

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA EDUARDA ALMEIDA TAVARES

**O PAPEL DA REV-ERB α COMO POSSIVEL REGULADOR CHAVE EM
ALTERAÇÕES MOLECULARES PROSTÁTICAS ASSOCIADAS A SESSÕES
AGUDAS DE EXERCÍCIO FÍSICO EM CAMUNDONGOS IDOSOS**

ARAÇATUBA,

2023

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Dissertação de Mestrado

Maria Eduarda Almeida Tavares

O PAPEL DA REV-ERB α COMO POSSIVEL REGULADOR CHAVE EM
ALTERAÇÕES MOLECULARES PROSTÁTICAS ASSOCIADAS A SESSÕES
AGUDAS DE EXERCÍCIO FÍSICO EM CAMUNDONGOS IDOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – PPGMCF, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA, campus de Araçatuba, regido pela Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis, como requisito máximo para a obtenção do título acadêmico de Mestre (a) em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Giovana Rampazzo Teixeira

Araçatuba,
2023

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T231p	Tavares, Maria Eduarda de Almeida. O papel da Rev-erba como possível regulador chave em alterações moleculares prostáticas associadas a sessões agudas de exercício físico em camundongos idosos / Maria Eduarda de Almeida Tavares. - Araçatuba, 2023 120 f. il. ; tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientadora: Profa. Giovana Rampazzo Teixeira 1. Envelhecimento 2. Exercício físico 3. Metabolismo energético 4. Doenças mitocondriais 5. Histopatologia I. T. CDD 612
-------	---

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

MARIA EDUARDA ALMEIDA TAVARES

Nascimento: 15/07/1999, Araçatuba/ SP, Brasil.

Filiação: Paulo Sergio Tavares

Andrea dos Santos Almeida

2017 – 2020: Graduação em Educação Física. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, campus de Presidente Prudente/ SP, Brasil.

2021 – 2023: Mestrado em Ciências Fisiologias pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, campus de Araçatuba/ SP, Brasil.

Nome em citações bibliográficas:

TAVARES, M. E. A.; ALMEIDA TAVARES, MARIA EDUARDA; TAVARES, MARIA EDUARDA ALMEIDA; TAVARES, MARIA EDUARDA DE ALMEIDA

AGRADECIMENTOS

Para crescermos como ser humano e profissionais que tanto almejamos, é necessário ter gratidão pelas pessoas que te ofereceram a mão pelo caminho. Por isso, desde já gostaria de deixar expresso minha sincera gratidão a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse processo. Nada é construído sozinho.

Gostaria de exaltar primeiramente minha gratidão a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por ter me dado força e coragem principalmente, para enfrentar as dificuldades e desafios, em todos os âmbitos da minha vida e sobretudo nesse ciclo que se encerra.

Aos meus familiares, agradeço por estarem sempre presente e sendo a base forte de apoio, incentivo e amor durante todos esses anos. Vocês foram e são incríveis. Agradeço em especial meus pais *Paulo Sergio Tavares* e *Andréa dos Santos Almeida*, meu querido irmão *Luiz Paulo Almeida Tavares*, meus avós *Eleonides Aparecida dos Santos Almeida*, *Claudio Hermenegildo Almeida*, *Braz Tavares Sobrinho* e *Marta Morreti Tescaro Tavares*.

Agradeço a minha orientadora, Professora Doutora *Giovana Rampazzo Teixeira*, pela vivência durante todos esses anos, exercendo em muitas vezes mais que o papel de orientadora, como também o de família, obrigada pelos seus ensinamentos acadêmicos e pessoais, pela paciência, dedicação e suporte no desenvolvimento dessa dissertação de mestrado. Novamente, espero que a nossa parceria perdure por muitos anos.

Em sequência, gostaria de agradecer aos meus amigos do Laboratório Experimental de Biologia do Exercício - LEBioEx, por todo apoio, ensinamentos, ajuda e parceira dentro e fora do laboratório, *Allice Santos Cruz Veras*, *Rafael Ribeiro Correia*, *Victor Rogerio Garcia Batista* e *Wolfgang Correa Babak*.

Gostaria de agradecer também ao Professor Doutor *Adelino Sanchez Ramos da Silva*, por todo apoio, disponibilização dos animais e materiais para a realização de técnicas em seu laboratório, bem como, pela oportunidade de parceria. Agradeço também aos membros do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Molecular e Exercício Físico da EEFERP-USP, em especial a *Ana Paula Pinto*, que sem dúvidas foi uma das pessoas que mais me ajudou durante o mestrado, contribuindo na realização de análises, ensinamentos de técnicas e discussões enriquecedoras para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ainda a todos os professores do ensino médio, professores da graduação e pós-graduação, bem como, todos os funcionários por todo trabalho e esforço dedicados.

Para finalizar, gostaria de agradecer a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, nos campi de Presidente Prudente e Araçatuba, a Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia.

EPÍGRAFE

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

- Atribuído a Nemo Nox.

RESUMO

RESUMO

O avanço da idade aumenta a prevalência para o câncer prostático (CaP). A senescência causa declínio hormonal, danificações de DNA, redução da apoptose, aumento de inflamação e estresse oxidativo, culminar no desenvolvimento do CaP. O relógio circadiano coordena o ritmo comportamental e fisiológicos via CLOCK/BMAL1 heterodímero transcricional. O receptor nuclear REV-ERB α forma um loop de feedback que contribui para a função do relógio, modula a biogênese mitocondrial, ciclo celular e controle apoptótico. O exercício físico regula o processo de envelhecimento e pode modificar os genes do relógio na próstata. Contudo, pouco se sabe da expressão da REV-ERB α na próstata e o potencial efeito do exercício físico. Portanto, nosso objetivo foi caracterizar o perfil metabólico e histopatológico prostático em camundongos jovens (6 meses) e camundongos idosos (18 e 24 meses de idade) e verificar a expressão gênica de *Nr1d1* e proteica da REV-ERB α e suas relações metabólicas no microambiente prostático associado ao exercício físico combinado em camundongos idosos. Para avaliar o efeito da idade no desenvolvimento de lesões prostáticas utilizamos camundongos C57BL/6J machos, com idades de 6, 18 e 24 meses. Para avaliar o efeito do ritmo circadiano e do exercício físico no metabolismo prostático durante o envelhecimento utilizamos camundongos de 18 meses sedentários e submetidos ao exercício físico combinado por 3 semanas (3 dias/semana de treinamento físico aeróbio, 40 - 50% do teste de carga incremental; e 2 dias/semana de treinamento físico de força, 40 - 50% de 1 RM). Os animais foram submetidos à eutanásia, a próstata foi coletada e processada para análises bioquímicas, Western Blotting e RT-PCR. Os resultados evidenciaram que durante o envelhecimento os animais de 18 e 24 meses apresentam maior peso prostático, bem como, maiores incidências de neoplasia intraepitelial prostática (NIP) tipo III e IV, infiltrado inflamatório e metaplasia nuclear. Com isso, observamos que animais de 18 meses eram mais suscetíveis a lesões prostáticas e apresentavam maior nível de REV-ERB α e menor expressão de *Bmal1*. Por outro lado, o exercício físico combinado aumentou os níveis de *Bmal1* e reduziu REV-ERB α na próstata., acompanhados pela redução de AMPK/SIRT1/PGC-1 α , e aumento de PI3K/AKT e p53/PTEN/caspase 3. Dessa maneira, é possível concluir que camundongos idosos apresentavam lesões NIP IV associadas a metaplasia nuclear e infiltrado inflamatório, podendo evoluir para um adenocarcinoma concomitante a mudanças nos níveis proteico de REV-ERB α prostático. Por outro lado, o exercício físico combinado pode mitigar as alterações moleculares pré-neoplásicas relacionadas à idade, restaurando *Bmal1* e REV-ERB α e com isso regular o metabolismo energético e apoptose celular prostática.

Palavras chaves: senescência, treinamento físico, metabolismo energético, disfunção mitocondrial, histopatologia.

ABSTRACT

ABSTRACT

Advancing age increases the prevalence of prostate cancer (PCa). Senescence causes hormonal decline, DNA damage, reduced apoptosis, increased inflammation, and oxidative stress, culminating in the development of PCa. The circadian clock coordinates behavioral and physiological rhythm via CLOCK/BMAL1 transcriptional heterodimer. The REV-ERB α nuclear receptor forms a feedback loop that contributes to clock function, modulates mitochondrial biogenesis, cell cycle and apoptotic control. Physical exercise regulates the aging process and can modify clock genes in the prostate. However, little is known about the expression of REV-ERB α in the prostate and the potential effect of physical exercise. Therefore, our objective was to characterize the prostatic metabolic and histopathological profile in young mice (6 months old) and old mice (18 and 24 months old) and to verify the gene expression of Nr1d1 and REV-ERB α protein and their metabolic relationships in the prostatic microenvironment associated with combined physical exercise in elderly mice. To evaluate the effect of age on the development of prostatic lesions, male C57BL/6J mice aged 6, 18 and 24 months were used. To evaluate the effect of circadian rhythm and physical exercise on prostatic metabolism during aging, we used sedentary 18-month-old mice submitted to combined physical exercise for 3 weeks (3 days/week of aerobic physical training, 40 - 50% load test incremental; and 2 days/week of physical strength training, 40 - 50% of 1 RM). The animals were euthanized, the prostate was collected and processed for biochemical analysis, Western Blotting and RT-PCR. The results showed that during aging, animals aged 18 and 24 months presented greater prostatic weight, as well as higher incidences of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) types III and IV, inflammatory infiltrate and nuclear metaplasia. Thus, we observed that 18-month-old animals were more susceptible to prostatic lesions and had a higher level of REV-ERB α and lower expression of Bmal1. On the other hand, combined physical exercise increased levels of Bmal1 and reduced REV-ERB α in the prostate, accompanied by a reduction in AMPK/SIRT1/PGC-1 α , and an increase in PI3K/AKT and p53/PTEN/caspase 3. , it is possible to conclude that elderly mice had PIN IV lesions associated with nuclear metaplasia and inflammatory infiltrate, which could progress to adenocarcinoma concomitantly with changes in prostatic REV-ERB α protein levels. On the other hand, combined physical exercise can mitigate age-related pre-neoplastic molecular alterations, restoring Bmal1 and REV-ERB α and thereby regulating energy metabolism and prostatic cell apoptosis.

