



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUILHERME HENRIQUE TAMARINDO

AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS PROSTÁTICAS
HUMANAS TRATADAS COM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO
E MELATONINA

CAMPINAS

2017

GUILHERME HENRIQUE TAMARINDO

**AVALIAÇÃO DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS PROSTÁTICAS HUMANAS TRATADAS
COM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO E MELATONINA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural na
área de concentração Biologia Celular.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO GUILHERME
HENRIQUE TAMARINDO E ORIENTADA PELA
PROF^ª DR^ª REJANE MAIRA GÓES.

Orientador: Prof^ª Dr^ª REJANE MAIRA GÓES

*Co-Orientador: Prof^ª Dr^ª FERNANDA RAMOS GADELHA
Prof^ª Dr^ª MARINA GUIMARÃES GOBBO*

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

T15a Tamarindo, Guilherme Henrique, 1992-
Avaliação da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo em células prostáticas humanas tratadas com ácido docosahexaenóico e melatonina / Guilherme Henrique Tamarindo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rejane Maira Góes.
Coorientadores: Fernanda Ramos Gadelha e Marina Guimarães Gobbo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Melatonina. 3. Ácido docosahexaenoico. 4. Estresse oxidativo. 5. Ômega-3. I. Góes, Rejane Maira. II. Gadelha, Fernanda Ramos. III. Gobbo, Marina Guimarães. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in human prostate cells treated with docosahexaenoic acid and melatonin

Palavras-chave em inglês:

Prostate

Melatonin

Docosahexaenoic acid

Oxidative stress

Omega-3

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Ana Angélica Henrique Fernandes

Wagner José Fávaro

Data de defesa: 02-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 2 de Junho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Góes

Prof^a. Dr^a. Ana Angélica Henrique Fernandes

Prof^o. Dr^o. Wagner José Fávaro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

A todos os envolvidos nesse projeto, que foram muitos, em especial:

À Prof^a Dr^a Daniele Lisboa Ribeiro pelo treinamento inicial com cultura celular, pela doação da linhagem utilizada e por sempre sanar dúvidas técnicas,

À Prof^a Dr^a Paula Rahal e à toda sua equipe, em especial a Dr^a Marília Calmon, por me acolher e ajudar no cultivo celular,

Ao Prof^o Dr^o Hernandes Faustino Carvalho por me acolher em seu laboratório durante as análises realizadas na Unicamp, assim como aos seus alunos Juliana, Rafaela e Andrés por sempre me ajudarem prontamente quando solicitado,

Ao Prof^o Dr^o Sebastião Roberto Taboga pela ajuda nas análises morfológicas, por sempre esclarecer minhas dúvidas e pelos conselhos dados,

À Prof^a Dr^a Patrícia Simone Leite Vilamaior por auxiliar nas técnicas de microscopia confocal,

Ao Me. Luiz Roberto Falleiros Jr e Me. Maysa Succi pelo apoio técnico no Centro de Microscopia e Microanálise e Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desreguladores Endócrinos do IBILCE,

À todos os alunos que frequentaram o Centro de Microscopia e Microanálise do IBILCE pelo apoio nos vários momentos difíceis que se colocaram na realização desse projeto,

Ao meu amigo Luiz Henrique Guerra por sempre me estimular, nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis, nas frustrações, por me fazer acreditar que no fim tudo iria dar certo e sempre me acompanhar nos cafés e experimentos noturnos,

Ao Prof^o Dr^o Eduardo Alves Almeida e seus alunos Milena e Danilo por toda ajuda com análises iniciais de estresse oxidativo,

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Marina Guimarães Gobbo pelos ensinamentos desde o início da carreira acadêmica e por me incentivar a executar este projeto desafiador,

À Prof^a Dr^a Fernanda Ramos Gadelha por me acolher em seu laboratório e por acreditar em mim desde o princípio, pelas broncas quando necessário e pelos conselhos e ensinamentos que levarei por toda a vida acadêmica, assim como às suas alunas que me auxiliaram sempre quando foi preciso,

À Profª Drª Rejane Maira Góes por estar comigo desde o primeiro mês da graduação, por me acolher como aluno, por acreditar em mim e entrar nessa aventura de propor um projeto inovador e desafiador,

À Lilian Alves Senne pela amizade, apoio e suporte em todos os momentos,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2015/13371-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas,

E aos meus pais, Edson e Dionéia, por todo o apoio no início e continuidade da minha formação acadêmica,

A todas estas pessoas e instituições, muito obrigado. A realização deste mestrado só foi possível com a participação de cada uma.

RESUMO

O câncer de próstata está entre as cinco principais causas de morte no mundo e um dos fatores que contribuem para esse alto índice de mortalidade são as limitações no diagnóstico precoce. Neste sentido, tem-se buscado estratégias de redução dos riscos de desenvolver a patologia pela quimioprevenção. O ácido docosahexaenóico (DHA) e a melatonina (MLT) têm sido investigados como agentes antitumorais e existem fortes evidências do envolvimento das mitocôndrias nesse processo, o que até o momento não foi completamente elucidado. Neste sentido, na tentativa de testar o potencial preventivo, nosso objetivo foi avaliar se o DHA reduz a proliferação e sobrevivência de células PNT1A mediado pelo aumento do estresse oxidativo, como também se a MLT exerce o mesmo efeito modulando a bioenergética mitocondrial. Além disso, testamos também se combinados têm efeito amplificado. Primeiramente, observamos que: (1) O DHA apresentou comportamento hormético, de forma que estimulou a proliferação em menores concentrações, mas diminuiu na maior molaridade testada de 100 μ M para os tempos 48 e 72h; (2) a MLT exibiu efeito anticlonogênico a partir de 1 μ M, o que foi amplificado na co-incubação com o lipídio. O efeito antiproliferativo do DHA (100 μ M) e da MLT (1 μ M) com 48h de exposição indicaram que: (3) o ômega-3 elevou o estresse oxidativo acompanhado de aumento da área e perímetro mitocondrial, parâmetros reduzidos pela MLT; (4) a indolamina sozinha ou combinada com o lipídio melhorou a fosforilação oxidativa e recuperou a capacidade das células de responderem a situações de estresse, provocadas pelo DHA; (5) A MLT estimulou e o DHA reduziu o acúmulo de glicogênio intracelular; (6) isolados ou em combinação, os tratamentos inativaram AKT, sendo que o hormônio individualmente inibiu a via do mTOR e na presença do DHA ativou a via ERK1/2; (7) o hormônio co-incubado com o DHA aumentou a expressão de GSTP1; (8) ambos os compostos não alteraram a expressão de AR, mas a MLT aumentou a captação de testosterona pelas células PNT1A; e (9) os efeitos da indolamina observados não foram dependentes de receptores MTR1 e MTR2. Por outro lado, constatamos que o DHA estimulou a proliferação celular (50 μ M por 48h) na maior concentração, provavelmente devido à retenção citoplasmática do PPAR γ . Em conclusão, esses resultados sugerem cautela na suplementação com DHA, tendo em vista seu papel supressor ou estimulador da proliferação. Além disso, a propriedade quimiopreventiva de ambos, isolados ou em combinação, ficou evidenciada e coloca o estresse oxidativo, em especial as mitocôndrias, como importantes alvos na redução da sobrevivência de células epiteliais prostáticas com alterações pré-malignas.

ABSTRACT

Prostate Cancer (PCa) is among the five main causes of death in world scenario and early diagnosis limitations may contribute to this higher mortality index. In this line, strategies have been investigated with focus on prevention and decrease of risks to develop PCa. Docosahexaenoic acid (DHA) and melatonin (MLT) have been suggested as antitumor agents and there are strong evidences of mitochondria role in their effects, but is not completely elucidated. In this context, our aim was to evaluate chemoprevention potential of DHA in decrease survivor and proliferation of PNT1A cells mediated by increase of oxidative stress, as well as if MLT exert same effect by modulating mitochondria bioenergetics. Moreover, we tested if combined they exhibited amplified effect. Firstly, we concluded that: (1) DHA exerted hormetic behavior by stimulating at lower concentrations cell proliferation and decreasing at highest molarity 100 μ M when exposed for 48h and 72h; (2) MLT displayed anticlonogenic effect from 1 μ M which was amplified when co-incubated with lipid. Antiproliferative effect of DHA (100 μ M) and MLT (1 μ M) at 48h indicated that: (3) omega-3 increased oxidative stress followed by area and mitochondrial perimeter, parameters reduced by MLT; (5) indole alone or in combination with fatty acid improved oxidative phosphorylation and recovered cell capacity to respond to stress situation provoked by DHA; (5) MLT increased and DHA reduced intracellular glycogen accumulation; (6) isolated or combined, treatments inactivated AKT, MLT alone suppressed mTOR and when co-incubated activated ERK1/2 pathway; (7) hormone co-incubated with DHA increased GSTP1 expression; (8) treatments did not change AR expression, but MLT stimulated testosterone uptake by PNT1A cells; and (9) indole effects observed in our study were not dependent of MTR1 and MTR2 receptors sensitization. On the other hand, DHA increased cell proliferation (50 μ M-48h, the highest rate achieved), probably due to cytoplasmatic retention of PPAR γ . In conclusion, our results suggest wariness with DHA supplementation with regard to lipid role in encourage or inhibit cell proliferation. Besides that, both chemopreventive property, isolated or in combination, was revealed and point to oxidative stress, mainly mitochondria, as relevant targets in decrease of survivor of prostatic epithelial cells with pre-malignant alterations..

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Antimicina A

ADP – Adenosina Difosfato

AKT – Proteína Quinase B

AR – Receptor de Andrógeno

ATP – Adenosina Trifosfato

Bcl-2 – Proteína 2 da célula-B de linfoma

BSA – Albumina Sérica Bovina

CaP – Câncer de Próstata

CCCP – Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CO₂ – Dióxido de Carbono

CuZnSOD – Superóxido dismutase I

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DHA – Ácido Docosahexaenóico

DHT – 5 α -dihidrotestosterona

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DU145 – Linhagem de células prostáticas humanas andrógeno independente

EGTA – Etilenoglicol bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetra acético

ER – Receptor de Estrógeno

ERK – Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares

ERK1/2 – Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1/2

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ER α – Receptor de Estrógeno Alfa

GPx – Glutathione Peroxidase

GSK3 β – Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta

GST – Glutathione-S-Transferase

GSTP1 – Glutathione-S-Transferase P1

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanesulfônico

HRP – Horseradish Peroxidase

I- κ B – Inibidor de Kappa Beta

IRS-1 – Substrato 1 do Receptor de Insulina

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico

LNCaP – Linhagem de células prostáticas humanas andrógeno dependente

LXR α – Receptor X do Fígado

LZ – Luzindol

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MnSOD – Superóxido dismutase 2

mPTP – Poro de Transição de Permeabilidade mitocondrial

mTOR – Alvo mecânico de Rapamicina

MTR1 – Receptor de melatonina 1

MTR2 – Receptor de melatonina 2

NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa Beta

NIP – Neoplasia Intraepitelial Prostática

O₂^{•-} - Ânion Superóxido

OLG – Oligomicina

PAS – Ácido Periódico de Schiff

PC3 – Linhagem de células prostáticas humanas andrógeno independente

PDK1 – Piruvato Desidrogenase Quinase 1

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase

PIP₃ – Fosfatidilinositol(3,4,5)Trisfosfato

PKA – Proteína Quinase A

PKC – Proteína Quinase C

PMSF – Fluoreto de Fenilmetanesulfonil

PNT1A – Linhagem epitelial luminal terminal prostática humana normal

PPARs – Receptores Ativados de Proliferação dos Peroxissomos

PPAR γ – Receptor Gama Ativado de Proliferação dos Peroxissomos

PUFA – Ácidos Graxos Polinsaturados

RWPE1 – Linhagem epitelial prostática humana normal

RXR – Receptor X de Retinóide

RXR α – Receptor X de Retinóide Alfa

VEGF – Factor de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO.....	13
II.	PROBLEMÁTICA.....	18
III.	OBJETIVOS.....	22
IV.	RESULTADOS.....	22
	CAPÍTULO 1: O Ácido Docosahexaenóico e a Melatonina sozinhos ou combinados apresentam propriedade quimiopreventiva por modular o estresse oxidativo e a bioenergética mitocondrial de células PNT1A.....	23
	CAPÍTULO 2: O Ácido Docosahexaenóico causa exclusão nuclear do PPARγ o que pode estar relacionado à maior proliferação de células PNT1A.....	62
V.	CONCLUSÕES FINAIS.....	73
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
VII.	ANEXOS.....	86

I. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda causa de morte no Brasil (Filippou e Nielsen, 2016) e afeta principalmente homens, em média, a partir dos 66 anos de idade (Shiu et al., 2007). A sua etiologia ainda não está elucidada, mas sabe-se que tem cunho multifatorial com componentes genéticos e ambientais, como o tipo de alimentação, exposição à carcinógenos, respostas a mediadores inflamatórios, além do histórico familiar (Cunningham e You 2015; Torre et al. 2015). No intuito de entender os eventos moleculares que influenciam a carcinogênese da glândula, modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos com características distintas de regulação androgênica e progressão tumoral, conforme resume a Tabela 1 (Cunningham e You, 2015). No entanto, dadas as características moleculares de cada estágio da patologia e limitações no diagnóstico precoce, o CaP ainda permanece entre as cinco principais causas de morte no cenário mundial.

Linhagem	Origem	Tipo	AR	Cariótipo
PNT1A	Epiteliais luminais imortalizadas com SV40	Normal	RNA _m /proteína	aneuploide
RWEP-1	Células HPE da zona periférica	Normal	RNA _m /proteína	45/51, perda de 7q e 18
LNCaP	Nódulo supraclavicular	Tumoral responsiva a andrógeno	RNA _m /proteína	33-91, aneuploide
PC3	Metástase vertebral	Tumoral não responsiva a andrógeno	Não expressa RNA _m /proteína	58, aneuploide
DU145	Metástase cerebral	Tumoral não responsiva a andrógeno	Não expressa RNA _m /proteína	46-143

Tabela 1. Caracterização geral dos principais sistemas *in vitro* de estudo da carcinogênese prostática (Cunningham e You, 2015, adaptado).

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino regulada por esteroides sexuais desde o início do seu desenvolvimento até a vida adulta, via ativação de receptores de andrógenos (AR) e de estrógenos (ERs). Estes receptores controlam eventos determinantes na homeostasia glandular, como proliferação, metabolismo, determinação

celular, além da atividade do epitélio secretor (Cunha et al., 1996; Cunha et al., 2004; Marker et al., 2003) e alterações na resposta disparada por tais receptores, ou até mesmo na sensibilidade aos seus respectivos hormônios, são frequentes em células tumorais (Hebert et al., 1998; Parsons et al., 2006; Powers e Marker, 2013). O tratamento mais indicado para casos de CaP em que as células ainda dependem de andrógeno é a castração química ou cirúrgica, seguido de prostatectomia e radioterapia (Heidenreich et al., 2011). Entretanto, a ablação androgênica pode conferir uma vantagem seletiva a células cancerígenas independentes de andrógenos, as quais eventualmente proliferam e promovem a reincidência de forma mais agressiva, adquirindo alto potencial metastático, principalmente para os ossos, cérebro e pulmão (Abertsen et al., 1998; Kirby et al., 2011; Jin et al., 2011). Atualmente, entre as principais estratégias de tratamento do CaP está o uso de compostos com capacidade de influenciar a via de sinalização de esteroides sexuais (Cui et al., 2017). Entre eles, são investigados principalmente inibidores da 5 α -redutase (finasterida e dutasterida), devido à propriedade desta enzima em converter testosterona em 5 α -dihidrotestosterona (DHT), hormônio com alta afinidade pelo AR, o qual quando ativado pode regular múltiplos genes envolvidos na carcinogênese prostática (Heinlein e Chang, 2014; Kosaka et al., 2014). Além destes, antagonistas do AR (Flutamida e Bicalutamida), como também bloqueadores da atividade do ER (Toremifeno) têm sido sugeridos como potenciais agentes terapêuticos (Alberts et al., 2006; Price et al., 2006; Zanardi et al., 2009). Entretanto, os mecanismos disparados por tais candidatos ainda não estão completamente elucidados e seus efeitos são questionáveis, tendo em vista que alguns estudos experimentais reportaram a maior incidência de lesões pré-malignas após a administração de alguns inibidores (Cui et al., 2017). Neste sentido, uma das estratégias de redução de riscos de desenvolver do CaP pode ser a quimioprevenção, focalizada em impedir a progressão de estágios iniciais para mais avançados.

Entre os candidatos com potencial terapêutico e sem relevantes efeitos colaterais estão os Ácidos Graxos Polinsaturados (PUFAs), presentes na dieta e muito utilizados como suplementação nutricional, especialmente os ômega-3 (ω -3), encontrados tanto em alimentos de origem vegetal como animal (Lovegrove et al., 2015; Martin et al., 2006). Estes lipídios estão sujeitos à metabolização parcial no retículo endoplasmático liso e podem gerar intermediários que atuam favorecendo ou inibindo a sobrevivência celular (Appolinário et al., 2011; Eser et al., 2013). Além disso, o papel antimitogênico, em especial de PUFAs ω -3, tem sido atribuído à capacidade de promover a redução do crescimento de células tumorais

prostáticas por indução da apoptose mediado pelo aumento do estresse oxidativo em níveis letais (Berquin et al., 2011; Bianchini et al., 2012; Epstein et al., 2012; Shin et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre suas propriedades em células com fenótipo normal e com alterações pré-malignas iniciais. Embora estes efeitos antitumorais tenham sido descritos, alguns estudos mostraram haver uma correlação positiva entre altas concentrações de PUFA's com a incidência de tumores sólidos em diferentes tecidos, como o hepático, mama e também na próstata (Sauer et al., 2001; Sorongon-Legaspi et al., 2013; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2014). Esta associação ainda é reforçada por estudos clínicos que apontam uma relação forte de maior agressividade do carcinoma prostático e PUFA's ω -3 (Chua et al., 2013). O estímulo de proliferação em diferentes células tumorais pode estar, em parte, associado a mudanças no perfil metabólico (Lima et al., 2016; Vaz et al., 2012) que podem promover o maior aporte de ácidos graxos, incluindo os polinsaturados, que estimulam vias como as da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) (Dauchy et al., 2003; Sauer et al., 2007). Portanto, não existe um consenso sobre a ação dos PUFA's, inclusive na próstata e alguns autores ainda apontam para uma resposta individual e dose dependente entre linhagens prostáticas normais e cancerígenas na proliferação celular (Meng et al., 2013).

O estresse oxidativo é dado pelo aumento na geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), termo utilizado coletivamente para radicais e outras formas não radicalares derivados do oxigênio, não neutralizadas. Sabe-se que sua formação intracelular ocorre durante a fosforilação oxidativa (Halliwell e Gutteridge, 2007), mas também podem ser geradas no Ciclo de Krebs, nas reações envolvendo NADPH oxidase e nas reações da β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos (Halliwell et al., 2007). A produção de EROs ocorre naturalmente em condições fisiológicas e leva à maior fosforilação de I- κ B (Inibidor de Kappa Beta) e translocação do NF- κ B (Fator Nuclear Kappa Beta) para o núcleo, estimulando a transcrição de enzimas antioxidantes (Tomás-Zapico e Coto-Montes, 2005), mantendo assim um equilíbrio. Por um lado, a produção excessiva de EROs não neutralizados pode ser letal e causar danos celulares irreversíveis, provocando autofagia e/ou apoptose devido a modificações não enzimáticas em proteínas, lipídios e DNA (Koyuturk et al., 2006; Rubio et al., 2012). Por outro, em níveis menores, o estresse oxidativo parece estar associado à progressão do CaP (Freitas et al., 2012; Oberley et al., 2000; Yossepowitch et al., 2007). Estas evidências apontam para o possível envolvimento das mitocôndrias, principal sítio de produção de EROs. Neste sentido, sabe-se que na carcinogênese prostática, ocorrem mutações em genes que codificam complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE), além de que

células andrógeno dependentes LNCaP detém 4,6 vezes mais mitocôndrias comparado às não cancerígenas, enquanto que na independentes PC3 e DU145 este índice reduz à metade (Panov e Orynbayeva, 2013; Philley et al., 2016), o que também coloca em evidência a participação do AR na atividade mitocondrial e a progressão tumoral. As mitocôndrias ainda participam do processo de apoptose pela indução do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) e depleção na produção de ATP (Patergnani et al., 2011; Wang e Youle, 2009; Wong, 2011). Somado a isso, há o envolvimento com proteínas da família Bcl-2, que controlam a liberação do citocromo c e outras moléculas presentes no espaço intermembranas para o citosol que podem ter ação pró ou anti-apoptótica (Bossy-Wetzel e Green, 1999; Kroemer et al., 1997; Tsujimoto et al., 2006). Estes achados parecem evidenciar as mitocôndrias como potenciais alvos terapêuticos e o uso de PUFAs, capazes de exercer efeito antimitogênico mediado pela elevação do estresse oxidativo mitocondrial, pode ser uma estratégia de prevenção ao CaP.

