

MODULAÇÃO DA VIA IRS/PI3K/AKT/mTOR EM MODELO EXPERIMENTAL PRÉ-CLÍNICO DE TUMOR PROSTÁTICO SUBMETIDO A DIETA HIPERLIPÍDICA.

RESUMO

Doenças como Obesidade, Diabetes Mellitus e Síndrome Metabólica, consideradas “epidemias do mundo moderno”, são epidemiologicamente relacionadas ao aumento da predisposição de alguns cânceres, aumento da agressividade de outros e apresentam em comum o estado de hiperinsulinemia. Neste contexto, uma das principais vias de sinalização associadas à carcinogênese, a via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR, é também a principal via de sinalização usada pela insulina para atingir seus efeitos metabólicos. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos no aumento da agressividade do câncer de próstata em indivíduos hiperinsulinêmicos são amplamente desconhecidos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da hiperinsulinemia no crescimento tumoral e caracterizar sistematicamente a ativação da via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR em enxertos tumorais de células PC-3 em camundongos SCID. Os resultados obtidos mostram que os camundongos SCID com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica apresentaram maior crescimento tumoral comparado ao grupo controle. Paralelamente, observamos aumento da fosforilação do IRS-1, da associação IRS-1/PI3K, fosforilação da Akt e atividade da mTOR nos enxertos de PC-3 antes e após tratamento agudo com insulina nos animais submetidos a dieta hiperlipídica, em contraste os animais tratados com dieta hiperlipídica a ativação dessa via de sinalização estava reduzida em tecidos classicamente envolvidos na sensibilidade periférica à insulina (fígado e músculo).

Nossos dados demonstram que a via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR direciona os sinais metabólicos ao crescimento tumoral e sugerem que o aumento da ativação dessa via de sinalização está envolvido no aumento da agressividade dos tumores de próstata em situações de hiperinsulinemia.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos da última década apontam a Obesidade como importante condição predisponente a maior morbidade e mortalidade (WHO Obesity and overweight, 2003). A prevalência da obesidade vem aumentando em curtos períodos de tempo em países desenvolvidos bem como nos países em desenvolvimento (Kopelman 2000). O câncer de próstata é o mais prevalente em homens, com uma estimativa de 1,5 milhão com diagnóstico nos últimos cinco anos e, de acordo com as estimativas de incidência de câncer no Brasil para 2006, a doença será a segunda mais incidente neste grupo, com 47.280 casos (INCA, 2006).

A Obesidade, o Diabetes Mellitus e a Síndrome Metabólica são estados associados à hiperinsulinemia e o aumento do nível de insulina plasmática tem sido relacionado com o aumento do risco de desenvolver o câncer de próstata e com seu estágio (Von Hafe *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004).

A via IRS/PI3K/Akt/mTOR, a principal via de sinalização da insulina, recentemente vem sendo relacionada à carcinogênese e à progressão em diversos tipos de cânceres. Portanto, a relação entre o Câncer de Próstata e Diabetes, Obesidade e Síndrome Metabólica pode ser devido a ação, em nível molecular, da hiperinsulinemia e a investigação de sua participação é relevante a medida que propicia o entendimento da fisiopatologia molecular de tumores prostáticos facilitando o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas no câncer prostático.

O presente trabalho tem como objetivo investigar a atuação da insulina em tumores prostáticos derivados de células PC-3 através da análise da atividade da via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR. Além disso, comparamos a diferença no crescimento tumoral entre camundongos normais e hiperinsulinêmicos e caracterizamos a ativação da via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR no tecido tumoral de camundongos normais e de camundongos obesos induzidos por dieta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos *in vivo*, escolhemos como modelo a linhagem de camundongos SCID (*Severe combined immunodeficiency*), animais que apresentam deficiência espontânea da produção de células T e B devido à falhas na recombinação V(D)J. Este modelo aceita facilmente xenoinxertos, incluindo de células tumorais humanas (Reddy et al., 1987), sendo eficaz para realização de experimentos que envolvem tratamento para câncer e amplamente utilizado no meio científico e pela equipe do Laboratório de Oncologia Molecular da UNICAMP.

Os animais foram divididos em dois grupos e alimentados diferentemente. Um dos grupos recebeu dieta hiperlipídica (proteína, 20%; carboidrato, 35%; lipídio, 45%) e o outro grupo foi mantido em dieta padrão (proteína, 20%; carboidrato, 70%; lipídio, 10%). Cada grupo permaneceu em dieta por oito semanas antes da realização do Teste de Tolerância à Insulina (ITT).

Para o ITT, os camundongos foram submetidos a jejum de seis horas e receberam injeção intraperitoneal de insulina regular (1,5 UI/kg de peso corporal). Para determinação da glicose plasmática foi coletado sangue nos tempos 0', 5', 10', 15', 20', 25' e 30'.

