, M., Scorticati, C., Lopez Silva, M., Mesch, V., ... Berg, G. (2016b). Complex relationship between sex hormones, insulin resistance and leptin in men with and without prostatic disease. *The Aging Male*, 19(1), 40–45. <https://doi.org/10.3109/13685538.2015.1100600>
- Gucalp, A., Iyengar, N. M., Zhou, X. K., Giri, D. D., Falcone, D. J., Wang, H., ... Dannenberg, A. J. (2017). Periprostatic adipose inflammation is associated with high-grade prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. <https://doi.org/10.1038/pcan.2017.31>
- Guelho, D., Gomes, L., Paiva, I., & Carrilho, F. (2016). Prolactina e metabolismo – uma perspetiva diferente de uma hormona multifuncional. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 11(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/J.RPEDM.2016.02.012>

- Guo, H., Ahmed, M., Zhang, F., Yao, C. Q., Li, S., Liang, Y., ... He, H. H. (2016). Modulation of long noncoding RNAs by risk SNPs underlying genetic predispositions to prostate cancer. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3637>
- Haiman, C. A., Chen, G. K., Blot, W. J., Strom, S. S., Berndt, S. I., Kittles, R. A., ... Henderson, B. E. (2011). Characterizing genetic risk at known prostate cancer susceptibility loci in African Americans. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001387>
- Harrison, S., Tilling, K., Turner, E. L., Lane, J. A., Simpkin, A., Davis, M., ... Martin, R. M. (2016). Investigating the prostate specific antigen, body mass index and age relationship: is an age-BMI-adjusted PSA model clinically useful? *Cancer Causes & Control*, 27(12), 1465–1474. <https://doi.org/10.1007/s10552-016-0827-1>
- Hemminki, K. (2012). Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1007/s00345-011-0801-1>
- Hill, J. H., Solt, C., & Foster, M. T. (2018). Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 33(2). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0012>
- Hisanori, U., Kobayashi, T., Matsumoto, M., Watanabe, S., Yoneda, A., & Yoshimi, B. (2018). Adipose tissue: Critical contributor to the development of prostate cancer. *The Journal of Medical Investigation*, 65(1.2), 9–17. <https://doi.org/10.2152/jmi.65.9>
- Hryn, V. H., Ustenko, R. L., Pilyugin, A. V, Sarychev, Y. V, & Lavrenko, D. O. (2018). Stereomorphology of the peripheral zone of the human prostate. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, 71(5), 992–995. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30176628>
- Hsing, A. W., Yeboah, E., Biritwum, R., Tettey, Y., De Marzo, A. M., Adjei, A., ... Hoover, R. N. (2014). High prevalence of screen detected prostate cancer in West Africans: Implications for racial disparity of prostate cancer. *Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.04.017>
- Hu, M.-B., Xu, H., Bai, P.-D., Jiang, H.-W., & Ding, Q. (2014). Obesity has multifaceted impact on biochemical recurrence of prostate cancer: a dose-response meta-analysis of 36,927 patients. *Medical Oncology*, 31(2), 829. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0829-8>
- Hussein, S., Satturwar, S., & Van Der Kwast, T. (2015). Young-age prostate

- cancer. *Journal of Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202993>
- Igawa, T., Takehara, K., Onita, T., Ito, K., & Sakai, H. (2014). Stability of [-2]Pro-PSA in Whole Blood and Serum: Analysis for Optimal Measurement Conditions. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 28(4), 315–319. <https://doi.org/10.1002/jcla.21687>
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K., & Guzik, T. J. (2012). Prolactin--not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 63(5), 435–443. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211297>
- Jalilpiran, Y., Dianatinasab, M., Zeighami, S., Bahmanpour, S., Ghiasvand, R., Mohajeri, S. A. R., & Faghih, S. (2018). Western Dietary Pattern, But not Mediterranean Dietary Pattern, Increases the Risk of Prostate Cancer. *Nutrition and Cancer*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1490779>
- Kahn, S. M., Li, Y.-H., Hryb, D. J., Nakhla, A. M., Romas, N. A., Cheong, J., & Rosner, W. (2008). Sex hormone-binding globulin influences gene expression of LNCaP and MCF-7 cells in response to androgen and estrogen treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 617, 557–564. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_57
- Karnati, H. K., Panigrahi, M. K., Li, Y., Tweedie, D., & Greig, N. H. (2017). Adiponectin as a Potential Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 23(28), 4170–4179. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170208123553>
- Kelly, D. M., & Jones, T. H. (2015a). Testosterone and obesity. *Obesity Reviews*, 16(7), 581–606. <https://doi.org/10.1111/obr.12282>
- Kelly, D. M., & Jones, T. H. (2015b). Testosterone and obesity. *Obesity Reviews*, 16(7), 581–606. <https://doi.org/10.1111/obr.12282>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kidawa, M., Gluba-Brzozka, A., Zielinska, M., Franczyk, B., Banach, M., & Rysz, J. (2018). Cholesterol subfraction analysis in patients with acute coronary syndrome. *Current Vascular Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.2174/1570161116666180601083225>

- Klein, E. A., Haddad, Z., Yousefi, K., Lam, L. L. C., Wang, Q., Choeurng, V., ... Magi-Galluzzi, C. (2016). Decipher Genomic Classifier Measured on Prostate Biopsy Predicts Metastasis Risk. *Urology*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.01.012>
- Knipe, D. W., Evans, D. M., Kemp, J. P., Eeles, R., Easton, D. F., Kote-Jarai, Z., ... Martin, R. M. (2014). Genetic variation in prostate-specific antigen-detected prostate cancer and the effect of control selection on genetic association studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0889>
- Kotb, A. F., Spaner, S., Crump, T., & Hyndman, M. E. (2018). The role of mpMRI and PSA density in patients with an initial negative prostatic biopsy. *World Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2341-4>
- Krishna, S. G., Rawal, V., Durkin, C., Modi, R. M., Hinton, A., Cruz-Monserrate, Z., ... Hussan, H. (2018). Weight Loss Surgery Reduces Healthcare Resource Utilization and All-Cause Inpatient Mortality in Morbid Obesity: a Propensity-Matched Analysis. *Obesity Surgery*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11695-018-3345-2>
- Lacher, D. A., & Hughes, J. P. (2015). Total, free, and complexed prostate-specific antigen levels among US men, 2007–2010. *Clinica Chimica Acta*, 448, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.009>
- Lai, C.-Y., Chen, C.-M., Hsu, W.-H., Hsieh, Y.-H., & Liu, C.-J. (2017). Overexpression of Endothelial Cell-Specific Molecule 1 Correlates with Gleason Score and Expression of Androgen Receptor in Prostate Carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, 14(12), 1263–1267. <https://doi.org/10.7150/ijms.21023>
- Landry, D., Cloutier, F., & Martin, L. J. (2013). Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reproductive Biology*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2012.12.001>
- LeBlanc, S., Coulombe, F., Bertrand, O. F., Bibeau, K., Pibarot, P., Marette, A., ... Larose, E. (2018). Hypertriglyceridemic Waist: A Simple Marker of High-Risk Atherosclerosis Features Associated With Excess Visceral Adiposity/Ectopic Fat. *Journal of the American Heart Association*, 7(8), e008139. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.008139>
- Leitzmann, M. F., & Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clinical Epidemiology*. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S16747>

- Lima, A. R., Bastos, M. de L., Carvalho, M., & Guedes de Pinho, P. (2016). Biomarker discovery in human prostate cancer: An update in metabolomics studies. *Translational Oncology*, 9(4), 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.05.004>
- Lima, A. R., De Lourdes Bastos, M., Carvalho, M., & Guedes De Pinho, P. (2016). Biomarker Discovery in Human Prostate Cancer: an Update in Metabolomics Studies. *TRANON*, 9, 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.05.004>
- Lin, P.-H., Aronson, W., & Freedland, S. J. (2015). Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Medicine*, 13(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0234-y>
- Lucarelli, G., Fanelli, M., Larocca, A. M. V., Germinario, C. A., Rutigliano, M., Vavallo, A., ... Ditonno, P. (2012). Serum sarcosine increases the accuracy of prostate cancer detection in patients with total serum PSA less than 4.0 ng/ml. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.22514>
- Luo, Y., Gou, X., Huang, P., & Mou, C. (2014). The PCA3 test for guiding repeat biopsy of prostate cancer and its cut-off score: a systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*, 16(3), 487–492. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.125390>
- Lv, Y., Liang, T., Wang, G., & Li, Z. (2018a). Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Bioscience Reports*, BSR20181061. <https://doi.org/10.1042/BSR20181061>
- Lv, Y., Liang, T., Wang, G., & Li, Z. (2018b). Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Bioscience Reports*, BSR20181061. <https://doi.org/10.1042/BSR20181061>
- Machioka, K., Mizokami, A., Yamaguchi, Y., Izumi, K., Hayashi, S., & Namiki, M. (2015). Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells. *Anticancer Research*, 35(1), 221–227. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550554>
- Mackenzie, H., Markar, S. R., Askari, A., Faiz, O., Hull, M., Purkayastha, S., ... Lagergren, J. (2018). Obesity surgery and risk of cancer. *British Journal of Surgery*. <https://doi.org/10.1002/bjs.10914>
- Magno, F., Guaraná, H., Fonseca, A. C., Cabello, G., Carneiro, J., Pedrosa, A., ... Rosado, E. (2018). Influence of *FTO* rs9939609 polymorphism on appetite, ghrelin, leptin, IL6, TNF α levels, and food intake of women with morbid obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and*

- Therapy, Volume 11*, 199–207. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S154978>
- Mandair, D., Rossi, R. E., Pericleous, M., Whyand, T., & Caplin, M. E. (2014). Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutrition & Metabolism*. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-30>
- Martin, S. S., Blaha, M. J., Elshazly, M. B., Toth, P. P., Kwiterovich, P. O., Blumenthal, R. S., & Jones, S. R. (2013). Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA*, 310(19), 2061–2068. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280532>
- Masko, E. M., Allott, E. H., & Freedland, S. J. (2013). The Relationship Between Nutrition and Prostate Cancer: Is More Always Better? *European Urology*, 63(5), 810–820. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.012>
- Matafome, P., & Seica, R. (2017). Function and Dysfunction of Adipose Tissue. In *Advances in neurobiology* (Vol. 19, pp. 3–31). https://doi.org/10.1007/978-3-319-63260-5_1
- Maurizi, A., & Rucci, N. (2018). The Osteoclast in Bone Metastasis: Player and Target. *Cancers*, 10(7), 218. <https://doi.org/10.3390/cancers10070218>
- Mazzone, E., Preisser, F., Nazzani, S., Tian, Z., Bandini, M., Gandaglia, G., ... Karakiewicz, P. I. (2018). Location of Metastases in Contemporary Prostate Cancer Patients Affects Cancer-Specific Mortality. *Clinical Genitourinary Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.05.016>
- McHill, A. W., Hull, J. T., McMullan, C. J., & Klerman, E. B. (2018). Chronic Insufficient Sleep Has a Limited Impact on Circadian Rhythmicity of Subjective Hunger and Awakening Fasted Metabolic Hormones. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 319. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00319>
- McKay, A. C., & Sharma, S. (2018). *Anatomy, Seminal Vesicle*. *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763029>
- Mendonça, F. M., de Sousa, F. R., Barbosa, A. L., Martins, S. C., Araújo, R. L., Soares, R., & Abreu, C. (2015). Metabolic syndrome and risk of cancer: Which link? *Metabolism*, 64(2), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.008>
- Mengual, L., Lozano, J. J., Ingelmo-Torres, M., Izquierdo, L., Musquera, M., Ribal, M. J., & Alcaraz, A. (2016). Using gene expression from urine sediment to diagnose prostate cancer: Development of a new multiplex mRNA urine test and validation of current biomarkers. *BMC Cancer*.