Keywords: senescence, physical training, energy metabolism, mitochondrial dysfunction, histopathology.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Relógio circadiano autônomo do tumor.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 2. Regulação do metabolismo proliferativo por fatores transcricionais de genes do relógio	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO I

Figura 3. Análises antropométricas e metabólicas de camundongos durante o processo do envelhecimento	Erro! Indicador não definido.
Figura 4. Imagens representativas das análises morfológicas na próstata ventral de camundongos idosos.....	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO II

Figura 5. Exercício físico combinado modula expressão de Bmal e REV-ERB e capacidades motoras em animais idosos	73
Figura 6. O exercício físico modulou as vias do metabolismo energético mitocondrial na próstata	76
Figura 7. Redução do REV-ERB α em animais exercitados modifica mecanismos intracelulares prostáticos em animais idosos	78
Figura 8. Análise bioinformática de células da próstata de camundongos C57Bl/6J jovens e velhos de um banco de dados público	80
Figura 9. O papel do exercício físico combinado durante o envelhecimento.....	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Ocorrência de distúrbios histopatológicos da próstata em camundongos idosos	60
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 2. Características de intensidade, volume, frequência e intervalo entre as sessões de treinamento.....	68
Tabela 3. Especificações dos genes analisados	70

LISTA DE ABREVIATURAS

α - Alfa

β – Beta

γ - Gama

% - Porcentagem

AR - Receptor de androgênio

AKT - Proteína quinase B

ACC - Acetil-CoA-carboxilase

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

AMP - Adenosina monofosfato

ATM - Proteína mutada na ataxia telangiectasia

ATR - Proteína relacionadas a ATM e Rad3

ATP - Adenosina trifosfato

BMAL1/ARNTL - do *inglês* Brain and muscle arnt-like

BAD - Agonista da proteína de morte celular associado a BCL2

BCL-2 - Linfoma de células B 2

BAX - Proteína X associada a bcl-2

CRY - do *inglês* *Cryptochrome*

CLOCK - do *inglês* - *circadian locomotor output cycles kaput*

CCL - O ligante de quimiocina

CDK - Quinases dependentes de ciclina

CPT1 - Carnitina Palmitoil transferase

CaP - Câncer de próstata

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DHT - Di-hidrotestosterona

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

ER - Receptor de estrogênio

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

FATP - Proteína de transporte de ácidos graxos de cadeia longa

FASN - Ácido graxo sintase – do *inglês* *Fatty Acid Synthase*

FRAP - Capacidade de redução férrica total

GSK-3 β - Glicogênio Sintase Quinase 3

GLUT – Transportadora de glicose

HBP: Hiperplasia benigna da próstata

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IL-10 - Interleucina 10

IKK - I κ B quinase

IFN- γ - interferón-gama

IL - Interleucina

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

JAK - Janus quinase

KO - do inglês *Knockout*

KGF - Fator de crescimento de queratinócitos

LPS - Lipopolissacarídeo

LHRH - Hormônio hipotalâmico liberador de LH

mTOR - Alvo mamífero da rapamicina

MYC - Proto-oncogene myc

MAPK – MAP quinase

MMP - Metaloproteinases da Matriz

MRE11 - Nuclease de reparo de quebra de fio duplo

NBS1 - A síndrome de quebras de Nijmegen

NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NF- κ B - factor nuclear kappa B

NCOR - co-repressor 1 do receptor nuclear

OIS – do inglês *Oncogene-induced senescence*

OPA1- Dinamina mitocondrial como GTPase

PPAR α - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa

PSA -Antígeno prostático específico

p53 - proteína 53

p21 - proteína 21

p16 - proteína 16

p27 - proteína 27

PGC1a ou *Ppargc1a* - O coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

AIP - atrofia inflamatória proliferativa -PIA

NIP - neoplasia intraepitelial prostática - PIN

PI3K - fosfatidil-inositol 3-quinase

PER - do inglês *Period*

PVN – Núcleo paraventricular

PTEN - fosfatase homóloga à tensina

REV-ERB α - receptores nucleares 1 membro do grupo D 1 (*Nr1d1*)

RAD51 - RAD51 Recombinase

ROR - receptor órfão

RXR - Receptor retinóide X

RAS – do inglês *Rat Sarcoma virus*

RAF - RAF proto-oncogene

ROS - do *inglês* reactive oxygen species

SASP: O fenótipo secretor associado a senescência

SAMP8 - do *inglês* - Senescence-accelerated mouse-prone 8

SIRT1 - sirtuina 1

SHBG - globulina ligadora de hormônios sexuais

STAT - Transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição

SCN – Núcleo supraquiasmático

SOD - superóxido dismutase

T - Testosterona

TBARs - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR – Toll like receptor

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	24
EFEITOS DO ENVELHECIMENTO: ASPECTOS GERAIS	28
ANATOMIA E FISIOLOGIA DA GLÂNDULA PROSTÁTICA.....	30
RITMO CIRCADIANO.....	35
EXERCÍCIO FÍSICO ENVELHECIMENTO E PRÓSTATA.....	41
JUSTIFICATIVA.....	48
Objetivos Gerais.....	50
Objetivos específicos	50
Capítulo 1	50
Capítulo 2	50
CAPÍTULO 1.....	52
RESUMO	52
INTRODUÇÃO	52
MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
Animais.....	54
Teste de tolerância à insulina (ITT)	54
Teste de tolerância a glicose (GTT)	55
Teste de Carga Incremental (TCI)	55
Análises histológica e histopatológica	55
Análises estatísticas	56
RESULTADOS	56
<i>Envelhecimento reduz captação da glicose, velocidade de corrida e gordura epididimal, mas não altera peso da próstata e bexiga urinaria</i>	<i>56</i>
<i>Envelhecimento não modifica glicogênio intracelular prostático, mas aumenta a deposição de colágeno</i>	<i>58</i>
<i>Envelhecimento aumenta o número de ocorrência e porcentagem de alterações neoplásicas na próstata de camundongos idosos</i>	<i>60</i>
DISCUSSÃO	60
CAPÍTULO 2.....	64
RESUMO	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	67
Animais.....	67
Teste de carga incremental (TCI) e teste de força (repetição máxima - RM).....	67
Protocolo de Treinamento Físico Combinado	68
Análises Bioquímicas do Estado Redox Plasmático	69
Análise de Western Blotting (WB).....	69
Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-qPCR)	70

Tabela 3. Especificações dos genes analisados	70
Conjuntos de dados transcriptômicos publicamente disponíveis da próstata	71
Análises estatísticas	71
RESULTADOS	71
<i>O exercício físico combinado aumentou a velocidade de corrida e a força, mas reduziu os TBARS</i>	71
<i>O exercício físico combinado aumentou os níveis de mRNA de Bmal1 e baixou o Nr1d1 na próstata</i>	74
<i>O exercício físico regulou negativamente o REV-ERBa e modulou as vias do metabolismo energético mitocondrial na próstata</i>	74
<i>Redução do REV-ERBa em animais exercitados modifica mecanismos intracelulares prostáticos em animais idosos</i>	76
<i>Células basais e luminais da próstata mostram diferentes expressões nos genes Nr1d1 e Ppargc1α em camundongos jovens e velhos de dados públicos</i>	79
DISCUSSÃO	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	119

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de próstata (CaP) é um dos cânceres com maior incidência e taxa de mortalidade no mundo [1], é previsto para o ano de 2023 cerca de 288.300 novos casos de CaP e aproximadamente 34.700 mortes apenas nos EUA [2]. No Brasil para o triênio de 2023 -2025 cerca de 71.730 novos casos de câncer de próstata foram previstos [3], sendo o tipo de câncer maligno com maior incidência e taxa de mortalidade entre os homens no Brasil [4]. De acordo com Miller et al., [5], a maior taxa de incidência de CaP está entre 50-65 anos de idade. Ainda, a hereditariedade, o uso excessivo de álcool, tabagismo, hábitos alimentares como uso de dieta hiperlipídica e a prática insuficiente de atividade física [6,7], podem potencializar o risco do CaP [8–10]. Portanto, o desenvolvimento de terapias que retardem o desenvolvimento e a progressão do câncer de próstata é de extrema importância para a população idosa.

Durante o processo de envelhecimento, ocorrem modulações significativas no metabolismo energético, no sistema hormonal e na resposta imunológica na próstata. Essas alterações desencadeiam uma hiperestimulação das vias intracelulares, como é o caso da via PI3K/AKT, assim como um aumento na sinalização androgênica. Paralelamente, observa-se uma redução nos níveis de supressores tumorais, como PTEN e p53, que desempenham papéis cruciais na regulação do crescimento celular, juntamente com uma diminuição da atividade da caspase 3, uma enzima envolvida na apoptose [11]. A influência dessas modulações nas vias celulares promove um cenário propício para o aumento da proliferação celular, concomitantemente à redução dos marcadores p53, p21 e p27, os quais normalmente induzem a parada do ciclo celular e a apoptose programada [12]. Esse contexto cria um microambiente favorável ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e, em última instância, ao surgimento de carcinoma prostático [13].