Após o teste de tolerância a insulina os animais foram inoculados SC na região dorsal com aproximadamente 10^6 células de adenocarcinoma de próstata PC-3. Os tumores foram medidos diariamente após o surgimento. Aproximadamente 20 dias após o surgimento dos tumores, foi realizada a extração dos mesmos.

Para a extração, os animais foram anestesiados com Tiopental (50mg/kg) intraperitonealmente, e depois foram realizadas as cirurgias para retirada de fragmentos do fígado, do músculo gastrocnêmio e do tumor dos animais. Alguns animais de cada grupo foram ainda infundidos com insulina ou solução salina (controle) na veia cava antes de realizarmos a extração dos órgãos.

O material extraído foi colocado em tampão de extração (100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fenilmetilsulfonilfluorido e 0.1 mg/ml aprotinina) e homogeneizado com Politron PTA 20S Generator, Brinkmann Instruments model PT 10/35, ajustado à velocidade máxima. Após a homogeneização, foi acrescentado 1% Triton X-100.

A verificação da fosforilação e atividade das proteínas foi realizada através de *immunoblotting* (eletroforese em gel de poliacrilamida, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, marcação com anticorpos específicos e análise de autoradiografias).

RESULTADOS

1. Comparação entre o tempo de crescimento tumoral após inoculação das células PC-3 e entre os volumes dos tumores de animais mantidos em dieta padrão e de animais submetidos a dieta hiperlipídica.

A fim de verificarmos a situação da via IRS/PI3K/Akt/mTOR, camundongos machos SCID foram submetidos ao tratamento com dieta hiperlipídica (proteína, 20%; carboidrato, 35%; lipídio, 45%) e comparados com animais mantidos em dieta padrão (proteína, 20%; carboidrato, 70%; lipídio, 10%), o tratamento com dieta hiperlipídica resultou em resistência à insulina (Figura 1) e os animais que consumiram a dieta hiperlipídica por um período de oito semanas apresentaram concentração sérica de leptina três a quatro vezes maior que animais mantidos em dieta padrão ($P < 0,05$, $n=5$) (Figura 2).

Verificou-se que nos animais resistentes à insulina o índice de crescimento do tumor após inoculação foi de 100%, enquanto que nos animais controle esse índice foi de apenas 50% ($P < 0,001$). Além disso, durante as medições diárias, é possível observar que nos animais resistentes à insulina há maior proliferação das células tumorais, resultando em aumento acelerado do volume tumoral em comparação com os animais em dieta padrão (Figura 3).

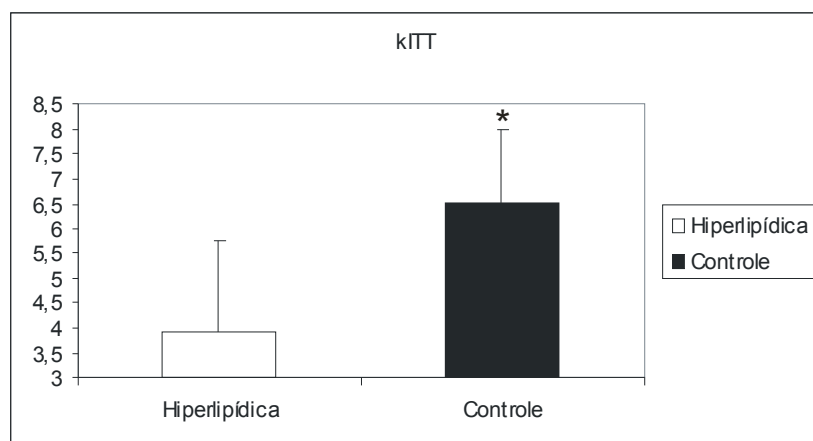


Figura 1. Caracterização de resistência à insulina através do kITT ($n=10$)