- <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2127-2>
- Mi, Y., Ren, K., Zou, J., Bai, Y., Zhang, L., Zuo, L., ... Yasui, T. (2018). The Association Between Three Genetic Variants in MicroRNAs (Rs11614913, Rs2910164, Rs3746444) and Prostate Cancer Risk. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(1), 149–157. <https://doi.org/10.1159/000491671>
- Mikropoulos, C., Selkirk, C. G. H., Saya, S., Bancroft, E., Vertosick, E., Dadaev, T., ... Eeles, R. A. (2018). Prostate-specific antigen velocity in a prospective prostate cancer screening study of men with genetic predisposition. *British Journal of Cancer*, 118(2), 266–276. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.429>
- Moon, J.-Y., Choi, M. H., & Kim, J. (2016). Metabolic profiling of cholesterol and sex steroid hormones to monitor urological diseases. *Endocrine-Related Cancer*, 23(10), R455-67. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0285>
- Mora, B. C., Fleshner, N. E., Klotz, L. H., & Venkateswaran, V. (2015). The Effects of Serum from Prostate Cancer Patients with Elevated Body Mass Index on Prostate Cancer Cells in Vitro. *Lipid Insights*, 8, LPI.S23135. <https://doi.org/10.4137/LPI.S23135>
- Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, T. (2017). Multiple Mechanisms of Regulation of Transient Receptor Potential Ion Channels by Cholesterol. In *Current topics in membranes* (Vol. 80, pp. 139–161). <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2017.05.007>
- Moreira, Â., Pereira, S. S., Costa, M., Morais, T., Pinto, A., Fernandes, R., & Monteiro, M. P. (2015a). Adipocyte secreted factors enhance aggressiveness of prostate carcinoma cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123217>
- Moreira, Â., Pereira, S. S., Costa, M., Morais, T., Pinto, A., Fernandes, R., & Monteiro, M. P. (2015b). Adipocyte Secreted Factors Enhance Aggressiveness of Prostate Carcinoma Cells. *PLOS ONE*, 10(4), e0123217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123217>
- Moreno-Aliaga, M. J., Lorente-Cebrián, S., & Martínez, J. A. (2010). Regulation of adipokine secretion by n-3 fatty acids. In *Proceedings of the Nutrition Society*. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001801>
- Morgentaler, A., & Rhoden, E. L. (2006). Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less. *Urology*, 68(6), 1263–1267. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.08.1058>

- Murdolo, G., Bartolini, D., Tortoioli, C., Piroddi, M., Iuliano, L., & Galli, F. (2013). Lipokines and oxysterols: Novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.007>
- Nelles, J. L., Hu, W.-Y., & Prins, G. S. (2011a). Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 437-451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>
- Nelles, J. L., Hu, W.-Y., & Prins, G. S. (2011b). Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 437-451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>
- Nelles, J. L., Hu, W.-Y., & Prins, G. S. (2011c). Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 437-451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>
- Nelles, J. L., Hu, W.-Y., & Prins, G. S. (2011d). Estrogen action and prostate cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 6(3), 437-451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>
- Nicholson, T., Church, C., Baker, D. J., & Jones, S. W. (2018). The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. *Journal of Inflammation*, 15(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12950-018-0185-8>
- Nielsen, A. J., & McNulty, J. (2018). Polyphenolic natural products and natural product-inspired steroidal mimics as aromatase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21536>
- Nimptsch, K., Platz, E. A., Pollak, M. N., Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Giovannucci, E. (2011). Plasma insulin-like growth factor 1 is positively associated with low-grade prostate cancer in the Health Professionals Follow-up Study 1993-2004. *International Journal of Cancer*, 128(3), 660-667. <https://doi.org/10.1002/ijc.25381>
- Nishimura, K., Soda, T., Nakazawa, S., Yamanaka, K., Hirai, T., Kishikawa, H., & Ichikawa, Y. (2012). Serum adiponectin and leptin levels are useful markers for prostate cancer screening after adjustments for age, obesity-related factors, and prostate volume. *Minerva Urologica e Nefrologica = The Italian Journal of Urology and Nephrology*, 64(3), 199-208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971685>
- Nunes, P., Pimentel, F. L., Pina, F., & Rolo, F. (2010). Registo Nacional de Cancro da Próstata, em Portugal - ReNaCaP. *Acta Urológica*, (3), 39-45. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00570-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00570-7)

- O'Reilly, M. W., House, P. J., & Tomlinson, J. W. (2014). Understanding androgen action in adipose tissue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.008>
- Ogawa, S., Liu, X., Shepherd, B. S., & Parhar, I. S. (2018). Ghrelin stimulates growth hormone release from the pituitary via hypothalamic growth hormone-releasing hormone neurons in the cichlid, *Oreochromis niloticus*. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2870-6>
- Olabi, A., Hwalla, N., Daroub, H., Obeid, O., & Cordahi, C. (2018). Food acceptability affects ghrelin and insulin levels in healthy male subjects. A pilot study. *Nutrition Research*, 49, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.10.001>
- Parekh, D. J., Punnen, S., Sjoberg, D. D., Asroff, S. W., Bailen, J. L., Cochran, J. S., ... Zappala, S. M. (2015). A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. *European Urology*, 68(3). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.10.021>
- Parikesit, D., Mochtar, C. A., Umbas, R., & Hamid, A. R. A. H. (2016). The impact of obesity towards prostate diseases. *Prostate International*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pnrl.2015.08.001>
- Pataky, Z., Bobbioni-Harsch, E., & Golay, A. (2010). Open questions about metabolically normal obesity. *International Journal of Obesity*, 34(S2), S18–S23. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.235>
- Paz-Filho, G. (2011). Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Frontiers in Bioscience*. <https://doi.org/10.2741/3810>
- Perez-Cornago, A., Appleby, P. N., Pischon, T., Tsilidis, K. K., Tjønneland, A., Olsen, A., ... Travis, R. C. (2017a). Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: results from the EPIC cohort study. *BMC Medicine*, 15(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0876-7>
- Perez-Cornago, A., Appleby, P. N., Pischon, T., Tsilidis, K. K., Tjønneland, A., Olsen, A., ... Travis, R. C. (2017b). Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: Results from the EPIC cohort study. *BMC Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0876-7>
- Pérez-Hernández, A. I., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., & Frühbeck, G. (2014a). Mechanisms linking excess adiposity and

- carcinogenesis promotion. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 65. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00065>
- Pérez-Hernández, A. I., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., & Frühbeck, G. (2014b). Mechanisms linking excess adiposity and carcinogenesis promotion. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00065>
- Pérez-Lanzac-Lorca, A., Barco-Sánchez, A., Romero, E., Martinez-Peinado, A., López-Elorza, F., Sanchez-Sanchez, E., ... Castiñeiras-Fernández, J. (2013). Correlación del cociente PSA complex/PSA total con el cociente PSA libre/PSA total, sensibilidad y especificidad de ambos marcadores para el diagnóstico del cáncer de prostata. *Actas Urológicas Españolas*, 37(8), 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2012.11.014>
- Pettersson, A., Robinson, D., Garmo, H., Holmberg, L., & Stattin, P. (2018). Age at diagnosis and prostate cancer treatment and prognosis: a population-based cohort study. *Annals of Oncology*, 29(2), 377–385. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx742>
- Pierorazio, P. M., Ferrucci, L., Kettermann, A., Longo, D. L., Metter, E. J., & Carter, H. B. (2010). Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *BJU International*, 105(6), 824–829. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08853.x>
- Potočnjak, I., Trbušić, M., Terešak, S. D., Radulović, B., Pregartner, G., Berghold, A., ... Frank, S. (2017). Metabolic Syndrome Modulates Association between Endothelial Lipase and Lipid/Lipoprotein Plasma Levels in Acute Heart Failure Patients. *Scientific Reports*, 7(1), 1165. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01367-2>
- Quagliariello, V., Rossetti, S., Cavaliere, C., Di Palo, R., Lamantia, E., Castaldo, L., ... Facchini, G. (2017). Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer associations: biochemical and pathophysiological evidences. *Oncotarget*, 8(18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16725>
- Reneau, J., Goldblatt, M., Gould, J., Kindel, T., Kastenmeier, A., Higgins, R., ... Kidambi, S. (2018). Effect of adiposity on tissue-specific adiponectin secretion. *PLOS ONE*, 13(6), e0198889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198889>
- Rhee, H., Vela, I., & Chung, E. (2016). Metabolic Syndrome and Prostate Cancer: a Review of Complex Interplay Amongst Various Endocrine Factors in the

- Pathophysiology and Progression of Prostate Cancer. *Hormones and Cancer*.
<https://doi.org/10.1007/s12672-015-0238-x>
- Ribeiro, R., Monteiro, C., Cunha, V., Oliveira, M. J., Freitas, M., Fraga, A., ... Medeiros, R. (2012). Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 31(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-32>
- Rodrigues, K. F., Pietrani, N. T., Bosco, A. A., Campos, F. M. F., Sandrim, V. C., & Gomes, K. B. (2017). IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 61(5), 438–446. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000254>
- Roobol, M. J. (2014). Re: PSA Density Improves Prediction of Prostate Cancer. *European Urology*, 66(5), 964–965. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.08.027>
- Rundle, A., & Neugut, A. I. (2008). Obesity and screening PSA levels among men undergoing an annual physical exam. *The Prostate*, 68(4), 373–380. <https://doi.org/10.1002/pros.20704>
- Ruscica, M., Botta, M., Ferri, N., Giorgio, E., Macchi, C., Franceschini, G., ... Gomaschi, M. (2018). High Density Lipoproteins Inhibit Oxidative Stress-Induced Prostate Cancer Cell Proliferation. *Scientific Reports*, 8(1), 2236. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19568-8>
- Sackmann-Sala, L., & Goffin, V. (2015). Prolactin-induced prostate tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 846, 221–242. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_10
- Saini, S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>
- Sanchis-Bonet, A., Barrionuevo-González, M., Bajo-Chueca, A., Morales-Palacios, N., & Sanchez-Chapado, M. (2018). Does [-2]Pro-Prostate Specific Antigen Meet the Criteria to Justify Its Inclusion in the Clinical Decision-Making Process? *Urologia Internationalis*, 100(2), 146–154. <https://doi.org/10.1159/000481439>
- Serra-Majem, L., & Bautista-Castaño, I. (2013). Etiology of obesity: two “key issues” and other emerging factors. *Nutricion Hospitalaria*, 28 Suppl 5, 32–43. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.sup5.6916>
- Sidossis, L., & Kajimura, S. (2015). Brown and beige fat in humans: Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *Journal of Clinical*

- Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI78362>
- Singh, S., Facciorusso, A., Singh, A. G., Castele, N. Vande, Zarrinpar, A., Prokop, L. J., ... Sandborn, W. J. (2018). Obesity and response to anti-tumor necrosis factor- α agents in patients with select immune-mediated inflammatory diseases: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 13(5), e0195123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195123>
- Skrede, T., Steene-Johannessen, J., Anderssen, S. A., Resaland, G. K., & Ekelund, U. (2018). The prospective association between objectively measured sedentary time, moderate-to-vigorous physical activity and cardiometabolic risk factors in youth: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. <https://doi.org/10.1111/obr.12758>
- Stephan, C., Jung, K., & Ralla, B. (2015). Current biomarkers for diagnosing of prostate cancer. *Future Oncology*, 11(20), 2743–2755. <https://doi.org/10.2217/fon.15.203>
- Strittmatter, F., Stieber, P., Nagel, D., Füllhase, C., Walther, S., Stief, C. G., & Waidelich, R. (2011). Detection of prostate cancer with complexed PSA and complexed/total PSA ratio - is there any advantage? *European Journal of Medical Research*, 16(10), 445–450. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-16-10-445>
- Suganami, T., & Ogawa, Y. (2013). Role of chronic inflammation in adipose tissue in the pathophysiology of obesity. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*.
- Suganami, T., Tanaka, M., & Ogawa, Y. (2012). Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocrine Journal*. <https://doi.org/10.1507/endocrj>.
- Tada, H., Kawashiri, M., Nomura, A., Yoshimura, K., Itoh, H., Komuro, I., & Yamagishi, M. (2018). Serum triglycerides predict first cardiovascular events in diabetic patients with hypercholesterolemia and retinopathy. *European Journal of Preventive Cardiology*, 204748731879698. <https://doi.org/10.1177/2047487318796989>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Vidal, A. C., & Freedland, S. J. (2017). Obesity and Prostate Cancer: A Focused Update on Active Surveillance, Race, and Molecular Subtyping. *European Urology*, 72(1), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.10.011>

- Vidal, A. C., Howard, L. E., Moreira, D. M., Castro-Santamaria, R., Andriole, G. L., & Freedland, S. J. (2014). Obesity increases the risk for high-grade prostate cancer: Results from the REDUCE study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0795>
- Villarroya, F., Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, J., & Giralt, M. (2018). Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/joim.12803>
- Walsh, T. J., Shores, M. M., Krakauer, C. A., Forsberg, C. W., Fox, A. E., Moore, K. P., ... Matsumoto, A. M. (2018). Testosterone treatment and the risk of aggressive prostate cancer in men with low testosterone levels. *PLOS ONE*, 13(6), e0199194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199194>
- Weiner, A. B., Matulewicz, R. S., Eggener, S. E., & Schaeffer, E. M. (2016). Increasing incidence of metastatic prostate cancer in the United States (2004-2013). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 19(4), 395-397. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.30>
- Xu, N., Wu, Y.-P., Chen, D.-N., Ke, Z.-B., Cai, H., Wei, Y., ... Xue, X.-Y. (2018). Can Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2 reduce unnecessary prostate biopsies in men with PSA levels of 4-10 ng/ml? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(5), 987-995. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2616-6>
- Yassin, A. A., Saad, F., & Gooren, L. J. (2008). Metabolic syndrome, testosterone deficiency and erectile dysfunction never come alone. *Andrologia*, 40(4), 259-264. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00851.x>
- Yassin, A., Nettleship, J. E., Talib, R. A., Almeahadi, Y., & Doros, G. (2016). Effects of testosterone replacement therapy withdrawal and re-treatment in hypogonadal elderly men upon obesity, voiding function and prostate safety parameters. *The Aging Male*, 19(1), 64-69. <https://doi.org/10.3109/13685538.2015.1126573>
- Yin, L.-J., & Wang, X.-H. (2018). [Research advance in the effects of androgen and its receptor on the development of obesity, obesity-related diseases and disorders of glucose and lipid metabolism]. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 70(3), 319-328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926074>
- Zhao, J., Zhai, L., Liu, Z., Wu, S., & Xu, L. (2014). Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 190945.

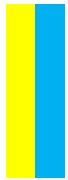
<https://doi.org/10.1155/2014/190945>

Zhou, Y., Bolton, E. C., & Jones, J. O. (2015). Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*.

<https://doi.org/10.1530/JME-14-0203>

Zou, Y., Chen, Z., Li, J., Gong, W., Zhang, L., Xu, F., ... Huang, H. (2018). Progestin and AdipoQ Receptor 3 Upregulates Fibronectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Glomerular Mesangial Cells via Activating NF- κ B Signaling Pathway Under High Glucose Conditions. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 275.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00275>



Doutoramento em Ciências Biomédicas

Anexos

Artigo

Artigo

ORIGINAL ARTICLE



Clinical and metabolic implications of obesity in prostate cancer: is testosterone a missing link?

M. F. Duarte^{a,b,c,d}, C. Luis^{a,d}, P. Baylina^a , M. I. Faria^{a,e}, R. Fernandes^{a,d}  and J. M. La Fuente^{b,c}

^aPolitécnico do Porto, Escola Superior de Saúde, Porto, Portugal; ^bCentro Hospitalar Universitário do Porto (CHUP), Porto, Portugal; ^cInstituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Porto, Portugal; ^dInstituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal; ^eFacultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela, España

ABSTRACT

Objectives: To assess sex hormones in men with obesity and prostate cancer (PCa) and to study association between androgens and the pathogenesis biology of PCa *in vitro*.

Subjects and methods: One hundred and eighty-one men older than 45 years selected from of a population attending to Urology departments screening for PCa, (78 participants without PCa and 103 patients with PCa). All participants were assessed for body mass index (BMI), age, Gleason score, and PSA. Endocrine profile was determined for LH, total testosterone (TT), 17 β -estradiol (E2), prolactin and leptin. Biochemical profile (HbA1c, triacylglycerols and lipoproteins) was also determined. *In vitro* experiments were also performed, involving the study of 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and E2 in the presence of adipocyte-enriched medium (aCM).

Results: All variables were continuous and described a Gaussian distribution unless mentioned. To determine the relation of aggressiveness, variable were transformed into categories. Thus, PCa aggressiveness is associated with the increase of age and BMI ($p < .0001$) but with is decreased with TT and E2 ($p < .05$). Moreover, adipocyte-secreted molecules increase aggressiveness of PCa cells *in vitro*. Lastly, DHT but not E2 enables invasiveness *in vitro*.

Conclusions: It was observed a coexistence of hormone axis profile alteration with sex hormones and BMI in PCa patients, in accordance with the new perspective of PCa pathogenesis.

ARTICLE HISTORY

Received 31 July 2018

Revised 1 September 2018

Accepted 1 September 2018

Published online 25 September 2018

KEYWORDS

Prostate cancer; obesity; testosterone

Introduction

Across the world, prostate cancer (PCa) is the second most frequent type of Cancer among men [1]. In particular, in the North Portugal it is the more common, and about 22.2% of men who have cancer, have PCa. Moreover, in 2009 it was accounted that 1733 men had PCa and in 2015 the number increased to 2351, representing an increase of 35.7% and an increase of 74.0% is expected from 2009 to 2020 [2].

Evidence has supported obesity as a risk factor for both benign prostate hyperplasia (BPH) and PCa. The World Health Organization and The National Institutes of Health define overweight as a body mass index (BMI) of greater than 25 kg/m², and obesity as BMI of greater than 30 kg/m² [3].

It is long recognized, that testosterone is a crucial lipid hormone that plays a major role in key metabolic and pathophysiological processes such as obesity and cancer [4–7]. The increased central adiposity (fat mass) and reduced lean mass is related with hypogonadism

(low levels of testosterone) [8,9]. These anatomic features are closely related to metabolic dysfunction. Particularly, metabolic features associated to testosterone deficiency include energy metabolism imbalance such as impaired glucose regulation, reduced insulin sensitivity and dyslipidemia [10,11].

Testosterone may be found in different forms. There is “free” testosterone, that is not bound to any proteins or blood transporters and it is recognized to be the most abundant in the body. However, testosterone may also be bound to albumin and to sex hormone-binding globulin (SHBG). In this form testosterone is not active. Testosterone is often converted to dihydrotestosterone (DHT) by a set of widely distributed enzymes, 5 α -reductases (EC. 1.3.1.22). DHT is five times more potent than testosterone and is the preferred form used by the cells of prostate, skin, and hair follicles [12].

Androgen levels change with age. It is estimated that testosterone levels decline about 1% per year after the age of 30. When testosterone decreasing

levels in the aging male cause discomfort and loss of quality-of-life such as erectile dysfunction (ED), muscle strength, bone strength [13], and fatigue, hormone therapy must be considered [14,15].

Testosterone low-levels or even deficiency is not only linked with age. In fact, testosterone deficiency is also associated with insulin resistance and the metabolic syndrome (MetS), reduced bone density and increased visceral obesity. Thus, several authors discussed whether restoring testosterone normal physiological levels may exert benefits to elderly men, not only in the metabolic fitness (reduces obesity, increases insulin sensitivity) but also libido improvement and health-related quality of life [16–18].

Regarding the role of testosterone on prostate cancer (PCa) there is still some discussion among the scientific community, since there are several discrepant studies. While numerous longitudinal studies have recognized an association between high levels of TT and subsequent development of PCa [19,20] other smaller, well-designed studies have demonstrated the opposite, that is, increased PCa risk in patients with lower testosterone levels [21,22].

Nevertheless, considered by most scientific and clinical community one of most important and perhaps one of the most robust study on the role of testosterone and PCa relationship comes from the study of the a 5 α -reductase inhibitor, dutasteride, the REDUCE trial (Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events) [23]. The study included two arms, the placebo arm and the Dutasteride arm, and enrolled initially 8231 patients distributed 4126 by placebo and 4105 by dutasteride arms. In analyzing the placebo arm, Muller et al. identified no association of testosterone or DHT with PCa incidence nor Gleason grade [24].

Thus, a large number of scientific evidence have somehow linked serum testosterone levels and/or its carrier (SHBG) to cancer and metabolic disturbances such as metabolic syndrome and diabetes [15,25–30]. In fact, androgen deprivation has been associated to worst glycemic control and increase cardiovascular biochemical risk factors in diabetic prostate cancer patients [31].