Se por um lado o aumento do estresse oxidativo em níveis letais pode ter efeito antitumoral, por outro, considerando que há aumento da produção de EROs na progressão do CaP, a sua contenção poderia atrasar o avanço tumoral. Nas últimas décadas, a melatonina (MLT), um hormônio de efeito pleiotrópico sintetizado a partir do triptofano, tem sido investigada seu papel protetor no CaP (Shiu et al., 2007; Stehle et al., 2011). Esta hipótese de que a MLT atuaria como agente supressor de tumor é corroborada por estudos clínicos que diagnosticaram pacientes com CaP e detectaram baixos níveis séricos da indolamina, enquanto outros ainda relataram que ocorre queda acentuada na progressão de quadros de Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) para adenocarcinoma (Bartsch et al., 1997; Shiu et al., 2007). Interessantemente, 75% da incidência deste câncer ocorrem em homens acima dos 65 anos (Shiu et al., 2007), e sabe-se que com o envelhecimento há ablação na síntese de MLT devido ao comprometimento da glândula pineal (Iguchi et al., 1982; Waldhauser et al., 1988; Srinivasan et al., 2005), assim como da função mitocondrial devido à maior geração de EROs (Sohal e Weindruch, 1996; Scialo et al., 2017). Neste sentido, estudos com animais pinealectomizados mostraram uma associação entre a ausência de MLT pineal com o desenvolvimento e progressão de diferentes tipos tumorais, incluindo o de próstata (Blask et al., 2011; Cutando et al., 2012). Por outro lado, a administração deste hormônio foi capaz de suprimir o crescimento tumoral após inoculação de células LNCaP, mesmo após a castração (Siu et al., 2002). Estas evidências podem sugerir que a suplementação com MLT em faixas etárias de risco (30 a 40 anos), caracterizadas devido à maior probabilidade de formação de

Neoplasias Intraepiteliais Prostáticas (NIPs), possa ser uma estratégia de prevenção (Sakr et al., 1993; 1996). Além de interferir na sinalização androgênica, o hormônio ainda tem papel determinante no estado redox celular devido à sua propriedade antioxidante. Em nosso laboratório a MLT, administrada na água de beber a uma dose 100µg/peso corporal/dia, se mostrou eficiente na recuperação da atrofia prostática em ratos senis e obesos e pareceu influenciar na proliferação, frequência de células AR-positivas, como também o perfil antioxidante da glândula, em especial o aumento da atividade da Glutathione-S-transferase (GST) intratecidual (Tamarindo et al., 2016). Outros estudos de nosso grupo também revelaram um efeito positivo do tratamento com baixas doses desse hormônio (10µg/peso corporal/dia) contra os danos provocados pelo estresse oxidativo na próstata de ratos diabéticos (Gobbo et al., 2015). Contudo, os efeitos da MLT sobre a fisiologia das células prostáticas ainda são inconclusivos, em especial em linhagens com alterações pré-malignas iniciais.

II. PROBLEMÁTICA

A MLT é o hormônio responsável principalmente por controlar o ritmo circadiano e, além das suas propriedades antioxidante e antitumoral, também apresenta atividade imunomoduladora e antiinflamatória (Gao et al., 2017). Sua via de atuação pode ser desencadeada de forma dependente ou não da sensibilização de receptores de membrana acoplados a proteína G, MTR1 e MTR2, ambos expressos da próstata (Gilad et al., 1998). Sabe-se que em baixas concentrações, próximas a encontrada no plasma, a MLT atua majoritariamente pela ativação destes receptores (Reiter et al., 2005). Entretanto, em elevadas concentrações, como a encontrada em alguns tecidos, a indolamina pode atravessar a membrana plasmática e exercer ação independentemente destes receptores, como a atenuação do estresse oxidativo (Reiter et al., 2005). Como agente antioxidante, neutraliza EROs diretamente ou por meio de seus metabólitos (Acuña Castroviejo et al., 2002). Esta propriedade ainda pode ser potencializada devido ao aumento da atividade e expressão de enzimas antioxidantes, tais como CuZnSOD (Superóxido dismutase 1), MnSOD (Superóxido dismutase 2) e GPx (Glutathione peroxidase) de forma tecido dependente (Mayo et al., 2002), além de suprimir enzimas pró-oxidantes em diferentes tipos celulares (Acuña-Castroviejo et al., 2005; Iñarrea et al., 2011). A MLT pode modular a expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante pela inibição de calmodulina que reduz a ativação de quinases, inativação de ROR α (Receptor Órfão Alfa) no núcleo e manutenção da expressão destas (Tomás-Zapico et al., 2005). O seu papel como agente atenuador do estresse oxidativo também pode ser devido à modulação da função mitocondrial. Isso porque foi reportada sua capacidade de manutenção do potencial de membrana, intrinsecamente relacionado à geração de EROs (López et al., 2008). Além disso, a MLT influencia a função mitocondrial por elevar a síntese de ATP aumentando a atividade dos complexos I, III e IV da cadeia transportadora de elétrons (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Martín et al., 2000, 2002). Portanto, a literatura oferece fortes evidências da atuação da MLT na fisiologia mitocondrial (Figura 1) e que podem ter relação estreita com o estresse oxidativo, mas esse conhecimento ainda é escasso para a próstata, inclusive sua correlação com a proliferação e morte celular.

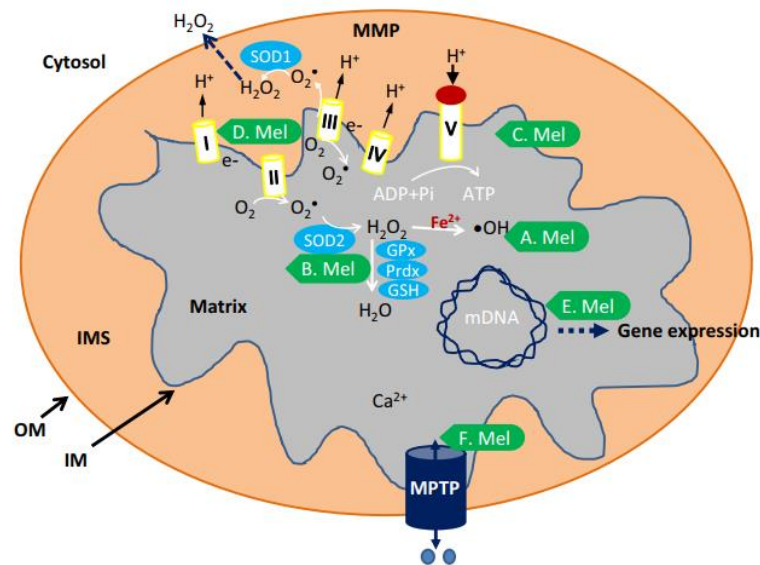


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos exercidos pela MLT na mitocôndria. (A) Neutralização direta de EROs. (B) Aumento da Atividade de enzimas antioxidantes. (C) Membrana Mitocondrial Interna. (D) MLT aumenta atividade dos complexos da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) e a produção de ATP. (E) Regulação de genes mitocondriais. (F) Regulação direta de mPTP. Legenda: MLT – Melatonina; MMP – Potencial de Membrana Mitocondrial; mPTP – poro de transição de permeabilidade mitocondrial; SOD2 – Superóxido dismutase 2; GPx – Glutaciona peroxidase; - SOD1 - Superóxido dismutase 1; Prdx – Peroxiredoxina; GSH – Glutaciona; mDNA – DNA mitocondrial; I, II, II, IV, e V representam complexos da cadeia respiratória; IM – Membrana Mitocondrial Interna; OM – Membrana Mitocondrial Externa; IMS – Espaço Intermembranas. (Zhang e Zhang, 2014).

De acordo com revisões encontradas na literatura (Reiter et al., 2017; Shiu et al., 2007), a MLT pode exercer seu efeito anticlonogênico em linhagens prostáticas tumorais também por interferência na via de sinalização do receptor de andrógeno (AR), por provocar arresto do ciclo celular, como também redução da angiogênese pela menor transcrição de VEGF em modelos xenográficos (Paroni et al., 2014; Sohn et al., 2015), conforme resume a Figura 2. O seu potencial antiproliferativo tem sido associado principalmente à sensibilização de MTR1, responsável por co-ativar paralelamente PKC e PKA levando à maior expressão de p27^{Kip1}, reduzindo a taxa mitótica (Tam et al., 2007; 2008). Além disso, a maior ativação de PKC via MTR1 está relacionada à exclusão nuclear do AR e redução da sua atividade transcricional (Lupowitz et al., 2001; Rimler et al., 2002). Entretanto, linhagens andrógeno independentes, modelos *in vitro* de alta agressividade do CaP, apresentam níveis indetectáveis de MTR1 e quando expostas a MLT sugerem outras vias de inibição mitótica que ainda não estão completamente compreendidas (Marelli et al., 2000; Reiter et al., 2017).

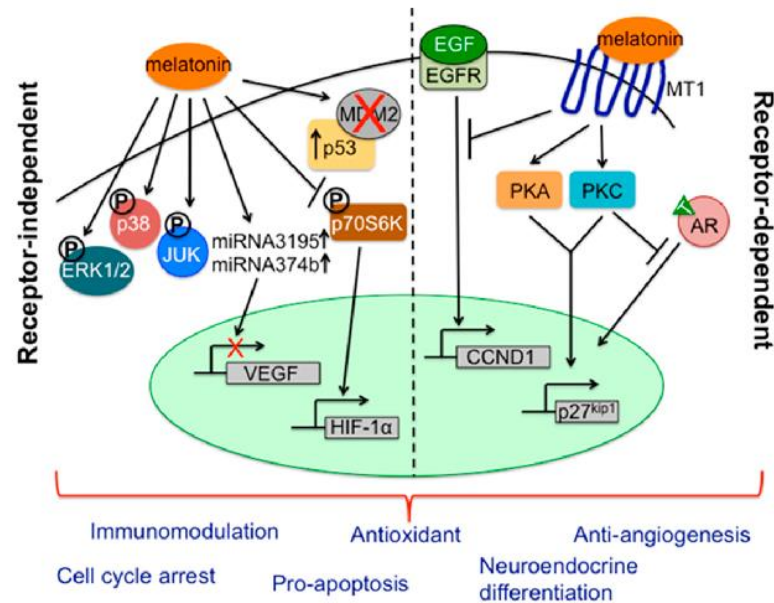


Figura 2. Mecanismos de ação oncostática da MLT na progressão do CaP. À esquerda, sinalização independente da sensibilização de receptores de membrana. À direita, ação da indolamina dependente da ativação de MTR1. Legenda: Melatonin – melatonina; EGF – Fator de Crescimento Epitelial; EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epitelial; PKA – Proteína Quinase A; PKC – Proteína Quinase C; AR – Receptor de Andrógeno; MT1 – Receptor de Melatonina 1; VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular; HIF-1 α – Fator 1 α de Hipóxia; CCND1 – Genes envolvidos no controle do ciclo celular; ERK1/2 – Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares. Adaptado de Reiter et al., 2017.

Apesar da MLT exercer seu efeito antitumoral, alguns estudos revelaram que tem capacidade de sensibilizar células neoplásicas devido a supressão de vias de sobrevivência, como AKT, potencializando o efeito supressor de outros compostos (Gao et al., 2016; Lu et al., 2016). O ácido docosahexaenóico (C22:6 n-3), ou DHA, é um PUFA ω -3 essencial abundante em peixes marinhos de águas frias, mas também encontrado em baixas quantidades em aves, ovos e tem sido indicado como suplemento alimentar (Lovegrove et al., 2015; Martin et al., 2006). Este lipídio tem propriedade antimetogênica por inibir vias de proliferação e sobrevivência celular mediado pelo aumento na produção de EROs mitocondrial em níveis letais, em especial o eixo AKT/mTOR (Shin et al., 2013). Estes dados reforçam as mitocôndrias como potenciais alvos celulares na supressão tumoral. Somado a isso, este PUFA ainda pode suprimir outras vias, como AKT/PIP₃ (Gu et al., 2013) e PDK1/Akt/Bad levando à morte de células tumorais (Hu et al., 2010). A via de sinalização por esteroides sexuais também parecem responder ao DHA. Isto porque foi reportado que tal ômega-3 pode degradar AR na linhagem LNCaP (Hu et al., 2015), como também reduzir a expressão desse e de ER α *in vivo* e em linhagens prostáticas epiteliais e estromais benignas

(Wang et al., 2016). Outros estudos indicam a degradação do AR pelo DHA via NF- κ B, reduzindo o crescimento e a sobrevivência tumoral *in vitro* (Cavazos et al., 2011). Este PUFA sofre um processo complexo de oxidação que envolve os peroxissomos e mitocôndrias (Park et al., 2016), o que leva a geração de metabólitos que atuam na supressão tumoral (Appolinário et al., 2011; O'Flaherty et al., 2012), além de ser altamente suscetível à oxidação mediada por espécies reativas (Lyberg e Adlerceutz, 2006), gerando hidroperóxidos e aldeídos cito e genotóxicos que podem afetar a viabilidade celular (Esterbauer et al., 1991; Girotti, 1998; Yin et al., 2005). Tais evidências apontam para o potencial quimiopreventivo do DHA, porém as respostas celulares frente a este lipídio ainda são inconclusivas. Isto porque foram detectadas altas concentrações séricas deste PUFA (Chua et al., 2013; Sorongon-Legaspi et al., 2013; Yang et al., 2016), como também intratecduais em todos os tipos de câncer de próstata (Brasky et al., 2013). Portanto, os efeitos do DHA nas células prostáticas parecem envolver vias de atuação importantes para sobrevivência, mas o conhecimento do efeito quimiopreventivo pela sua suplementação ainda não é compreendido em todos os estágios da carcinogênese.

Portanto, DHA e MLT, apresentam fortes evidências de potencial quimiopreventivo e terapêutico, principalmente por provocar a supressão de vias de proliferação e sobrevivência. Entretanto, como é dado este mecanismo ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que ocorra envolvimento das mitocôndrias, em especial do estresse oxidativo. As evidências apresentadas realçam o seu potencial no CaP já avançado, mas em células que preservam características normais, mas com alterações pré-malignas, até o momento não foi estudado. Além disso, acredita-se que a ação combinada do DHA com a MLT possa potencializar seus efeitos supressores da proliferação e sobrevivência celular, o que ainda não foi avaliado.

III. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito preventivo do DHA e da MLT, isolados ou em combinação, na sobrevivência de células prostáticas epiteliais com fenótipo normal, mas com alterações pré-malignas.

Para isso, testamos a seguintes hipóteses:

- 1) O DHA exerce efeito antimitogênico nas células PNT1A, mediado pelo aumento do estresse oxidativo mitocondrial.
- 2) O DHA atua de forma similar nas linhagens prostáticas tumorais determinadas e nas normais alteradas.
- 3) A MLT tem propriedade antiproliferativa por modular a bioenergética mitocondrial.
- 4) Quando co-incubados, DHA e MLT apresentam efeito amplificado.

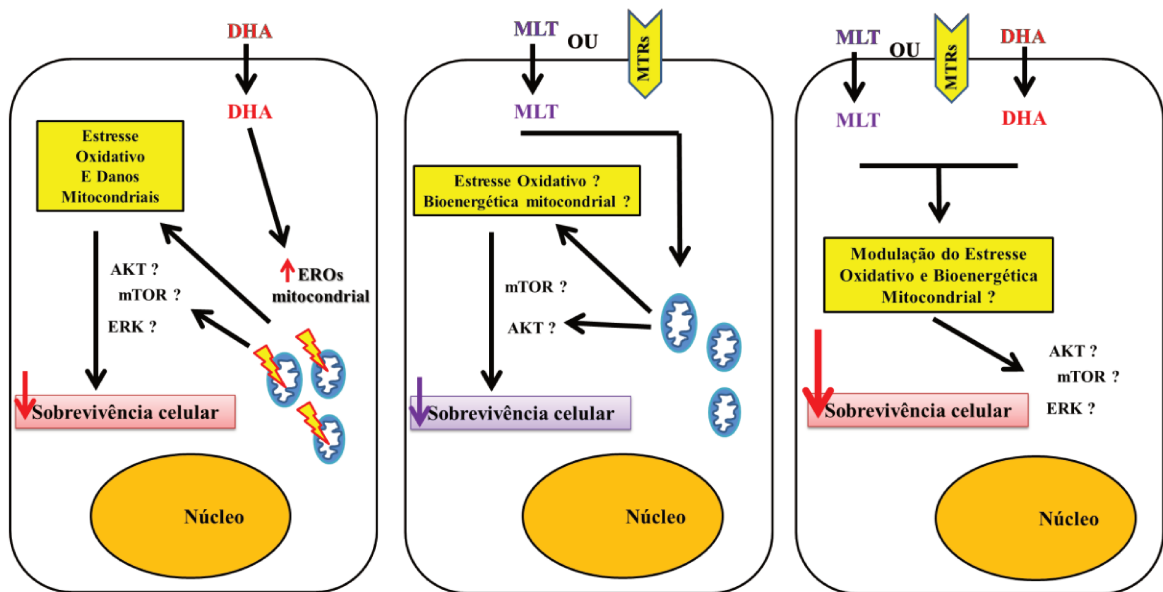


Figura 1. Síntese das hipóteses testadas na linhagem PNT1A.

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de um manuscrito (Capítulo 1) e outros dados adicionais (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

O Ácido Docosaheptaenóico e a Melatonina sozinhos ou combinados apresentam propriedade quimiopreventiva por modular o estresse oxidativo e a bioenergética mitocondrial de células PNT1A

TAMARINDO, G.H.^{1,4}; RIBEIRO, D.L.²; GOBBO, M.G.³; GUERRA; L.H.A.⁴; RAHAL, P.⁴; TABOGA, S.R.⁴; CARVALHO, H.F.⁴; GADELHA, F.R.⁵; GÓES, R.M.¹.

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brazil

⁴ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

⁵ Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

O câncer de próstata está entre as cinco principais causas de morte no mundo e um dos fatores que contribuem para esse alto índice de mortalidade são as limitações no diagnóstico precoce. Neste sentido, tem-se buscado estratégias de redução dos riscos de desenvolver a patologia pela quimioprevenção. O ácido docosahexaenóico (DHA) e a melatonina (MLT) têm sido investigados como agentes antitumorais e existem fortes evidências do envolvimento das mitocôndrias nesse processo, o que até o momento não foi completamente elucidado. Neste sentido, na tentativa de testar o potencial preventivo, nosso objetivo foi avaliar se o DHA reduz a proliferação e sobrevivência de células PNT1A mediado pelo aumento do estresse oxidativo, como também se a MLT exerce o mesmo efeito modulando a bioenergética mitocondrial. Além disso, testamos também se combinados têm efeito amplificado. Primeiramente, observamos que: (1) o efeito antiproliferativo do DHA é observado primeiramente com 100 μ M por 48h; (2) a MLT exibiu efeito anticlonogênico a partir de 1 μ M, o que foi amplificado na co-incubação com o lipídio. O efeito antiproliferativo do DHA (100 μ M) e da MLT (1 μ M) com 48h de exposição indicaram que: (3) o ômega-3 elevou o estresse oxidativo acompanhado de aumento da área e perímetro mitocondrial, parâmetros reduzidos pela MLT; (4) a indolamina sozinha ou combinada com o lipídio melhorou a fosforilação oxidativa e recupera a capacidade da célula de responder a situações de estresse, provocado pelo DHA; (5) A MLT estimulou e o DHA reduziu o acúmulo de glicogênio intracelular; (6) isolados ou em combinação, os tratamentos inativaram AKT, sendo que o hormônio individualmente inibiu a via do mTOR e na presença do DHA ativou a via ERK1/2; (7) o hormônio co-incubado com o DHA aumenta a expressão de GSTP1; (8) ambos os compostos não alteraram a expressão de AR, mas a MLT aumentou a captação de testosterona pelas células PNT1A; e (9) os efeitos da indolamina observados não foram dependentes de receptores MTR1 e MTR2. Em conclusão, esses resultados sugerem cautela na suplementação com DHA, tendo em vista seu papel supressor ou estimulador da proliferação. Além disso, a propriedade quimiopreventiva de ambos, isolados ou em combinação, fica evidenciada e coloca o estresse oxidativo, em especial as mitocôndrias, como importantes alvos na redução da sobrevivência de celular.

Palavras-chave: próstata, melatonina, ácido docosahexaenóico, PNT1A, estresse oxidativo

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) afeta principalmente homens, em média, a partir dos 66 anos de idade e alguns estudos têm reportado o adiantamento do diagnóstico em cerca de 10 anos de vida (Shiu et al., 2007). A sua etiologia ainda não está elucidada, mas sabe-se que tem cunho multifatorial com componentes genéticos e ambientais, como o tipo de alimentação, exposição à carcinógenos, respostas a mediadores inflamatórios, além do histórico familiar (Cunningham e You 2015; Torre et al. 2015). O tratamento mais indicado para casos de CaP em que as células ainda dependem de andrógeno é a castração química ou cirúrgica, seguido de prostatectomia e radioterapia (Heidenreich et al., 2011). Entretanto, a ablação androgênica pode conferir uma vantagem seletiva a células tumorais não responsivas a andrógenos, as quais eventualmente proliferam e promovem a reincidência de forma mais agressiva, adquirindo alto potencial metastático, principalmente para os ossos, cérebro e pulmão (Albertsen et al., 1998; Kirby et al., 2011; Jin et al., 2011). Neste sentido, uma das estratégias de redução de riscos pode ser a quimioprevenção, focalizada em inibir a progressão para estágios mais avançados.

Alguns estudos tem mostrado que a progressão e agressividade do CaP está associada ao aumento do estresse oxidativo (Freitas et al., 2012; Oberley et al., 2000; Yossepowitch et al., 2007). Estas evidências apontam para o possível envolvimento das mitocôndrias, principal sítio de produção de EROs. Neste sentido, sabe-se que na carcinogênese prostática, ocorrem mutações em genes que codificam complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE), além de que células andrógeno dependentes LNCaP detém 4,6 vezes mais mitocôndrias comparado às normais, enquanto que na independentes PC3 e DU145 este índice reduz à metade (Panov e Orynbayeva, 2013; Philley et al., 2016), o que também coloca em evidência a participação do AR na atividade mitocondrial e a progressão tumoral. Nas últimas décadas, a melatonina (MLT), um hormônio de efeito pleiotrópico sintetizado a partir do triptofano, tem sido investigada como potencial agente supressor do CaP (Shiu, 2007; Stehle et al., 2011). Esta hipótese é corroborada por estudos clínicos que diagnosticaram pacientes e detectaram baixos níveis séricos da indolamina, enquanto outros ainda relataram que ocorre queda acentuada na progressão de quadros de Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) para adenocarcinoma (Bartsch et al., 1997; Shiu, 2007). Neste sentido, estudos com animais pinealectomizados ainda revelaram uma associação entre a ausência de MLT com o desenvolvimento e progressão de diferentes tipos tumorais, incluindo o de próstata (Blask et al., 2011; Cutando et al., 2012). De acordo com Siu e colaboradores (2002)

a administração deste hormônio foi capaz de suprimir o crescimento tumoral após inoculação de células LNCaP, mesmo após a castração. Acredita-se que uma das vias de prevenção pela sua suplementação possa estar associada a modulação do funcionamento mitocondrial. Isto porque existem evidências de que a MLT possa alterar a fluidez da membrana mitocondrial, o que está intimamente associado à menor geração de EROs como também elevar a produção de ATP devido à maior atividade dos complexos I, III e IV da CTE (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Martín et al., 2000). Interessantemente, 75% da incidência deste câncer ocorrem em homens acima dos 65 anos (Shiu et al., 2007), e sabe-se que com o envelhecimento há ablação na síntese de MLT devido ao comprometimento da glândula pineal (Iguchi et al., 1982; Waldhauser et al., 1988; Srinivasan et al., 2005), assim como da função mitocondrial devido à maior geração de EROs (Scialo et al., 2017; Sohal e Weindruch, 1996). Estas evidências podem sugerir que a suplementação com MLT em faixas etárias de risco (30 a 40 anos), caracterizadas devido à maior probabilidade de formação de Neoplasias Intraepiteliais Prostáticas (NIPs), possa ser uma estratégia de prevenção (Sakr et al., 1993; 1996).