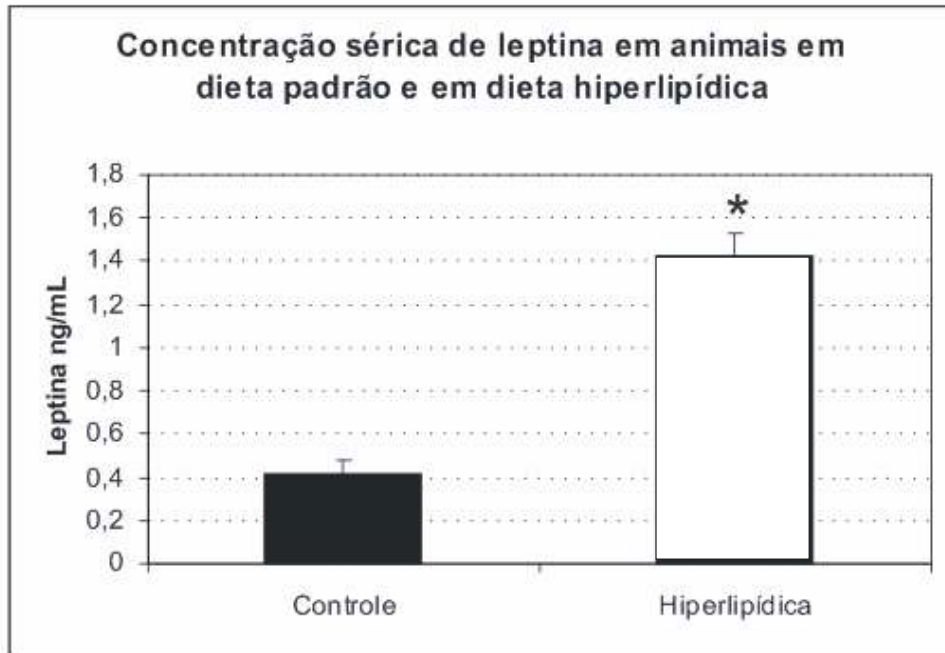


Figura 2. Gráfico de comparação entre a concentração sérica de leptina de animais em dieta padrão (Controle) e de animais submetidos à dieta hiperlipídica (Hiperlipídica) (n=5)

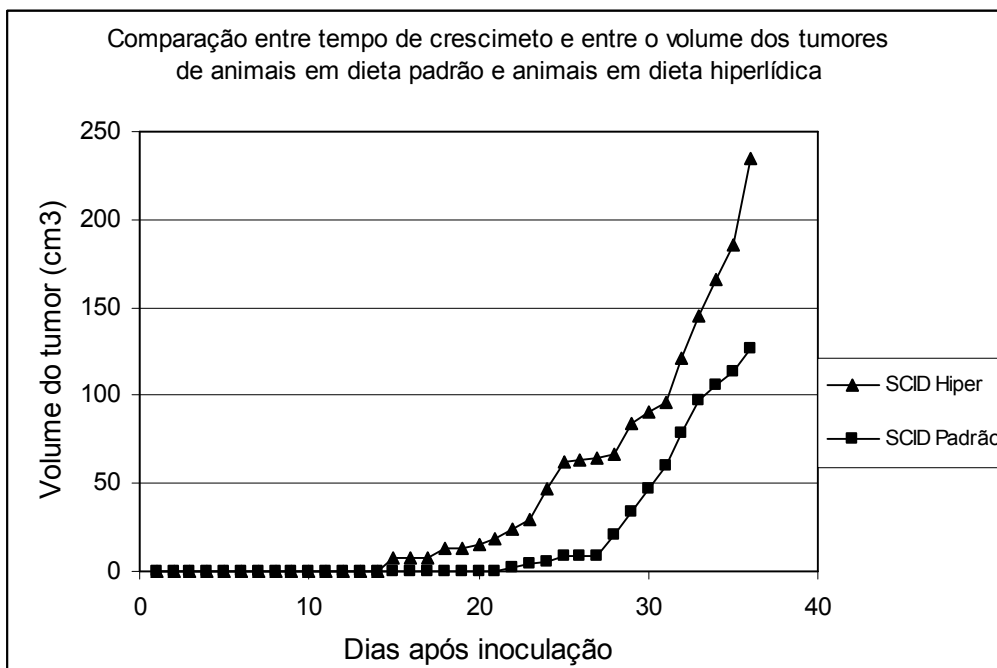


Figura 3. Gráfico de comparação entre o tempo de crescimento e entre os volumes dos tumores de animais em dieta padrão (SCID Padrão) e de animais submetidos à dieta hiperlipídica (SCID Hiper) (n=10).

2. Efeito da dieta hiperlipídica na fosforilação em Tirosina dos receptores de insulina (IR).

Como mostrado na **figura 4** é possível observar a fosforilação dos resíduos de tirosina do IR nas amostras de tumor dos animais controle que receberam ou não infusão de insulina. O mesmo resultado é verificado nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. É possível verificar também uma maior atividade das proteínas IR nos animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparados a animais em dieta padrão quando ambos se encontram nas mesmas condições de presença aguda ou não do hormônio.

Nas amostras de fígado e de músculo, a fosforilação em tirosina do IR foi verificada nos animais controle que sofreram a infusão, mas não nos animais que não receberam o hormônio. Já em relação aos animais em dieta hiperlipídica, a fosforilação é observada tanto nos camundongos que receberam a insulina quanto nos camundongos que não receberam o hormônio. É possível perceber que na taxa basal, a atividade do IR é maior em animais submetidos à dieta hiperlipídica, entretanto não observamos aumento da fosforilação do receptor de insulina após estímulo insulínico.