However, the exact type of the observed relations remains indeterminate. These ambiguities may be endorsed to the high variability of the associations reported. The most relevant evidence suggests that associations may differ according to age and BMI [32–34].

Aims

Considering these facts, the current study aims to evaluate the association between hormonal and

biochemical profile with the occurrence and aggressiveness (Gleason Score) of PCa in the Portuguese obese men from the North of Portugal. In order to achieve that purpose, we have analyzed a set of patients from this region with and without PCa. Also, we have studied the effect of sexual hormones (testosterone and estradiol) on PCa cells *in vitro* within an environment enriched by the secreted signaling molecules of adipose cells.

Material and methods

Sample size and characteristics

The current study presents a cross-sectional design and included 181 men older than 45 years, who were referred to routine urological evaluation. The study protocol was approved by our local ethical committee, and all patients signed the written informed consent.

The indication for prostate biopsy is based on the prostate specific antigen (PSA) blood test, its evolution over time and on prostate changes regarding the consistency or shape detected by direct examination (prostate touch) or both.

Socio-demographic information was obtained, and blood samples were collected for biochemical and hormonal analysis.

Blood collection

Patients who submitted for ultrasound-guided prostate biopsy were given a venous blood sample prior to any prostatic manipulation (rectal examination) and transrectal echography in Vacutainer BD tubes, a tube without any additive, which were subsequently centrifuged at 3500 r.p.m. and the separate serum for the determination of the aforementioned hormones and biochemical markers.

Recommendations for the handling and storage of samples are provided by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Laboratory tests

For the determination of all the hormones included in the study, commercial reagent kits from Roche (Roche Diagnostics) developed for use in the E170 modular automatic analyzer were used.

The method used for the determination of all hormones was the electrochemiluminescent assay (ECLIA) by means of competitive or sandwich approach.

The reagents used were those indicated by the manufacturer and where necessary calibrations were

carried out and the calibrators used were those recommended by the respective manufacturers.

For each series of determinations, control sera were inserted. These were acquired in the market, in three levels of concentration (low, normal and high). The determinations were only made after validating the results of the quality control, which were always within the values defined by the Quality Control platform.

Hormonal and biochemical profile

The hormonal profile in the current study was performed in the patients who underwent the ultrasound-guided prostate biopsy and were defined at the beginning of the study, being constituted by the following hormones: Leptin, Prolactin, Estradiol, Luteinizing Hormone, and Total Testosterone. The normal range considered in the present study were of 0.7–5.3 ng/mL for Leptin, 4.04–15.2 ng/mL for Prolactin, 7.63–42.6 pg/mL for Estradiol (E2), 1.7–8.6 mIU/mL for Luteinizing Hormone, and 2.8–8.0 ng/mL for Total Testosterone. Values below or higher than the normal range, are considered as low or high respectively.

Moreover, the biochemical profile includes glycated hemoglobin HbA1c, triacylglycerols (TAGs), total cholesterol (CHOT) and its fractions, such as high-density lipoproteins (HDL-c), low-density lipoproteins (LDL-c) and very low-density lipoproteins (VLDL). Normal ranges of such biochemical parameters in use in the present study are 4.0–6.0% for HbA1c, 40–160 mg/dL for TAGs, 0–200 mg/dL for CHOT, 35–55 mg/dL for HDL-c mg/dL, 0–130 mg/dL for LDL-c and 3–56 mg/dL for VLDL. As before, we have considered the values inferior or superior to the normal range as low or high respectively.

Cell culture and in vitro treatments

For the current work 3T3-L1 (purchased from American Type Culture Collection) cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 g/L Glucose and L-Glutamine, without Sodium Pyruvate. Santa Cruz Biotechnology, Inc.), supplemented with 10% FBS, and 1000 units/mL gentamycin solution, maintained in T-25 tissue culture flasks in 5% CO₂/95% air at 37 °C in a humidified incubator.

Human prostate cancer cell line, PC3 were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Life technologies, 52400-025, USA) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (Gibco, Life technologies, 10270, USA) and 1% antibiotic/antimycotic (Gibco, Life

technologies, 10270, USA). The cells were maintained in a humidified chamber with 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. The cells were used between passages 2 and 8.

Adipocyte differentiation and conditioned medium (CM) collection

3T3-L1 pre-adipocytes were propagated and allowed to reach confluence. After 2 days (day 0), the differentiation was initiated by addition of a hormonal mixture composed of 2 µM insulin, 1 µM dexamethasone and 0.25 mM isobutylmethylxanthine. Three days after (day 3), the induction medium was replaced by complete medium supplemented with insulin only. At day 6 cultures were washed twice in phosphate buffered saline and incubated in serum-free medium. After 24 h (day 7), medium was harvested from the adipocytes cultures, spun for 3000 g for 5 min and the supernatant (mature adipocytes conditioned medium) was stored at –80 °C for the subsequent treatments. This conditioned medium (CM) is rich in adipokines which are globally referred as secretome.

Cell culture treatments

Afterwards, prostate cells were divided in two distinct groups. On one hand, prostate cancer cells PC3 were grown under the influence of the mature adipocytes secretome. On other hand, the control group consisted in the PC3 cells cultured in the absence of 3T3-L1 conditioned medium with low levels of glucose (LG).

Treatments were performed using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), without supplementation. To assay the hormone effects on cell growth, cells were grown for 24 h in DMEM medium (Sigma-Aldrich) supplemented with different concentrations of hormones, testosterone (Fluka), and 17β-estradiol (E2) (Sigma-Aldrich) dissolve in 0,1% of DMSO. The most significant concentration was used to perform an Injury assay.

Cell viability assay

After 24 h incubation of 1×10^5 cells/mL with the different treatments, culture medium was replaced by PBS and 20 µL of the MTT reagent (Abcam, USA), was added into each 96-plate well followed by 3 h incubation period. Color development was determined by measuring absorbance at 550/650 nm.

Table 1. Descriptive statistics for hormonal and biochemical profiles.

Variables	Total participants		Partients with Pca		Participants without Pca	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (y.o.)	66.38	8.53	68.12	8.45	64.06	8.12
BMI (kg/m ²)	26.75	3.88	28.51	3.88	24.41	2.34
tPSA (ng/mL)	17.18	29.58	24.65	37.30	7.19	4.13
LH (mUI/mL)	7.11	6.09	7.94	7.21	5.99	3.92
TT (pg/mL)	3.67	1.90	3.27	1.84	4.21	1.85
E2 (pg/mL)	22.89	10.56	22.93	11.17	22.84	9.75
PROL (ng/mL)	10.33	8.90	8.55	3.83	11.63	11.10
LEPT (ng/mL)	13.84	21.93	15.26	23.60	11.93	19.45
HbA1c (%)	5.72	0.65	5.74	0.70	5.70	0.58
TAG (mg/dL)	157.46	79.54	168.40	90.87	142.82	58.65
CHOT (mg/dL)	192.27	37.82	192.96	38.62	191.35	36.95
HDL (mg/dL)	52.53	14.53	54.02	14.92	50.53	13.83
LDL (mg/dL)	104.15	33.07	101.40	31.52	107.83	34.91
VLDL (mg/dL)	31.24	15.40	32.43	17.66	29.66	11.64

BMI: Body Mass Index; tPSA– total Prostate Specific Antigen; LH: Luteinizing hormone; TT: Total Testosterone; E2: Estradiol; Prol: Prolactin; Lept: Leptin; Hb A1c: Glycated hemoglobin A, fraction 1c; TAG: Triacylglycerols; CHOT: Cholesterol, total fraction; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein; SD: Standard deviation.

Injury assay and computational stereology analysis

Confluent PC3 monolayers on 24-plate well, were wounded with a 10- μ l pipette tip. Twenty-four hours after treatment, the migrated distance was photographed under an inverted microscope (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) at a 200x magnification and the scratch closure was determined by measuring the injury width by means of bioinformatics analysis using Image J software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) with a macro specially designed for injury assays designated as Wound Healing Tool [35].

Statistical analysis

Sample size was calculated *a priori* using G*Power version 3.1.9.3 [36,37], designed to detect statically significant Pearson Correlation Coefficients of 0.5 for level of significance α error of 5% and a power of 90% (1- β) the sample should be at least 86 control individuals and 86 prostate cancer (PCa) patients. The sample was stratified into two groups, according to presence/absence of prostate carcinoma. Student t-test was used to compare means of two different samples. Chi-square test was used to compare categorical data. Kolmogorov–Smirnov and Levene's test were used to determine normality of populations and variances. All the studied variables are normally distributed. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of the mean (SEM), unless otherwise stated.

All statistical analyses were performed with IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL). All statistical tests were two-sided and $p < .05$ was considered statistically significant and plotted using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

Results

Clinical and socio-demographic characterization

The current study presents a cross-sectional study and included 181 men attending the Urology Department of CHUP (Central Hospital from the University of Porto), 78 participants without PCa and 103 patients with PCa. The age ranges from 46 to 85 years old. The overall mean of ages amongst participants was of 66.4 ± 8.5 (mean $\pm$ standard deviation) stratified by 68.1 ± 8.4 versus 64.1 ± 8.1 regarding the participants with and without cancer, respectively (Table 1).

All men consent to be submitted to anthropometric characterization (weight and height) in order to determine the Body Mass Index (BMI) according to WHO recommendations [3]. Thus, the overall BMI was of 26.75 ± 3.88 kg/m² classifying this sample, generally as overweight. When looking to BMI by groups, it was established as 28.51 ± 3.88 kg/m² versus 24.41 ± 2.34 kg/m² in the arm with and without cancer respectively (Table 1).

The indication for prostate biopsy was mainly based on the PSA blood test and/or on prostate changes by direct examination. Thus, the global mean of tPSA (total PSA) was of 17.18 ± 29.58 ng/mL, being different amongst participants with and without cancer, varying from 24.65 ± 37.30 ng/mL and 7.19 ± 4.13 ng/mL respectively (Table 1).

Hormonal and metabolic characterization of participants

Several hormones were characterized. The hypothalamus pituitary testicular axis was measured using luteinizing hormone (LH) and total testosterone (TT). Estradiol (E2), an aromatized form of a testosterone was also analyzed. Considering means ($\pm$ SD) of both arms with or without PCa no significant changes of such hormones were observed. Global levels of LH are of 7.11 ± 6.09 mUI/mL being of 7.94 ± 7.21 mUI/mL and 5.99 ± 3.92 mUI/mL in men with and without PCa respectively. Also, regarding TT, the global levels of this androgen were of 3.67 ± 1.90 ng/mL and the levels in people with and without PCa were of 3.27 ± 1.84 ng/mL and 4.21 ± 1.85 ng/mL respectively. Estradiol (E2) an end product of Aromatase using

testosterone as substrate, was globally of 22.89 ± 10.56 pg/mL but also very similar amongst the two arms varying from 22.93 ± 11.17 pg/mL to 22.84 ± 9.75 pg/mL in patients with and without PCa, respectively. Finally, Prolactin a hormone related to both sexual health and metabolism [38] was also evaluated. Men with PCa have lower levels of prolactin. Thus, these values ranged from 8.55 ± 3.83 ng/mL to 11.63 ± 11.10 ng/mL in patients with and without PCa (Table 1).