O envelhecimento afeta todos os aspectos da nossa fisiologia e comportamento, incluindo o relógio circadiano. A sincronização adequada dos ritmos circadianos é crucial para a saúde e o bem-estar. O núcleo supraquiasmático (SCN) é o marca-passo central do ritmo circadiano. O SCN recebe informações sobre os ciclos de luz e escuridão por meio de fotorreceptores na retina, que são transmitidas ao SCN por meio de projeções neuronais. Essa intrincada comunicação possibilita a formação da criticidade no relógio central, e como resultado direto, promove a coordenação da produção de hormônios, regula a temperatura corporal, controla o ciclo de sono-vigília e influencia uma variedade de processos biológicos em todo o corpo [14].

A disfunção do ritmo circadiano durante o envelhecimento é um processo complexo que envolve múltiplos fatores dos sistemas biológicos. Alguns dos principais mecanismos envolvidos na disfunção do ritmo circadiano durante o envelhecimento inclui o declínio em número e eficiência dos fotorreceptores retinianos [15]. O próprio SCN sofre alterações estruturais e funcionais ao longo do envelhecimento. Outro fator associado a desregulação do ritmo circadiano é a redução na produção de melatonina, um hormônio associado à regulação do sono e ao ritmo circadiano. Isso pode resultar em uma redução na eficiência do sistema circadiano em sincronizar

os processos biológicos com os ciclos diurnos e noturnos [16]. Mudanças no estilo de vida, como padrões irregulares de sono, exposição inadequada à luz durante o dia e hábitos alimentares desregulados, podem contribuir para a disfunção do ritmo circadiano em pessoas idosas [17]. Assim, todas essas alterações produzem a perda de ritmicidade e desencadeia alterações na atividade de proteínas como REV-ERB α [14]. A REV-ERB α exerce influência na regulação de genes envolvidos nas respostas metabólicas e inflamatórias [18,19]. Como resultado direto, a desregulação dessa proteína pode desencadear modificações significativas nas respostas hormonais, no funcionamento mitocondrial, no metabolismo celular e no equilíbrio energético [20]. Portanto, a disfunção do ritmo circadiano, especialmente durante o processo de envelhecimento, revela a complexidade intrínseca das interações entre os ritmos biológicos e os sistemas regulatórios do corpo. A compreensão mais profunda desses mecanismos não apenas lança luz sobre os fundamentos da regulação biológica, mas também oferece perspectivas promissoras para intervenções terapêuticas destinadas a mitigar os efeitos do envelhecimento e melhorar a saúde e o bem-estar ao longo da vida.

Nessa premissa o exercício físico poderia ser utilizado como método não-farmacológico para a prevenção e tratamento das alterações prostáticas associada ao processo de envelhecimento. Em síntese, o exercício físico sistematizado é caracterizado por atividades que aumentam significativamente a demanda energética modulando positivamente o perfil metabólico, hormonal e imunológico. Pouco se sabe sobre o efeito do exercício físico na regulação do ritmo circadiano prostático durante o processo de envelhecimento [21,22]. No entanto, o exercício físico pode modular proteínas e genes CLOCK no músculo estriado esquelético, hipotálamo e fígado e parece estar envolvido nas alterações no metabolismo mitocondrial. Apesar de diversos estudos mostrarem ação circadiana no controle de vias proliferativas, ciclo celular e apoptose na tecidos prostáticos [23–26], esse é o primeiro estudo no qual mostra efeito das proteínas do ritmo circadiano com influência do exercício físico combinado em tecidos prostáticos em animais idosos.

REFERENCIAL TEÓRICO

EFEITOS DO ENVELHECIMENTO: ASPECTOS GERAIS

O envelhecimento é um processo contínuo, gradual e de alterações naturais que inicia na vida adulta. O envelhecimento é acompanhado de significativas transformações demográficas, biológicas, sociais, econômicas e comportamentais [27]. Em demografia, entende-se por envelhecimento populacional o processo de crescimento da população idosa conforme sua participação relativa no total da população [28]. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE - 2023 [29], atualmente no Brasil há cerca de 14,7 % da população total, com idade acima de 60 anos, e estima-se para 2050 aproximadamente 29,1 % população, um em cada 3 brasileiros será idoso [30].

O processo do envelhecimento pode ser considerado resultante das interações entre fatores internos e externos que ocorrem ao longa vida. O que pode levar ao declínio das capacidades funcionais e a perturbação homeostase do organismo, resultando senilidade associada a dependência e fragilidade em humanos [31]. O declínio pode ser acelerado com a presença da síndrome geriátrica, uma classe de doenças associado a senilidade, que afetam a capacidade do idoso em realizar tarefas cotidianas, bem como a qualidade de vida [32]. Múltiplas funções fisiológicas podem predizer o estado de homeostase, como cognição, locomoção, controle psicossocial, vitalidade e controle sensorial [27]. A relação do processo de envelhecimento entre humanos e nos camundongos, apesar da diferença na expectativa de vida entre as espécies, está pautada na semelhança na fisiopatologia e nas estruturas moleculares que controlam a atividade celular durante o mecanismo do envelhecimento, entretanto, para que ocorra condições experimentais análogas, é necessário e correlação entre as idades [33]. Dessa forma, foi proposto por Dutta & Sengupta, [34], que na senescência reprodutiva dos camundongos C57BL/6J, cada 8,82 dias do camundongos equivalem um ano humano, desta forma animais idoso de 24 meses equivalem a 80 anos humanos, 18 meses equivalem a 60 anos humanos e os animais jovens de 6 meses equivalem a 20 anos humanos.

A senilidade originalmente é iniciada pela senescência celular. A senescência celular é definida como a perda irreversível do potencial proliferativo, decorrendo do estresse celular, seja estimulado por fatores endógenos ou fatores exógenos [35]. A senescência celular pode ser classificada em dois tipos: a senescência replicativa e senescência induzida ou prematura. Na senescência replicativa, ocorre um limite de o número de divisões celulares em todos as células eucariotas somáticos, esse mecanismo foi postulado por Hayflick & Moorhead, [36]. Em células jovens a integridade do DNA é mantida pela presença dos telômeros (DNA não codificante) nas extremidades, isso devido a atividade da enzima telomerase, que tem papel importante na manutenção e síntese de novos telômeros [37]. Entretanto, no envelhecimento ocorre uma perda gradual da atividade da telomerase, o que leva ao encurtamento dos telômeros. Nesse sentido, a manutenção de telomerase evita a senescência celular. A sinalização celular replicativa, induzida

pelo encurtamento telômerico envolve ativação da histona H2A.X, sinalizando a formação do complexo MRN (MRE11/RAD51/NBS1), o qual ativa as proteínas ATM/ATR (Proteína mutada na ataxia telangiectasia/relacionadas a ATM e Rad3), que culminam fosforilação das quinases de checkpoint (Chk1 e Chk2) que tem o papel de checkpoint do ciclo celular [38], o que resultam na fosforilação da p53 (serina 15), que atua como fator de transcrição de p21, levando a indução de parada do ciclo celular e senescência celular [39].

O mecanismo de indução da senescência prematura pode ser iniciado pela disfunção mitocondrial, com aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou pela superexpressão de genes oncogênicos, os chamados OIS (*Oncogene-Induced Senescence*) [40]. O funcionamento das mitocondrias é essencial para a homeostase celular, isso porque elas são como centros de energia e respiração celular [41]. A disfunção mitocondrial ocupa um importante papel no desenvolvimento da senescência celular, isso porque é um componente essencial para o feedback positivo da senescência induzida por EROs [42]. O aumento de EROs afeta não só o DNA nuclear, como também o mtDNA, que por sua vez promovem ainda mais aumento de EROs, e a disfunção mitocondrial, bem como outros mecanismos mitocondriais importantes para o funcionamento adequado da célula também estão perturbados, como o metabolismo energético e controle apoptótico e mitofagia [43]. Foi postulado que alterações no funcionamento das mitocôndrias promove relações anormais de NAD⁺/NADH e ATP/ADP, essas relações desequilibradas desencadeiam a ativação da proteína AMPK (Proteína quinase ativada por AMP), que por sua vez, ativa a via da p53/p21 levando a senescência celular induzida por AMPK [44]. Por outro lado, recentemente foi descoberto que a translocação da proteína PARKIN para as mitocôndrias defeituosas, induz a mitofagia, sendo esse um mecanismo de controle da indução de senescência celular, pois a mitofagia de mitocôndrias defeituosas resulta em menores produção de EROs, contudo esse mecanismo pode ser inibido pela ativação de p53 [45].

Outro mecanismo de indução de senescência prematura é pela superexpressão dos OIS. Sendo o mais implicado a sinalização oncogênica de RAS/RAF que induz sobrevivência celular, e danos irreversíveis ao DNA, induzindo a ativação da histona H2A.X/ATM/ATR/p53, com concomitante inibição de vias proliferativas como PI3K/AKT [46]. Molecularmente, o aumento de EROs e estimulação dos genes oncogênicos, levam a ativação da p53/p21 levando a indução da senescência [47], bem como, os oncogêneses também promovem estimulação da via p38/MAPK (MAP quinase) e posteriormente ativam a p16, reprimindo as quinase dependente de ciclina, impedindo a atividade do complexo ciclina-CDK, e da proteína do retinoblastoma (pRB) que controlam a progressão do ciclo celular, ambas levam a ativação da p53 e indução de parada do ciclo celular e senescência celular [48].

As células com fenótipo senescente apresentam marcadores específicos como o da β -galactosidase [49], aumento vias de indução de parada do ciclo celular (p16, p53, p21 e p27), e as células senescentes também secretam mediadores inflamatórios, denominados "fenótipo

secretor associado a senescência (SASP)" [50]. Dentre os fatores imunológicos secretados pelas células senescentes incluem os microRNAs (miR-106 e miR-30), citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-8 e IL-16), quimiocinas (CCL1, CCL17, CCL20 e CCL22), fatores de crescimento (TGF, IGF-1, KGF, EGF e FGF), proteases e metaloproteinases (MMP2 e MMP9), promovendo um ambiente de caráter pró-inflamatório crônico associado a idade, conhecido como do inglês "*inflammaging*" [51]. O programa de senescência e o fenótipo SASP, leva células adjacentes, a modificação do ambiente celular, conduzindo a uma redução na eficácia das funções fisiológicas e uma perda de resistência ou adaptação ao estresse [52,53], estando envolvida em diversos processos fisiopatológicos [35,54].