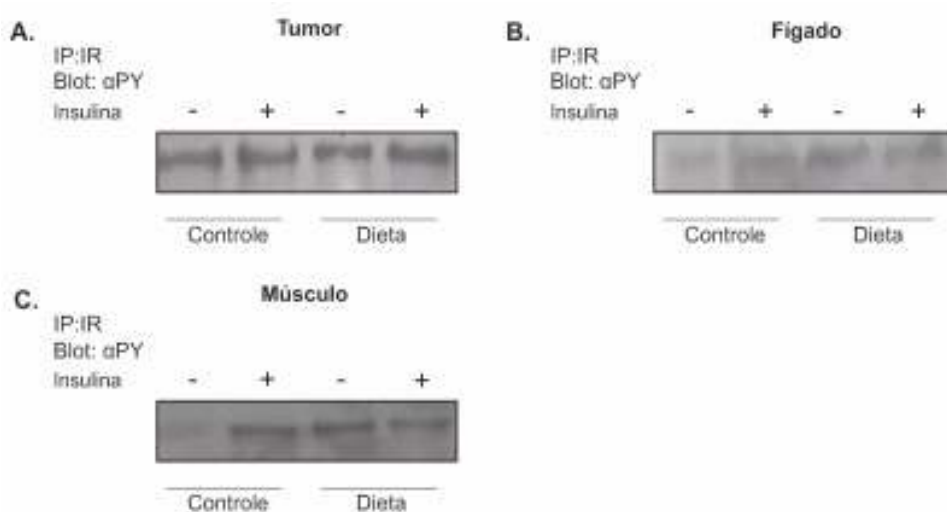


Figura 4. Análise da atividade da proteína IR em (A) tumor, (B) fígado e (C) músculo de animais controle e submetidos à dieta hiperlipídica, após infusão ou não de insulina (n=2).

3. Efeito da dieta hiperlipídica na fosforilação dos resíduos de Tirosina do IRS-1.

A fosforilação dos resíduos de tirosina do IRS-1 (Figura 5) foi observada nas amostras tumorais de todos os animais. Entretanto, é possível observar que nos animais em dieta hiperlipídica há uma maior ativação basal das proteínas IRS-1 quando comparados aos animais em dieta padrão. No tecido tumoral a dieta hiperlipídica não interferiu com a ação aguda da insulina, ou seja, a fosforilação do IRS-1 aumentou com o tratamento agudo com insulina. Por outro lado, observamos uma redução da capacidade do tratamento agudo com insulina de ativar o IRS-1 em tecido hepático e muscular, indicando assim que a via IRS/PI3K/Akt/mTOR se encontra ativada em situação de hiperinsulinemia. Esses achados são congruentes com o resultado do ITT.

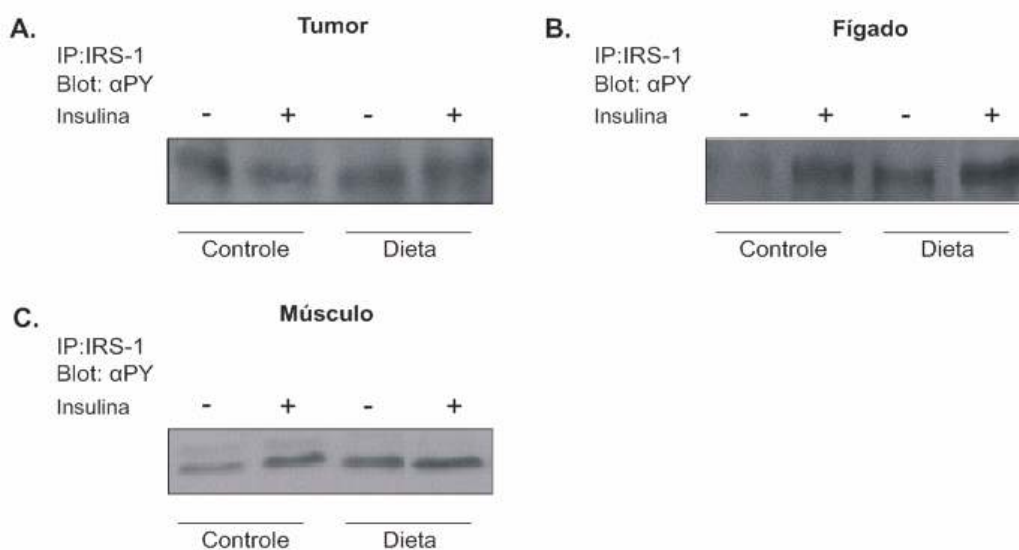


Figura 5. Análise da atividade da proteína IRS-1 em (A) tumor, (B) fígado e (C) músculo de animais controle e submetidos à dieta hiperlipídica, após infusão ou não de insulina (n=2).