Em linhagens prostáticas tumorais a MLT também exerce seu efeito anticlonogênico por interferência na via de sinalização do receptor de andrógeno (AR), provocar arresto do ciclo celular, como também redução da angiogênese pela menor transcrição de VEGF em modelos xenográficos (Paroni et al., 2014; Sohn et al., 2015). Sabe-se que a MLT pode atuar de forma dependente ou não de receptores de membrana acoplados a proteína G, MTR1 e MTR2, ambos expressos na próstata (Gilad et al., 1998; Reiter et al., 2017). O seu potencial antiproliferativo está associado principalmente à sensibilização de MTR1, responsável por co-ativar paralelamente PKC e PKA levando à maior expressão de p27^{Kip1}, reduzindo a taxa mitótica (Tam et al., 2007; 2008). Além disso, a maior ativação de PKC via MTR1 está relacionada à exclusão nuclear do receptor de andrógeno (AR) e redução da sua atividade de transcricional (Lupowitz et al., 2001; Rimler et al., 2002). Entretanto, linhagens andrógeno independentes, modelos *in vitro* de alta agressividade do CaP, apresentam níveis indetectáveis de MTR1 e quando expostos a MLT sugerem outras vias de inibição mitótica que ainda não estão completamente compreendidas (Marelli et al., 2000; Reiter et al., 2017).

Apesar da MLT exercer seu efeito antitumoral, alguns estudos revelaram sua capacidade de sensibilizar células neoplásicas devido a supressão de vias de sobrevivência, como AKT, potencializando o efeito supressor de outros compostos (Gao et al., 2016; Lu et al., 2016). Embora o estresse oxidativo aumente na progressão do CaP, em níveis muito

elevados é letal e pode ativar vias que sinalizam para a morte celular. Desta forma, ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (PUFA ω -3), em especial o ácido docosahexaenóico (DHA), tem sido investigado por induzir autofagia e apoptose mediado pela elevada produção de EROs em linhagens tumorais (Shin et al., 2013). Este lipídio é metabolizado nos peroxissomos e mitocôndrias (Park et al., 2016) e é altamente suscetível à oxidação mediada por espécies reativas (Lyberg e Adlerceutz, 2006), gerando hidroperóxidos e aldeídos cito e genotóxicos que podem afetar a viabilidade (Esterbauer e Schaur e Zollner, 1991; Girotti, 1998; Yin et al., 2005). Além de ser capaz de induzir a degradação do AR via NFK β em células tumorais andrógenos sensíveis (LNCaP), o DHA ainda pode exercer seu efeito anticlonogênico por inibir AKT e mTOR, (Shin et al., 2013); modular a via AKT/PIP₃ (Gu et al., 2013); e PDK1/Akt/Bad, levando à supressão de células tumorais (Hu et al., 2010). Embora estudos tenham sido realizados majoritariamente em estágios avançados do CaP, estas evidências apontam para um potencial efeito quimiopreventivo do DHA, mesmos em estágios em que ocorrem apenas alterações pré-malignas.

Atualmente, entre as principais estratégias de prevenção e tratamento está o uso de compostos capazes de influenciar a via de sinalização de esteroides sexuais (Cui et al., 2017), como inibidores da 5 α -redutase, antagonistas do AR e bloqueadores da atividade de receptores de Estrógeno (ERs). Entretanto, os mecanismos disparados por tais candidatos ainda não estão completamente elucidados e sua segurança é questionável, tendo em vista que alguns estudos experimentais reportaram a maior incidência de lesões pré-malignas de alto grau após a administração de alguns inibidores (Cui et al., 2017). Desta forma, nosso objetivo foi testar o potencial de quimioprevenção da MLT isolada ou combinada com o DHA. Para isso, utilizamos uma linhagem PNT1A, derivada de células epiteliais luminiais diferenciadas normais e imortalizadas com SV40. Apesar de ser adotada como uma linhagem normal na maioria dos estudos é um bom modelo para estudar os primeiro estágios da carcinogênese tendo em vista alterações pré-malignas que conferem alta capacidade de proliferação. Isto porque possui metabolismo e fenótipo de células epiteliais secretoras normais, mas apresenta características observadas no adenocarcinoma prostático, como perda do braço curto do cromossomo 10, expressão de *c-myc* dez vezes amplificada, capacidade de transformação e formação de CaP indiferenciado em camundongos (Degeorges et al., 1995).

Neste estudo, testamos se a MLT pode atuar como supressor do crescimento de células prostáticas epiteliais PNT1A via modulação da bioenergética, redução do estresse oxidativo e se este mecanismo envolve a sensibilização de receptores de membrana. Além

disso, nosso objetivo também foi avaliar se esta indolamina em combinação com o DHA potencializa a inibição da sobrevivência celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular e tratamentos

Células PNT1A (#95012614) foram obtidas da Health Protection Agency (England, UK) e cultivadas em meio RPMI1640 (#R6504/ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (Life Technologies, Paisley, UK) em incubadora úmida 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Para manutenção do cultivo celular, o meio foi substituído a cada 2-3 dias e o repique feito com 70-85% de confluência. Para os tratamentos, as células foram incubadas de 1 a 5x10⁴ células/poço, mantendo a mesma densidade por tratamento em cada ensaio, e permitida aderência por 24h.

Primeiramente foram testados os efeitos do DHA sobre a proliferação celular nas concentrações 10µM, 20µM, 50µM, 100µM e controle com exposição por de 24, 48 e 72 horas. As concentrações desejadas foram preparadas em meio de cultura a partir da solução estoque de 20mM de DHA em etanol absoluto e adicionado 0,14% de BSA. As molaridades foram escolhidas de acordo com experimentos prévios com células prostáticas epiteliais normais RWPE1 realizados por Meng e colaboradores (2013). Para as análises posteriores, foi escolhida a concentração e tempo de exposição ao DHA que primeiro exerceu efeito antiproliferativo combinado ao acúmulo lipídico.

Devido a controvérsias na literatura quanto aos mecanismos que a MLT pode disparar em diferentes concentrações (Hevia et al., 2010, 2008; Reiter et al., 2005), foram avaliadas as faixas de concentração fisiológica (pM-nM), supra-fisiológica (nM-µM) e farmacológica (µM-mM). As concentrações 1pM, 1nM, 1µM e 1mM foram testadas isoladamente ou em co-incubação com DHA e analisada sua resposta na proliferação celular. As soluções de trabalho foram preparadas em meio de cultura a partir de um estoque de 100 mM de MLT dissolvida em etanol absoluto. A incubação com luzindol (Cayman Chemical, MI, USA), antagonista não seletivo dos receptores de membrana MTR1 e MTR2, com concentração cem vezes maior que a de MLT foi realizada para determinar a via de ação da indolamina. Os efeitos do inibidor foram avaliados frente à condição padrão de incubação

com veículo etanol absoluto (C), 1 μ M de melatonina (MLT), 100 μ M de DHA e co-incubação (DM).

Proliferação Celular

Os efeitos dos tratamentos foram analisados após incubação com MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol], utilizando o kit colorimétrico comercial *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega Corporation). O volume de 20 μ L de MTS foi adicionado em cada poço seguido de incubação por 60 minutos em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂, conforme instruções do fabricante. A absorbância foi analisada a 490nm em leitor de microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata em três eventos independentes (n=9). Os resultados foram expressos valores de absorbância e desvio padrão.

Lipídios Intracelulares

A análise microscópica para avaliação qualitativa do acúmulo de lipídios foi realizada após incubação com *Oil Red O* (#O0625 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Neste ensaio, o 1-([4-(Xililazo)xilil]azo)-2-naftol,1-[2,5-Dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)phenilazo]-2-naftol é solubilizado em lipídios neutros evidenciando gotículas lipídicas (Zeng et al., 2012). Foram plaqueadas 10⁴ células/poço em placa de 96 e, após aderência de 24h, as mesmas foram incubadas por 24, 48 e 72h em meio contendo 10, 20, 50 e 100 μ M de DHA ou etanol absoluto, veículo de diluição do DHA (C). O meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, foram imersas em isopropanol 60%, por 5 minutos em temperatura ambiente e então realizada incubação de 60 minutos com *Oil Red O* a 0,03% em isopropanol, recém-preparado. Após dois experimentos independentes realizados em duplicata foi considerado o perfil mais representativo de cada concentração.

A análise quantitativa do acúmulo de lipídios intracelulares foi realizada após incubação (5x10⁴ células/poço) com 5 μ M da sonda BODIPY™ *Lipid Probes* 493/503 (#D3922 - Molecular Probes®, Invitrogen) preparada em meio de cultura sem soro por cinco minutos a temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foram imediatamente capturadas imagens em microscópio de fluorescência invertido com objetiva de 40x (Axio Vert A1 Carl Zeiss AG, DE) e padronizado mesmo tempo de exposição

(280ms) e intensidade da lâmpada. O total de quinze imagens de células de três passagens diferentes, contabilizando ao menos quatrocentas células por grupo, foi considerado para quantificação da intensidade de fluorescência total, obtida com auxílio de software NIH ImageJ (versão 1.39).

Determinação de EROs

Para análise da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram incubadas, na placa de 96 poços (Nuclon® flat bottom black), 10^6 células/mL em PBS/ Mg^{2+} na presença 5mM de succinato, 1 U/mL de HRP e 25 μ M de Amplex Red (Molecular Probes®, ThermoFisher Inc). O monitoramento da fluorescência foi realizado pela excitação e emissão nos comprimentos de onda 563 e 587nm, respectivamente, utilizando leitor de microplaca *Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Biotek Instruments, Inc). A correlação quantitativa entre a fluorescência e a produção de H_2O_2 celular foi determinada previamente (Barros et al., 2004).

A quantificação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foi realizada após incubação com MitoSOX® Red (#M36008 - Molecular Probes, ThermoFisher Inc), conforme descrito previamente (McCarthy e Kenny 2016, modificado). Após os respectivos tratamentos por 48h, foi removido o de meio de cultura, as células (5×10^4 /poço) lavadas duas vezes com tampão KH (NaCl 120mM, $NaHCO_3$ 15mM, KCl 5mM, NaH_2PO_4 1,5 mM e Na_2HPO_4 0,7 mM), adicionada a sonda na concentração de 3 μ M preparada no mesmo tampão e incubadas por 15 minutos em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes para remoção da sonda que não foi captada pela mitocôndria. Foram capturadas quinze imagens obtidas após padronização do tempo de exposição (1200ms) e intensidade da lâmpada em células vivas com microscópio de fluorescência invertido em objetiva de 40x (Axio Vert A1 Carl Zeiss AG, DE). A intensidade de fluorescência total por campo foi mensurada e normalizada pelo número de células da imagem, sendo contabilizadas ao menos 250 células por tratamento.

Análises Morfométricas Mitocondriais

Foram plaqueadas 5×10^4 células/poço em Cell^{VIEW} com fundo de vidro (Greiner Bio-One) e, após os tratamentos, incubadas com 50nM de MitoTracker Orange CMTMRos (#M7510 Molecular Probes, Invitrogen) em meio de cultura sem soro por 15 minutos em estufa com 5% de CO_2 a 37°C (Li et al., 2015). Em seguida, o meio de cultura foi substituído

para remoção da sonda em excesso. As células foram observadas vivas em microscópio de fluorescência invertido (Axio Observer Z1 Carl Zeiss AG, DE). A avaliação morfológica mitocondrial foi realizada com auxílio do macro desenvolvido por Dagda e colaboradores (2009) para o software NIH ImageJ (versão 1.39). Para tal, foram analisadas área, perímetro e interconectividade mitocondrial (razão área/perímetro) de cada grupo e utilizadas ao menos quinze imagens capturadas em objetiva de 40x. A mensuração foi realizada considerando as porções fluorescentes totais da imagem, seguido de normalização pelo número de células por campo. Ao menos cem células por grupo foram contabilizadas para análises estatísticas.

Potencial de Membrana Mitocondrial

Após os respectivos tratamentos, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e o pellet lavado e ressuspenso em PBS. Os ensaios foram padronizados com 10^6 células/mL em tampão de respiração (125mM de sacarose, 65mM de KCl, 10mM de HEPES pH 7,2, 1mM de $MgCl_2$, 2mM de KH_2PO_4 , 0,5mM de EGTA e 0,15% de BSA) acrescido de 5mM de succinato, 5 μ M de safranina O e 20 μ M de digitonina (Holden e Sze, 1989, modificado). Para a análise, foram adicionados 50 μ M de ADP, 1 μ g/mL de oligomicina (OLG) e 1 μ g/mL de antimicina A (AA). Os dados foram registrados em espectrofotômetro de fluorescência (F2500 Hitachi) com excitação a 495 e emissão a 586nm. Após três experimentos independentes realizados em duplicata foi considerado o perfil mais representativo de cada tratamento e os valores foram apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência.

Análise do Consumo de Oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi registrada em oxígrafo Hansatech (Yellow Springs Corporation) após incubação de 10^6 células/mL em tampão de respiração acrescido de 20 μ M de digitonina na presença de 5 μ M de succinato como substrato respiratório. O controle respiratório (razão estado 3/ estado 4) foi determinado após adição de 50 μ M de ADP (estado 3) e 1 μ g/ml de oligomicina (estado 4). A velocidade máxima da cadeia respiratória foi determinada após a adição de 1 μ M CCCP, um desacoplador mitocondrial. Estas análises foram realizadas conforme descrito previamente por Silva e colaboradores (2011). A capacidade de reserva bioenergética mitocondrial foi calculada pela fórmula $CRBM = (E2-E3U)$ considerando o consumo de oxigênio não mitocondrial (Vayalil e Landar, 2015, modificado).

Identificação e Quantificação de Grânulos Intracelulares de Glicogênio

As células foram lavadas em PBS e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e os pellets fixados em Glutaraldeído 25% e Ácido Tânico em tampão Milloning, pH 7,2 a 4°C por 24 horas. Os pellets foram desidratados em acetona e incluídos em Araldite 502 (#AR502 - Sigma-Aldrich). Para a análise microscópica foram obtidos cortes semi-finos de 1µm de espessuras em ultramicrotomo e aderidos em lâminas de vidro.

Para quantificação de células com grânulos de glicogênio citoplasmáticos, foi realizada a coloração com PAS (*Periodic Acid Schiff*). Os cortes foram imersos em Ácido Periódico 0,5% , levados ao micro-ondas por 25 segundos e mantidas a 60°C por 15 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por 10 minutos, incubadas com Reativo de Schiff por 2 horas a 60°C, lavadas 3 vezes por 5 minutos cada com Metabissulfito de Sódio 0,5% e então contra coradas com Hematoxilina de Harris contendo 1% de tetraborato de sódio decahidratado por 10 minutos em placa aquecedora a 90°C. A avaliação da frequência de células PAS-positivas foi realizada após captura de imagens com auxílio de microscópio de luz com objetiva de 100x em óleo de imersão. Foram contabilizadas ao menos mil células por tratamento. Para o cálculo da frequência utilizou-se para cada campo a fórmula $\% = (\text{total de células contadas} / \text{número de células PAS-positivas}) \times 100$. Para confirmar a composição dos grânulos PAS-positivos, os cortes, após coloração, foram novamente incubados com diastase por 2h, seguida de preparação da lâmina para microscopia de luz. O exame qualitativo de degradação do glicogênio foi obtido pela ausente ou menor coloração granular.

Quantificação Hormonal

A determinação dos níveis de testosterona no meio de cultura foi realizada por ELISA com kit comercial AccuBind Testosterone System microwells (Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisadas seis amostras em duplicata de cada grupo de experimentos diferentes.

Western Blotting

As células (5×10^4 /poço) foram lisadas em tampão RIPA acrescido de 10% coquetel de inibidor de protease, ortovanadato de sódio (1:100) e PMSF (1:1000). Todos os reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A quantificação de proteínas foi realizada em leitor de microplacas Epoch acoplado a placa Take3 Micro-Volume a 280nm (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Após eletroforese, as proteínas (50

ou 100ug/uL) foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 1 hora e 40 minutos em sistema semi-úmido. O bloqueio de ligações inespecíficas para as proteínas fosforiladas foi realizado com BSA 5% em TBST por 1 hora a temperatura ambiente no agitador. As demais proteínas tiveram o bloqueio realizado com leite desnatado 5% em TBST por 30 minutos a temperatura ambiente no agitador. Após lavagem rápida com TBST, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo anti-fosfo-mTOR (rabbit monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:400), anti-fosfo-AKT (rabbit policlonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:400), anti-fosfo-ERK1/2 (rabbit policlonal, Cell Signalling, 1:1000), anti-GSTP1 (rabbit policlonal, Cell Signalling, 1:1000) e anti- β -actina (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) para normalização. A incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP (Santa Cruz Biotechnology) foi feita por 1 hora a 4°C. A revelação foi realizada com sistema ECL e as bandas visualizadas com auxílio de fotodocumentador G:BOX Chemi (Syngene, Synoptics Ltd). A quantificação foi realizada por densitometria relativa (β -actina) utilizando software NIH ImageJ. Os dados foram apresentados em valores da densitometria relativa e desvio padrão. As análises foram realizadas com três amostras de eventos independentes.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® (GraphPad Prism software, v.5.0). Primeiramente, os dados foram analisados considerando os pressupostos de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os grupos que assumiram perfil paramétrico foram submetidos ao Teste t ou ANOVA *One-way*, seguido do teste de Tukey (*post-hoc*). Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post-hoc*). Os dados foram expressos em média e desvio padrão e $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

O DHA tem propriedades pró e antimitogênicas com padrão dose e tempo dependente

O ômega-3 aumentou a proliferação das células PNT1A nas concentrações a partir de 20 μ M para os tempos 24 e 48, 10 μ M e 20 μ M com 72h, mas diminuiu na concentração de 100 μ M para os tempos 48 e 72h (Fig.1.A). Também foi verificado qualitativamente maior acúmulo de gotículas lipídicas com padrão dose e tempo dependente (dados não

apresentados). Portanto, a exposição com 100 μ M por 48h foi escolhida para realização das análises posteriores, visto ser a primeira a apresentar efeito anticlonogênico e ter grande acúmulo intracelular de lipídios (Fig.1.B).

A MLT reduziu a proliferação celular e teve efeito amplificado quando co-incubada com DHA

As faixas fisiológicas de MLT (pM-nM) não interferiram na proliferação celular com incubação padrão (Fig.1.C). Entretanto, no intervalo de μ M-mM foi observado efeito antiproliferativo. A faixa de 1 μ M apresentou redução de aproximadamente 16% na proliferação celular e de 30% quando realizada co-incubação com DHA (Fig.1.C). Já com 1mM as células tiveram a sobrevivência reduzida em 38% e 63% quando na presença do ácido graxo (Fig.1.C). Além disso, esta concentração apresentou a menor proliferação celular em relação às outras concentrações testadas e potencializado na presença de 100 μ M de DHA (Fig.1.C). Optou-se pelo uso da concentração de 1 μ M do hormônio, visto que nosso objetivo foi avaliar o seu papel direto independente da sensibilização de receptores de membrana, que ocorre predominantemente no intervalo pM-nM. Além disso, a partir de μ M concentrações intratecduais são frequentemente encontradas, mesmo em condições normais (Reiter et al. 2005).

O DHA isolado ou em combinação com MLT promoveu o acúmulo de lipídios intracelulares

Incubação com DHA 100 μ M aumentou 62% o acúmulo lipídico nas células PNT1A após 48h (Fig.2.B,B';E) e quando co-incubado com 1 μ M de MLT aumentou para 82% (Fig.2D;D';E). A indolamina sozinha não afetou a deposição intracelular de lipídios (Fig.2C; C';E).

O DHA aumentou a geração de EROs e a MLT aliviou o estresse oxidativo

A MLT reduziu a produção total de H₂O₂ em 62% em relação às células incubadas em condição padrão (Fig.3.A). Por outro lado, o DHA apresentou uma tendência em aumentar a produção de H₂O₂ (Fig.3.A). Quando as células foram co-incubadas (DM) foi detectado aumento de 44% na produção de H₂O₂ em relação à incubação padrão e elevação expressiva de 280% em relação às células tratadas somente com a MLT (Fig.3.A).

O DHA dobrou a produção do ânion superóxido (Fig.3.B;D) e a MLT por si só reduziu em 40% a geração dessa espécie reativa em relação ao controle (Fig.3.B;E). Quando co-incubados, a MLT foi capaz de reduzir 26% desta espécie reativa em relação às células expostas exclusivamente ao DHA, mas sua produção não foi normalizada aos níveis da incubação controle (Fig.3.B;F).

O DHA e a MLT alteraram a morfologia e o perfil do potencial de membrana mitocondrial

A incubação com DHA aumentou a área e o perímetro mitocondrial nas células epiteliais em cerca de 20% (Fig.4.B;E;F), o que não foi recuperado na co-incubação com MLT (Fig.4.D;E;F). Por outro lado, a MLT individualmente reduziu ambos os parâmetros em pelo menos 19% (Fig.4.C;E;F). Nenhum tratamento influenciou a interconectividade mitocondrial (Fig.4.G). Esta avaliação morfométrica foi refletida no perfil do potencial de membrana mitocondrial, obtido pelo método da safranina O (Fig.4.H). Com a maior área e perímetro, há o acúmulo em extensão da sonda, aumentando a fluorescência emitida. Da mesma forma, a menor área e perímetro mitocondrial apresentada na exposição à MLT refletiu na menor fluorescência da safranina O.