Contudo, o acúmulo persistente das células senescentes impacta negativamente na restauração da homeostase celular, sendo um impulsionador de declínio funcional associado a senilidade [53]. Ainda, o estudo da senescência celular envolve tanto as análises de alterações fenotípicas teciduais, de atipias nucleares, extensão de prolongamentos e alterações de metabolismo energético, como também alterações moleculares nas vias de sinalização intracelulares. Os mecanismos que controlam a senescência celular, ainda são poucos compreendidos, entretanto fatores que promovem homeostase no balanço redox, principalmente aumento da capacidade antioxidante, redução do fenótipo senescente SASP, indução de apoptose e redução dos fatores que podem prover algum dano ao DNA, como a proliferação exacerbada, podem impedir a progressão da senescência celular, sendo, possíveis alvos terapêuticos na prevenção e tratamento de diversas doenças associadas ao envelhecimento, como Alzheimer, sarcopenia e o câncer prostático.

ANATOMIA E FISIOLOGIA DA GLÂNDULA PROSTÁTICA

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, o qual produz um fluido leitoso, levemente ácido (pH 6,5). O líquido prostático compõe cerca de 20% a 30% do plasma seminal, e contém substâncias como ácido cítrico utilizados pelos espermatozoides para produção de adenosina trifosfato (ATP) via ciclo de Krebs [55]. Ainda, possui enzimas proteolíticas como o antígeno prostático específico (PSA), pepsinogênio, lisozima, amilase e hialuronidase são usados para degradar as proteínas de coagulação [56]. O líquido prostático contribui para motilidade e viabilidade dos espermatozoides, sendo uma glândula essencial para a função reprodutiva masculina. A próstata está localizada na cavidade pélvica, posterior a sínfise púbica, inferior a bexiga urinária e anterior ao reto [57], e circunda a uretra proximal à medida que emerge da bexiga urinária. Nos murinos a próstata é constituída por lobos anterior, dorso lateral e ventral. Nos humanos, a próstata é constituída por zonas denominadas: zona periférica que constitui cerca de 70% de todo o órgão, zona central e zona transicional [58]. Tanto em homens como camundongos, a próstata possui ácinos prostáticos são revestidos por epitélio colunar simples,

constituído por compartimentos morfológicamente distintos: o basal, luminal/secretor e neuroendócrinas [59,60]. As células basais possuem uma camada única que envolve dos ácinos, próximas a membrana basal, possuem núcleo ovoide com citoplasma discreto. Já as células lumbais são colunares, com citoplasma eosinófilo com núcleos redondos próximos da base da célula, essas células produzem e secretam o PSA [61]. As células neuroendócrina são uma pequena população de células endócrina, que expressão marcadores como a sinaptofisina, cromogranina A e com baixa responsividade para andrógeno [62]. As células basais e lumbais não são diferenciáveis apenas na histológica, mas também funcionalmente e pela expressão de classes diferentes de citoqueratinas [63]. O estroma fibromuscular é um tecido não glandular que circunda o órgão e suas porções glandulares, sendo formado por células musculares lisa, fibroblasto e miofibroblasto, células imunológicas e nervosas [64], células estas que estão envolvidas no reparo tecidual e manutenção da matriz extracelular. Além disso, o estroma prostático produz uma sinalização que influencia as células epiteliais secretoras a produzirem e secretarem o fluido prostático [65,66]. O estroma ainda está implicado no desenvolvimento e progressão do CaP através da formação do chamado estroma reativo, promovendo aumento de fatores angiogênicos, de crescimento e proliferativos que podem interferir na diferenciação das células epiteliais [67].

Os andrógenos têm forte influência na morfogênese, na manutenção da atividade funcional, proliferação e na diferenciação das células da próstata [68–70]. Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores androgênicos contidos no núcleo celular. Contudo, para que ocorra a ativação androgênica em tecidos prostáticos é necessário a presença do hormônio masculino, a testosterona, originada nos testículos (95%) e na glândula adrenal (5%). Para desempenhar suas funções anabólicas prostáticas a testosterona é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase [71]. Liberação hormonal da testosterona total sérica é controlada pelo funcionamento do eixo (HHG) hipotálamo (hormônio liberador de hormônio luteinizante - LHRH) - hipófise (Hormônio Luteinizante e Folículo estimulante LH / FSH) - testículo (testosterona). A concentração média de testosterona no plasma é de aproximadamente 600 ng/mL [72], e os níveis de testosterona plasmáticos permanecem razoavelmente constantes entre 25 e 60 anos de idade, mas começa a declinar gradualmente depois disso. A testosterona no sangue está conjugada a globulina ligada a hormônio esteroide – SHBG. Uma pequena fração é testosterona livre, utilizada para ativação celular. Além dos andrógenos, outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patológicas [69,73]. Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo/hipófise/gônada, com redução da produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos [73].

O papel dos hormônios esteroides na próstata têm sido debatidos por várias décadas [74,75]. Dentre os esteroides, a ação do estrógeno nas doenças prostáticas tem sido relacionada ao crescimento prostático [76]. O estrógeno, em particular o estradiol, pode atuar na próstata por meio do receptor de estrógeno-alfa ($ER\alpha$) localizado no estroma induzindo metaplasia escamosa e neoplasia intraepitelial prostática, mediando os efeitos carcinogênicos do estradiol [77,78]. Já a ativação do receptor de estrógeno β ($ER\beta$) pode atuar no processo antiproliferativo [79]. A supressão de $ER\beta$ promoveu hiperplasia da próstata e está associado a diferenciação e migração de células tumorais [80]. Foi sugerido que a ação anticancerígena do $ER\beta$ pode ser via aumento da atividade dos supressores tumorais, contudo a repressão do $ER\beta$, pode levar a perda dos supressores tumorais, envolvendo a ativação de vias proliferativas, como o aumento da sinalização PI3K/AKT (fosfatidil-inositol 3-quinase/proteína quinase B), que são essenciais para a tumorigênese [81].

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção às doenças que atingem esse órgão. Dentre as doenças destacam-se a hiperplasia prostática benigna (HBP), o CaP e as alterações histopatológicas que acometem o órgão como neoplasia intraepitelial (NIP), a atrofia prostática (AP) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) [68,82].

A HBP é uma alteração diretamente associada ao envelhecimento, caracterizada por predominante proliferação benigna dos compartimentos fibromusculares do estroma e, embora ocorra o aumento substancial do epitélio, a integridade regional da glândula é mantida [83]. Os principais sintomas da HBP é fluxo urinário fraco e gotejamento, isso devido a obstrução parcial da uretra prostática e saída da bexiga [84]. Fatores como envelhecimento e disfunção metabólica, mesmo ambas reduzindo a produção de testosterona e consequentemente menor ativação androgênica via DHT, podem impulsionar o crescimento benigno da próstata [85]. Os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de HBP, em baixas concentrações de testosterona são mediados pela presença de altos níveis de insulina, do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que culminam na interação com os receptores específicos ou receptores de fator de crescimento (GHR), promovendo fosforilação da via PI3K/AKT (fosfatidil-inositol 3-quinase/proteína quinase B), que além de inibir vias de indução a apoptose, estimulam a fosforilação de AR sua translocação para o núcleo [66,86], mediados pelo envelhecimento ou disfunção metabólica [87,88].

Tem sido proposto que as transformações teciduais neoplásicas prostáticas resultam da proliferação epitelial em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e liberação de agentes promotores de danificação no DNA como os oncogenes, bem como redução dos supressores tumorais como a PTEN (fosfatase homóloga à tensina) e proteína 53 (p53) e NKX 3.1 (ABATE-SHEN et al., 2008; KIM, C.-Y. et al., 2016; WANG, S. et

al., 2016). A NIP é um tipo de alteração tecidual pré-neoplásica relativamente comum, subdivididas para homens em NIP de baixo grau e NIP de alto grau [91], e para camundongos subdivididas em NIP I, NIP II, NIP III e NIP IV. A NIP é caracterizada pela hiperplasia luminal aumentada, sendo geneticamente semelhante ao fenótipo do câncer de próstata (CaP) [92]. De acordo com Majumder et al., [93], a NIP é clinicamente apontada como uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo e pode precedê-lo por até 10 anos, mas os mecanismos moleculares que suportam essa transição ainda não são conhecidos. Estudos clínicos demonstraram que homens com NIP de alto grau possuem 17% a 35% de risco de desenvolver o CaP. O CaP é considerado doença epitelial e, frequentemente, estende-se além dos limites normais do órgão [94].

O desenvolvimento do carcinoma prostático é de natureza endócrina e a possibilidade de ocorrência desta doença aumenta com a idade [95]. Atualmente, a ablação hormonal que inclui a terapia de privação androgênica é a primeira linha para o tratamento do CaP iniciais. No entanto, quase todos os pacientes progridem de CaP sensíveis a hormônios para o câncer de próstata resistente à castração (CRPC), com aumento do PSA [80]. No envelhecimento ocorre alteração na taxa de testosterona/estrógeno circulantes mesmo em homens saudáveis [48,49]. O envelhecimento promove a redução da síntese de testosterona [96], promovendo um estado de hipogonadismo, mesmo assim, promove aumento proliferativo prostático [75,97] pelo aumento da ativação de AR nuclear associado ao receptor de estrógeno α (ER α), e citocinas inflamatórias [98] mesmo com baixos níveis de testosterona. Neste contexto biológico, o envelhecimento pode modificar o ambiente prostático de forma que altere outros mecanismos para indução proliferativa.