In what concerns to metabolic profile of the participants, men with PCa have higher levels of Leptin than men without PCa. In those arms, the mean $\pm$ SD of Leptin was of 15.26 ± 23.60 ng/mL in PCa men and of 11.93 ± 19.45 ng/mL in men without PCa. The percentage of glycated hemoglobin HbA1c was determined. The average of this advanced glycation end-product (AGE) was very similar in both groups: $5.74 \pm 0.70\%$ and $5.70 \pm 0.58\%$ for participants with and without PCa. Regarding TAGs, patients with PCa had higher levels of these lipids. Thus, comparing patients with PCa with people without PCa the ranges of such lipids were 168.40 ± 90.87 mg/dL and 142.82 ± 58.65 mg/dL, respectively (Table 1).

Considering lipoprotein profile, as aforementioned we have measured all the cholesterol fractions. First of all, total cholesterol (CHOT) presents no differences between the two groups in study. CHOT values ranges from 192.96 ± 38.62 mg/dL to 191.35 ± 36.95 mg/dL in men with and without PCa respectively. Additionally, LDL-c fraction was measure and no significant differences were found however people with no cancer presented higher mean values. Patients with PCa presented a mean of values of 101.40 ± 31.52 mg/dL of these lipoprotein and patients with no cancer, presented an average value of 107.83 ± 34.91 mg/dL. Similarly, regarding HDL-c no differences were found amongst the arms in study but this time, patients with PCa presented the higher values. Hence, patients presented a mean of 54.02 ± 14.92 mg/dL of HDL-c, contrasting with healthy participants that presented 50.53 ± 13.83 mg/dL of this lipoprotein. Likewise, VLDL fraction was of 32.43 ± 17.66 mg/dL in people with PCa opposing with the mean of 29.66 ± 11.64 mg/dL belonging to healthy subjects (Table 1).

Correlations between clinical and biochemical profile

Correlation between continuous variables was determined by Pearson Correlation Coefficient or PCC. PCC is represented by the symbol ρ (rho or r). PCC value

has a value between +1 and -1, where 1 is total positive linear correlation, 0 is no linear correlation, and -1 is total negative linear correlation. The evaluation of categorical variables (e.g. Gleason Score) were determined by means of crosstabulations and estimation by Chi-square test (χ^2) statistics.

When comparing the categories of negative/positive cases of PCa distributed by Gleason score and BMI stratified by normal weight (NW), overweight (OW) and Obese (OB), the differences were significantly strong ($p < .0001$) estimated by χ^2 -test (Figure 1).

Similarly, evidence shows that tumor aggressiveness was correlated with age. Age values were transformed into an ordinal category of five classes of 10 years old each: the first class was of 45 to 54 years old (y.o.), the second of 55 to 64 y.o., and successively until the last class that included all the participants older than 85 years. (Figure 1).

Furthermore, when participants were stratified by normal interval ranges of TT, and divided into three groups named "low", "normal", and "high", strong significantly differences ($p < .0001$) were found when compared to Gleason Score. Lower levels of TT predict higher tumor aggressiveness (Figure 1).

The same approach was followed for several continuous clinical and biochemical variables. Stratification into three groups designated as "low", "normal", and "high" were implemented according to normal ranges of such variable. When Chi-square statistics was executed against each variable in study, it demonstrated strong significant differences with Age and BMI, with several hormones, namely Luteinizing Hormone, Testosterone, Estradiol and Prolactin. Also, significance was found in lipoprotein markers LDL and VLDL (Table 2).

Finally, the several continuous clinical and biochemical variables in study were correlated with each other. All variables were normally distributed and Pearson correlation coefficient (PCC) was determined to all variables two-by-two. The results are summarized in Table 3.

Briefly, tPSA (total prostate specific antigen) was inversely correlated ($p < .05$) with total Testosterone (TT) levels. Likewise, BMI was also strongly inversely correlated with TT levels ($p < .0001$). Another negative correlation with BMI was the association between weight status and the levels of Prolactin ($p < .0001$). Nevertheless, BMI was positively correlated with LH ($p < .05$), HbA1c ($p < .05$) and TAGs ($p < .05$).

With age several hormone and metabolic components of the body are known to be deteriorated.

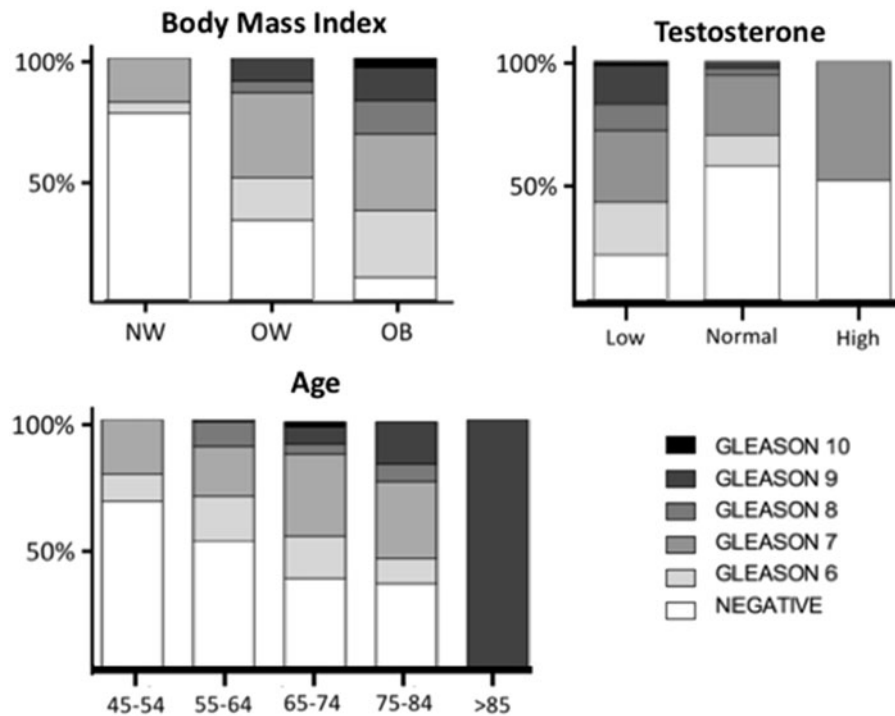


Figure 1. Ponderal profile of Urology patients. More aggressive forms of prostate cancer are associated (χ^2) with overweight and obesity ($p < .0001$). NW: Normal weight; OW: overweight; OB: obesity. Age was also significantly associated ($p < .0001$) to tumor aggressiveness which increases to the age of the patient. Normal levels of testosterone ranging from 2.8–8.0 ng/mL. Inferior and superior levels were considered as low or high respectively. Tumor aggressiveness was significantly ($p < .0001$) associated to low levels of testosterone. Without prostate cancer (white) and with prostate cancer (other colors).

Table 2. Chi-square (χ^2) of Gleason score (tumor aggressiveness) in relation to clinical and biochemical profiles.

Variables (statistics)		Endocrine profile							Metabolic profile					
		Age	BMI	LH	TT	E2	PROL	LEPT	HbA1c	TAG	CHOT	HDL	LDL	VLDL
GLEASON Score	χ^2	255.3**	69.29**	12.26*	92.41**	97.41**	120.01**	8.39	10.7	5.39	8.00	13.34	11.58*	13.20*
	p-value	.000	.000	.031	.000	.000	.000	.136	.058	.370	.152	.205	.041	.014

BMI: Body Mass Index; LH: Luteinizing hormone; TT: Total Testosterone; E2: Estradiol; Prol: Prolactin; Lept: Leptin; HbA1c: Glycated hemoglobin A, fraction 1c; TAG: Triacylglycerols; CHOT: Cholesterol, total fraction; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein. * $p < .05$; ** $p < .001$.

In the present sample of patients with prostate disease, age itself is also associated with increased of LH ($p < .0001$) as well as with decreased TAGs ($p < .05$), CHOT ($p < .0001$) and LDL ($p < .0001$). All outputs of the PCC statistics are summarized in Table 3.

Taking into considerations all data mentioned, we tried to molecularly dissect *in vitro* the role of some parameters that increased aggressiveness of PCa such as BMI and some hormone levels in well established cellular models of prostate cancer, namely using PC3 cell lines. Obviously, BMI can't be mimicked *in vitro*. However, a good cellular alternative is to *in vitro* grow adipocytes and mature them to up take and store lipids and then. At this stage, the adipocyte-secreted molecules such as hormones, cytokines, and adipokines, among others is collected (the all bunch of

adipocyte-secreted molecules are considered as secretome from now on). This is achieved, as mentioned in materials and methods section, by collecting the adipocyte-conditioned medium (aCM) was add it to cancer cells in culture. In the next section of results, we will reveal the effect of aCM on cell growth and aggressiveness on PC3 was well as the effect of testosterone and E2 *in vitro*.

Adipocyte secretome characterization

Numerous growth-factors, adipokines, cytokines, and angiogenesis-related molecules were secreted by mature adipocytes 3T3-L1 in culture (secretome) into the medium. That adipocyte-conditioned medium was collected (aCM), analyzed and used in PCa cells PC3.

Table 3. Pearson Correlations between clinical and biochemical profiles.

TABLE 2 Pearson Correlations between clinical and biochemical profiles.												
Variables (statistics)		Endocrine Profile					Metabolic Profile					
		LH	TT	E2	PROL	LEPT	HbA1c	TAG	CHOT	HDL	LDL	VLDL
PSA	ρ	0.019	−0.212*	0.031	0.008	0.177	0.188	−0.038	0.045	−0.073	0.120	−0.036
	<i>p</i> -value	.850	.032	.753	.934	.074	.057	.704	.648	.463	.226	.720
BMI	ρ	0.183*	−0.323**	0.034	−0.215**	0.308**	0.152*	0.186*	0.128	−0.042	0.058	0.133
	<i>p</i> -value	.014	.000	.650	.001	.000	.042	.012	.086	.577	.440	.075
Age	ρ	0.277**	0.018	−0.055	0.051	0.011	−0.047	−0.154*	−0.248**	0.078	−0.220**	−0.138
	<i>p</i> -value	.000	.816	.463	.504	.889	.534	.041	.001	.301	.003	.068

BMI: Body Mass Index; tPSA– total Prostate Specific Antigen; LH: Luteinizing hormone; TT: Total Testosterone; E2: Estradiol; Prol: Prolactin; Lept: Leptin; Hb A1c: Glycated hemoglobin A, fraction 1c; TAG: Triacylglycerols; CHOT: Cholesterol, total fraction; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; VLDL: Very low-density lipoprotein. * $p < .05$; ** $p < .001$.