A MLT melhorou a fosforilação oxidativa e aliviou danos mitocondriais causados pelo DHA

Os tratamentos não alteraram a respiração basal celular (E2 – Fig.5A). A MLT sozinha aumentou em 50% o controle respiratório (razão Estado 3/Estado 4) quando comparado ao C ou incubação somente com DHA (Fig.5.B). Entretanto, em combinação, a indolamina melhorou o controle respiratório em 20% comparado ao C ou o ômega-3 sozinho (Fig.5B). A Capacidade de Reserva Bioenergética Mitocondrial (CRBM) foi reduzida duas vezes quando as células foram expostas exclusivamente ao DHA, mas surpreendentemente a MLT restaurou (cerca de 130%) este parâmetro quando co-incubada com o PUFA (Fig.5.D). Sozinho, o hormônio pineal não alterou a CRBM (Fig.5.D).

A MLT estimulou e o DHA reduziu o acúmulo de glicogênio intracelular

A MLT promoveu o aumento da frequência de células com grânulos de glicogênio no citoplasma, sendo 2,6 vezes maior que a observada para células com incubação padrão (Fig.6.A;F). Por outro lado, o DHA reduziu em 38% a frequência de células PAS-positivas e

aumentou substancialmente a ocorrência de gotículas lipídicas (Fig.6.A;D). Quando realizada co-incubação, a MLT não foi capaz de elevar o acúmulo de glicogênio em relação à exposição somente com o hormônio, mas normalizou a frequência em relação às células padrão (Fig.6.A;H). Foi possível observar também que nas células com maior incidência de grânulos PAS-positivos não houve grande acúmulo de lipídios.

A MLT e DHA modularam vias de sinalização para proliferação e sobrevivência celular associadas à redução da taxa clonogênica

O DHA e MLT sozinhos ou em co-incubação reduziram a fosforilação de AKT, mas isso não apresentou sinergismo quando combinados (Fig.7.A). A MLT por si só afetou a ativação de mTOR, o que não foi observado na presença de DHA, sozinho ou combinado com o hormônio (Fig.7.B). Por outro lado, a MLT elevou a ativação de ERK1/2, o que foi amplificado quando ocorreu exposição simultânea ao DHA (Fig.7.C). A expressão de GSTP1 não foi alterada nos tratamentos com o ácido graxo e MLT isolados, mas quando co-incubados a expressão da enzima antioxidante aumentou aproximadamente 20% em relação às células expostas somente à indolamina (Fig.7.D). A expressão do receptor de andrógeno não foi alterada com nenhum tratamento (Fig.7.E).

A MLT estimulou a captação de testosterona pelas células PNT1A

A entrada de testosterona nas células PNT1A foi estimulada pela MLT, independentemente do DHA (Fig.8). Sozinho, o hormônio reduziu em 25% os níveis do andrógeno presente no meio de cultura e 20% quando combinado com o PUFA (Fig.8).

Os efeitos observados após exposição com 1 μ M de MLT isoladamente ou em combinação com DHA não foram predominantemente dependentes da sensibilização de MTR1 e MTR2

O ensaio realizado com o antagonista luzindol, na concentração de cem vezes maior que a de MLT, não alterou proliferação celular (Fig.9). Entretanto, reduziu a taxa clonogênica na presença de DHA.

DISCUSSÃO

O DHA e a MLT têm sido investigados em estudos experimentais com CaP devido à suas propriedades antiproliferativas (Garcia et al., 2015; Moretti et al., 2000; Shin et al., 2013; Xi et al., 2001). Neste trabalho constatou-se que isolados ou não, ambos apresentaram efeito antimitogênico em células PNT1A por alterar a fisiologia mitocondrial e interferir em vias de sinalização para proliferação e sobrevivência.

Células prostáticas com fenótipo normal são mais resistentes ao DHA do que as tumorais

Embora tenha sido descrita ação antimitogênica do DHA em células tumorais (Friedrichs et al., 2011; Shin et al., 2013), foi constatado em nosso estudo que esse ácido graxo teve comportamento hormético. Nossos resultados, em conjunto com a literatura, indicam que as células tumorais são mais sensíveis ao ômega-3, visto que de acordo com Shin et al. (2013), com 50 μ M (metade da concentração de DHA utilizada), houve aumento da morte celular, porém estimulou a PNT1A a proliferar, apresentando efeito citotóxico apenas com 100 μ M, considerando o mesmo tempo de exposição de 48h. Estas evidências podem estar relacionadas à maior captação e expressão de enzimas da via de degradação de lipídios detectado em linhagens tumorais (Sadeghi e Karami-tehrani 2015; Vaz et al. 2012), como também o aumento da quantidade de mitocôndrias (Panov e Orynbayeva, 2013). Além disso, células em estágios avançados de CaP apresentam maior estresse oxidativo (Freitas et al., 2012; Oberley et al., 2000; Yossepowitch et al., 2007) e acredita-se que a exposição ao DHA eleve a produção de EROs a níveis letais, favorecendo danos celulares e levando à apoptose. As vias de atuação deste PUFA enquanto agente quimiopreventivo no CaP, ainda são não esclarecidas, mas sugere-se que dois fatores sejam centrais no efeito citotóxico com 100 μ M deste ácido graxo: o aumento do estresse oxidativo e a menor ativação da via de proliferação pela AKT.

O DHA causou remodelação mitocondrial associada ao aumento do estresse oxidativo

Mostramos pela primeira vez que, em células PNT1A, o DHA induziu o aumento do estresse oxidativo, o que foi acompanhado pela redução da proliferação celular. Esta correlação também foi observada em linhagens tumorais de cólon expostas a diferentes PUFAs, inclusive ao DHA a partir da concentração aqui utilizada (Zhang et al. 2015). Sabe-se

que células sujeitas a elevados níveis de estresse oxidativo têm a função mitocondrial comprometida (Banerjee et al., 2016). Como resposta, alguns autores mostraram que nesta situação há aumento da fusão das mitocôndrias, a fim de recuperar a sua função (Youle e Blieg 2012). Considerando a exposição por 48h ininterruptas, acredita-se que o DHA tenha elevado o estresse oxidativo comprometendo inicialmente a função mitocondrial e, em resposta à situação de estresse, tenha ocorrido o aumento da fusão das mitocôndrias, refletindo no aumento da sua área e perímetro e recuperação da fosforilação oxidativa. Estes achados estão de acordo com estudos que reportaram aumento de proteínas envolvidas com a fusão mitocondrial Mfn1 e Mfn2 na presença de DHA (Zhang et al. 2011). Vale ressaltar que, embora o acoplamento tenha sido normalizado, ainda há comprometimento da fisiologia da organela, visto que o DHA reduz drasticamente a capacidade de reserva bioenergética, a qual indica a resiliência celular em responder a uma situação de estresse, e que é drasticamente reduzida com o estresse oxidativo (Chacko et al., 2014). Neste sentido, estudos em nosso grupo de pesquisa mostraram que gonócitos expostos à metade da concentração de DHA utilizada quando combinado ao mono-2-etilhexilftalato (MEHP) reduziram drasticamente a sobrevivência, evidenciando a sensibilização celular pelo ômega-3 (dados não publicados). Portanto, acredita-se que o DHA torne as células PNT1A mais sensíveis a outros compostos por prejudicar parâmetros mitocondriais e a capacidade de resposta a situações de estresse.

Redução da geração de EROs pela MLT isolada está associada a menor proliferação celular

Tendo em vista que o estresse oxidativo parece ser causa central na menor proliferação celular, avaliamos o potencial antioxidante da MLT. Esta indolamina é conhecida pelas suas propriedades antioxidantes por estimular a expressão e modular a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante, como SOD e GSTP1 (Mayo et al., 2002; Tomás-Tapico et al., 2005). De forma inédita mostramos que, além destas vias clássicas, a indolamina pode reduzir o estresse oxidativo nas células PNT1A devido a alterações de parâmetros da fisiologia mitocondrial, principalmente pela melhora da fosforilação oxidativa. A menor produção de EROs após tratamento com a indolamina pode estar relacionada a alteração da fluidez da membrana mitocondrial interna, como também descrito por López e colaboradores (2009) na mesma concentração utilizada. Além disso, a MLT ainda pode ter reduzido o estresse oxidativo por atenuar o vazamento de prótons na fração mitocondrial, observado em estudos com adipócitos (Jiménez-Aranda et al., 2014). Tendo em vista que a

maior geração de EROs aumentou a rede mitocondrial, questionou-se se a redução na sua produção acompanhada da melhoria no acoplamento mitocondrial também interferiria na morfologia organelar. A melhoria da função mitocondrial foi acompanhada de menor área e perímetro, o que pode evidenciar um sistema de qualidade responsável por remover totalmente ou frações mitocondriais que apresentaram maiores níveis de EROs, prejudiciais aos processos celulares. Por outro lado, não se pode descartar que os efeitos na fisiologia mitocondrial possam ser consequência de alterações primeiras na dinâmica da organela, como também na modulação do sistema de defesa antioxidante, efeito já descrito da MLT na literatura. O foco deste estudo não foi a dinâmica organelar frente aos respectivos tratamentos, mas revela novas possibilidades para o papel da MLT como regulador da função mitocondrial.

A melhora na fosforilação oxidativa e menor produção de EROs estão provavelmente associados às menores taxas de proliferação observadas após incubação com MLT. Nossos dados sugerem que seu efeito antimitogênico tenha correlação com aumento de ATP citosólico devido ao melhor acoplamento mitocondrial. De acordo com diversos autores, a MLT elevou a razão ADP/O, aumentou a produção de ATP e promoveu o aumento da expressão da subunidade β da ATP sintase (Castillo et al., 2005; Chuffa et al., 2016; López et al., 2009; Martín et al., 2002). Estudos *in vitro* também mostraram que a administração de ATP extracelular inibe o crescimento de células tumorais (Zhang et al. 2013), inclusive que atuou diretamente na supressão da ativação da via de AKT (Yang et al. 2017), também observado aqui. Alguns autores associam a maior produção intracelular de ATP ao processo de morte por apoptose e não por necrose (Tatsumi et al., 2003; Zamaraeva et al., 2005), cujo fenótipo não foi observado nas análises microscópicas na incubação com MLT. Portanto, acredita-se que esse hormônio diminua a proliferação celular por reduzir o estresse oxidativo, o que influencia vias de estímulo à mitose e sobrevivência celular. É sabido que com a progressão do CaP há aumento do estresse oxidativo, o que em conjunto com nossos dados, apontam para o papel da bioenergética mitocondrial no arresto celular e sugere que a MLT atue por esta via como eficaz agente antiproliferativo.

O Acúmulo de lipídios parece limitar o efeito antioxidante da MLT

Com o aumento do acúmulo lipídico, a indolamina não foi capaz de reduzir a produção de H_2O_2 , diferentemente do observado quando as células foram expostas exclusivamente ao hormônio. Neste sentido, acredita-se que a ação antioxidante da

indolamina combinada ao DHA tenha sido predominantemente na fração mitocondrial. Isto porque, apesar de não normalizar a produção em relação a C, reduziu a produção de $O_2^{\bullet-}$, provavelmente devido ao melhor acoplamento mitocondrial (também observado na sua incubação exclusiva). Além disso, a MLT pode não ter sido capaz de reduzir os níveis elevados de H_2O_2 formados com a oxidação do DHA, cuja metabolização é iniciada na fração peroxissomal devido à sua cadeia longa (Hou et al., 2012).

DHA e MLT modulam vias de proliferação e sobrevivência celular

O DHA e a MLT influenciaram o status oxidativo que interferiu em vias de sinalização determinantes para a sobrevivência celular. Independentemente do tipo de incubação, ocorreu redução da ativação de AKT, cuja fosforilação é essencial para a proliferação. Entretanto, a potencialização da inibição da sobrevivência celular parece envolver vias adicionais. Primeiramente, notamos que o DHA comportou-se de forma distinta na inibição da proliferação em relação a linhagens tumorais PC3 e DU145, nas quais provocou a supressão da via AKT/mTOR (Shin et al., 2013), o que ocorreu parcialmente para a PNT1A. Esta evidência fortalece a hipótese de ação diferencial do ácido graxo entre células normais e tumorais e sugere que atue na inibição de outras vias envolvidas com a supressão de fosfo-AKT, que não fosfo-mTOR. A MLT sozinha inibiu o eixo AKT/mTOR, reduzindo a fosforilação destes alvos moleculares, como também ativou a via ERK1/2, o que refletiu a menor proliferação das células PNT1A. Já quando incubada com DHA, a indolamina potencializou a redução da proliferação ativando a via da ERK1/2. A maior fosforilação de ERK1/2 embora seja frequentemente associada ao aumento da proliferação, quando há situações elevadas de estresse, inclusive aumento excessivo na produção de EROs, sua ativação pode provocar a morte celular (Mebratu e Tesfaigzi, 2009). Da mesma forma, isto foi observado na linhagem PC3 em que o aumento do estresse oxidativo reduziu a fosforilação de AKT acompanhado de maior ativação de ERK e menor proliferação celular (Yan et al., 2013), parecido com o que ocorreu com a PNT1A em nosso estudo. Neste sentido, é possível que, em partes, a maior ativação da via seja devido ao aumento do estresse oxidativo extramitocondrial, em especial do H_2O_2 , conforme também reportado em outros trabalhos (Cagnol e Chambard, 2010). É importante mencionar que a maior ativação de ERK pode estar relacionada à maior expressão de GSTP1, além de ser resposta ao maior estresse celular (Yin et al., 2000).

MLT pode ter estimulado o acúmulo intracelular de glicogênio por modulação de vias de sobrevivência e proliferação celular

A menor fosforilação de AKT está intrinsecamente ligada ao acúmulo de glicogênio, observado na presença exclusiva de MLT. Sabe-se que a menor fosforilação de AKT está associada à menor fosforilação da Glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β), ficando esta na sua forma ativa (Benelli et al., 2010). A GSK3 β , por sua vez, ativa glicogênio sintase, aumentando o acúmulo de glicogênio intracelular (Jope e Johnson 2004). Além disso, a maior ativação da GSK3 β está envolvida no arresto celular, principalmente pela degradação de ciclina D₁ (Diehl et al., 1998). Portanto, estes achados estão de acordo com outros estudos que apontam redução nos níveis desta ciclina na presença de MLT, o que estaria correlacionado à menor proliferação celular por atraso na passagem G₀/G₁, inclusive na glândula prostática (Moretti et al., ; Siu et al., 2002). É importante mencionar que o aumento do acúmulo lipídico na presença do DHA pode ter influenciado a síntese de glicogênio, assim como a modulação de outras vias de sinalização, tendo em vista que o aumento expressivo do carboidrato não ocorreu quando da exposição exclusiva ao ômega-3. Além disso, ocorreu apenas parcialmente quando foi realizada co-incubação, evidenciando ser um efeito atribuído ao hormônio.

Proliferação celular e a via androgênica

Dada a importância da regulação androgênica na manutenção de células prostáticas, determinamos se estes efeitos estabelecem relação com esta via de sinalização. O DHA não alterou a captação de hormônio ou a expressão de AR, o que fortalece a hipótese de que os efeitos provenientes da sua ação devam ser devido à alterações no status oxidativo. A expressão de AR também não foi alterada na presença de MLT, independentemente do DHA. Por outro lado, constatou-se que a indolamina estimulou a captação de testosterona, independentemente do DHA. Neste sentido, Estrada e colaboradores (2003) reportaram que na presença de andrógenos ocorreu aumento da ativação de ERK seguida de menor proliferação celular. Portanto, este estudo sugere uma associação entre a bioenergética mitocondrial, estresse oxidativo, sinalização androgênica e a MLT com a menor sobrevivência celular, evidenciando seu potencial quimiopreventivo.

Os efeitos da MLT não foram independentes da sensibilização de MTR1 e MTR2

Por fim, mostramos que as respostas celulares observadas não foram devido a sensibilização de receptores MTR1 e MTR2 presentes na próstata (Gilad et al., 1998; Gobbo et al., 2015b). Isto mostra, novamente, que a MLT devido à sua entrada nas células PNT1A, já comprovada previamente (Hevia et al., 2010), apresenta outras vias de atuação que não a sensibilização de receptores e que tem papel chave na modulação da atividade mitocondrial e do estresse oxidativo. Sabe-se que a MLT tem a propriedade de promover a exclusão nuclear do AR via MTR1/PKC, exercendo efeito antiproliferativo (Rimler et al. 2001; 2002). Entretanto, nossos dados podem sugerir novas vias de modulação androgênica, visto que há maior captação de testosterona acompanhada de menor proliferação celular independentemente da sensibilização de receptores.

CONCLUSÃO

As células prostáticas PNT1A são mais resistentes que linhagens cancerígenas, porém, com 100 μ M o DHA foi capaz de reduzir a sobrevivência por aumentar o estresse oxidativo em níveis letais, inibindo a via de AKT. É importante destacar o comportamento hormético do ômega-3, dado que em doses baixas estimulou a proliferação, o que chama atenção para a suplementação alimentar com este PUFA, principalmente em homens dentro de faixas etárias de risco de desenvolver CaP. Além disso, a MLT exibiu efeito anticlonogênico por modular a bioenergética mitocondrial, reduzindo a geração e EROs independentemente da sensibilização de receptores de membrana. Quando combinados, o DHA e a MLT podem indicar novas estratégias quimiopreventivas ao CaP.

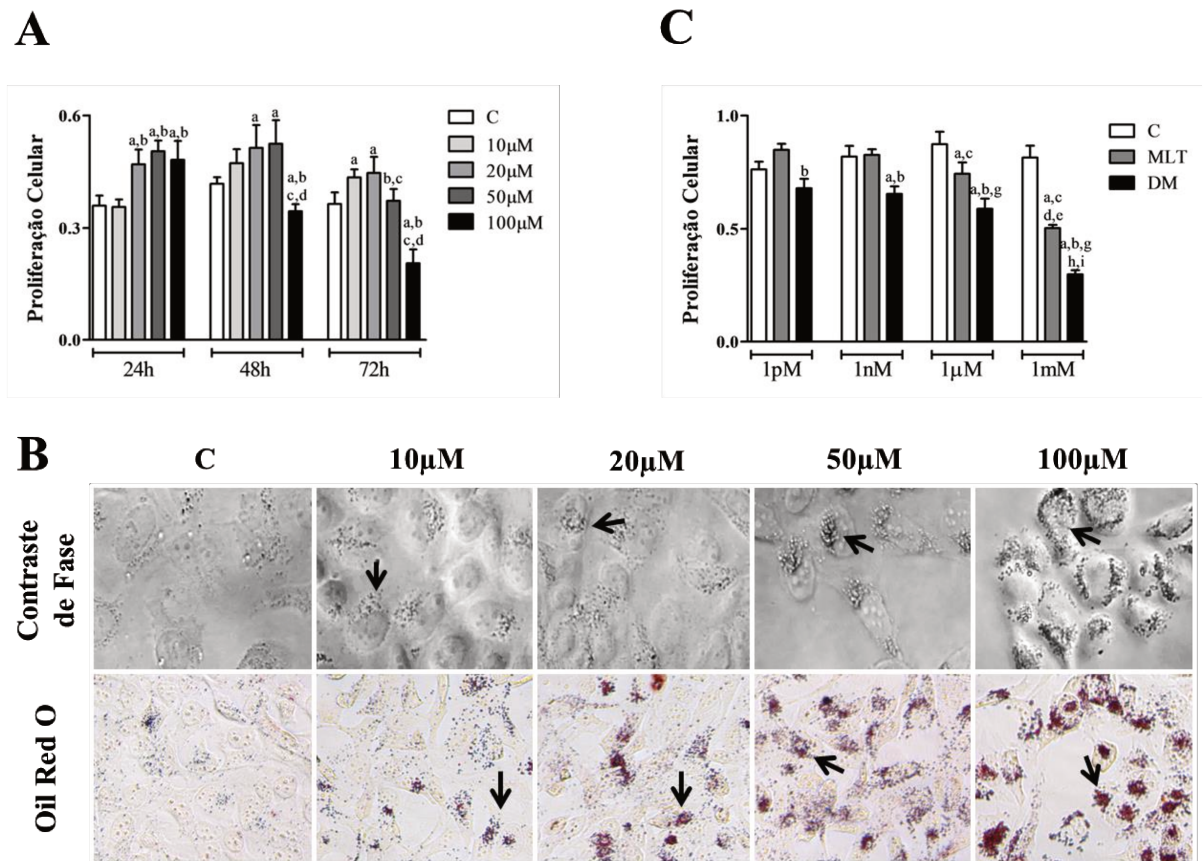


Figura 1. A) Avaliação dose resposta na proliferação de células PNT1A frente ao DHA. Legenda: C – Controle. Análise Estatística: a diferente estatisticamente de C; b diferente estatisticamente de 10μM; c diferente estatisticamente de 20μM; d diferente estatisticamente de 50μM; **B) Acúmulo de lipídios intracelulares.** Gotículas lipídicas evidenciadas em vermelho após incubação com *Oil Red O* nas concentrações testadas de DHA no tempo de 48h. Objetiva de 40x (20μm). Legenda: seta – gotícula lipídica. **C) Avaliação dose resposta na proliferação de células PNT1A frente à MLT.** Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1μM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100μM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT. Análise Estatística: a diferente de C; b diferente de MLT dentro da mesma faixa de concentração; c diferente de MLT-pM; d diferente de MLT-nM; e diferente de MLT-μM; g diferente de DM-pM; h diferente de DM-nM; i diferente de DM-μM; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante. Valores expressos em média de absorbância e desvio padrão.