A atrofia prostática (AP) também tem sido considerada uma alteração prostática precursora do adenocarcinoma [99]. Esta condição está intimamente associada com um quadro de inflamação crônica [82]. Em homens senis, áreas de atrofia epitelial são extremamente comuns na próstata. A AP é caracterizada pela redução do volume de glândulas preexistentes e pode ser dividida em dois tipos: difusa (APD) e focal (APF) [82]. APD resulta da diminuição dos andrógenos circulantes e comprometendo a próstata de forma relativamente uniforme. Em contraste, a APF pode não estar relacionada à diminuição das concentrações de andrógenos circulantes, comprometendo apenas parte da glândula. Já a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) é lesão do epitélio prostático que ocorre simultaneamente aos diferentes graus de inflamação intersticial adjacente. O termo PIA foi proposto por De Marzo et al., [100] para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou de hiperplasia pós-atrótica (PAH), ocorrendo em associação à inflamação. Ainda, Putzi & de Marzo [101] postularam que a PIA possa representar uma condição precursora da NIP e/ou do CaP. Segundo De Marzo et al., [82], todas as formas de atrofia focal da próstata são proliferativas, e a ampla maioria está associada à inflamação, de maneira que essas lesões podem se originar em um

cenário de estresse oxidativo aumentado, possivelmente, derivado das células inflamatórias adjacentes.

Alguns dos principais mecanismos envolvidos no crescimento da próstata são potenciais alvos terapêuticos que incluem alterações no estado hormonal, alterações no eixo insulina/IGF/IGFBP, inflamação e alterações no metabolismo resultante da estimulação anormal persistente [102]. A resposta proliferativa do tecido à lesão e inflamação é necessária para a sobrevivência do tecido, contudo, existe associação entre a inflamação crônica e câncer levando a concluir que essa resposta proliferativa advinda de uma inflamação pode impulsionar o crescimento epitelial em neoplasia e proliferação anormal [103,104]. Desta forma, mediadores inflamatórios tem papel principal no processo inflamatório e podem contribuir para o desenvolvimento e progressão do tumor. Porém seu efeito sobre a progressão do tumor ainda é considerado colateral não específico.

O declínio da função imunitária associado ao envelhecimento, é conhecido como imunossenescência, e pode aumentar a suscetibilidade para doenças infecciosas e câncer [105]. A modulação imunológica provinda de uma infecção viral ou da redução da resposta imunológica devido a imunossenescência pode desempenhar um papel importante na carcinogênese prostática [106]. Alterações nas repostas imunológicas promovem não só o aumento da inflamação local, com também podem levar a modificações nas sinalizações intracelulares de proliferação, redução do potencial apoptótico e desregulação do ciclo celular, bem como alterações genéticas levando ao desenvolvimento do câncer de próstata [107]. Entretanto, durante o desenvolvimento do CaP em indivíduos idosos ocorre uma grande infiltração de células do sistema imune, como linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos, células natural killer e mastócito, que a princípio é um sistema de defesa do organismo no combate do crescimento tumoral local, contudo devido à alta capacidade de adaptativa das células cancerígenas, elas utilizam do ambiente inflamatório para promover o crescimento tumoral [108].

A senescência replicativa é um mecanismo de interrupção da proliferação celular de células com danos irreversíveis ao DNA [109]. Assim, o mecanismo de indução de senescência celular é descrito como supressor tumoral [110]. A senescência celular é caracterizada pela alta expressão de marcadores como a SA- β galactosidase associada ao aumento da atividade lisossomal, perda de PTEN e concomitante aumento das proteínas p53, p16 INK4a, p21CIP1 e p27 conhecidas por inibir a atividade das quinase dependente de ciclina, impedindo a atividade do complexo ciclina-CDK e a progressão do ciclo celular [111], esse mecanismo induz resistência a proliferação celular, sendo incapazes de se replicar, isso devido ao bloqueio da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular [110]. Entretanto, as células com fenótipo senescentes secretam uma série de mediadores inflamatórios, que agem de forma parácrina em outras células do órgão promovendo microambiente inflamatório, denominados de "fenótipo secretor associado a senescência (SASP)", o qual contém citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α ,

IL-8 e IL-16), quimiocinas (CCL1, CCL17, CCL20 e CCL22), fatores de crescimento, proteases e metaloproteinases (MMP2 e MMP9) [112], que estão associadas com o desenvolvimento das lesões teciduais, HPB e câncer prostático em células da próstata envelhecida [109,113].

Os mecanismos pró-tumorgênicos do SASP são mediadas por vias sinalização celular da PI3K/AKT/JAK/STAT3 (fosfatidil-inositol 3-quinase/proteína quinase B/Janus quinase/Transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição), a ativação dessa via fosforila as proteínas oncogênicas RAS/RAF e MAPK (MAP quinase), induzindo sobrevivência celular, proliferação, e invasão de células imunes [114]. Ainda, a ativação de via JAK/STAT3/PIM (local de integração proviral para o vírus da leucemia murina Moloney) leva a inibição da proteína pró-apoptótica BAD (agonista da proteína de morte celular associado a BCL2) e estimulação do MYC (proto-oncogene) levando ao fenótipo proliferativo em celulares epiteliais não senescentes [109]. Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias não-farmacológicas e farmacológicas que consigam conter a indução de senescência celular e o fenótipo inflamatório, em indivíduos com idade avançada pode ser um alvo promissor para a redução do desenvolvimento e progressão dos casos de câncer de próstata na população idosa.

RITMO CIRCADIANO

O ritmo circadiano (do latim *circa diem*) é um processo biológico que controla toda a atividade fisiológica corporal durante o período de 24 horas, gerados pelo núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo [115]. O SCN é o marca-passo central do ritmo circadiano [116], o qual recebe a informação de ciclos claro/escuro durante o período de 24 horas, através dos fotorreceptores contidos na retina e enviam projeções neuronais para o SCN e para o núcleo paraventricular (PVN) induzindo a glândula pineal a produzir e secretar a melatonina durante o período da noite, e para que produza a ritmicidade do relógio central, sincronizando com o relógio moleculares autônomos nos tecidos periféricos e controlando a secreção de hormônios, atividade cardíaca, temperatura corporal, ciclo de sono-vigília, bem como diversas outras funções como reprodução, receptor de hormônio da tireoide e vitamina D [117]. O ritmo circadiano também é responsável por controlar o metabolismo celular, homeostase mitocondrial e atividade de enzimas do balaço redox [118].

A maquinaria oscilatória do relógio central é controlada pelo complexo de dois loops de feedback, composta pelos genes ativadores transcricionais CLOCK/BMAL1 (circadian locomotor output cycles kaput/brain and muscle Arnt-like protein -1, também conhecido como ARNTL) e reprimidos por genes PER (period) e CRY (cryptochrome) durante o dia [119]. Essas proteínas controlam a homeostase fisiológica através de mecanismo de feedback pela ativação dos receptores nucleares ROR α (receptor órfão alfa relacionado ao RAR) e REV-ERB α ou REV-

ERB β [120]. A REV-ERB α é responsável por regular o segundo loop do ritmo circadiano. É uma proteína nuclear, conhecida como *receptores nucleares da subfamília 1, grupo D, membro 1 e 2*, regulada pelo gene *Nr1d1*, e fazem transcrição gênica a partir da ligação a sequência do DNA do elemento de resposta ROR (RORes – retinoic acid-related orphan receptor response elements). Um conjunto de fatores de transcrição compreende os loops de retroalimentação e ligação transcricional e translacional autônomo que permitem oscilação de genes circadianos. O loop primário, ativa fatores de transcrição CLOCK/BMAL1 heterodimerizam e promovem a transcrição de genes de Período (PER1, PER2, PER3) e genes de Criptocromo (CRY1 e CRY2). As proteínas PER e CRY se translocam para o núcleo e inibem a atividade transcricional do heterodímero CLOCK/BMAL1 e, assim, reprimem sua própria expressão. Além disso, a expressão de BMAL1 é regulada pelo loop de feedback secundário, em que CLOCK e BMAL1 induzem a expressão de REV-ERB α (*Nr1d1*) e REV-ERB β (*Nr1d2*) e, em seguida, as proteínas REV-ERB α / REV-ERB β reprimem a expressão de BMAL1 (ARNTL) por ligações concorrentes de ativadores transcricionais, ROR α e ROR γ , ao elemento de resposta ROR (RRE) no promotor *Bmal1*. Portanto, acredita-se que os REV-ERBs sejam os principais reguladores da oscilação transcricional mediada por RRE. A ativação da REV-ERB α em tecidos periféricos é responsável pela homeostase do metabolismo energético, controlando genes de metabolismo lipídico e glicolítico em tecidos metabolicamente ativos como musculo estriado esquelético, tecido adiposo e fígado [121,122].

Um dos mecanismos para compreender o funcionamento normal da maquinaria circadiana é a regulação do tempo de sono-vigília [123]. O sono pode ser dividido em 4 estágios: sono não-REN 1, período de transcrição da vigília para sono leve; sono não-REN 2, período de sono leve, sono não-REN 3, período de sono profundo e sono REN (Rapid eye movement sleep), período de alta atividade neuronal, chamado de sono ativo, consolidação de memória e aprendizado. Contudo, em geral temos entre 4 e 6 ciclos durante o período de sono, dependendo da quantidade de horas dormidas, secreção de melatonina e principalmente exposição a luz durante a noite [124].

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, sobre influência da baixa exposição de luz natural [125]. Nos tecidos periféricos, a melatonina pode agir por meio do receptor de melatonina de membrana, receptores metabotrópicos MT1 e MT2 [126,127] ou atravessando a membrana plasmática e interagindo com proteínas citosólicas [128] atuando como potente antioxidante não enzimático, neutralizando os EROs. Dessa maneira a melatonina, é conhecida por desempenhar um importante papel na promoção de estado de indução do sono [129], e baixas concentrações de melatonina podem promover o desenvolvimento de distúrbios do sono, e desregulação da maquinaria molecular circadiana [130]. A principal função da melatonina é regulação do tempo e qualidade de sono, porém numerosos estudos mostram que a secreção regulada de melatonina está associada com aumento de mecanismo antioxidantes,

melhorando diversos processos fisiológicos como regulação do metabolismo energético mitocondrial, atividade neuronal durante o dia e sistema imunológico [131–134].