The hormonal profile of aCM was of 0.257 ± 0.09 mUI/mL for LH, 0.061 ± 0.004 ng/mL for TT, 227.6 ± 30.4 pg/mL for E2 and 0.047 ± 0.000 for Prolactin. Regarding biochemical profiles, adipocyte secretome was composed by 155.1 ± 27.4 mg/dL of glucose, 102.0 ± 35.4 mg/dL of TAGs and 4.0 ± 1.8 mg/dL of CHOT. Our group has also analyzed extensively the secretome of adipocytes in previous studies [39,40] by proteomic approaches including microarrays. Briefly, it is observed in the secretome increased levels of VEGF, TIMP-1, and endocan that control angiogenesis. Also increased levels of the interleukin (IL) family of cytokines: IL-6, IL-11, and leukemia inhibitory factor (LIF) were also significantly overexpressed as well as monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Adipose tissue hormones were also identified. Resistin and leptin relative expression levels were higher in aCM. Interestingly though, a significant reduction in adiponectin levels was observed in aCM.

Adipocyte-conditioned medium (aCM) increases viability of PC3

The prostate cells PC3 were treated with aCM. The result was an increased metabolic activity when MTT assay was performed. Also, two dose response curves were determined to 5α -dihydrotestosterone (DHT) and to 17β -Estradiol (E2). The half maximal effective concentration (EC_{50}) for such hormones on PC3 cell lines were of 1 nM for DHT and 0.1 nM for 17β -Estradiol.

When compared to control group (PC3 with complete medium), all experimental groups were significantly different ($p < .0001$). Cancer cells submitted *in vitro* to an environment enriched with adipocyte-related secretome (aCM) demonstrate a metabolic activity of 3.21 ± 0.10 times fold when compared to control group. Also, cells growing with DHT 1.0 nM and E2 0.1 nM increased their metabolic activity to 2.98 ± 0.11 times and 2.04 ± 0.22 times, respectively. Likewise, metabolic activity also increased when

compared to control group when aCM was doped with DHT 1.0 nM and E2 0.1 nM to 3.48 ± 0.07 times and 2.98 ± 0.37 , respectively (Figure 2(A)).

The injury assay or wound healing assay is an *in vitro* test that is based in the fact that in culture, cells will invade cell-free territories. Experimentally, the territories are created artificially by removing a group of cells of a confluent culture thus creating an injury or wound. The more rapid the wound is closed, the most aggressive are the cells due their invasion capacity. Prostate cancer cells PC3 in culture 24 h after injury were able to close $11.34 \pm 4.41\%$. However, cell under the effect of the aCM that contains all the growth factors, signaling molecules, cytokines derived from adipose tissue were able to close the wound up to $62.08 \pm 2.43\%$. Likewise, PC3 within the same conditions of control arm but supplemented with DHT 1.0 nM were able to repair the injury up to $79.12 \pm 3.76\%$. Finally, the wound closed $23.75 \pm 8.76\%$. When compared to control, the experimental groups aCM and DHT were significantly different and have increased the rate of wound repair of 5.5 ± 0.55 and 7.0 ± 0.85 times. Also, E2 treated cells also increase 2.0 ± 1.9 fold their injury repair but in a non-significant manner (Figure 2(B)).

Discussion

Among the several known risk factors for PCa, age is one of most important factor. Not only the incidence increases but also aggressiveness is higher. Also, age at the diagnosis is related to worst prognosis. In our Portuguese male population attending to urology consultation the age has strong relation (Figure 1, Table 2) not only with its onset and incidence but also with tumor aggressiveness which agrees with most other studies [41–43]. Thus age has major impact on prognosis, response to the treatments and survival rate [44,45].

Obesity has long been suggested to be implicated in the carcinogenesis of PCa through several molecular

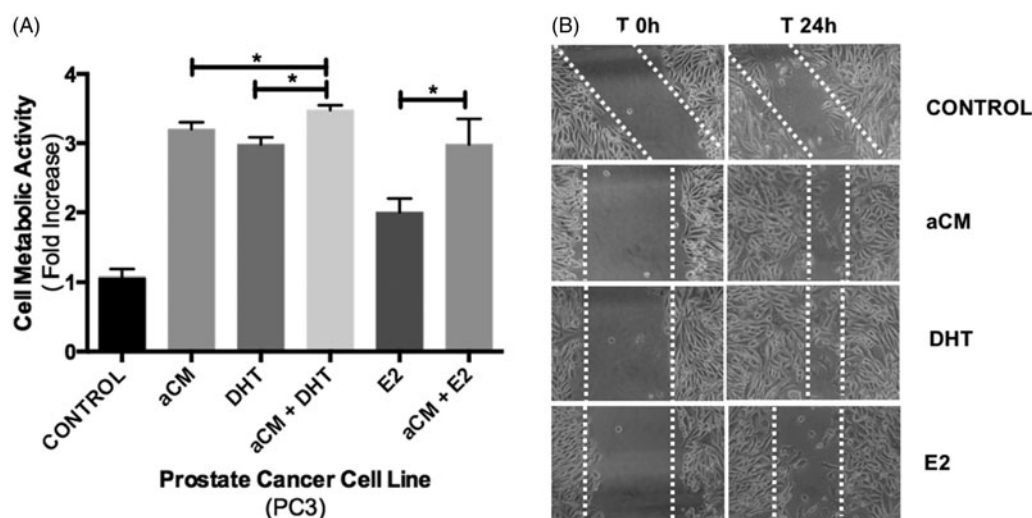


Figure 2. Metabolic activity (A) and Aggressiveness (B) of prostate cancer cells PC3. (A) Metabolic activity was measured with MTT assay (spectrophotometry) by fold increase in relation to the control (PC3 without any treatment). All assays were significantly different by t-test to control group ($p < .0001$). Differences between other groups were indicated by (*) which means $p < .05$. (B) Aggressiveness in vitro was determined by the injury assay. The area was calculated with image J with “Wound Healing Tool” macro and differences were significantly ($p < .0001$) after 24h. aCM: adipocyte-conditioned medium; DHT: 5 α -Dihydrotestosterone; E2:17 β -Estradiol.

pathways that include sexual hormone axis, adipokines biological signaling among other. Regarding obesity and its contribution to PCa in our population, our results show clear evidence that overweight and obesity play a major role on PCa pathogenesis (Figure 1, Table 2). In our population from the North of Portugal, normal weight patients only 22.4% have PCa and the other patients (77.6%) have some kind of benign prostate pathology such as prostatitis or benign hyperplasia. Interestingly, our sample shows higher scores of Gleason scale increased in overweight patients and again in obese patients with a strong significance ($p < .0001$, χ^2). The contribution of BMI in our population is in agreement to the several studies on the subject [3,46–48].

Grosman et al. [49] have discussed the complexity of sexual hormone axis and Prostate cancer. In the particular case of testosterone this gains a new meaning. As aforementioned Muller et al. [24] identified no association of testosterone or DHT with PCa incidence nor Gleason grade. However, other authors, such as Pierorazio et al. [19] no share the same opinion. Kim et al. [50] in a very recent and critical work on the debate of testosterone levels and PCa using big data have found a significant contribution of total Testosterone (TT) on PCa aggressiveness (Gleason Score). This team has described that low levels of TT have direct relationship with Gleason score. However, the implication of TT is not confined to tumor aggressiveness. Levels of TT also correlate independently

with PSA and BMI. In a very interesting recent work, Yassin et al. [51] have found that men receiving testosterone replacement therapy (TRT) reduced the incidence of high risk prostate biopsies [51]. Peskoe et al. [52] have made a nationwide study on this matter and have found a positive correlation between circulating levels of PSA with TT. Otherwise, Aref et al. [53] have evidence circulating levels of PSA correlated inversely with BMI. Our set of results confirm the findings of the authors who share the opinion that low levels of TT correlates with PCa aggressiveness [19,50] (Figure 1, Table 2) and also the findings of Aref et al. [53] since we also found strong significance between low levels of TT and the BMI. However, our results regarding PSA levels and TT we have found an inverse relationship (Table 2) which does not agree with Peskoe et al. study [52]. Nevertheless Rastrelli et al. [54] found that PSA may act as a predictor of testosterone deficiency. In conclusion, low levels of TT correlate with PCa aggressiveness. The low levels of TT may have several causes. The molecular endocrine mechanisms underlying this observation may rely on upstream or downstream hormones, in particular Luteinizing Hormone (LH), at upstream, or estrogens such as 17 β -Estradiol (E2) at downstream.

Measuring serum LH is of help, since the level of this hormone indicates where the failure is located: in the testis if serum LH is high (primary), or at the level of the hypothalamus or pituitary if serum LH is low or normal (secondary). In our sample no relationship was

found between the serum levels of TT and LH ($p = .723$, PCC) although inversely related. However, in our patients, LH increased with BMI. This observation may be justified by androgen receptor insensitivity and/or hypogonadal function due to obesity [21,55–57].

Due to the fact that testosterone is aromatized to E2 within adipocytes and prostate cells, various pre-clinical studies support the assumption that estrogen plays an important role in PC development and progression [58,59]. Our sample also evidence that a direct correlation with TT and E2 ($p < .0001$, PCC) and that levels of E2 are associated with higher scores of Gleason scale, thus indicating its role on PCa aggressiveness. Still, no association was found independently with Age, PSA or BMI.

The physiological role of prolactin in the prostate gland is not clearly understood. It has been associated as a autocrine/paracrine signaling mediator of prostate gland that may act in cancer cells initiation [60,61]. Also, low levels prolactin have associated to metabolic syndrome [62]. In our sample we have found no relation between the two groups of patients (with or without PCa). However, when levels of prolactin were stratified into categories low, normal, and high and compared with Gleason score suggests that low levels of prolactin are related with increase aggressiveness. Also our results show that for this population, the levels of prolactin independently correlate with obesity which is in agreement with the finding of Corona et al. [62].

The scientific evidence regarding relationship between prostate health, androgens and obesity comes mainly through studies from HRT [4,11,56,57,63–65]. We have speculated, accordingly to other several scientists that adipose tissue must be seen as another endocrine organ rather than only a mere energy storage organ [66,67]. Likewise, members of our group have confirmed *in vitro* and *in vivo* in a mouse model the influence of adipocyte secreted adipokines on prostate cells [68]. Regarding *in vitro* experimental assays on PCa cell culture it was possible to confirm the role of sexual hormones and the role of the metabolic environment on tumor cells.