4. Efeito da dieta hiperlipídica na fosforilação em Serina da Akt.

A fosforilação do resíduo Ser473 da Akt foi detectada em todas as amostras de tumores dos animais, sendo que estas se encontravam mais ativas nas amostras de

animais submetidos à dieta hiperlipídica no tecido tumoral e hepático (figura 6). No painel à esquerda da **figura 6** podemos observar que o tratamento com dieta hiperlipídica resultou em aumento da fosforilação da Akt nos enxertos da PC-3 tanto no estado basal como após estímulo insulínico, demonstrando a manutenção da atividade insulínica em direção ao crescimento tumoral mesmo em animais resistentes à insulina. Apesar da ineficiência da infusão de insulina em aumentar a fosforilação do IR e IRS-1 nós observamos aumento da atividade da Akt no fígado de animais tratados com dieta hiperlipídica e estimulados com insulina (figura 6 – painel a direita).

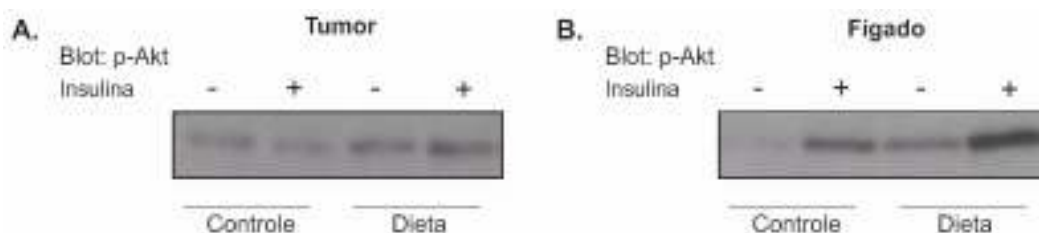


Figura 6. Análise da atividade da proteína Akt em (A) tumor e (B) fígado de animais controle e submetidos à dieta hiperlipídica, após infusão ou não de insulina (n=2).

6. Efeito da dieta hiperlipídica na fosforilação em treonina da p70S6K

A fosforilação do resíduo Thr389 da p70S6K foi observada em todas as amostras de tumores dos animais, em dieta padrão ou em dieta hiperlipídica e infundidos ou não com insulina. A quantidade de proteínas fosforiladas é maior nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, e é semelhante tanto para os animais que sofreram estímulo agudo de insulina quanto para os animais que não foram infundidos com o hormônio.

Além disso, é possível observar maior fosforilação da proteína p70S6K no estado basal para os animais em dieta hiperlipídica quando comparados com os animais mantidos em dieta padrão, indicando a maior atividade que esta proteína possui em animais resistentes à insulina. Isso pode levar a um maior crescimento e aumento de

proliferação celular, como o evidenciado pela diferença na velocidade de crescimento e no tamanho dos enxertos nos animais.

No tecido hepático, observamos uma maior fosforilação do resíduo Thr389 da p70S6K quando há maior quantidade de insulina. Esse fato se evidencia ainda mais quando comparamos a atividade da proteína dos animais em diferentes dietas (padrão e hiperlipídica) no estado basal, onde podemos verificar que os animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentam uma maior atividade da p70S6K.

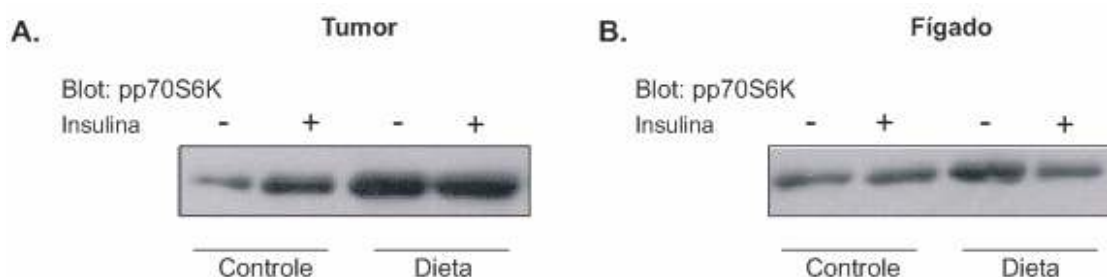


Figura 7. Análise da atividade da proteína p70S6K em (A) tumor e (B) fígado de animais controle e submetidos à dieta hiperlipídica, após infusão ou não de insulina (n=2).

Experimentos *in vitro*

As células da linhagem de adenocarcinoma de próstata PC-3 foram adquiridas da *American type culture collection* (ATCC), Filadélfia, PA, USA. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), e mantidas à 37°C em atmosfera úmida de 5% CO₂.