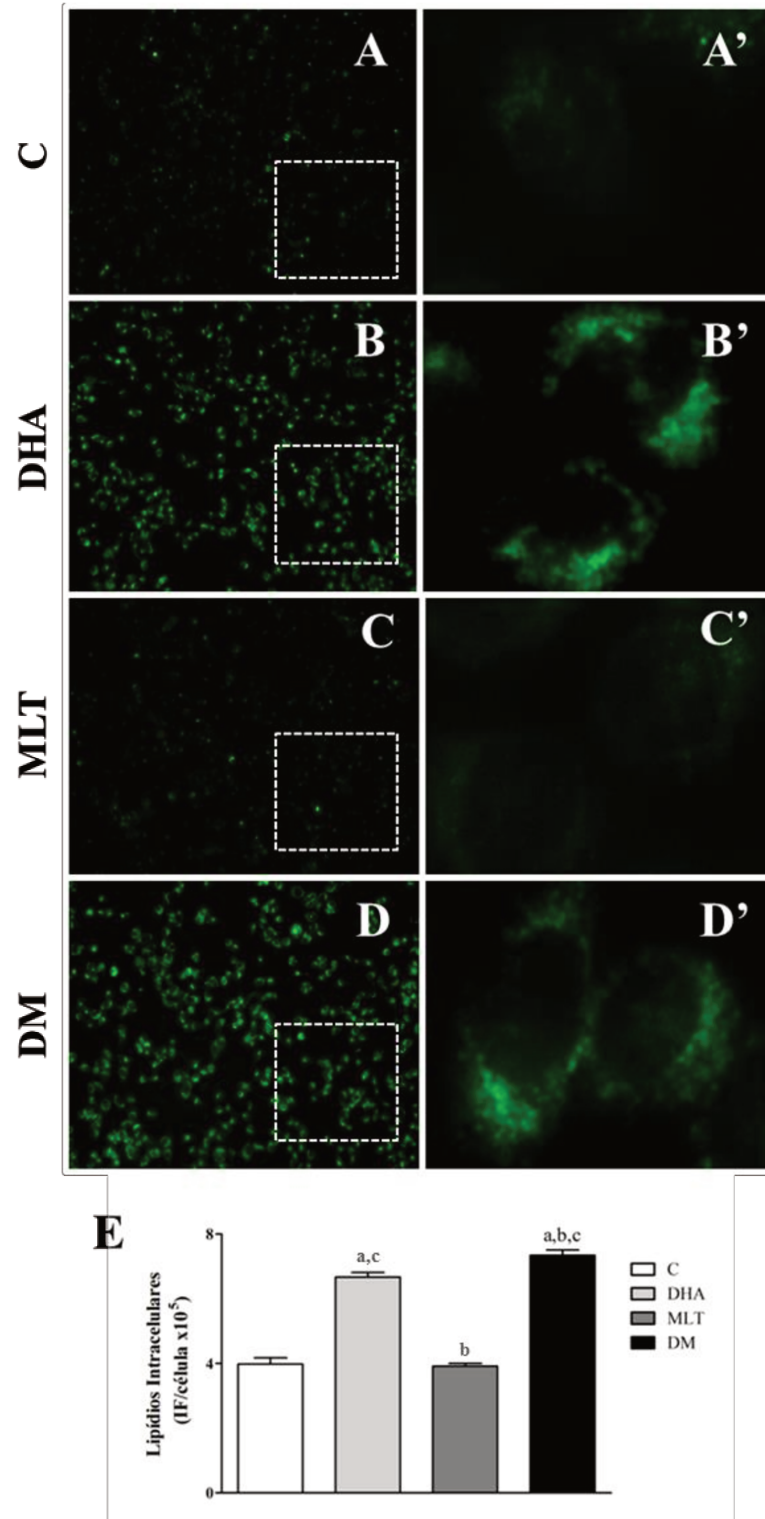


Figura 2. A-D) Identificação de lipídios intracelulares. Detecção de gotículas lipídicas após incubação com a sonda BODIPYTM 493/503. Imagens da coluna esquerda capturadas em objetiva de 10x (100µm) e da direita em 40x (20µm). **E) Quantificação dos lipídios intracelulares.** Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1µM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100µM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT. Análise Estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT; p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Valores expressos em média de unidades de fluorescência por célula e desvio padrão.

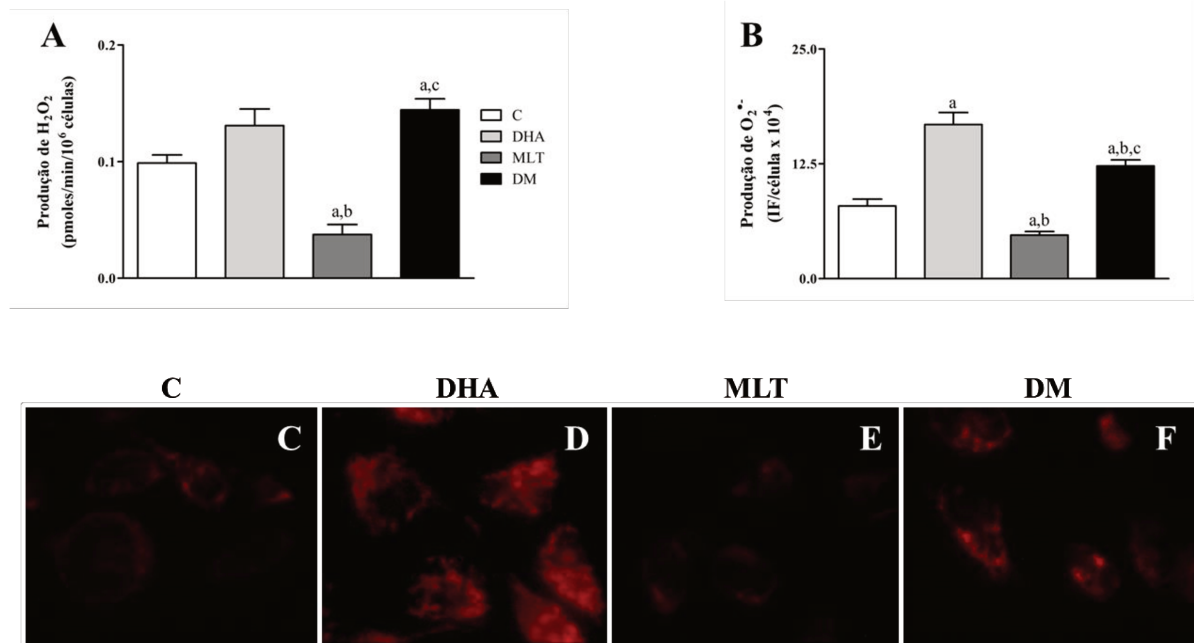


Figura 3. Estresse Oxidativo. A) **Produção total de H₂O₂.** Valores expressos em pmoles de H₂O₂/min/10⁶ células e desvio padrão. B) **Produção de O₂^{*}.** Valores expressos em unidades de fluorescência por célula. C-F) **Visualização da Intensidade de Fluorescência após incubação com MitoSOX®.** Objetiva de 40x (20µm). Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1µM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100µM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT; Análise Estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT. p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

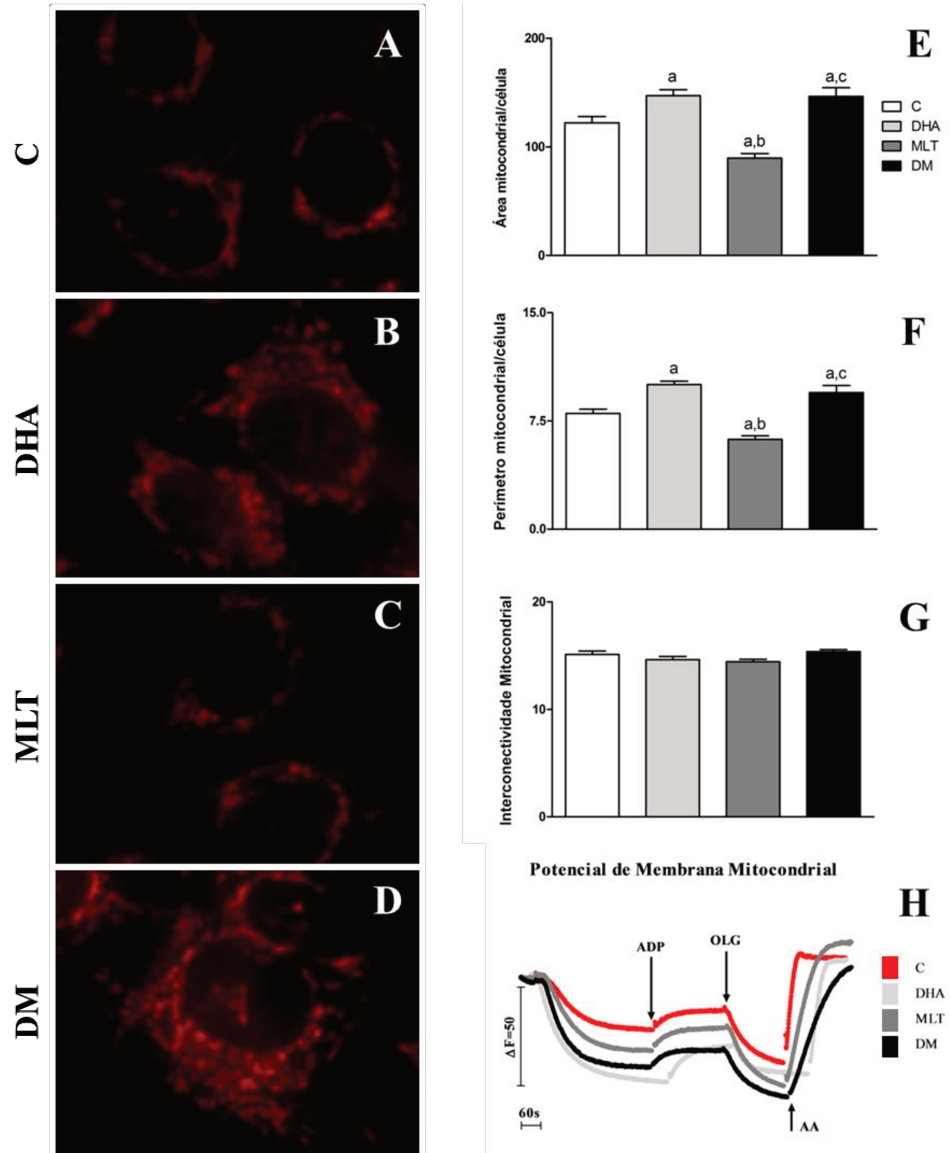


Figura 4. Morfologia e Potencial de Membrana Mitocondrial. A-D) Identificação das mitocôndrias nas células PNT1A após incubação com MitoTracker. Objetiva de 40x (20μm) com microscópio de fluorescência invertido. **E) Área Mitocondrial.** Valores expressos em μm²/pixel e desvio padrão. **F) Perímetro Mitocondrial.** Valores expressos em μm/pixel e desvio padrão. **G) Interconectividade Mitocondrial.** Razão área/perímetro. **H) Perfil do Potencial de membrana mitocondrial após incubação com Safranina O.** Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1μM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100μM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT; ADP – adenosina difosfato; OLG – oligomicina; AA – antimicina A; Análise Estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT; p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

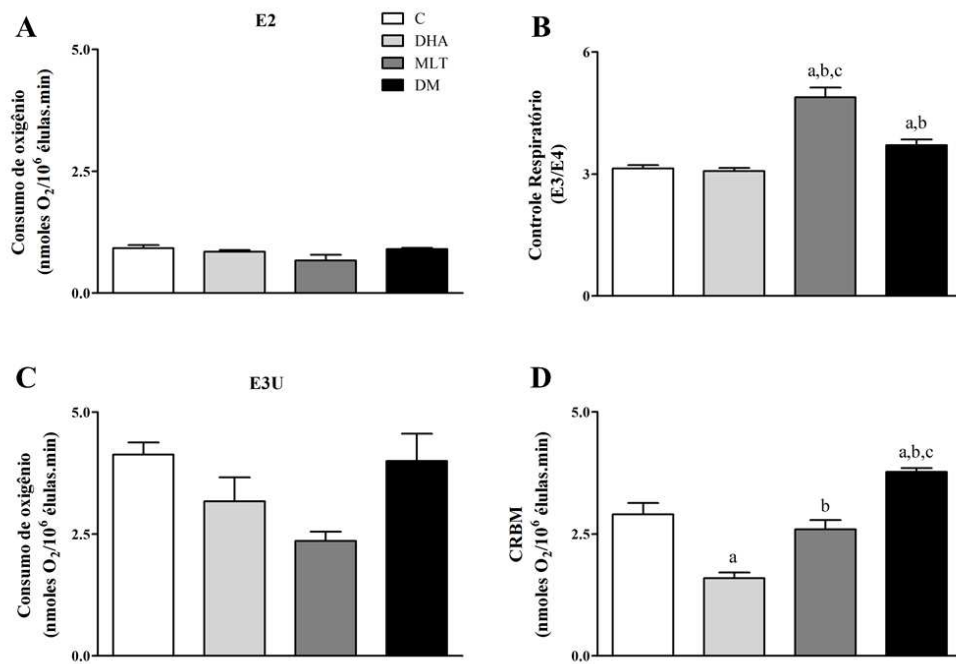


Figura 5. Taxas de consumo de oxigênio. A) Células permeabilizadas (E2). B) Controle respiratório (Estado3/ Estado4). C) Velocidade máxima da cadeia respiratória (E3U). D) CRBM – Capacidade de Reserva Bioenergética Mitocondrial. Valores expressos em média de nmoles de O₂/10⁶ células.min e desvio padrão. Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1μM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100μM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT. Análise estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT. p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

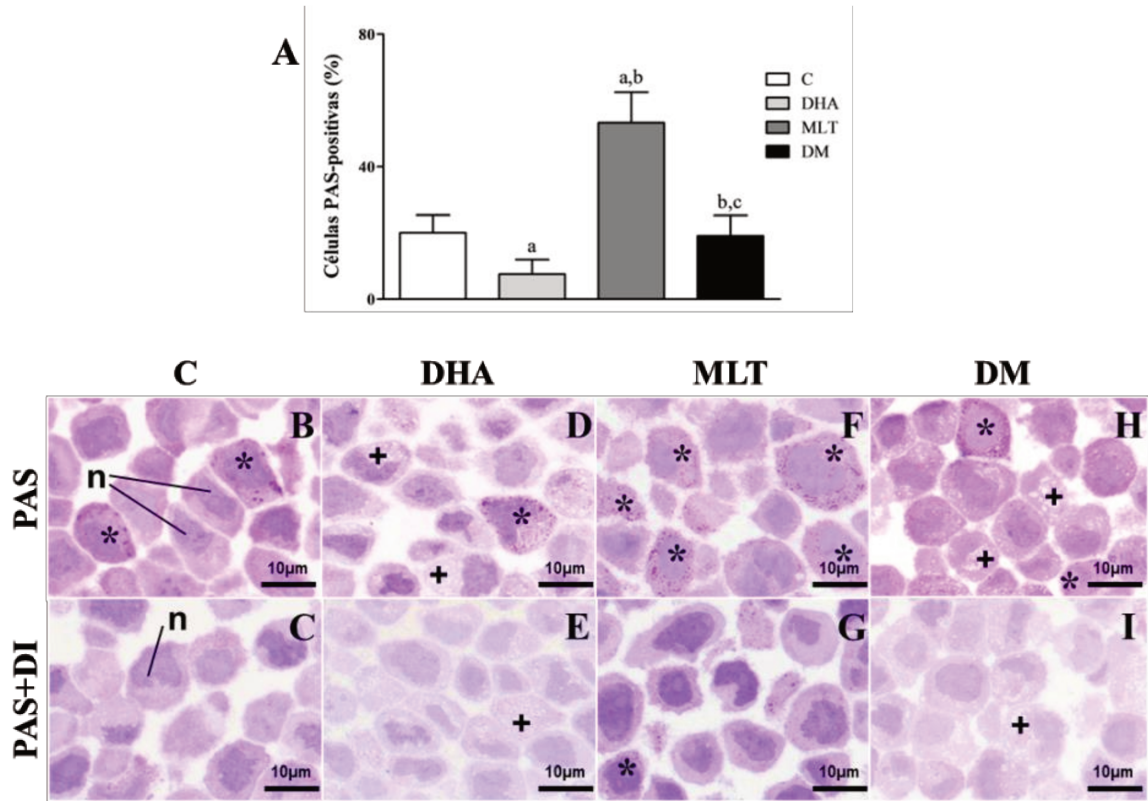


Figura 6. A) Frequência de células PAS-positivas. Valores expressos em porcentagem e desvio padrão. **B-H) Identificação de grânulos PAS-positivos.** Coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) evidenciando grânulos positivos em magenta escuro. **C-I) Caracterização dos grânulos PAS-positivos.** A menor intensidade PAS-positiva após incubação com diastase indica degradação do glicogênio. Objetiva de 100x (10μm). Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com 1μM-48h de melatonina; DHA – incubação com 100μM-48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT; * células PAS-positivas; + células com gotículas lipídicas. Análise estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

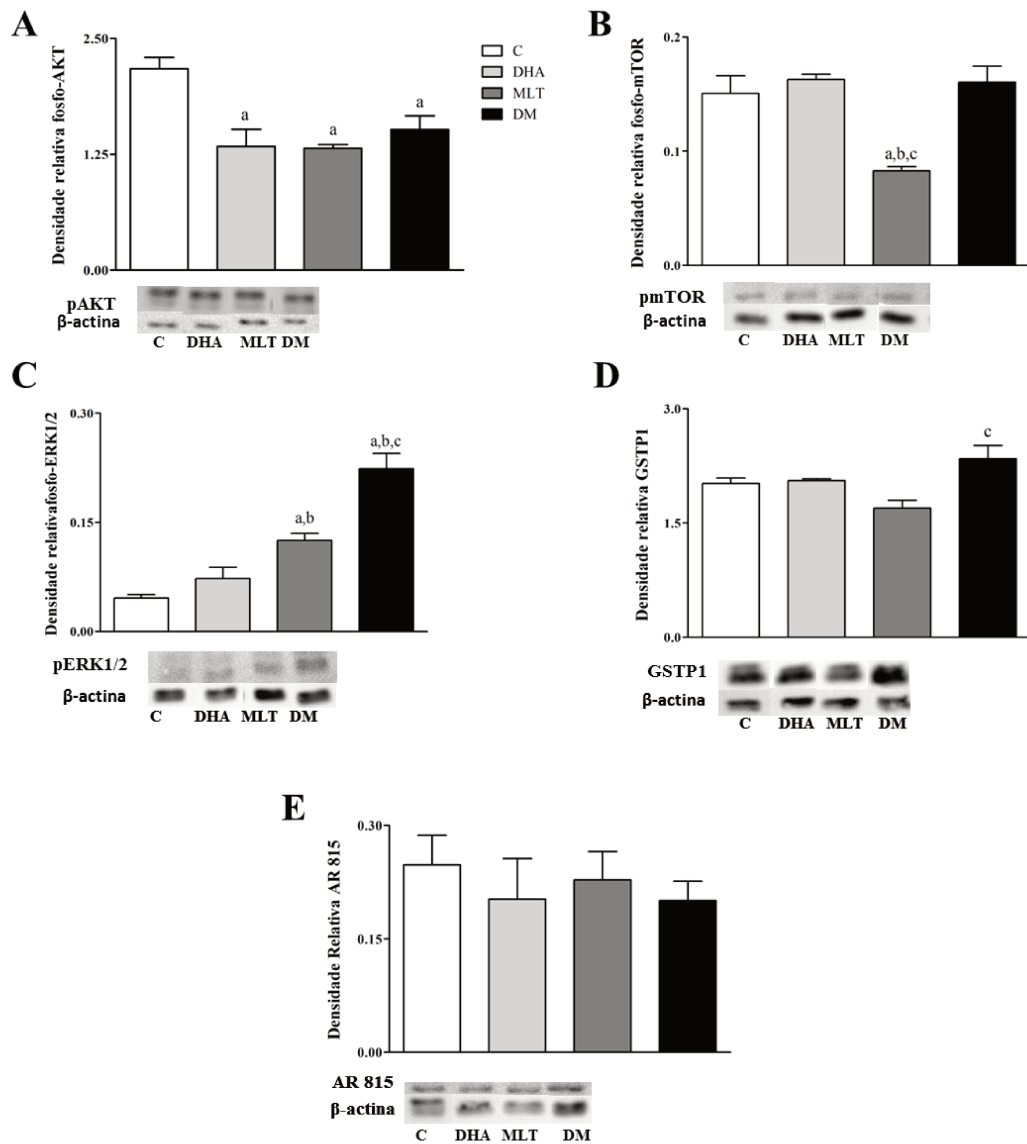


Figura 7. Vias de sinalização. A) Ativação de AKT, B) de mTOR, C) de ERK1/2, D) Expressão de GSTP1 e E) AR. Valores expressos em média de densidade relativa normalizado pela β -actina e desvio padrão. Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com $1\mu\text{M}$ -48h de melatonina; DHA – incubação com $100\mu\text{M}$ -48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT. Análise Estatística: a diferente de C; b diferente de DHA; c diferente de MLT; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

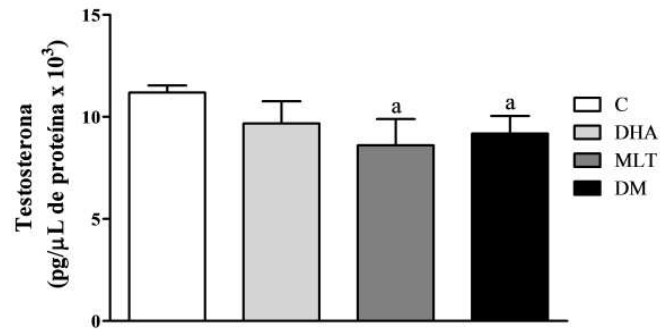


Figura 8. Captação de Testosterona pelas células PNT1A. Quantificação do andrógeno presente no meio de cultura após os respectivos tratamentos. Os valores foram expressos em média de pg de testosterona por μL de proteína obtido a partir do respectivo lisado celular. Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com $1\mu\text{M}$ -48h de melatonina; DHA – incubação com $100\mu\text{M}$ -48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT. Análise Estatística: a diferente de C; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

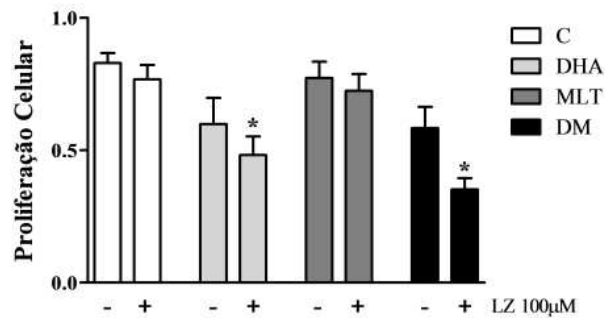


Figura 9. Inibição não seletiva dos receptores MTR1 e MTR2. Ensaio de proliferação celular com antagonista Luzindol. Valores expressos em média de absorbância e desvio padrão. Legenda: C – incubação padrão; MLT – incubação com $1\mu\text{M}$ -48h de melatonina; DHA – incubação com $100\mu\text{M}$ -48h de DHA; DM – co-incubação DHA e MLT; LZ – luzindol. Análise Estatística: * diferente da incubação sem luzindol; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; LEÓN, J.; KHALDY, H.; REITER, R. J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 2, p. 65–74, 2001.
- ALBERTSEN, P. C.; HANLEY, J. A.; GLEASON, D. F.; BARRY, M. J. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 975–80, 16 set. 1998.
- BANERJEE, S.; AYKIN-BURNS, N.; KRAGER, K. J.; SHAH, S. K.; MELNYK, S. B.; HAUER-JENSEN, M.; PAWAR, S. A. Loss of C/EBPdelta enhances IR-induced cell death by promoting oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Free Radic Biol Med**, v. 99, p. 296–307, 2016.
- BARROS, M. H.; BANDY, B.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 49883–49888, 2004.
- BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; SCHMIDT, A.; ILG, S.; BICHLER, K. H.; FLÜCHTER, S. H. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: Evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 209, n. 3, p. 153–167, 1992.
- BENELLI, R.; MONTEGHIRFO, S.; VENÈ, R.; TOSETTI, F.; FERRARI, N. The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3beta pathway and beta-catenin stability. **Molecular cancer**, v. 9, p. 142, 2010.
- BLASK, D. E.; HILL, S. M.; DAUCHY, R. T.; XIANG, S.; YUAN, L.; DUPLESSIS, T.; MAO, L.; DAUCHY, E.; SAUER, L. A. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 3, p. 259–269, 2011.