Finally, in what concerns to metabolic profile, there were no significant differences to report with some few exceptions. Triacylglycerols (TAGs) and lipoprotein profile no significant different were found when comparing means of the two groups (patients with and without PCa) nor correlations were found between PSA levels and lipids/lipoproteins. Nevertheless, LDL and VLDL levels were correlated with the increase of PCa aggressiveness. In 2010 Grosman et al. have also

found some associations between lipoproteins and PCa. In their study, researchers found that PCa patients presented lower CHOL and HDL than BPH and Controls [69].

Regarding metabolic environment studies, on human prostate cancer cell PC3 our results resemble those verified by us previously on mice prostate cancer cell RM1. Comparing both findings, adipocyte secretome-enriched conditioned medium (aCM) increased both cancer cell metabolic activity measured by MTT assay. In the same manner, after injury assay, cancer cells under an environment enriched by adipocyte secretome were able to repair the wound more rapidly (Figure 2). The rate of *in vitro* wound healing is a good cellular biomarker of the ability to invade territories. As mentioned before, *in vitro* studies have also evaluated the individual effects of DHT and E2. Metabolic activity of tumor cells also increased with both DHT and E2, but this effect was more expressive in DHT. Also, significant differences were found in the cells submitted to aCM + DHT in comparison to those with aCM or DHT alone (Figure 2(A)). In a different manner significant differences were found between cells treated with aCM + E2 when compared with E2 alone but no significant differences were found between the cells treated with aCM + E2 and aCM alone. Also comparing the patterns of DHT with E2, E2 is not able to reach a grade of response as achieve by TT or aCM alone. These results are in accordance to the observation of wound healing assay, in the sense that, besides E2 be able to reduce the injury more expressively than the control group, the difference is not significant ($p = .673$). Nonetheless, the aCM and DHT repair the injury significantly faster than control group, but under the effect of DHT alone cell can grow even faster than aCM that contains a broad number of signaling molecules and growth factors secreted by adipocytes. The components existing in the aCM may be related to prostate carcinogenesis and aggressiveness, since they are composed by a high number of low-grade inflammatory cytokines, growth factors and enzymes, that not only promote cancer but also its invasiveness. Some of the component are active chemo-attractive macrophage molecules and matrix metalloproteases that opens a path to cancer cell migration as well as angiogenesis [39,68,70,71]. Supporting this theory, we can refer some of adipokines presented in our cellular model. For example, ESM1 (Endothelial Cell-Specific Molecule 1 or endocan) that is found in aCM was referred as correlates with not only with Gleason score but also with the expression of androgen receptor in PCa [72].

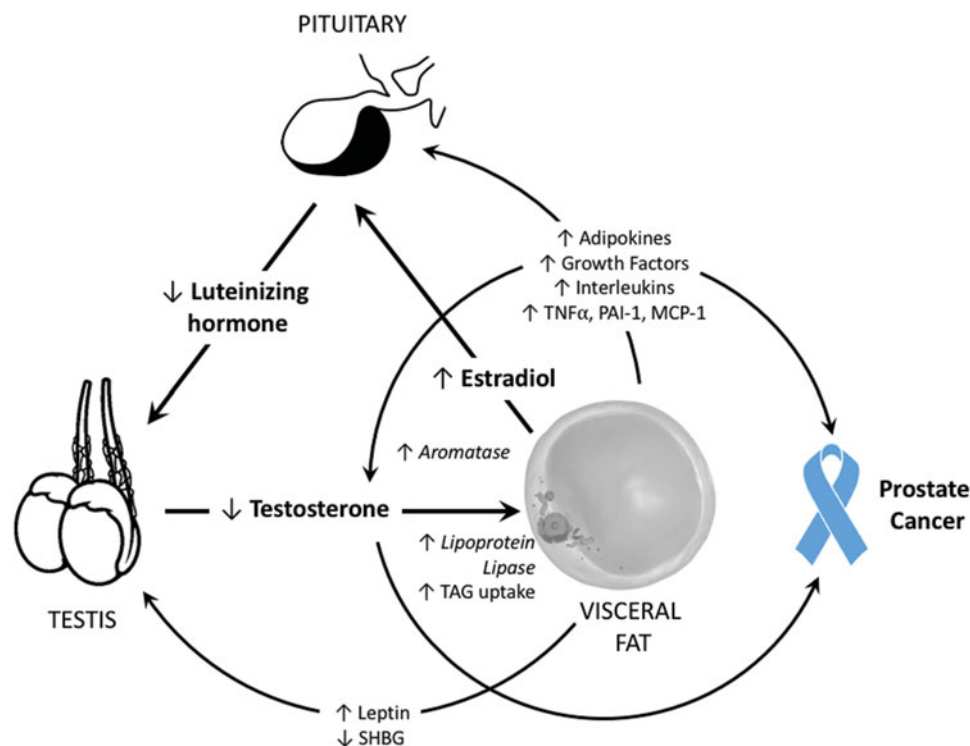


Figure 3. Hypothalamus-pituitary-gonadal axis in obesity and prostate cancer.

Also, our aCM previous proteomic characterization demonstrated high levels of VEGF, TIMP, MCP-1, PAI-1, IL6 among others that have been extensively associated to PCa pathogenesis not only in humans but also *in vitro* [70,73–75]. This cellular model and microarrays may also be used to address the question whether sex hormones such testosterone are responsible for the phenotypic changes of inflammatory cytokines and acute phase markers as it found in PCa patients [69,73,76].

Conclusions

We have demonstrated in the present work that in the North of Portugal, patients with PCa are mainly overweight and obese. In 2015, in this region 2351 patients were diagnosed. One major limitation of this study is the fact that all participants have prostate disease since were recruited in the Urology Department of a major university central hospital from the region. Although all the participants have prostate disease, the differences between the two arms in study gain a more meaningful significance. Thus, differences observed are linked to cancer specifically and not only to a baseline disease of the prostate gland. Also, the several clinical, biochemical, and metabolic alterations that connect prostate cancer and obesity together may be explain mainly by the alteration of sexual endocrine axis involving testosterone upstream and downstream hormones. In brief,

obesity related-hormones and cytokines are responsible for the volume expansion (hyperotrophy) and hyperplasia of both adipocyte and tumor cells. The increase in number of adipose cells increases the activity of aromatase, thus converting testosterone to estrogens (mainly estradiol). Also, adipocytes secrete low-grade inflammatory molecules that, together with increased estradiol are responsible for the decrease of LH reducing even more testosterone levels that also contribute for the pathogenesis of PCa. Besides we have not found significant differences between Leptin and PCa aggressiveness or TT levels we have found significant relation between this hormone and the increase of BMI. Testosterone production by testis are also negatively regulated by Leptin [77,78] thus we may not really exclude their participation in the reduction of testosterone production on testis, based on literature (Figure 3).

Acknowledgements

Fernandes R. on the behalf of the authors deeply acknowledge Prof. Carmen Jerónimo, IPO-Francisco Gentil, Porto/ICBAS-UP, Porto, Portugal by her kindness in providing the PC3 cells.

Ethical statement

This study was approved by the institutional ethics committee of Porto University Hospital Centre. No human cells were

used, other than commercially available cell lines, that require prior ethical approval to the corresponding ethic committees.

Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Notes on contributors

M. F. Duarte has a major on Clinical Analysis and Public Health and is PhD student in Biomedical Sciences. Ms. Duarte is adjunct professor of Clinical Chemistry and Clinical Toxicology at the School of Health of Porto Polytechnic Institute and is the Head Coordinator of Clinical Analysis Technicians at the Porto University Hospital Centre.

C. Luis has a major in Biology and a MSc in Molecular Medicine and Oncology. Ms. Luis is a research technician at Porto Polytechnic Institute and at the unit of Metabolism, Endocrinology and Nutrition I3S – Institute for Research and Innovation in Health, Porto University.

P. Baylina has a major in Chemical Engineering and an MSc in Environment Engineering and PhD in Public Health. Dr. Pilar Baylina is adjunct professor of Quality in Health Systems and Quality in Biotechnology at the School of Health of Porto Polytechnic Institute. She is also founder and CEO of InnoPhage.

M. I. Faria has a major in Radiation Therapy and is PhD student in Molecular Medicine. Ms Faria is adjunct professor and the head of department of Radiotherapy at the School of Health of Porto Polytechnic Institute.

R. Fernandes has a major in Biology and in Anatomic Pathology and holds a PhD in Biology and habilitation in Biomedicine. Dr Fernandes is adjunct professor of Clinical Biochemistry, Molecular Diagnostics, among others, at the School of Health of Porto Polytechnic Institute. Dr. Fernandes is also senior researcher at the unit of Metabolism, Endocrinology and Nutrition at i3S.

J. M. La Fuente has a MD in Medicine and holds a PhD and habilitation in Medicine. Professor La Fuente is full professor of Medicine-Urology at Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, Porto University. Prof. La Fuente is a medical doctor at the Urology Department of the Porto University Hospital Centre.

ORCID

P. Baylina  <http://orcid.org/0000-0002-3740-862X>

R. Fernandes  <http://orcid.org/0000-0001-8933-3984>

References

- [1] GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: prostate cancer.
- [2] Castro C, Antunes L, Lunet N, et al. Cancer incidence predictions in the North of Portugal: keeping

- population-based cancer registration up to date. *Eur J Cancer Prev.* 2016;25:472–480.
- [3] Parikesit D, Mochtar CA, Umbas R, et al. The impact of obesity towards prostate diseases. *Prostate Int.* 2016;4:1–6.
- [4] Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. *Obes Rev.* 2015;16:581–606.
- [5] Fui MNT, Dupuis P, Grossmann M. Lowered testosterone in male obesity: mechanisms, morbidity and management. *Asian J Androl.* 2014;16:223–231.
- [6] Khera M, Crawford D, Morales A, et al. A new era of testosterone and prostate cancer: from physiology to clinical implications. *Eur Urol.* 2014;65:115–123.
- [7] Klap J, Schmid M, Loughlin KR. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: a review of the continuing controversy. *J Urol.* 2015; 193:403–414.
- [8] Molina-Vega M, Muñoz-Garach A, Damas-Fuentes M, et al. Secondary male hypogonadism: a prevalent but overlooked comorbidity of obesity. *Asian J Androl.* 2018.
- [9] Mah PM, Wittert GA. Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316:180–186.
- [10] Jones TH. Effects of testosterone on type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome. *J Diabetes.* 2010;2:146–156.
- [11] Yassin AA, Saad F, Gooren LJ. Metabolic syndrome, testosterone deficiency and erectile dysfunction never come alone. *Andrologia.* 2008;40:259–264.
- [12] Faydaci G, Bilal E, Necmettin P, et al. Baldness, benign prostate hyperplasia, prostate cancer and androgen levels. *Aging Male.* 2008;11:189–192.
- [13] Wong SK, Mohamad N-V, Jayusman PA, et al. The use of selective estrogen receptor modulators on bone health in men. *Aging Male.* 2018;1–13.
- [14] Lunenfeld B, Arver S, Moncada I, et al. How to help the aging male? Current approaches to hypogonadism in primary care. *Aging Male.* 2012;15:187–197.
- [15] Lunenfeld B, Mskhalaya G, Zitzmann M, et al. Recommendations on the diagnosis, treatment and monitoring of hypogonadism in men. *Aging Male.* 2015;18:5–15.
- [16] Yassin D-J, Doros G, Hammerer PG, et al. Long-term testosterone treatment in elderly men with hypogonadism and erectile dysfunction reduces obesity parameters and improves metabolic syndrome and health-related quality of life. *J Sex Med.* 2014;11: 1567–1576.
- [17] Ebert T. Clinical experiences with testosterone therapy: prostate safety. *Aging Male.* 2004;7:304–311.
- [18] Morgentaler A, Zitzmann M, Traish AM, et al. International expert consensus conference on testosterone deficiency and its treatment held in Prague, Czech Republic. *Aging Male.* 2015;18:205–206.
- [19] Pierorazio PM, Ferrucci L, Kettermann A, et al. Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore longitudinal study of aging. *BJU Int.* 2010;105:824–829.
- [20] D'Amico AV, Moul JW, Carroll PR, et al. Surrogate end point for prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy or radiation therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1376–1383.