Para realização do experimento *in vitro*, foram plaqueadas aproximadamente 10⁶ células PC-3 em placas contendo 10ml de RPMI não suplementado. Essas células foram expostas por 24 horas a concentrações crescentes de insulina (0 nM, 10 nM, 10² nM e 10³ nM), sendo posteriormente submetidas a um segundo tratamento agudo com 1μM

de insulina por 10 minutos (Pirola,2003). As placas que sofreram apenas estímulo crônico não receberam a segunda dose de insulina.

1. Efeito da insulina em células PC-3 in vitro na fosforilação em serina da Akt.

A fosforilação do resíduo Ser473 da Akt foi detectada em todas as amostras de células para as diferentes concentrações de insulina (Figura 8.A e 8.B). Nas células sob efeito do tratamento crônico observamos um aumento da fosforilação do resíduo Ser473 da Akt dependente da dose, onde a maior fosforilação da proteína é encontrada na maior dose recebida do hormônio.

A resposta da fosforilação em Ser 473 da Akt a uma exposição de 10 minutos a uma dose de 1µM de insulina foi diminuída e apresentou-se dependente de dose em células sujeitas a um pré-tratamento com insulina por 24 horas, indicando dessensibilização da via de sinalização da insulina.

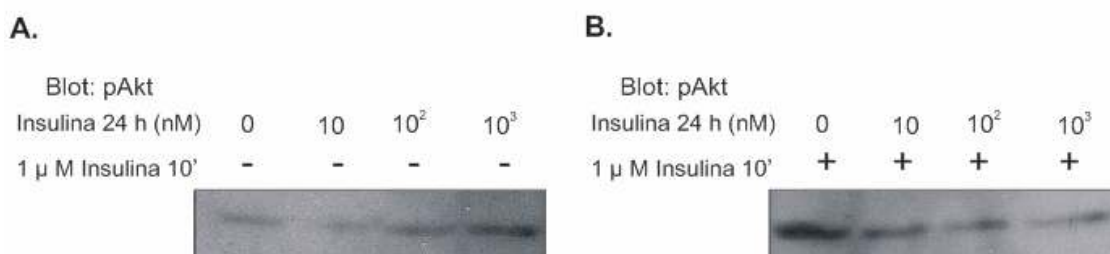


Figura 8. Análise da atividade da proteína pAkt em células PC-3 após tratamento crônico de insulina em concentrações de 0 nM, 10 nM, 10² nM e 10³ nM (A) e tratamento crônico, com as mesmas concentrações de 0 nM, 10 nM, 10² nM e 10³ nM e posterior tratamento agudo com 1 µM de insulina (B).

Para verificarmos o efeito da insulina na proteína mTOR, verificamos a atividade de proteínas fosforiladas pela mTOR, como a p70S6K, que é fosforilada e ativada pela mTOR e a 4EBP-1, que é fosforilada e inativada pela mTOR. A fosforilação de ambas as proteínas a jusante da mTOR gera um aumento na síntese protéica das células através

da produção de mRNA, resultando em aumento no tamanho celular e proliferação (Sarbasov et al., 2005).

2. Efeito da insulina em células PC-3 *in vitro* na fosforilação em treonina de p70S6K

A fosforilação do resíduo Thr389 p70S6K foi detectada em todas as amostras de células para as diferentes concentrações de insulina para o tratamento agudo (Figura 9.A e 9.B).

Nas células sob efeito do tratamento crônico observamos um pequeno aumento da fosforilação do resíduo Thr389 p70S6K dependente da dose a que estavam submetidos, com maior fosforilação detectada na concentração de 10^3 nM.

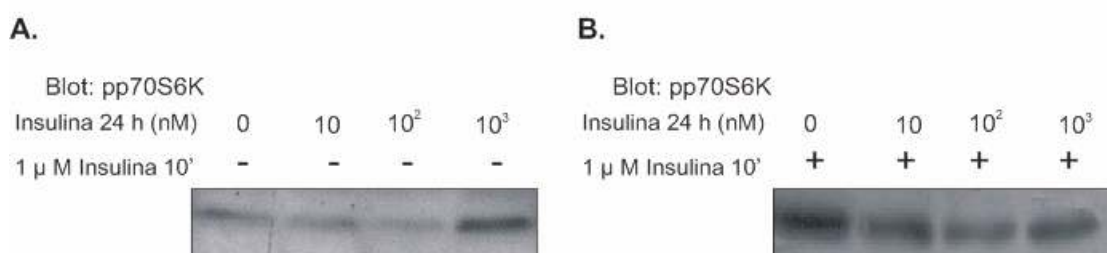


Figura 9. Análise da atividade da proteína pp70S6K em células PC-3 após tratamento crônico de insulina em concentrações de 0 nM, 10 nM, 10^2 nM e 10^3 nM (A) e tratamento crônico, com as mesmas concentrações de 0 nM, 10 nM, 10^2 nM e 10^3 nM e posterior tratamento agudo com $1 \mu\text{M}$ de insulina (B).