CAGNOL, S.; CHAMBAR, J. C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, v. 277, n. 1, p. 2–21, 2010.

CASTILLO, C.; SALAZAR, V.; ARIZNAVARRETA, C.; VARA, E.; TRESGUERRES, J. A. F. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 4, p. 240–246, 2005.

CHACKO, B. K.; KRAMER, P. A.; RAVI, S.; BENAVIDES, G. A.; MITCHELL, T.; DRANKA, B. P.; FERRICK, D.; SINGAL, A. K.; BALLINGER, S. W.; BAILEY, S. M.; HARDY, R. W.; ZHANG, J.; ZHI, D.; DARLEY-USMAR, V. M. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. **Clinical science** (London, England : 1979), v. 127, n. 6, p. 367–73, 2014.

CHUFFA, L. G. A.; LUPI JÚNIOR, L. A.; SEIVA, F. R. F.; MARTINEZ, M.; DOMENICONI, R. F.; PINHEIRO, P. F. F.; DOS SANTOS, L. D.; MARTINEZ, F. E. Quantitative Proteomic Profiling Reveals That Diverse Metabolic Pathways Are Influenced by Melatonin in an in Vivo Model of Ovarian Carcinoma. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3872–3882, 2016.

CUI, K.; LI, X.; DU, Y.; TANG, X.; ARAI, S.; GENG, Y.; XI, Y.; XU, H.; ZHOU, Y.; MA, W.; ZHANG, T.; CUI, K.; LI, X.; DU, Y.; TANG, X.; ARAI, S.; GENG, Y.; XI, Y.; et al. Chemoprevention of prostate cancer in men with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): a systematic review and adjusted indirect treatment comparison. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, p. 36674–36684, 2015.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of biological methods**, v. 2, n. 1, 2016.

CUTANDO, A.; LÓPEZ-VALVERDE, A.; ARIAS-SANTIAGO, S.; DE VICENTE, J.; DE DIEGO, R. G. Role of melatonin in cancer treatment. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2747–53, 2012.

DAGDA, R. K.; CHERRA, S. J.; KULICH, S. M.; TANDON, A.; PARK, D.; CHU, C. T. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13843–13855, 2009.

DEGEORGES, A.; HOFFSCHIR, F.; GAUVILLE, C.; DUC, A. L. E.; DUTRILLAUX, B.; CALVO, F. Recurrent cytogenetic alterations of prostate carcinoma and amplification of c-myc or epidermal growth factor receptor in subclones of immortalized PNT1 human. v. 731, p. 724–731, 1995.

DIEHL, J. A.; CHENG, M. G.; ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Glycogen synthase kinase 3 beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. **Genes & Development**, v. 12, n. 22, p. 3499–3511, 1998.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical biology & medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991.

ESTRADA, M.; ESPINOSA, A.; MÜLLER, M.; JAIMOVICH, E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3586–3597, 2003.

FREITAS, M.; BALDEIRAS, I.; PROENÇA, T.; ALVES, V.; MOTA-PINTO, A.; SARMENTO-RIBEIRO, A. Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. **FEBS Open Bio**, v. 2, n. x, p. 119–128, 2012.

FRIEDRICHS, W.; RUPAREL, S. B.; MARCINIAK, R. A.; DEGRAFFENRIED, L. Omega-3 Fatty Acid Inhibition of Prostate Cancer Progression to Hormone Independence Is Associated With Suppression of mTOR Signaling and Androgen Receptor Expression. **Nutrition and Cancer**, v. 63, n. 5, p. 771–777, 2011.

GAO, Y.; XIAO, X.; ZHANG, C.; YU, W.; GUO, W.; ZHANG, Z.; LI, Z.; FENG, X.; HAO, J.; ZHANG, K.; XIAO, B.; CHEN, M.; HUANG, W.; XIONG, S.; WU, X.; DENG, W. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K / AKT and κ B / iNOS signaling pathways, **Journal of Pineal Research**, p. 1–15, 2017.

GARCIA, C. P.; LAMARQUE, A. L.; COMBA, A.; BERRA, M. A.; SILVA, R. A.; LABUCKAS, D. O.; DAS, U. N.; EYNARD, A. R.; PASQUALINI, M. E. Synergistic anti-tumor effects of melatonin and PUFAs from walnuts in a murine mammary adenocarcinoma model. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 570–577, 2015.

GILAD, E.; PICK, E.; MATZKIN, H.; ZISAPEL, N. Melatonin receptors in benign prostate epithelial cells: evidence for the involvement of cholera and pertussis toxins-sensitive G proteins in their signal transduction pathways. **The Prostate**, v. 35, n. 1, p. 27–34, 1998.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 8, p. 1529–42, ago. 1998.

GOBBO, M. G.; DIZEYI, N.; ABRAHAMSSON, P.-A.; BERTILSSON, P.-A.; MASITÉLI, V. S.; PYTLOWANCIV, E. Z.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. Influence of Melatonin on the Proliferative and Apoptotic Responses of the Prostate under Normal and Hyperglycemic Conditions. **Journal of diabetes research**, v. 2015, p. 538529, 2015.

GU, Z.; WU, J.; WANG, S.; SUBURU, J.; CHEN, H.; THOMAS, M. J.; SHI, L.; EDWARDS, I. J.; BERQUIN, I. M.; CHEN, Y. Q. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 9, p. 1968–1975, 2013.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; MASON, M.; MATVEEV, V.; MOTTET, N.; SCHMID, H. P.; VAN DER KWAST, T.; WIEGEL, T.; ZATTONI, F. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

HEVIA, D.; MAYO, J. C.; QUIROS, I.; GOMEZ-CORDOVES, C.; SAINZ, R. M. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1235–1244, 2010.

HOLDEN, M. J.; SZE, H. Effects of Helminthosporium maydis Race T Toxin on Electron Transport in Susceptible Corn Mitochondria and Prevention of Toxin Actions by Dicyclohexylcarbodiimide. **Plant physiology**, v. 91, n. 4, p. 1296–302, 1989.

HOU, L.; LIAN, K.; YAO, M.; SHI, Y.; LU, X.; FANG, L.; HE, T.; JIANG, L. Reduction of n-3 PUFAs, specifically DHA and EPA, and enhancement of peroxisomal beta-oxidation in type 2 diabetic rat heart. **Cardiovascular diabetology**, v. 11, n. 1, p. 126, 2012.

HU, Y.; SUN, H.; OWENS, R. T.; GU, Z.; WU, J.; CHEN, Y. Q.; O'FLAHERTY, J. T.; EDWARDS, I. J. Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. **Neoplasia** (New York, N.Y.), v. 12, n. 10, p. 826–836, 2010.

IGUCHI, H.; K-H., K.; H., I. Age-Dependent Reduction in Serum Melatonin Concentrations in Healthy Human Subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 55, n. 1, p. 27–29, 1982.

JIMENÉZ-ARANDA, A.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, G.; MOHAMMAD A-SERRANO, M.; REITER, R. J.; AGIL, A. Melatonin improves mitochondrial function in inguinal white adipose tissue of Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 103–109, 2014.

JIN, J.-K.; DAYYANI, F.; GALLICK, G. E. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2545–2561, 1 jun. 2011.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. W. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 95–102, 2004.

KIRBY, M.; HIRST, C.; CRAWFORD, E. D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: A systematic review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 65, n. 11, p. 1180–1192, 2011.

LI, X.; LAO, Y.; ZHANG, H.; WANG, X.; TAN, H.; LIN, Z.; XU, H. The natural compound Guttiferone F sensitizes prostate cancer to starvation induced apoptosis via calcium and JNK elevation. **BMC Cancer**, v. 15, p. 254, 2015.

LIU, L.; ZHANG, K.; SANDOVAL, H.; YAMAMOTO, S.; JAISWAL, M.; SANZ, E.; LI, Z.; HUI, J.; GRAHAM, B. H.; QUINTANA, A.; BELLEN, H. J. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. **Cell**, v. 160, n. 1–2, p. 177–190, 2015.

LÓPEZ, A.; GARCÍA, J. A.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, L. C.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 2, p. 188–198, 2009.

LU, Y.; CHEN, D.; WANG, D.; CHEN, L.; MO, H.; SHENG, H.; BAI, L.; WU, Q.; YU, H.; XIE, D.; YUN, J.; ZENG, Z.; WANG, F.; JU, H.; XU, R. Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 10, p. e2432-12, 2016.

LUPOWITZ, Z.; RIMLER, A.; ZISAPEL, N. Evaluation of signal transduction pathways mediating the nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 58, n. 14, p. 2129–35, 2001.

LYBERG, A.-M.; ADLERCEUTZ, P. Monitoring monohydroperoxides in docosahexaenoic acid using high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 41, n. 1, p. 67–76, 2006.

MARELLI, M. M.; LIMONTA, P.; MAGGI, R.; MOTTA, M.; MORETTI, R. M. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 45, n. 3, p. 238–44, 1 nov. 2000.

MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T.; ORTIZ, G. G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **Journal of pineal research**, v. 28, n. 4, p. 242–8, 2000.

MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; LEÓN, J.; ESCAMES, G.; KHALDY, H.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 4, p. 348–357, 2002.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C.; ANTOLI, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002.

MCCARTHY, C.; KENNY, L. C. Therapeutically targeting mitochondrial redox signalling alleviates endothelial dysfunction in preeclampsia. **Scientific reports**, v. 6, p. 32683, 2016.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? **Cell cycle** (Georgetown, Tex.), v. 8, n. 8, p. 1168–1175, 2009.

MENG, H.; SHEN, Y.; SHEN, J.; ZHOU, F.; SHEN, S.; DAS, U. N. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 1, p. 160, 2013.

MORETTI, R. M.; MARELLI, M. M.; MAGGI, R.; DONDI, D.; MOTTA, M.; LIMONTA, P. Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells. **Oncology reports**, v. 7, n. 2, p. 347–51, 2000.

OBERLEY, T. D.; ZHONG, W.; SZWEDA, L. I.; OBERLEY, L. W. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. **The Prostate**, v. 44, n. 2, p. 144–155, 2000.

PANOV, A.; ORYNBAYEVA, Z. Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3, DU145 and LNCaP. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 22–24, 2013.

PARK, H. G.; LAWRENCE, P.; ENGEL, M. G.; KOTHAPALLI, K.; BRENNAN, J. T. Metabolic fate of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) in human cells: direct retroconversion of DHA to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) dominates over elongation to tetracosahexaenoic acid (24:6n-3). **FEBS Letters**, v. 590, n. 18, p. 3188–3194, 2016.

PARONI, R.; TERRANEO, L.; BONOMINI, F.; FINATI, E.; VIRGILI, E.; BIANCIARDI, P.; FAVERO, G.; FRASCHINI, F.; REITER, R. J.; REZZANI, R.; SAMAJA, M. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: Relationship with hypoxia signalling. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 43–52, 2014.

PHILLEY, J. V.; KANNAN, A.; QIN, W.; SAUTER, E. R.; IKEBE, M.; HERTWECK, K. L.; TROYER, D. A.; SEMMES, O. J.; DASGUPTA, S. Complex-I Alteration and Enhanced Mitochondrial Fusion Are Associated With Prostate Cancer Progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 6, p. 1364–1374, 2016.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MALDONADO, M. D. Melatonin as an antioxidant: Physiology versus pharmacology. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 215–216, 2005.

REITER, R.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.-X.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; QIN, L.; YANG, S.-F.; XU, K. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis, **International Journal of Molecular Science**, v. 18, n. 4, p. 843, 17 abr. 2017.

RIMLER, A.; CULIG, Z.; LEVY-RIMLER, G.; LUPOWITZ, Z.; KLOCKER, H.; MATZKIN, H.; BARTSCH, G.; ZISAPEL, N. Melatonin elicits nuclear exclusion of the human androgen receptor and attenuates its activity. **The Prostate**, v. 49, n. 2, p. 145–154, 2001.

RIMLER, A.; CULIG, Z.; LUPOWITZ, Z.; ZISAPEL, N. Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 81, n. 1, p. 77–84, 2002.

SADEGHI, R. N.; KARAMI-TEHRANI, F. Targeting prostate cancer cell metabolism: impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. p. 2893–2905, 2015.

SAKR, W. A.; GRIGNON, D. J.; HAAS, G. P.; HEILBRUN, L. K.; PONTES, J. E.; CRISSMAN, J. D. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. **European urology**, v. 30, n. 2, p. 138–44, 1996.

SAKR, W. A.; HAAS, G. P.; CASSIN, B. F.; PONTES, J. E.; CRISSMAN, J. D. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **The Journal of urology**, v. 150, n. 2 Pt 1, p. 379–85, 1993.

SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1–7, 2017.

SHIN, S.; JING, K.; JEONG, S.; KIM, N.; SONG, K. S.; HEO, J. Y.; PARK, J. H.; SEO, K. S.; HAN, J.; PARK, J. I.; KWEON, G. R.; PARK, S. K.; WU, T.; HWANG, B. D.; LIM, K. The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53. **Biomed Res Int**, v. 2013, n. c, p. 568671, 2013.

SHIU, S. Y. W. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 1, p. 1–9, ago. 2007.

SILVA, T. M.; PELOSO, E. F.; VITOR, S. C.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R. O(2) consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 43, p. 409–417, 2011.

SIU, S. W. F.; LAU, K. W.; TAM, P. C.; SHIU, S. Y. W. Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. **The Prostate**, v. 52, n. 2, p. 106–22, 2002.

SIU, S. W. F.; LAU, K. W.; TAM, P. C.; SHIU, S. Y. W. Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. **The Prostate**, v. 52, n. 2, p. 106–22, 2002.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science** (New York, N.Y.), v. 273, n. 5271, p. 59–63, 1996.

SOHN, E. J.; WON, G.; LEE, J.; LEE, S.; KIM, S. H. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2015.

SRINIVASAN, V.; PANDI-PERUMAL, S.R.; MAESTRONI, G.J.M.; ESQUIFINO, A.I.; HARDELAND, R. CARDINALI, D.P. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. **Neurotox Res.**, v.7, n.4, p.293-318, 2005.

STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O.; ACKERMANN, K.; JILG, A.; SEBESTÉNY, T.; MARONDE, E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 17–43, 2011.

TAM, C. W.; CHAN, K. W.; LIU, V. W. S.; PANG, B.; YAO, K.-M.; SHIU, S. Y. W. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. **Journal of pineal research**, v. 45, n. 4, p. 403–12, 2008.

TAM, C. W.; MO, C. W.; YAO, K.-M.; SHIU, S. Y. W. Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 191–202, mar. 2007.

TATSUMI, T.; SHIRAISHI, J.; KEIRA, N.; AKASHI, K.; MANO, A.; YAMANAKA, S.; MATOBA, S.; FUSHIKI, S.; FLISS, H.; NAKAGAWA, M. Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 59, n. 2, p. 428–440, 2003.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 99–104, 2005.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA: a cancer journal of clinicians.*, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

VAYALIL, P.K.; LANDAR, A. Mitochondrial oncobioenergetic index: A potential biomarker to predict progression from indolent to aggressive prostate cancer. **Oncotarget**, v.6, n.40, p. 43065-80, 2015.

VAZ, C. V.; ALVES, M. G.; MARQUES, R.; MOREIRA, P. I.; OLIVEIRA, P. F.; MAIA, C. J.; SOCORRO, S. Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 2077–2084, 2012.

WALDHAUSER, F.; WEISZENBACHER, G.; TATZER, E.; GISINGER, B.; WALDHAUSER, M.; SCHEMPER, M.; FRISCH, H. Alternations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 66, n. 3, p. 648–652, 1988.

XI, S. C.; SIU, S. W.; FONG, S. W.; SHIU, S. Y. Inhibition of androgen-sensitive LNCaP prostate cancer growth in vivo by melatonin: association of antiproliferative action of the pineal hormone with mt1 receptor protein expression. **The Prostate**, v. 46, n. 1, p. 52–61, 2001.

YAN, K. H.; YAO, C. J.; HSIAO, C. H.; LIN, K. H.; LIN, Y. W.; WEN, Y. C.; LIU, C. C.; YAN, M. DE; CHUANG, S. E.; LAI, G. M.; LEE, L. M. Mefloquine exerts anticancer activity in prostate cancer cells via ROS-mediated modulation of Akt, ERK, JNK and AMPK signaling. **Oncology Letters**, v. 5, n. 5, p. 1541–1545, 2013.

YANG, Z.; LIU, Y.; SHI, C.; ZHANG, Y.; LV, R.; ZHANG, R.; WANG, Q.; WANG, Y. Suppression of PTEN/AKT signaling decreases the expression of TUBB3 and TOP2A with subsequent inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via ATP and caspase-3 signaling pathways. **Oncology Reports**, p. 1011–1019, 2017.

YIN, H.; MUSIEK, E. S.; GAO, L.; PORTER, N. A.; MORROW, J. D. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26600–11, 2005.

YIN, Z.; IVANOV, V. N.; HABELHAH, H.; TEW, K.; RONAI, Z. Glutathione S-Transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases1. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4053–4057, 2000.

YOSSEPOWITCH, O.; PINCHUK, I.; GUR, U.; NEUMANN, A.; LICHTENBERG, D.; BANIEL, J. Advanced but not localized prostate cancer is associated with increased oxidative stress. **The Journal of urology**, v. 178, n. 4 Pt 1, p. 1238-43–4, 2007.

YOULE, R.; BLIEK, A. VAN DER. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.

ZAMARAEVA, M. V; SABIROV, R. Z.; MAENO, E.; ANDO-AKATSUKA, Y.; BESSONOVA, S. V; OKADA, Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. **Cell death and differentiation**, v. 12, n. 11, p. 1390–7, 2005.

ZENG, Y.; YANG, X.; WANG, J.; FAN, J.; KONG, Q.; YU, X. Aristolochic acid I induced autophagy attenuates cell apoptosis via ERK 1/2 pathway in renal tubular epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

ZHANG, C.; YU, H.; SHEN, Y.; NI, X.; SHEN, S.; DAS, U. N. Polyunsaturated fatty acids trigger apoptosis of colon cancer cells through a mitochondrial pathway. **Archives of medical science : AMS**, v. 11, n. 5, p. 1081–94, 2015.

ZHANG, Y.; CHIN-QUEE, K.; RIDDLE, R. C.; LI, Z.; ZHOU, Z.; DONAHUE, H. J. BRMS1 Sensitizes Breast Cancer Cells to ATP-Induced Growth Suppression. **BioResearch**, v. 2, n. 2, p. 77–83, 2013.

ZHANG, Y.; JIANG, L.; HU, W.; ZHENG, Q.; XIANG, W. Mitochondrial dysfunction during in vitro hepatocyte steatosis is reversed by omega-3 fatty acid-induced up-regulation of mitofusin 2. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 6, p. 767–775, 2011.

CAPÍTULO 2

O Ácido Docosahexaenóico causa exclusão nuclear do PPAR γ o que pode estar relacionado à maior proliferação de células PNT1A

TAMARINDO, G.H.²; CALMON, M.S.¹; TABOGA, S.R.¹; GOES, R.M.¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil

² Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Os ácidos graxos polinsaturados têm sido utilizados como agentes terapêuticos para o câncer de próstata (CaP). Entretanto, existem estudos clínicos que apontam para uma correlação entre incidência de lesões intraepiteliais prostáticas (NIPs) e CaP com altas concentrações séricas destes lipídios. Observamos anteriormente que o ácido docosahexaenóico (DHA) apresentou comportamento hormético e em doses baixas (até 50 μ m) pode aumentar a proliferação celular. Neste sentido, testamos se este estímulo mitogênico está associado à via de receptores nucleares que regulam genes responsáveis pelo metabolismo de lipídios, como o PPAR γ e o LXR α . Portanto, sabendo que estes receptores estão envolvidos na dinâmica celular e que o DHA é capaz de ativá-los, avaliamos a expressão e citolocalização de ambos. Observamos que na presença de 50 μ M por 48h, o PPAR γ é retido no citoplasma, o que é reportado na literatura como importante evento antiapoptótico, e parece estar envolvido a maior proliferação de células PNT1A.