Durante o processo de envelhecimento o ritmo circadiano modifica resposta imunológicas elevando o risco para o desenvolvimento de doenças caracterizadas por inflamação crônica e neurodegenerativas [135]. As modulações promovidas pelo ritmo circadiano processo de envelhecimento começam a serem orquestradas pela redução da secreção do hormônio melatonina [136], tanto sobre a secreção de melatonina via pineal [137], quanto sobre a secreção via tecidos extra pineais [138]. Dessa forma, o processo de envelhecimento promove o declínio hormonal de melatonina e do eixo HHG interferindo nos processos inflamatórios [139,140], aumento do estresse oxidativo [141], declínio da massa corporal [142]. Contudo, o envelhecimento reduz a secreção de melatonina e conseqüentemente provoca desregulação no ciclo circadiano, bem como, induz alterações proliferativas na próstata de animais idosos.

E a exposição a luz branca e/ou azul, durante o período noturno e o envelhecimento estão relacionados com baixas concentrações de melatonina, partindo dessa premissa, Wendeu-Foyet et al [143,144] verificaram que homens com o ciclo de trabalho invertido e privação de sono, apresentavam redução em genes do ritmo circadiano, provocando redução na síntese e secreção de melatonina, levando ao aumento da estimulação androgênica, desbalanço proliferativo e redução da função imunológica prostática. Neste contexto, há uma correlação entre distúrbios em genes do ritmo circadiano e o aumento de fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata [145–147].

A maquinaria do ritmo circadiano funciona de forma rítmica durante as 24 horas, contudo quando há desregulação dos genes do relógio central, pode levar ao estado de patológico de diversas doenças, incluindo câncer [20]. Foi observado e relatado em células de CaP (LNCap, 22Rv1, DU145 e PC3) a redução de CLOCK e PER2 está altamente associada com a alta expressão de BMAL1, associado ainda com lesões NIP de alto grau e CaP agressivo com metástase [148]. No mesmo modo, em células PC3, o aumento da proteína GAS6 derivado de osteoblastos, promoveu aumento dos genes do ritmo circadiano PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, CRY1 e CRY2, e a estimulação dessas proteínas promoveram a ativação de p21 e p27 que favorecem a senescência das células cancerígenas [149], sugerindo que a modulação do ritmo circadiano desempenha um papel fundamental na senescência de células de CaP. As proteínas envolvidas na via circadiana, como a proteína coativador da REV-ERB α , a ROR é altamente expresso em tecidos de câncer de próstata metastático resistente à castração e está envolvido na sinalização de AR com splicing alternativo promovendo mecanismo de resistência a terapia de privação androgênica e conseqüentemente promoção do crescimento tumoral [25]. Dessa maneira, também foi postulado que os genes do ritmo circadiano, principalmente BMAL1, PER1, CRY e complexo ARNTL-NPAS2 [150], quando desregulados ou reguladas negativamente, desempenham papel crucial no desenvolvimento de câncer prostático, devido ao mecanismo de

controle do ciclo celular, apoptose e reguladores da proliferação celular [24]. Em um estudo Cao et al., (2009), transfetaram células de câncer prostáticas (PC3, DI145 e LNCaP) com um vetor de expressão para PER1, e foi verificado que a hiperativação de PER1 induziu a parada da proliferação celular em todas as linha celulares, mostrando que o aumento da expressão de PER1 inibiu a atividade de AR, atuando como um regulador negativo da ativação androgênica em células de CaP.

A expressão de PER1 e PER2 é regulada negativamente no carcinoma de cólon, mama e endometrial [151]. PER2 também é regulado para baixo em várias linhas de células de linfoma humano e em tecidos de câncer de pulmão de células não pequenas [152]. Além disso, mutações no gene CLOCK foram encontradas em linhas de células de câncer de próstata [153]. Notavelmente, a baixa expressão de PER2 está correlacionada com metástase hepática de câncer colorretal [152], ao passo que o aumento da expressão de PER2 e PER3 está associado à supressão do crescimento do tumor, aumento da diferenciação ou apoptose de tumores, menos metástases em linfonodos e maior sobrevida livre de metástases período em vários tipos de câncer [154]. A figura 1 resume os principais ativadores transcricionais circadianos, ativadores e repressores em células normais e cancerosas. Destaca-se a redução da expressão de REV-ERB é reduzida como resultado da diminuição da transcrição de *Nr1d1*.

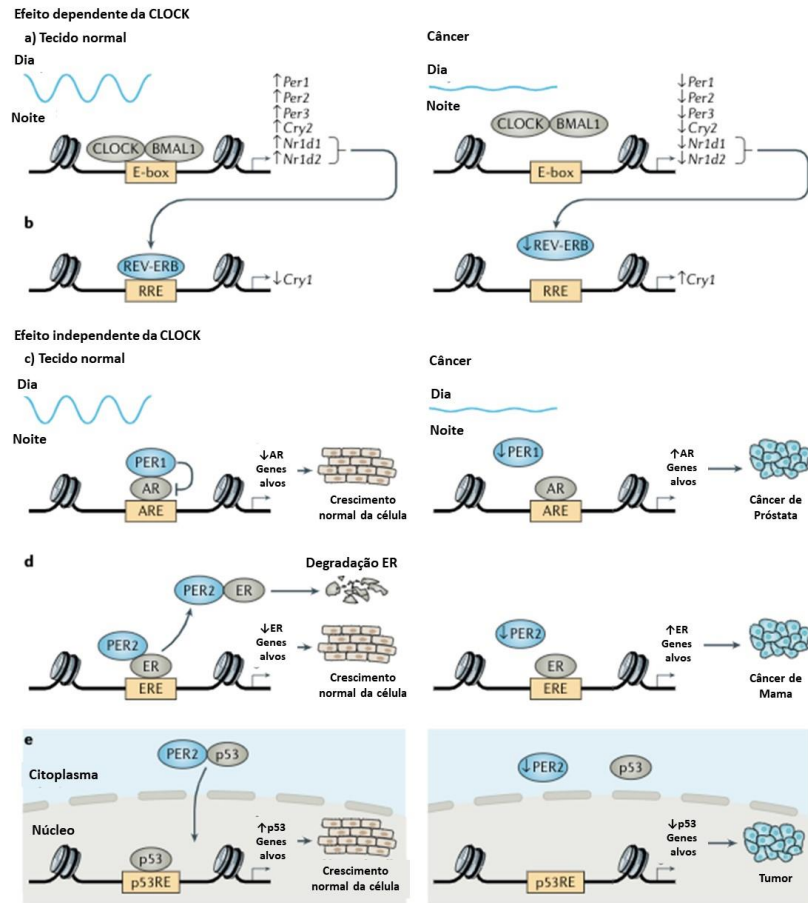


Figura 1. Relógio circadiano autônomo do tumor imagens adaptadas de (Kinouchi et al., 2020). O regulador circadiano de período 1 (PER1) se liga ao receptor de andrógeno (AR), reprimindo a transcrição mediada por AR na próstata normal, enquanto os níveis de PER1 são mais baixos no câncer de próstata, levando à ativação do AR. O PER2 interage com o receptor de estrogênio (ER), um evento que leva à degradação do ER, enquanto a redução do PER2 permite que o ER seja estabilizado e estimula a transcrição mediada pelo ER, promovendo o câncer. O PER2 se liga a p53, promovendo uma translocação de p53 do citosol para o núcleo em células normais, enquanto a redução de PER2 detém p53 no citosol, embotando a transcrição mediada por p53 e desativando as funções supressoras de tumor de p53. Ovais cinza denotam ativadores transcrpcionais. Ovais azuis são repressores transcrpcionais. ARE, elemento de resposta ao andrógeno; CRY, regulador circadiano de citocromo; ERE, elemento de resposta ao estrogênio; p53RE, elemento de resposta p53; RRE, elemento de resposta do receptor órfão relacionado ao receptor do ácido retinóico.

A REV-ERB α também controla a expressão de proteínas envolvidas na função mitocondrial como autofagia e biogênese mitocondrial e balanço redox [118]. No tecido a REV-ERB α resulta no recrutamento dos seus co-ativadores o co-repressor do receptor nuclear (NCOR) e ROR α e do PPAR α (receptor ativado por proliferador de peroxissomo α) e PGC1- α (coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma), RXR (receptor retinóico X) [156], sendo mediados pela ação da proteína AMPK e da enzima SIRT1 em razão do estímulo metabólico levando ao aumento da sua atividade [157]. A translocação desses receptores nucleares (PPAR α , PGC1- α , REV-ERB α) promove a transcrição de genes envolvidos no

metabolismo energético como como *SREPB-1* que tem ação lipogênica, e FATP1 responsável pelo transporte de ácidos graxos e o FASN responsável pela síntese lipídica, GLUT2, glicose-6-fosfatase, acetil-coa-carboxilase (ACC), carnitina palmitoil transferase (CPT1), além de promoverem a biogênese mitocondrial pela atividade da PGC1- α [158]. Ainda, a REV-ERB α regula expressões da Interleucina 6 (IL-6), e Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e controla a ativação de Toll Like Receptor 4 (TLR4) por LPS. Em camundongos deficientes em REV-ERB α não exibem mais essas oscilações, principalmente em IL-6, IL-12, CCL5 e CXCL1 e CCL2 [120].