A ativação da Akt em nossos experimentos foi semelhante àquela encontrada por Pirola et al. (2003) que indica que a ativação da Akt foi paralela a atividade da associação da IRS-1 com a PI3K em todas as condições testadas. Assim como, a ativação da p70S6K mostrou um padrão de ativação similar ao da Akt (Pirola et al., 2003).

A correlação entre atividade da associação IRS-1 com PI3K e os níveis de ativação observados em Akt e p70S6K indicam que a atividade da associação de IRS-1 com PI3K assemelha-se a atividade da PI3K *in vivo* (Pirola et al., 2003).

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra uma correlação positiva entre Obesidade e crescimento tumoral. Animais obesos apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de tumor palpável após a inoculação SC de células tumorais quando comparados com camundongos controle. A média do tamanho do tumor foi maior nos animais obesos do que nos não obesos, demonstrando que as células tumorais proliferam mais rapidamente em animais com resistência à insulina.

A sinalização insulínica é iniciada através do recrutamento de moléculas intracelulares para o receptor ativado com função de fosforilar resíduos de tirosina (Pirola et al., 2003). Entre essas moléculas podemos encontrar os IRS-1/2/3/4 (White, 1997). O IRS fosforilado se liga com o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), um heterodímero de porção p85/p110 por ligação com o domínio SH2 da subunidade p85, através dos motivos pYMXM (Backer et al., 1992). Uma vez capturado pelo IRS, a PI3K se torna ativada e produz o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), que estimula a cascata serina/treonina quinase PDK-1/Akt/p70S6K (Chan et al., 1999). A Akt e a p70S6K são proteínas quinases centrais na ação da insulina (Alessi and Downes, 1998) e a p70S6K é um fator chave regulação do efeito de crescimento da insulina (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

O status hormonal pode afetar a susceptibilidade do tumor associado à obesidade. Por exemplo, a hiperinsulinemia crônica pode ativar o receptor de IGF-I (IGF-IR), estimulando o crescimento celular e inibindo a apoptose. Alternativamente, a insulina poderia mediar seu efeito através do receptor de insulina na isoforma A (IR-A), que possui maior potencial mitogênico que a isoforma B do receptor de insulina (IR-B) (Sciacca et al., 1999) Muitos trabalhos (Pandini et al., 1999, Pandini et al., 2003, Pandini et al., 2005) demonstraram que certos tipos de células tumorais expressam

maior quantidade de IR-A do que IGF-IR. Além disso, a insulina pode sinalizar através de receptores heterodiméricos que contenham IGF-IR e IR. A insulina estimula a ativação a jusante da Akt e MAPK em células cancerígenas, que estimulam a proliferação celular (Yakar et al., 2006). Nossos resultados demonstram um aumento da fosforilação do receptor de insulina e conseqüente ativação da via IRS/PI3K/Akt/mTOR em células tumorais no estado basal, efeito que ocorreu paralelamente ao aumento do crescimento tumoral. Por outro lado, a insulina foi ineficaz para aumentar a captação de glicose como demonstrado pelo teste de tolerância à insulina e pela diminuição da fosforilação das vias de sinalização a jusante do IR em fígado e músculo. Assim, apesar da redução da resposta ao tratamento agudo da insulina, observamos um aumento das vias envolvidas no crescimento tumoral.

Estudos anteriores demonstram que adipócitos produzem uma grande variedade de citocinas biologicamente ativas e que essas pequenas e potentes moléculas possuem um importante papel na estimulação do crescimento tumoral (Yakar et al., 2006). As citocinas associadas aos adipócitos, entre elas TNF α , resistina, leptina, adiponectina e IGF-I, estão envolvidas no crescimento celular, na proliferação, na diferenciação, no controle do ciclo celular e na angiogênese (Yakar et al., 2006). Os nossos resultados mostram aumento da concentração sérica de leptina que pode estar contribuindo para o desenvolvimento do tumor.

Estudos recentes demonstraram que em tratamento prolongado com insulina, simulando a hiperinsulinemia, a via de sinalização da PI3K/Akt está “down-regulated” e os níveis celulares dos IRS-1 e IRS-2 estão diminuídos tanto em células L6 como em modelos de hiperinsulinemia crônica (Pirola et al., 2003; Ueno et al., 2005). A ativação da PI3K/Akt está relacionada com o decréscimo na IRS-1/2, a PI3K é uma molécula “upstream” e controla a degradação de IRS-1/2 via diferentes mecanismos. Tanto os

níveis de IRS-1 como de IRS-2 diminuíram após exposição a insulina por 24 horas de uma maneira dose-dependente (Pirola et al., 2003; Ueno et al., 2005). A diminuição do IRS-1 foi pós-transcricional e a concentração da Akt aumentou, também de maneira dependente da concentração (Pirola et al., 2003).