Palavras-chave: próstata, ácido docosahexaenóico, PNT1A, PPAR γ , LXR α

INTRODUÇÃO

A obesidade e consumo elevado de lipídios são situações cada vez mais constantes na população mundial e que podem exercer influência significativa direta ou indireta na fisiologia prostática (Chan et al., 2005; Hebert et al., 1998; Parsons et al., 2006, 2013; Vikram et al., 2010). Vários estudos experimentais com roedores, inclusive do nosso grupo de pesquisa, têm revelado que a dieta hiperlipídica pode afetar a dinâmica de proliferação e morte celular na próstata (Cai et al., 2001; Pytlowanciv et al., 2016; Ribeiro et al., 2012b; Silva et al., 2015). Outros estudos ainda mostraram que o consumo em excesso de lipídios parece afetar o potencial mitogênico por vias que envolvem Fosfoinositideo-3 quinase (PI3K), do Substrato Receptor de Insulina 1 (IRS-1) e aumento da expressão de Receptor de Estrógeno (ER), facilitando o desenvolvimento de lesões pré-malignas na próstata (Ribeiro et al., 2012a). Entretanto, além da quantidade, a natureza lipídica também parece ser importante na atividade proliferativa glandular. Isto porque dietas ricas em ácidos graxos saturados apresentam efeitos diferentes dos insaturados, especialmente na expressão do PPAR γ (Receptor Gama Ativado de Proliferação do Peroxissomo) e do receptor de andrógeno, AR (Escobar et al., 2009; Furriel et al., 2014). Estes achados apontam lacunas nos mecanismos pelos quais diferentes lipídios afetam a fisiologia das células prostáticas.

Existem receptores nucleares envolvidos no controle metabólico e dinâmica celular que são diretamente regulados pela presença de ácidos graxos, inclusive oriundos da dieta ou seus metabólitos. O PPAR γ (NR1C3) é um deles e está relacionado com a diferenciação celular, acúmulo de lipídios, regulação metabólica e sensibilidade à insulina (Ahmadian et al., 2013), além de coordenar alterações conformacionais do AR, o que pode refletir na proliferação e resposta diferencial em células dependentes ou não de andrógenos (Schaufele et al., 2005). A dieta hiperlipídica insaturada também parece influenciar a via de sinalização do Receptor X Hepático Alpha (LXR α), visto que nosso grupo de pesquisa reportou recentemente uma associação entre a frequência de células LXR α -positivas no compartimento estromal e AR-positivas epiteliais com hiperplasia prostática em roedores (Pytlowanciv et al., 2016). Somado a isso, tanto PPARs como LXRs atuam como heterodímeros obrigatórios do Receptor X de Retinóide (RXR), cuja atividade também pode influenciar a dinâmica celular (Chawla et al., 2001). Estes dados mostram que um dos mecanismos de ação dos lipídios na próstata pode ser dado via regulação destes sensores

metabólicos, entretanto como isso ocorre e seu papel na carcinogênese prostática ainda não está completamente elucidado.

Mostramos previamente que o DHA tem comportamento hormético, de forma que a partir de 100 μ M reduz a proliferação na linhagem PNT1A, mas estimula em outras concentrações, com maior taxa a 50 μ M por 48h. Nesta molaridade é possível observar grande acúmulo de lipídios intracelulares, o que pode estar associado ao aumento da proliferação celular. Neste sentido, sabendo que o DHA pode ativar a via de receptores nucleares envolvidos no controle metabólico e proliferação, nosso objetivo foi analisar se na maior taxa clonogênica encontrada, ocorre devido à interferência da via do LXR α e PPAR γ em células PNT1A.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análise Morfológica Geral

A morfologia celular foi avaliada por imagens obtidas em microscópio de luz após a coloração com Hematoxilina-Eosina realizada após exposição com 50 μ M de DHA por 48h. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos (Saraiva-Pava et al., 2015).

Ensaio de citolocalização

As células foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células/poço em lamínulas de vidro e submetidas a 50 μ M de DHA e por 48h. Após remoção do meio de cultura e lavagem em PBS, foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se permeabilização com Triton 0,2% em tampão TBST por 15 minutos e o bloqueio de ligações inespecíficas com leite 5% em TBST por 30 minutos. Os anticorpos anti-PPAR γ (rabbit policlonal ab19481, Abcam 1:100) e anti-LXR α (rabbit policlonal ab106464, Abcam 1:100) foram diluídos em BSA 1% seguido de incubação *overnight* em câmara úmida a 4°C no agitador. Os núcleos foram corados com DAPI e as lâminas finalizadas com meio de montagem UltraCruz® (Santa Cruz Biotechnology). Foi utilizado microscópio confocal Zeiss LSM 710 para estudo da localização celular do LXR α e microscópio de fluorescência Zeiss AX 10 com câmera AXIOCAM MRC para avaliação do PPAR γ .

Western Blotting

As células (5×10^4 /poço) foram lisadas em tampão RIPA acrescido de 10% coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A quantificação de proteínas foi realizada em leitor de microplacas Epoch acoplado a placa Take3 Micro-Volume (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) a 280nm. Após eletroforese, as proteínas (30ug/uL) foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 1 hora e 40 minutos em sistema semi-úmido. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com leite desnatado 5% em TBST por 50 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem rápida com TBST, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo anti-PPAR γ (rabbit policlonal ab19481, Abcam, 1:400), anti-LXR α (rabbit policlonal ab106464, Abcam, 1:400) e anti- β -actina (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) para normalização. A incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP (Santa Cruz Biotechnology) foi feita por 1 hora a 4°C. A revelação foi realizada com sistema ECL e as bandas visualizadas com auxílio de fotodocumentador G:BOX Chemi (Syngene, Synoptics Ltd). A quantificação foi realizada por densitometria relativa (β -actina) utilizando software NIH ImageJ. Os dados foram apresentados em valores da densitometria relativa e erro padrão. As análises foram realizadas com três amostras de eventos independentes.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® (GraphPad Prism software, v.5.0). Primeiramente, os dados foram analisados considerando os pressupostos de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os grupos que assumiram perfil paramétrico foram submetidos ao Teste t ou ANOVA One-way, seguido do teste de Tukey (post-hoc). Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (post hoc). Os dados foram expressos em média e desvio padrão e $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

O DHA aumentou o número de células em divisão celular

A coloração com Hematoxilina-Eosina permitiu notar qualitativamente o maior número de células em mitose, especificamente na metáfase, após tratamento com DHA (Fig.1.B), enquanto que as controles apresentaram menor frequência de divisão e aparente maior número de células com fenótipo apoptótico (Fig.1.A).

O DHA promoveu retenção citoplasmática do PPAR γ , mas não do LXR α

A citolocalização do receptor nuclear LXR α não foi alterada na presença de DHA (Fig.3). Por outro lado, após incubação com o lipídio, o PPAR γ apresentou retenção citoplasmática (Fig.2).

O DHA não alterou a expressão de PPAR γ nem de LXR α

A quantificação de ambos os receptores nucleares não apresentou diferença significativa (Fig.4).

DISCUSSÃO

Este trabalho revelou que com 50 μ M de DHA ocorreu aumento da distribuição do PPAR γ no espaço peri e extra-nuclear, diferente da localização nuclear esperada. Alguns autores sugerem que a disposição citoplasmática deste receptor nuclear está associada à ativação e translocação de quinases para o núcleo, as quais se ligam ao receptor e promovem sua exportação para o citoplasma, caracterizando um mecanismo de redução da transcrição gênica (Burgermeister e Seger, 2008). Associado a este evento, alguns trabalhos têm comprovado a compartimentalização subcelular do PPAR γ e acredita-se ser também uma via de impedimento físico de acesso do fator de transcrição ao núcleo, porém, as suas funções extra-nucleares ainda não são bem conhecidas (Luconi et al., 2010). Essa distribuição peri e extra-nuclear observada aqui é semelhante ao que ocorre nas linhagens cancerígenas LNCap e PC3 não tratadas, o que, aliado à estudos com antagonista do PPAR γ , corrobora o mecanismo de inibição da apoptose pela exclusão nuclear do receptor (Lee et al., 2013). Por outro lado, na presença de PUFAs nestas mesmas linhagens tumorais, a proliferação é reduzida e a localização nuclear do receptor aumentada (Li et al., 2014). *In vivo*, o bloqueio desta via está associado à formação de NIPs (Neoplasia Intraepitelial Prostática) e maior proliferação em

cultura primária (Jiang et al., 2010). Portanto, em nosso estudo, a evidente imunolocalização do PPAR γ no citoplasma sugere que o DHA interferiu na sua via de sinalização e manteve níveis significantes fora do núcleo favorecendo a proliferação, evidenciando mecanismos divergentes do observado em linhagens cancerígenas.

De acordo com Chawla e colaboradores (2001), ainda há um *cross-talk* entre estes receptores e a via dos LXRs, o que nos levou a examinar se há *interplay* entre estas vias. Contudo, não constatamos alterações na expressão dos receptores LXR α ($p=0,1365$), embora tenha sido observada grande variação na sua expressão. Além disso, também não ocorreram diferenças na sua citolocalização. Neste sentido, pode ser que estas variações sejam uma resposta à maior proliferação das células PNT1A em função da exclusão nuclear do PPAR γ . Isto porque estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que o aumento na expressão do LXR α está associado à redução da proliferação de células prostáticas (Chuu e Lin, 2010; Kim et al., 2009; Pytlowanciv et al., 2016). Entretanto, não se descarta outras isoformas do LXR, como a β , possam estar envolvidas na maior proliferação celular observada.

Em conclusão, até o momento podemos inferir que o DHA a 50 μ M promoveu aumento da proliferação celular, provavelmente associado ao bloqueio da translocação do PPAR γ para o núcleo, causando menor transcrição de genes pró-apoptóticos.

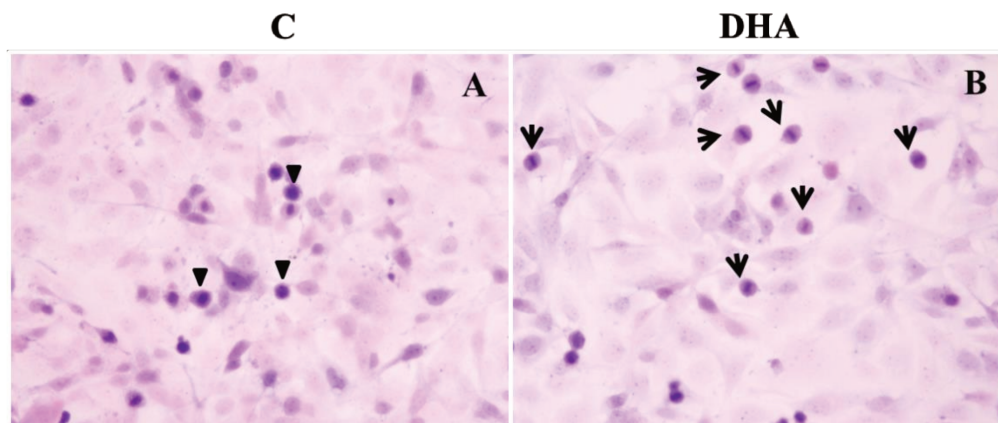


Figura 1 – Morfologia. Células em confluência coradas com hematoxilina-eosina de Harrys. Aumento de 40x, 20 μ M. Legenda: cabeça da seta – células apoptóticas; setas curtas – células em mitose; C – controle ; DHA - 50 μ M por 48h.

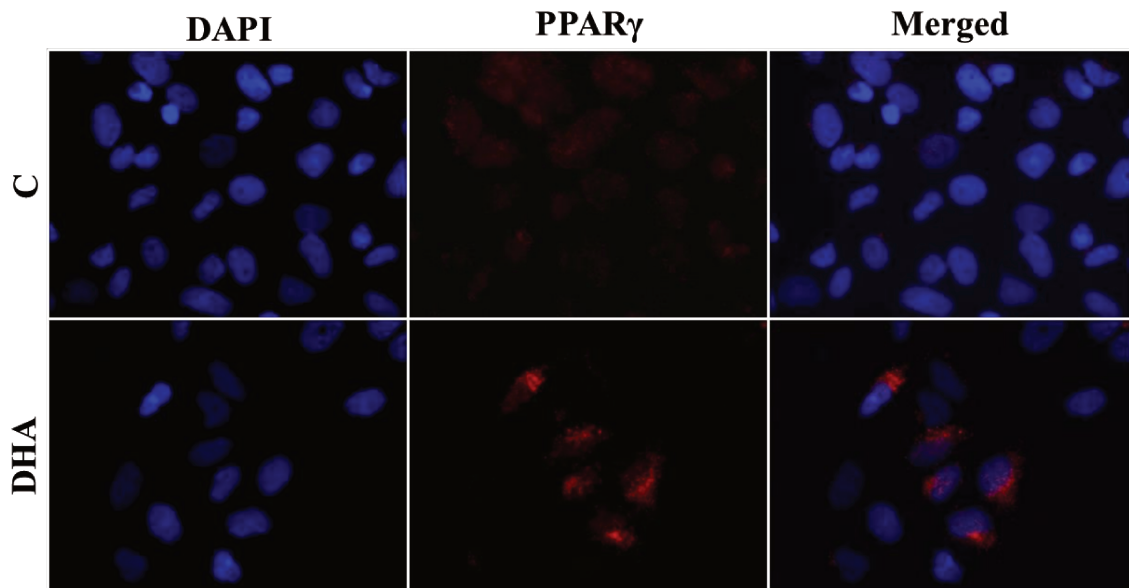


Figura 2 – Imunofluorescência. Distribuição intracelular do PPAR γ com destaque para a retenção citoplasmática nas células tratadas com DHA. Núcleos corados em azul (DAPI) e PPAR γ corado em vermelho. Aumento 40x, 20 μ m. Legenda: C – controle; DHA – 50 μ M por 48h.

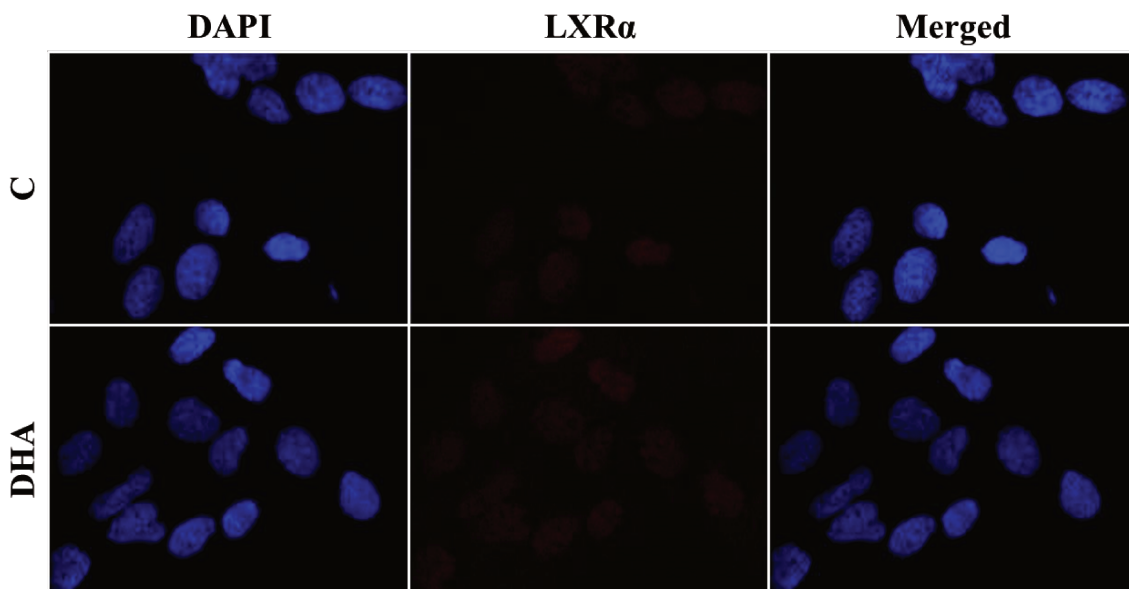


Figura 3 – Microscopia Confocal. Imunolocalização do receptor LXR α com maior intensidade nas células tratadas com DHA. Núcleos corados em azul (DAPI) e LXR α em vermelho. 40x, 20 μ m. Legenda: C – controle; DHA – 50 μ M por 48h.

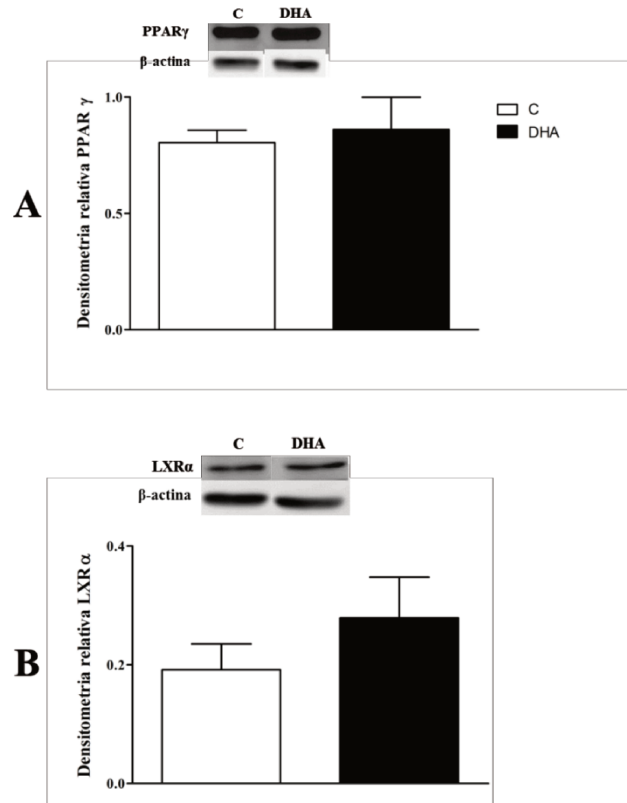


Figura 4. Western Blotting. A) Quantificação de PPAR γ e B) LXR α . Não houve diferença estatística. Valores de densidade relativa normalizado pela β -actina. Legenda: C – Controle; DHA – 50 μ M por 48h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; LIDDLE, C.; ATKINS, A. R.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–66, 2013.

BRASKY, T. M.; DARKE, A. K.; SONG, X.; TANGEN, C. M.; GOODMAN, P. J.; THOMPSON, I. M.; MEYSKENS, F. L.; GOODMAN, G. E.; MINASIAN, L. M.; PARNES, H. L.; KLEIN, E. A.; KRISTAL, A. R. Plasma Phospholipid Fatty Acids and Prostate Cancer Risk in the SELECT Trial. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 15, p. 1132–1141, 2013.

BURGERMEISTER, E.; SEGER, R. PPAR γ and MEK interactions in cancer. **PPAR Research**, v. 2008, 2008.

CAI, X.; HALEEM, R.; ORAM, S.; CYRIAC, J.; JIANG, F.; GRAYHACK, J. T.; KOZLOWSKI, J. M.; WANG, Z. High fat diet increases the weight of rat ventral prostate. **The Prostate**, v. 49, n. 1, p. 1–8, 2001.

CHAN, J. M.; GANN, P. H.; GIOVANNUCCI, E. L. Role of diet in prostate cancer development and progression. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 32, p. 8152–8160, 2005.

CHAWLA, A. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866–1870, 2001.

CHUU, C.-P.; LIN, H.-P. Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. **Anticancer research**, v. 30, p. 3643–3648, 2010.

ESCOBAR, E. L. O.; GOMES-MARCONDES, M. C. C.; CARVALHO, H. F. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR γ levels and prostate growth. **The Prostate**, v. 69, n. 5, p. 548–558, 2009.

FURRIEL, A.; CAMPOS-SILVA, P.; SILVA, P. C. G. P.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B.; GREGÓRIO, B. M. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

GU, Z.; WU, J.; WANG, S.; SUBURU, J.; CHEN, H.; THOMAS, M. J.; SHI, L.; EDWARDS, I. J.; BERQUIN, I. M.; CHEN, Y. Q. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 9, p. 1968–1975, 2013.

HEBERT, J. R.; HURLEY, T. G.; OLENDZKI, B. C.; TEAS, J.; MA, Y.; HAMPL, J. S. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 21, p. 1637–47, 1998.

JIANG, M.; FERNANDEZ, S.; JEROME, W. G.; HE, Y.; YU, X.; CAI, H.; BOONE, B.; YI, Y.; MAGNUSON, M. A.; ROY-BURMAN, P.; J, R.; SHAPPELL, S. B.; HAYWARD, S. W. **Cell**, v. 17, n. 3, p. 1–24, 2010.

KIM, H.-J.; ANDERSSON, L. C.; BOUTON, D.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-Å. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 558–563, 2009.

LEE, N. J.; OH, J. H.; BAN, J. O.; SHIM, J. H.; LEE, H. P.; JUNG, J. K.; AHN, B. W.; YOON, D. Y.; HAN, S. B.; HAM, Y. W.; HONG, J. T. 4-O-methylhonokiol, a PPAR γ agonist, inhibits prostate tumour growth: P21-mediated suppression of NF-kB activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 5, p. 1133–1145, 2013.

LI, C.-C.; HOU, Y.-C.; YEH, C.-L.; YEH, S.-L. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on prostate cancer cell migration and invasion induced by tumor-associated macrophages. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99630, 2014.

LUCONI, M.; CANTINI, G.; SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): Is the genomic activity the only answer ? **Steroids**, v. 75, n. 8–9, p. 585–594, 2010.

PARSONS, J. K.; CARTER, H. B.; PARTIN, A. W.; WINDHAM, B. G.; METTER, E. J.; FERRUCCI, L.; LANDIS, P.; PLATZ, E. A. Metabolic Factors Associated with Benign Prostatic Hyperplasia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 7, p. 2562–2568, 2006.

PARSONS, J. K.; SARMA, A. V.; MCVARY, K.; WEI, J. T. Obesity and Benign Prostatic Hyperplasia: Clinical Connections, Emerging Etiological Paradigms and Future Directions. **The Journal of Urology**, v. 189, n. 1, p. S102–S106, 2013.

PYTLOWANCIV, E. Z.; PINTO-FOCHI, M. E.; REAME, V.; GOBBO, M. G.; RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. **The Prostate**, v. 678, p. 662–678, 2016.

RIBEIRO, D. L.; PINTO, M. E.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R.; MAEDA, S. Y.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; TABOGA, S. R.; GOES, R. M. High-Fat Diet Obesity Associated With Insulin Resistance Increases Cell Proliferation, Estrogen Receptor, and PI3K Proteins in Rat Ventral Prostate. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 854–865, 2012. .

SARAIVA-PAVA, K.; NAVABI, N.; SKOOG, E. C.; LINDÉN, S. K.; OLEASTRO, M.; ROXO-ROSA, M. New NCI-N87-derived human gastric epithelial line after human telomerase catalytic subunit over-expression. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 21, p. 6526–42, 2015.