Contudo a redução ou inibição da REV-ERB α , leva ao comprometimento da atividade mitocondrial, prejudicando a síntese de ATP e diminuição da capacidade antioxidante, provocando deficiência na capacidade oxidativa aeróbica e acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) [159]. A inibição da REV-ERB α promove déficit no transporte de elétrons da cadeia respiratória na mitocôndria, isso provocando o desencadeamento da autofagia e estresse oxidativo [160]. A autofagia está relacionada com a redução da REV-ERB α , sendo que as proteínas (Atg7, Atg3 e Atg10) que iniciam o processo de autofagia, são sensíveis a sinalização redox, por serem suscetíveis a modificações oxidativas por EROs, tendo a sua estrutura modificada [161]. Foi visto por Stujanna et al., [162] que a administração de um agonista da REV-ERB α melhorou a capacidade mitocondrial e oxidativa, bem como diminuição da inflamação no coração, regulando a homeostase inflamatória.

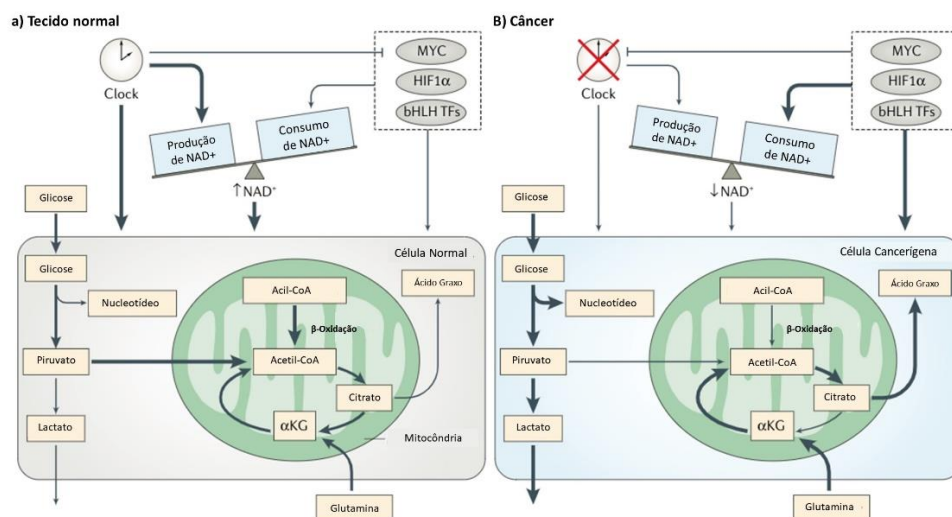


Figura 2. Regulação do metabolismo proliferativo por fatores transcricionais de genes do relógio e não relógio, adaptado de (Kinouchi et al., 2020). Em células somáticas terminalmente diferenciadas, quiescentes, uma oscilação robusta do relógio circadiano reduz a função MYC. O relógio aumenta a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) por meio da via de resgate NAD⁺. Consequentemente, o metabolismo celular favorece a glicose mitocondrial e a oxidação de lipídios, enquanto silencia o metabolismo redutor, como a biossíntese de lipídios e nucleotídeos. Em uma célula de proliferação vigorosa, fatores de transcrição não-relógio como MYC e fator 1 α indutível por hipóxia (HIF1 α), desabilitam o sistema clock, enquanto promovem o metabolismo redutor, levando ao consumo de NAD⁺. Como resultado, o metabolismo celular muda para glicólise aeróbica e oxidação da glutamina e síntese de nucleotídeos e lipídios. α KG, α -cetoglutarato; bHLH, hélice-alça-hélice básica

Modificações que alteram ou interrompe a ritimicidade do relógio biológico contribui na estimulação de vias que afetam o desenvolvimento do câncer prostático modificando a atividade metabólica da célula, progressão do ciclo celular e proliferação, aumento da atividade androgênica e status de balanço redox [163,164]. Portanto, focar nos ritmos circadianos e no relógio biológico durante o processo de envelhecimento é uma estratégia atraente e possivelmente promissora para a prevenção e terapêutica do câncer de próstata. Embora a intervenção comportamental e os compostos de pequenas moléculas direcionados ao relógio tenham sido testados usando vários modelos animais, rigorosas investigações precisam associar como a regulação do relógio biológico e como o ciclo celular é modificado durante o processo de envelhecimento.

EXERCÍCIO FÍSICO ENVELHECIMENTO E PRÓSTATA

A prática regular de exercício físico e o estilo de vida saudável desacelera o processo de envelhecimento provendo melhor qualidade de vida [165,166]. Nesta vertente o exercício físico é caracterizado por aumentar a demanda energética e manter as capacidades físicas (força, resistência, velocidade, flexibilidade, coordenação e equilíbrio) [167], provocando alterações no metabolismo celular, neuroendócrino e oxidativo [168].

Os principais fatores para a prática saudável do exercício físico é o controle das variáveis do exercício (duração, frequência, intensidade e modalidade de sobrecarga impostam), o que pode determinar a intensidade e tipo de exercício é o metabolismo empregado na realização do movimento [169]. Em uma sessão de exercício físico ocorre aumento de 15 – 20% acima do gasto calórico basal para a produção de energia e fornecimento do ATP [170]. Em exercícios físicos de longa duração (maior de 10 minutos), é utilizado o metabolismo aeróbio, entretanto, no início da atividade (1 - 4 minutos), quando ainda não há aumento do consumo de O₂, a primeira via de bioenergética a ser ativada é o sistema ATP-CP (creatina fosfoquinase), subsequente da utilização do glicogênio intramuscular (via glicólise anaeróbia) e por fim, produção de ATP via oxidação dos lipídios, metabolizados nas mitocôndrias [171]. Esse metabolismo aeróbio pode ser mantido por longos minutos em indivíduos treinados (Ex: atletas fundistas) [172]. Contudo, a energia utilizada para realizar um exercício físico de alta intensidade e curta duração (acima de 20 segundos até 6 minutos), usa-se prioritariamente as vias metabólicas anaeróbias para a produção de ATP (ATP-CP e glicogênio muscular) [173], esse mecanismo pode ser mantido por poucos períodos de contração, sendo necessário descanso para ressíntese dos estoques de energia (Ex: velocistas e praticantes de musculação) [174].

Dessa forma, o exercício físico pode ser classificado como: exercício físico aeróbio/resistência, com exercícios físicos com maior tempo de duração (maior de 30 minutos), contudo com intensidade prioritariamente moderada (Entre 4 – 6 na escala de Borg e/ou 60% - 80% da frequência cardíaca de treino e/ou pelo consumo máximo de oxigênio - VO₂ Max), sendo capaz de modular diversos parâmetros relacionados a saúde, como aptidão cardiovascular e respiratória e regulação do metabolismo energético e manutenção da massa muscular [167,175]. Por outro lado, o HITT (*High Intensity Interval Training* - Treino Intervalado de Alta Intensidade) também é classificado como treinamento aeróbio, porém é realizado com picos curtos de alta intensidade, com intervalos que podem ser passivos (parado) ou intervalos ativos em movimento, porém com intensidade reduzida, consistindo em poucos minutos de treino, entretanto com alto gasto calórico e aporte cardiovascular e respiratório [176]. Já o exercício físico anaeróbio/resistência é classificado como: realizado contra resistência (força) [177], promovendo aumento da força e potência, com exercícios físicos com menor tempo de duração, contudo com intensidade prioritariamente de moderada a vigorosa (maior de 60% da repetição máxima - 1RM a 100% do 1RM). Sendo importante para manutenção da massa muscular, bem como hipertrofia, aumento do gasto calórico basal, sensibilização da insulina e adaptações nos tipos de fibras musculares [178]. Segundo o *American College of Sports Medicine* (ACSM) para aproveitamento dos benefícios da prática de exercícios físicos é recomenda a realização de exercícios contínuos de intensidade moderada por um mínimo de 30 minutos em 5 dias na semana ou 20 minutos de exercícios vigorosos 3 dias por semana, ou uma combinação dos dois (ACSM). Com isso, a prática regular de exercícios físicos sistemáticos proporciona redução da pressão arterial sistólica e diastólica, melhoras na capacidade funcional, redução de circunferência abdominal, do peso e do percentual de gordura corporal. De fato, estas alterações nos sistemas cardiovasculares e autonômicos, proporcionadas pelo exercício físico, têm feito com que o exercício seja fortemente sugerido como uma alternativa não-farmacológica no tratamento de diferentes doenças como a resistência à insulina, o diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial e obesidade [180–182].

Nessa vertente, a prática regular do protocolo de exercício físico combinado na população idosa é capaz de promover os benefícios tanto do exercício físico aeróbio como o exercício de força, melhorando o metabolismo energético lipídico e glicolítico, sendo eficiente no controle da dislipidemia, doenças cardiovasculares, hiperglicemia, hiperinsulinêmica, resistência à insulina diminuindo o risco para o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo II, obesidade e sarcopenia [183], bem como, manutenção e hipertrofia da massa muscular [184,185], proteção da perda de densidade mineral óssea, reduzindo os riscos de queda e fragilidade, além de apresentar benefício para a saúde cardíaca e cognitiva [186,187].