- [21] Morgentaler A, Rhoden EL. Prevalence of prostate cancer among hypogonadal men with prostate-specific antigen levels of 4.0 ng/mL or less. *Urology*. 2006;68:1263–1267.
- [22] Shin BS, Hwang EC, Im CM, et al. Is a decreased serum testosterone level a risk factor for prostate cancer? A cohort study of Korean men. *Korean J Urol*. 2010;51:819.
- [23] Musquera M, Fleshner NE, Finelli A, et al. The reduce trial: chemoprevention in prostate cancer using a dual 5 α -reductase inhibitor, dutasteride. *Exp Rev Anticancer Ther*. 2008;8:1073–1079.
- [24] Muller RL, Gerber L, Moreira DM, et al. Serum testosterone and dihydrotestosterone and prostate cancer risk in the placebo arm of the reduction by dutasteride of prostate cancer events trial. *Eur Urol*. 2012;62:757–764.
- [25] Paul Chubb SA, Hyde Z, Almeida OP, et al. Lower sex hormone-binding globulin is more strongly associated with metabolic syndrome than lower total testosterone in older men: the Health in Men Study. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:785–792.
- [26] American Association for Cancer Research. S, International Cancer Research Foundation. Y, William H, Donner Foundation A, Hryb D, et al. Cancer research: the official organ of the American Association for Cancer Research, Inc. Vol. 68. Cancer Research. Waverly Press; 2008. 1230–1230 p.
- [27] Santeusano F. Hypogonadism and the metabolic syndrome in men: an association to be considered. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18:253–255.
- [28] Golan R, Scovell JM, Ramasamy R. Age-related testosterone decline is due to waning of both testicular and hypothalamic-pituitary function. *Aging Male*. 2015;18:201–204.
- [29] Li H, Pham T, McWhinney BC, et al. Sex hormone binding globulin modifies testosterone action and metabolism in prostate cancer cells. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1–10.
- [30] Kahn SM, Li Y-H, Hryb DJ, et al. Sex hormone-binding globulin influences gene expression of LNCaP and MCF-7 cells in response to androgen and estrogen treatment. *Adv Exp Med Biol*. 2008;557–564.
- [31] Haidar A, Yassin A, Saad F, et al. Effects of androgen deprivation on glycaemic control and on cardiovascular biochemical risk factors in men with advanced prostate cancer with diabetes. *Aging Male*. 2007;10:189–196.
- [32] Haring R, Völzke H, Felix SB, et al. Prediction of metabolic syndrome by low serum testosterone levels in men: results from the study of health in Pomerania. *Diabetes*. 2009;58:2027–2031.
- [33] Kupelian V, Hayes FJ, Link CL, et al. Inverse association of testosterone and the metabolic syndrome in men is consistent across race and ethnic groups. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3403–3410.
- [34] Blaya R, Thomaz LDGR, Guilhermano F, et al. Total testosterone levels are correlated to metabolic syndrome components. *Aging Male*. 2016;19:85–89.
- [35] Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18:529.
- [36] Faul F, Erdfelder E, Buchner A, et al. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41:1149–1160.
- [37] Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175–191.
- [38] Bolyakov A, Paduch DA. Prolactin in men's health and disease. *Curr Opin Urol*. 2011;21:527–534.
- [39] Coelho P, Almeida J, Prudêncio C, et al. Effect of adipocyte secretome in melanoma progression and vasculogenic mimicry. *J Cell Biochem*. 2016;117:1697–1706.
- [40] Coelho P, Silva L, Faria I, et al. Adipocyte secretome increases radioresistance of malignant melanocytes by improving cell survival and decreasing oxidative status. *Radiat Res*. 2017;187:581–588.
- [41] Pettersson A, Robinson D, Garmo H, et al. Age at diagnosis and prostate cancer treatment and prognosis: a population-based cohort study. *Ann Oncol*. 2018;29:377–385.
- [42] Leitzmann M, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol*. 2012;4:1.
- [43] Bellier A, Colonna M, Delafosse P, et al. Incidence of prostate cancer and net survival by grade in a geriatric population: a population-based study in a French administrative entity from 1991 to 2013. *Cancer Epidemiol*. 2018;56:60–66.
- [44] Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol*. 2011;29:235–241.
- [45] Duchesne GM, Woo HH, Bassett JK, et al. Timing of androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer with a rising PSA (TROC 03.06 and VCOG PR 01-03 [TOAD]): a randomised, multicentre, non-blinded, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:727–737.
- [46] Perez-Cornago A, Appleby PN, Pischon T, et al. Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: results from the EPIC cohort study. *BMC Med*. 2017;15:115.
- [47] Bandini M, Gandaglia G, Briganti A. Obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2017;27:415–421.
- [48] Vidal AC, Freedland SJ. Obesity and prostate cancer: a focused update on active surveillance, race, and molecular subtyping. *Eur Urol*. 2017;72:78–83.
- [49] Grosman H, Fabre B, Lopez M, et al. Complex relationship between sex hormones, insulin resistance and leptin in men with and without prostatic disease. *Aging Male*. 2016;19:40–45.
- [50] Kim M, Kim JW, Kim JK, et al. Association between serum levels of insulin-like growth factor-1, bioavailable testosterone, and pathologic Gleason score. *Cancer Med*. 2018.
- [51] Yassin A, Salman M, Talib RA, et al. Is there a protective role of testosterone against high-grade prostate cancer? Incidence and severity of prostate cancer in 553 patients who underwent prostate biopsy: a prospective data register. *Aging Male*. 2017;20:125–133.
- [52] Peskoe SB, Joshu CE, Rohrmann S, et al. Circulating total testosterone and PSA concentrations in a

- nationally representative sample of men without a diagnosis of prostate cancer. *Prostate*. 2015;75:1167–1176.
- [53] Aref A, Vincent AD, O'Callaghan M, et al. The inverse relationship between prostate-specific antigen (PSA) and obesity. *Endocrine-Related Cancer* 2018;ERC-17-0438.
- [54] Rastrelli G, Corona G, Vignozzi L, et al. Serum PSA as a predictor of testosterone deficiency. *J Sex Med*. 2013;10:2518–2528.
- [55] Yu I-C, Lin H-Y, Sparks JD, et al. Androgen receptor roles in insulin resistance and obesity in males: the linkage of androgen-deprivation therapy to metabolic syndrome. *Diabetes*. 2014;63:3180–3188.
- [56] Canguven O, Talib RA, El Ansari W, et al. Testosterone therapy has positive effects on anthropometric measures, metabolic syndrome components (obesity, lipid profile, Diabetes Mellitus control), blood indices, liver enzymes, and prostate health indicators in elderly hypogonadal men. *Andrologia*. 2017;49:e12768.
- [57] Yassin A, Nettleship JE, Talib RA, et al. Effects of testosterone replacement therapy withdrawal and re-treatment in hypogonadal elderly men upon obesity, voiding function and prostate safety parameters. *Aging Male*. 2016;19:64–69.
- [58] Bonkhoff H. Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate*. 2018;78:2–10.
- [59] Machioka K, Mizokami A, Yamaguchi Y, et al. Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells. *Anticancer Res*. 2015;35:221–227.
- [60] Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M, et al. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:245–250.
- [61] Sackmann-Sala L, Goffin V. Prolactin-induced prostate tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 221–242.
- [62] Corona G, Wu FC, Rastrelli G, et al. low prolactin is associated with sexual dysfunction and psychological or metabolic disturbances in middle-aged and elderly men: the european male aging study (EMAS). *J Sex Med*. 2014;11:240–253.
- [63] Efesoy O, Apa D, Tek M, et al. The effect of testosterone treatment on prostate histology and apoptosis in men with late-onset hypogonadism. *Aging Male*. 2016;19:79–84.
- [64] Boxer RS, Kenny AM, Dowsett R, et al. The effect of 6 months of androgen deprivation therapy on muscle and fat mass in older men with localized prostate cancer. *Aging Male*. 2005;8:207–212.
- [65] Urushima H, Inomata-Kurashiki Y, Nishimura K, et al. The effects of androgen deprivation therapy with weight management on serum aP2 and adiponectin levels in prostate cancer patients. *Aging Male*. 2015; 18:72–76.
- [66] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548–2556.
- [67] Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9:191–200.
- [68] Moreira Â, Pereira SS, Costa M, et al. Adipocyte secreted factors enhance aggressiveness of prostate carcinoma cells. *Plos One*. 2015;10:e0123217.
- [69] Grosman H, Fabre B, Mesch V, et al. Lipoproteins, sex hormones and inflammatory markers in association with prostate cancer. *Aging Male*. 2010;13:87–92.
- [70] Gucalp A, Iyengar NM, Zhou XK, et al. Periprostatic adipose inflammation is associated with high-grade prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2017; 20:418–423.
- [71] Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012; 31:32.
- [72] Lai C-Y, Chen C-M, Hsu W-H, et al. Overexpression of endothelial cell-specific molecule 1 correlates with Gleason score and expression of androgen receptor in prostate carcinoma. *Int J Med Sci*. 2017;14: 1263–1267.
- [73] Mohamad N-V, Wong SK, Wan Hasan WN, et al. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male*. 2018; 1–12.
- [74] Price RS, Cavazos DA, De Angel RE, et al. Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012;15:135–143.
- [75] Cicco C, Ravasi L, Zorzino L, et al. Circulating levels of VCAM and MMP-2 may help identify patients with more aggressive prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:199–206.
- [76] Shigehara K, Konaka H, Ijima M, et al. The correlation between highly sensitive C-reactive protein levels and erectile function among men with late-onset hypogonadism. *Aging Male*. 2016;19:239–243.
- [77] Zhao J, Zhai L, Liu Z, et al. Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1–14.
- [78] Landry D, Cloutier F, Martin LJ. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reproduc Biol*. 2013;13:1–14.