SCHAUFLELE, F.; CARBONELL, X.; GUERBADOT, M.; BORNGRAEBER, S.; CHAPMAN, M. S.; MA, A. A. K.; MINER, J. N.; DIAMOND, M. I. The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino – carboxy interactions. p. 10–15, 2005.

SILVA, S. A.; GOBBO, M. G.; PINTO-FOCHI, M. E.; RAFACHO, A.; TABOGA, S. R.; ALMEIDA, E. A.; GÓES, R. M.; RIBEIRO, D. L. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 1, p. 21–30, 2015

VIKRAM, A.; JENA, G. B.; RAMARAO, P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: Linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. **The Prostate**, v. 70, n. 1, p. 79–89, 2010.

V. CONCLUSÕES FINAIS

A exposição a 100 μ M de DHA por 48h evidenciou sua propriedade quimiopreventiva mediada pelo aumento na geração de EROs, principalmente nas mitocôndrias. Entretanto, apresentou comportamento hormético, de forma que com metade desta concentração estimulou a proliferação de células PNT1A. Tendo em vista nossos resultados, chamamos atenção para o uso da suplementação alimentar com este ácido graxo, sendo necessários estudos mais detalhados sobre seus efeitos na próstata, em especial em momentos de riscos de desenvolver CaP. Por outro lado, a MLT mostrou potencial preventivo modulando a fisiologia mitocondrial associada à inibição de vias de sobrevivência. Estes achados evidenciam as mitocôndrias e o estresse oxidativo como alvos terapêuticos e o uso combinado de DHA e MLT pode ser uma estratégia preventiva.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; CARAZO, A.; LEÓN, J.; KHALDY, H.; REITER, R. J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 2, p. 133–51, 2002.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; HITOS, A. B.; LEÓN, J. Melatonin and Nitric Oxide: Two Required Antagonists for Mitochondrial Homeostasis. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 159–168, 2005.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; LEÓN, J.; KHALDY, H.; REITER, R. J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 2, p. 65–74, 2001.

ALBERTS, S. R.; NOVOTNY, P. J.; SLOAN, J. A.; DANELLA, J.; BOSTWICK, D. G.; SEBO, T. J.; BLUTE, M. L.; FITCH, T. R.; LEVITT, R.; LIEBERMAN, R.; LOPRINZI, C. L. Flutamide in men with prostatic intraepithelial neoplasia: a randomized, placebo-controlled chemoprevention trial. **American journal of therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 291–7, 2006.

ALBERTSEN, P. C.; HANLEY, J. A.; GLEASON, D. F.; BARRY, M. J. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 975–80, 16 set. 1998.

APPOLINÁRIO, P. P.; DEROGIS, P. B. M. C.; YAMAGUTI, T. H.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1409–1416, 2011.

BARTSCH, C.; BARTSCH, H.; SCHMIDT, A.; ILG, S.; BICHLER, K. H.; FLÜCHTER, S. H. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: Evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. **Clinica Chimica Acta**, v. 209, n. 3, p. 153–167, 1992.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; KRIDEL, S. J.; CHEN, Y. Q. Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3–4, p. 295–309, 2011.

BIANCHINI, F.; GIANNONI, E.; SERNI, S.; CHIARUGI, P.; CALORINI, L. 22 : 6n-3 DHA inhibits differentiation of prostate fibroblasts into myofibroblasts and tumorigenesis. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2129–2137, 2012.

BLASK, D. E.; HILL, S. M.; DAUCHY, R. T.; XIANG, S.; YUAN, L.; DUPLESSIS, T.; MAO, L.; DAUCHY, E.; SAUER, L. A. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 3, p. 259–269, 2011.

BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. **Mutation research**, v. 434, n. 3, p. 243–51, 1999.

BRASKY, T. M.; DARKE, A. K.; SONG, X.; TANGEN, C. M.; GOODMAN, P. J.; THOMPSON, I. M.; MEYSKENS, F. L.; GOODMAN, G. E.; MINASIAN, L. M.; PARNES, H. L.; KLEIN, E. A.; KRISTAL, A. R. Plasma Phospholipid Fatty Acids and Prostate Cancer Risk in the SELECT Trial. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 15, p. 1132–1141, 2013.

CAVAZOS, D. A.; PRICE, R. S.; APTE, S. S.; DEGRAFFENRIED, L. A. Docosahexaenoic acid selectively induces human prostate cancer cell sensitivity to oxidative stress through modulation of NF- κ B. **The Prostate**, v. 71, n. 13, p. 1420–8, 2011.

CHUA, M. E.; SIO, M. C. D.; SORONGON, M. C.; MORALES, M. L. The relevance of serum levels of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: A meta-analysis. **Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada**, v. 7, n. 5–6, p. E333-43, 2013.

CUI, K.; LI, X.; DU, Y.; TANG, X.; ARAI, S.; GENG, Y.; XI, Y.; XU, H.; ZHOU, Y.; MA, W.; ZHANG, T.; CUI, K.; LI, X.; DU, Y.; TANG, X.; ARAI, S.; GENG, Y.; XI, Y.; et al. Chemoprevention of prostate cancer in men with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): a systematic review and adjusted indirect treatment comparison. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, p. 36674–36684, 2015.

CUNHA, G. R. Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. **The Prostate**, v. 6, p. 22–5, 1996.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives of histology and cytology**, v. 67, n. 5, p. 417–434, 2004.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of biological methods**, v. 2, n. 1, 2016.

CUTANDO, A.; LÓPEZ-VALVERDE, A.; ARIAS-SANTIAGO, S.; DE VICENTE, J.; DE DIEGO, R. G. Role of melatonin in cancer treatment. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2747–53, 2012.

DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAVIDSON, L. K.; KRAUSE, J. A.; SMITH, L. C.; DAUCHY, E. M. Physiologic melatonin concentration, omega-3 fatty acids, and conjugated linoleic acid inhibit fatty acid transport in rodent hind limb skeletal muscle in vivo. **Comparative medicine**, v. 53, n. 2, p. 186–90, 2003.

EPSTEIN, M. M.; KASPERZYK, J. L.; MUCCI, L. A.; GIOVANNUCCI, E.; PRICE, A.; WOLK, A.; HÅKANSSON, N.; FALL, K.; ANDERSSON, S.-O.; ANDRÉN, O. Dietary fatty acid intake and prostate cancer survival in Örebro County, Sweden. **American journal of epidemiology**, v. 176, n. 3, p. 240–52, 2012.

ESER, P. O.; VANDEN HEUVEL, J. P.; ARAUJO, J.; THOMPSON, J. T. Marine- and plant-derived ω -3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation. **Molecular and clinical oncology**, v. 1, n. 3, p. 444–452, 2013.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free radical biology & medicine**, v. 11, n. 1, p. 81–128, 1991.

FILIPPOU, P.; III, J. E. F.; NIELSEN, M. E. Epidemiology of Prostate and Testicular Cancer. v. 1, n. 212, p. 182–185, 2016.

FREITAS, M.; BALDEIRAS, I.; PROENÇA, T.; ALVES, V.; MOTA-PINTO, A.; SARMENTO-RIBEIRO, A. Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. **FEBS Open Bio**, v. 2, n. x, p. 119–128, 2012.

GAO, Y.; XIAO, X.; ZHANG, C.; YU, W.; GUO, W.; ZHANG, Z.; LI, Z.; FENG, X.; HAO, J.; ZHANG, K.; XIAO, B.; CHEN, M.; HUANG, W.; XIONG, S.; WU, X.; DENG, W. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K / AKT and κ B / iNOS signaling pathways. **Journal of Pineal Research** p. 1–15, 2017.

GILAD, E.; PICK, E.; MATZKIN, H.; ZISAPEL, N. Melatonin receptors in benign prostate epithelial cells: evidence for the involvement of cholera and pertussis toxins-sensitive G proteins in their signal transduction pathways. **The Prostate**, v. 35, n. 1, p. 27–34, 1998.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 8, p. 1529–42, 1998.

GOBBO, M. G.; COSTA, C. F.; SILVA, D. G.; DE ALMEIDA, E. A.; GOES, R. M. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs of Rats under Experimental Diabetes. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 614579, 2015a.

GU, Z.; WU, J.; WANG, S.; SUBURU, J.; CHEN, H.; THOMAS, M. J.; SHI, L.; EDWARDS, I. J.; BERQUIN, I. M.; CHEN, Y. Q. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 9, p. 1968–1975, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 2007.

HEBERT, J. R.; HURLEY, T. G.; OLENDZKI, B. C.; TEAS, J.; MA, Y.; HAMPL, J. S. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 21, p. 1637–47, 1998.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; MASON, M.; MATVEEV, V.; MOTTET, N.; SCHMID, H. P.; VAN DER KWAST, T.; WIEGEL, T.; ZATTONI, F. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 276–308, 2004.

HU, Y.; SUN, H.; OWENS, R. T.; GU, Z.; WU, J.; CHEN, Y. Q.; O'FLAHERTY, J. T.; EDWARDS, I. J. Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. **Neoplasia** (New York, N.Y.), v. 12, n. 10, p. 826–836, 2010.

HU, Z.; QI, H.; ZHANG, R.; ZHANG, K. U. N.; SHI, Z. Docosahexaenoic acid inhibits the growth of hormone-dependent prostate cancer cells by promoting the degradation of the androgen receptor. p. 3769–3774, 2015.

IGUCHI, H.; K-H., K.; H., I. Age-Dependent Reduction in Serum Melatonin Concentrations in Healthy Human Subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 55, n. 1, p. 27–29, 1982.

IÑARREA, P.; CASANOVA, A.; ALAVA, M. A.; ITURRALDE, M.; CADENAS, E. Melatonin and steroid hormones activate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase by means of mitochondrial cytochrome P450. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1575–1581, 2011.

JIN, J.-K.; DAYYANI, F.; GALLICK, G. E. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2545–2561, 2011.

KIRBY, M.; HIRST, C.; CRAWFORD, E. D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: A systematic review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 65, n. 11, p. 1180–1192, 2011.

KOSAKA, T.; MIYAJIMA, A.; OYA, M. Is DHT Production by 5 α -Reductase Friend or Foe in Prostate Cancer? **Frontiers in oncology**, v. 4, n. September, p. 247, 2014.

KOYUTURK, M.; YANARDAG, R.; BOLKENT, S.; TUNALI, S. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 235–240, 2006.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunology today**, v. 18, n. 1, p. 44–51, 1997.

LIMA, A. R.; BASTOS, M. D. L.; CARVALHO, M.; PINHO, P. G. DE. Translational Oncology Biomarker Discovery in Human Prostate Cancer : an Update in Metabolomics Studies. **TRANON**, v. 9, n. 4, p. 357–370, 2016.

LÓPEZ, A.; GARCÍA, J. A.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, L. C.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 2, p. 188–198, 2009.

LOVEGROVE, C.; AHMED, K.; CHALLACOMBE, B.; KHAN, M. S.; POPERT, R.; DASGUPTA, P. Systematic review of prostate cancer risk and association with consumption of fish and fish-oils: Analysis of 495,321 participants. **International Journal of Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 87–105, 2015.

LU, Y.; CHEN, D.; WANG, D.; CHEN, L.; MO, H.; SHENG, H.; BAI, L.; WU, Q.; YU, H.; XIE, D.; YUN, J.; ZENG, Z.; WANG, F.; JU, H.; XU, R. Melatonin enhances sensitivity to fluorouracil in oesophageal squamous cell carcinoma through inhibition of Erk and Akt pathway. **Nature**, v. 7, n. 10, p. e2432-12, 2016.

LUPOWITZ, Z.; RIMLER, A.; ZISAPEL, N. Evaluation of signal transduction pathways mediating the nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. **Cellular and molecular life sciences**, v. 58, n. 14, p. 2129–35, 2001.

LYBERG, A.-M.; ADLERCEUTZ, P. Monitoring monohydroperoxides in docosahexaenoic acid using high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 41, n. 1, p. 67–76, 2006.

MARELLI, M. M.; LIMONTA, P.; MAGGI, R.; MOTTA, M.; MORETTI, R. M. Growth-inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 45, n. 3, p. 238–44, 1 nov. 2000.

MARKER, P. C.; DONJACOUR, A. A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 2003.

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T.; ORTIZ, G. G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **Journal of pineal research**, v. 28, n. 4, p. 242–8, 2000.

MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; LEÓN, J.; ESCAMES, G.; KHALDY, H.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 4, p. 348–357, 2002.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C.; ANTOLI, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002.

MENG, H.; SHEN, Y.; SHEN, J.; ZHOU, F.; SHEN, S.; DAS, U. N. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. **Lipids in health and disease**, v. 12, n. 1, p. 160, 2013.

O'FLAHERTY, J. T.; HU, Y.; WOOTEN, R. E.; HORITA, D. A.; SAMUEL, M. P.; THOMAS, M. J.; SUN, H.; EDWARDS, I. J. 15-Lipoxygenase Metabolites of Docosahexaenoic Acid Inhibit Prostate Cancer Cell Proliferation and Survival. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

OBERLEY, T. D.; ZHONG, W.; SZWEDA, L. I.; OBERLEY, L. W. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. **The Prostate**, v. 44, n. 2, p. 144–155, 2000.

PANOV, A.; ORYNBAYEVA, Z. Bioenergetic and Antiapoptotic Properties of Mitochondria from Cultured Human Prostate Cancer Cell Lines PC-3, DU145 and LNCaP. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 22–24, 2013.

PARK, H. G.; LAWRENCE, P.; ENGEL, M. G.; KOTHAPALLI, K.; BRENNAN, J. T. Metabolic fate of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) in human cells: direct retroconversion of DHA to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) dominates over elongation to tetracosahexaenoic acid (24:6n-3). **FEBS Letters**, v. 590, n. 18, p. 3188–3194, 2016.

PARONI, R.; TERRANEO, L.; BONOMINI, F.; FINATI, E.; VIRGILI, E.; BIANCIARDI, P.; FAVERO, G.; FRASCHINI, F.; REITER, R. J.; REZZANI, R.; SAMAJA, M. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: Relationship with hypoxia signalling. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 43–52, 2014.

PARSONS, J. K.; CARTER, H. B.; PARTIN, A. W.; WINDHAM, B. G.; METTER, E. J.; FERRUCCI, L.; LANDIS, P.; PLATZ, E. A. Metabolic Factors Associated with Benign Prostatic Hyperplasia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 7, p. 2562–2568, 2006.

PATERGNANI, S.; SUSKI, J. M.; AGNOLETTI, C.; BONONI, A.; BONORA, M.; DE MARCHI, E.; GIORGI, C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; POLETTI, F.; RIMESSI, A.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 19, 2011. .

PHILLEY, J. V.; KANNAN, A.; QIN, W.; SAUTER, E. R.; IKEBE, M.; HERTWECK, K. L.; TROYER, D. A.; SEMMES, O. J.; DASGUPTA, S. Complex-I Alteration and Enhanced Mitochondrial Fusion Are Associated With Prostate Cancer Progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 6, p. 1364–1374, 2016.

POWERS, G. L.; MARKER, P. C. Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 243–256, 2013.

PRICE, D.; STEIN, B.; SIEBER, P.; TUTRONE, R.; BAILEN, J.; GOLUBOFF, E.; BURZON, D.; BOSTWICK, D.; STEINER, M. Toremifene for the prevention of prostate cancer in men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia: results of a double-blind, placebo controlled, phase IIB clinical trial. **The Journal of urology**, v. 176, n. 3, p. 965-70–1, 2006.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MALDONADO, M. D. Melatonin as an antioxidant: Physiology versus pharmacology. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 215–216, 2005.

REITER, R.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.-X.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; QIN, L.; YANG, S.-F.; XU, K. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. **International Journal of Molecular Science** v. 18, n. 4, p. 843, 2017.

RIMLER, A.; CULIG, Z.; LUPOWITZ, Z.; ZISAPEL, N. Nuclear exclusion of the androgen receptor by melatonin. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 81, n. 1, p. 77–84, maio 2002.

RUBIO, N.; COUPIENNE, I.; DI VALENTIN, E.; HEIRMAN, I.; GROOTEN, J.; PIETTE, J.; AGOSTINIS, P. Spatiotemporal autophagic degradation of oxidatively damaged organelles after photodynamic stress is amplified by mitochondrial reactive oxygen species. **Autophagy**, v. 8, n. 9, p. 1312–24, 2012.

SAKR, W. A.; GRIGNON, D. J.; HAAS, G. P.; HEILBRUN, L. K.; PONTES, J. E.; CRISSMAN, J. D. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. **European urology**, v. 30, n. 2, p. 138–44, 1996.

SAKR, W. A.; HAAS, G. P.; CASSIN, B. F.; PONTES, J. E.; CRISSMAN, J. D. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **The Journal of urology**, v. 150, n. 2 Pt 1, p. 379–85, 1993.

SAUER, L. A.; BLASK, D. E.; DAUCHY, R. T. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 10, p. 637–649, 2007.

SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E. Polyunsaturated fatty acids, melatonin, and cancer prevention. **Biochemical pharmacology**, v. 61, n. 12, p. 1455–1462, 2001.

SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1–7, 2017.

SHIN, S.; JING, K.; JEONG, S.; KIM, N.; SONG, K. S.; HEO, J. Y.; PARK, J. H.; SEO, K. S.; HAN, J.; PARK, J. IL; KWEON, G. R.; PARK, S. K.; WU, T.; HWANG, B. D.; LIM, K. The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53. **BioMed Research International**, v. 2013, n. c, 2013.

SHIU, S. Y. W. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 1, p. 1–9, ago. 2007.

SIU, S. W. F.; LAU, K. W.; TAM, P. C.; SHIU, S. Y. W. Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. **The Prostate**, v. 52, n. 2, p. 106–22, 2002.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science** (New York, N.Y.), v. 273, n. 5271, p. 59–63, 1996.

SOHN, E. J.; WON, G.; LEE, J.; LEE, S.; KIM, S. H. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b mediates the anti-angiogenic properties of melatonin in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19–28, 2015.

SORONGON-LEGASPI, M. K.; CHUA, M.; SIO, M. C.; MORALES, M. Blood level omega-3 Fatty acids as risk determinant molecular biomarker for prostate cancer (DARE structured abstract). Database of Abstracts of Reviews of Effects., v. 2013, p. 875615, 2013.

STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O.; ACKERMANN, K.; JILG, A.; SEBESTÉNY, T.; MARONDE, E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 17–43, 2011.

TAM, C. W.; CHAN, K. W.; LIU, V. W. S.; PANG, B.; YAO, K.-M.; SHIU, S. Y. W. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. **Journal of pineal research**, v. 45, n. 4, p. 403–12, 2008.

TAM, C. W.; MO, C. W.; YAO, K.-M.; SHIU, S. Y. W. Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 191–202, mar. 2007.

TAMARINDO, G.H.; GOBBO, M.G.; PYTLOWANCIV, E.Z, TABOGA, S.R; ALMEIDA, E.A.; GOES, R.M. (2016) Melatonin increases Glutathione-S-transferase (GST) and reduces corpora amylacea in prostate of old rats regardless long-term high-fat diet. **The Prostate**, submetido.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 99–104, 2005.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012. CA: a cancer journal of clinicians., v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TSUJIMOTO, Y.; NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9–10, p. 1297–1300, 2006.

VAZ, C. V.; ALVES, M. G.; MARQUES, R.; MOREIRA, P. I.; OLIVEIRA, P. F.; MAIA, C. J.; SOCORRO, S. Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 2077–2084, 2012.

WALDHAUSER, F.; WEISZENBACHER, G.; TATZER, E.; GISINGER, B.; WALDHAUSER, M.; SCHEMPER, M.; FRISCH, H. Alternations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 66, n. 3, p. 648–652, 1988.

WANG, C.; LUO, F.; ZHOU, Y.; DU, X.; SHI, J.; ZHAO, X.; XU, Y. The therapeutic effects of docosahexaenoic acid on oestrogen / androgen-induced benign prostatic hyperplasia in rats. v. 345, p. 125–133, 2016.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis*. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 95–118, 2009.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

YANG, M.; AYUNINGTYAS, A.; KENFIELD, S. A.; SESSO, H. D.; CAMPOS, H.; MA, J.; STAMPFER, M. J.; CHAVARRO, J. E. Blood fatty acid patterns are associated with prostate cancer risk in a prospective nested case–control study. **Cancer Causes & Control**, v. 27, n. 9, p. 1153–1161, 2016.

YIN, H.; MUSIEK, E. S.; GAO, L.; PORTER, N. A.; MORROW, J. D. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26600–11, 2005.

YOSSEPOWITCH, O.; PINCHUK, I.; GUR, U.; NEUMANN, A.; LICHTENBERG, D.; BANIEL, J. Advanced but not localized prostate cancer is associated with increased oxidative stress. **The Journal of urology**, v. 178, n. 4 Pt 1, p. 1238-43–4, 2007.

ZANARDI, S.; PUNTONI, M.; MAFFEZZINI, M.; BANDELLONI, R.; MORI, M.; ARGUSTI, A.; CAMPODONICO, F.; TURBINO, L.; BRANCHI, D.; MONTIRONI, R.; DECENSI, A. Phase I-II trial of weekly bicalutamide in men with elevated prostate-specific antigen and negative prostate biopsies. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 4, p. 377–384, 2009.

ZHANG, H.-M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of pineal research**, v. 57, n. 2, p. 131–46, set. 2014.

ZHAO, X.; REZONZEW, G.; WANG, D.; SIEGAL, G. P.; HARDY, R. W. Diet modulation is an effective complementary agent in preventing and treating breast cancer lung metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, n. 6, p. 625–638, 2014.

VII. ANEXOS



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**Avaliação da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo em células prostáticas humanas tratadas com ácido docosahexaenóico e melatonina**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Guilherme H. Tamarindo
Nome do(a) aluno(a): Guilherme Henrique Tamarindo

Assinatura: Rejane Góes
Nome do(a) orientador(a): Prof^a Dr^a Rejane Maira Góes

Data: 26 de Julho de 2017

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Avaliação da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo em células prostáticas humanas tratadas com ácido docosahexaenóico e melatonina"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 26 de Julho de 2017

Assinatura : Guilherme H. Tamarindo
Nome do(a) autor(a): **Guilherme Henrique Tamarindo**
RG n.º 48.200.498-8

Assinatura : Rejane M. Góes
Nome do(a) orientador(a): **Profª Drª Rejane Maira Góes**
RG n.º 17404810