Para investigar algumas alterações moleculares induzidas pela hiperinsulinemia em células de câncer de próstata, tratamos células PC-3 por 24 horas com diferentes concentrações de hormônios seguido por um segundo tratamento agudo com o hormônio por 10 minutos. Essas condições assemelham-se ao estado hiperinsulinêmico, onde um aumento temporário da secreção de insulina é sobreposto a um elevado nível de insulina. A ativação da Akt atingiu um nível maior do que o controle em todas as concentrações de hormônio testadas para o tratamento crônico, como era esperado para células responsivas à insulina. Entretanto, quando ocorreu um segundo tratamento com uma dose elevada de insulina, a ativação da Akt apresentou-se menor nas células que já haviam sido tratadas com o hormônio quando comparadas com a situação controle consistente com os resultados obtidos em animais.

Além disso, com os resultados da atividade da p70S6K, que indica a atividade da mTOR (Sarbasov et al., 2005), também obtivemos respostas semelhantes às encontradas para a Akt. Onde podemos verificar uma ativação da proteína com o aumento da concentração de hormônio para o tratamento de 24 horas com insulina. E após o tratamento com uma dose de 1 μ M do hormônio a atividade da p70S6K mostrou-se menor em relação ao controle.

CONCLUSÃO

Conforme mostrado nos nossos resultados, os animais hiperinsulinêmicos apresentam um crescimento tumoral mais acelerado quando comparados aos animais controle e nosso estudo demonstra que a Obesidade está associada com aumento do crescimento tumoral em camundongos enxertados. Nossos dados demonstram ainda que a via IRS/PI3-quinase/Akt/mTOR direciona os sinais metabólicos ao crescimento tumoral e sugerem que o aumento da ativação dessa via de sinalização está envolvido no aumento da agressividade dos tumores de próstata em situações de hiperinsulinemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alessi, D. R., and Downes, C. P. (1998). The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* 1436, 151-164.
- Backer, J. M., Myers, M. G., Jr., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J., and et al. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J* 11, 3469-3479.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., and Tschlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68, 965-1014.
- Instituto Nacional de Câncer (2003). <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>
- Kopelman P. G.(2000). "Obesity as a medical problem". *Nature* 404, 635-643.
- Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H., and Huang, X. F. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 639-646.
- Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2003). Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. *J Biol Chem* 278, 42178-42189.

Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Roberts, C. T., Jr., Marcelli, M., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2005). Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 1849-1857.

Pandini, G., Vigneri, R., Costantino, A., Frasca, F., Ippolito, A., Fujita-Yamaguchi, Y., Siddle, K., Goldfine, I. D., and Belfiore, A. (1999). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* 5, 1935-1944.

Pirola, L., Bonnafous, S., Johnston, A. M., Chaussade, C., Portis, F., and Van Obberghen, E. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-mediated reduction of insulin receptor substrate-1/2 protein expression via different mechanisms contributes to the insulin-induced desensitization of its signaling pathways in L6 muscle cells. *J Biol Chem* 278, 15641-15651.

Reddy, S., Piccione, D., Takita, H., and Bankert, R. B. (1987). Human lung tumor growth established in the lung and subcutaneous tissue of mice with severe combined immunodeficiency. *Cancer Res* 47, 2456-2460.

Rodriguez, C., Patel, A. V., Mondul, A. M., Jacobs, E. J., Thun, M. J. and Calle E. E. (2004). "Diabetes and risk of prostate cancer in a prospective cohort of US men." *Am J Epidemiol* 161,147-52.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.

Sciacca, L., Costantino, A., Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Scalia, P., Sbraccia, P., Goldfine, I. D., Vigneri, R., and Belfiore, A. (1999). Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 18, 2471-2479.

Ueno, M., Carneiro, J. B., Tambascia, R. C., Bezerra, R. M., Amaral, M. E., Carneiro, E. M., Folli, F., Franchini, K. G., and Saad, M. J. (2005). Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* 48, 506-518.

Von Hafe, P., Pina, F., Pérez, A., Tavares M. and Barros H. (2004). "Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer." *Obes Res* 12, 1930-35.

White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2-17.

World Health Organization (2003) "Obesity and overweight". <http://www.who.int>

Yakar, S., Nunez, N. P., Pennisi, P., Brodt, P., Sun, H., Fallavollita, L., Zhao, H., Scavo, L., Novosyadlyy, R., Kurshan, N., et al. (2006). Increased tumor growth in mice with diet-induced obesity: impact of ovarian hormones. *Endocrinology* 147, 5826-5834.