Já é sabido na literatura vigente que o treinamento físico de intensidade moderada é capaz de minimizar os efeitos do processo de envelhecimento celular [188,189], promove melhorias no sistema imunológico [190], melhoria das relações sociais (saúde mental) e cognitivas [191]. A

população idosa em geral tem uma tendência a aumentar a gordura corporal e reduzir o volume de massa muscular, bem como reduzir a densidade mineral óssea, condição conhecida como obesidade sarcopênica [192], que leva a perda da força muscular, redução da mobilidade e aumento da incidência de quedas [193]. Nessa premissa, é recomendado a prática de exercício físico aeróbios de 3 - 5 vezes na semana, com duração de 45 -50 minutos, para manutenção da massa muscular, redução da % de gordura corporal, bem como melhorias na capacidade cardiometabólica e respiratória [194]. Também é recomendado pelo *American College of Sports Medicine (ACSM)*, a prática de exercício físico de força, 2 vezes na semana, com duração de 30 - 45 minutos, para manutenção da massa muscular, aumento da sensibilidade a insulina, e principalmente da densidade mineral óssea, reduzindo os riscos para a sarcopenia, fragilidade e incapacidade [195,196]. Em um estudo com idosos que sofriam com quedas frequentes, Liu-Ambrose et al., [197], mostraram que um programa de treinamento de força e equilíbrio, realizado em casa com o auxílio de um profissional qualificado, por 12 meses, reduziu significativamente as taxas de quedas e melhoria da qualidade de vida. Outro estudo semelhante, avaliou (pré e pós) desempenho físico e marcadores inflamatórios de idosos, que realizavam treinamento físico aeróbio e treinamento físico de resistido por 12 semanas, onde eles observaram redução dos marcadores inflamatórios (IL-6 e proteína C reativa), aumento do equilíbrio e redução de fragilidade, melhorando a qualidade de vida [198].

O sistema imunológico, responsável pela imunidade inata e adaptativa, sofre um declínio progressivo da função imunitária associadas a idade [199]. Esse processo é caracterizado principalmente pelos aumentos dos mediadores inflamatórios, acompanhadas por uma mudança para um estado pró-inflamatório crônico (*inflammaging*), associado a diversas doenças que acometem a população idosa, condição conhecida como imunossenescência [200]. O estilo de vida saudável associada a prática de exercício físico regular durante toda a vida tem efeitos positivos no sistema imunológico, retardando a imunossenescência [201]. Nessa vertente o exercício físico em idosos saudáveis, promove um melhor funcionamento das células natural killers (NK) e melhor migração tecidual de neutrófilos e monócitos [202]. Ainda, o exercício físico induz a diferenciação de monócito em macrófagos do tipo M2 com ação anti-inflamatório e secreção de citocinas como interleucina – 10 (IL- 10) [203–205].

O estilo de vida saudável junto com a prática de exercício físico e alimentação balanceada, são atualmente um alvo importante no controle do metabolismo energético (glicolítico e oxidativo) [206], isso devido ao poder de redução de peso e aumento o gasto energético, mesmo em indivíduos idosos. Há evidências que o exercício físico principalmente o aeróbio, pode modular o perfil lipídico, reduzindo as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL, quando comparados com indivíduos sedentários [207]. Da mesma forma, o colesterol HDL e triglicérides apresentam maior resposta ao exercício físico, com maior concentração de HDL e menor de triglicérides [208,209], prevenindo o desenvolvimento de aterosclerose [210], e o risco

de doenças cardiovasculares [211] e dislipidemias [182]. Além disto, evidências científicas demonstram que a prática de exercício físico regular age sobre o funcionamento e biogênese mitocondrial [212,213], modulando negativamente o estresse oxidativo, intensificando as vias antioxidantes através da ativação de PGC1 α , PPAR α (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa) e AMPK, diminuindo o complexo enzimático geradores de superóxidos NADPH-oxidase [213,214]. Dessa forma, a prática regular de exercício físico melhora a resposta metabólica lipídica, mesmo em indivíduos idosos, reduzindo o risco de doenças metabólicas associadas a idade.

Outro mecanismo energético extremamente importante, que sofre ação do exercício físico é o metabolismo de glicose [215]. Alterações nesse mecanismo estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II, principalmente na população idosa [216,217]. A glicose pode ser utilizada durante o exercício pela glicólise, que consiste na degradação da glicose em moléculas menores e pela glicogenólise, que consiste na quebra do glicogênio muscular em glicose. Para que ocorra a captação de glicose plasmática pelas células musculares é necessário a ação da insulina, entretanto durante a prática de exercício físico a insulina tem sua secreção inibida, com isso, a via da AMPK é estimulada para a captação de glicose, independente de insulina [218]. Ativação dos receptores de insulina (IR) pela insulina, provem a fosforilação da substratos IR1 e 2 e consequente fosforilação da via PI3K/AKT, a proteína AKT estimula a translocação dos transportadores de glicose (GLUT) para a membrana celular e consequente captação de glicose, entretanto, durante o exercício físico, o aumento da relação AMP/ATP e EROs estimulam a AMPK, que age diretamente no GLUT estimulando sua translocação para a membrana celulares e captação de glicose [219]. Estudos com homens idosos (45 – 80 anos de idade) submetidos ao treinamento físico [220], melhoraram a condição física (peso corporal, porcentagem de gordura e capacidade aeróbia), bem como aumentaram a sensibilidade a insulina pela estimulação das proteínas AKT, GSK-3 β , IRS-1 e IR.

A ação benéfica do exercício físico em tecidos prostáticos pode ser mediada via as miocinas, a regulação do metabolismo energético, resposta anti-inflamatória, e regulação dos níveis sistêmicos de fatores de crescimento e respostas hormonais, revelando a ligação entre alteração do conteúdo plasmático e supressão tumoral [221]. Em um ambiente tumoral o aumento dos fatores de crescimento e inflamação promove hiperestimulação androgênica e das vias PI3K/AKT e MAPK em tecidos prostáticos, o que está associado não só com a progressão cancerígena, como também com aumento de gordura e redução da massa muscular e da função física [222]. Dessa maneira foi descrita que a exposição aguda da IL-6 pode levar a uma melhor estimulação androgênica e consequente menor ativação das vias PI3K/AKT e MAPK levando a diminuição da proliferação celular [223]. Ainda a aplicação do soro de homens saudável em células de câncer de próstata LNCaP, após 2 horas de uma única sessão de exercício físico aumentou os marcadores de apoptose e os níveis de p53 que age como supressor tumoral,

induzindo a parada do ciclo celular [224]. Outro estudo semelhante com células de câncer de próstata LNCaP cultivadas com soro de homens saudáveis treinados, houve uma redução de 27% do crescimento celular, aumento de 371% da apoptose celular e aumento da p53, em relação a células estimuladas com soro de homens saudáveis sedentários [225]. Ainda, dados do nosso grupo de pesquisa confirmam os efeitos do treinamento físico na próstata de ratos e camundongos. Exercício físico aeróbio regulou a ativação do AR, reduziu as vias apoptóticas e inflamatórias, o que está associadas com a redução de focos de NIP em camundongos PPAR α KO [226]. Em outro estudo o exercício físico realizado de forma combinada (aeróbio e anaeróbio na mesma sessão), reduz a inflamação prostática em ratos Wistar [227]. O treinamento de força por 12 semanas, reduziu a proliferação celular e receptores hormonais, modificando a homeostase prostática [228]. Ainda, identificamos os efeitos do exercício físico de alta intensidade aumenta a apoptose e reduz os efeitos proliferativos da hipertensão arterial em ratos idosos de 12 meses [229].

Os efeitos do exercício físico sobre o ritmo circadiano descrito na literatura permeiam a melhora da qualidade do sono- vigília em idosos [230] e pode ser consequência da expressão dos genes que fazem a regulação da proteína REV-ERB alpha [231,232], resultado devido ao aumento da secreção de melatonina pela glândula pineal [233]. Uma alternativa não farmacológica para minimizar os efeitos do envelhecimento seria o exercício físico promovendo a regulação da secreção de melatonina e atividade da REV-ERB alpha amenizando os efeitos deletérios do envelhecimento sistêmicos [234]. Já é sabido que o exercício físico programado ativa os relógios circadiano moleculares com diversos tecidos periféricos como musculo, pulmão e glândula submandibular [235,236], promovendo principalmente aumento da expressão/atividade da PER2, sugerindo que o exercício físico programado aciona o relógio molecular tanto no SCN quanto nos tecidos periféricos [237]. Contudo em tecidos prostáticos de ratos idosos a suplementação de melatonina promoveu melhora da capacidade antioxidante e redução de alterações epiteliais. [238], reduzindo os danos causados pelo envelhecimento.

O exercício físico é capaz de estimular a expressão da REV-ERB alpha com apenas uma sessão [239]. Estímulo físico aumenta a razão AMP/ATP induz a liberação da proteína AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e pela enzima SIRT1 (sirtuina 1), leva a ativação dos receptores nucleares REV-ERB α [240]. A ativação de AMPK estimula a atividade da PGC-1 α (coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma) via translocação dos PPARs e da REV-ERB α para o núcleo celular. Já sabemos que o exercício físico aeróbio executado por 4 semanas, estimula as vias biogênicas da PGC-1- α e SIRT1 em camundongos idosos [241]. Em estudos com camundongos idosos de 24 meses, Cordeiro et al., [242] verificaram que 4 semanas de treinamento físico em esteira de intensidade moderada aumenta a conteúdo da SIRT1, bem como o aumento da biogênese mitocondrial no musculo. Ainda, Lenhare et al., [243] verificou animais idosos de 24 meses submetidos há 1 única sessão de treinamento físico em natação, e verificou aumento na resposta autofágica muscular e a melhoram na

sensibilidade insulínica estimulando a AMPK. Esses achados fornecem resposta sobre quais mecanismo o exercício físico agudo contribui para a função muscular e hepática no envelhecimento [243]. Assim, o exercício físico restaura a sincronicidade das proteínas envolvidas no ritmo circadiano, que tem ação de regular o balanço redox, biogênese mitocondrial e possivelmente metabolismo celular mesmo durante a senescência [118,244].

A desregulação do relógio circadiano induzidas pelo envelhecimento pode levar a mudanças no metabolismo celular e alterações deletérias no metabolismo energético [245]. Como já foi descrito, atividade de CLOCK/BMAL1 e REV-ERB α controlam as proteínas envolvidas nos mecanismos de respiração mitocondrial, e função mitocondrial mediados pela AMPK/SIRT1 PPAR α /PGC1 α . O exercício físico além de restaurar a sincronidades das proteínas CLOCK/BMAL1 e REV-ERB α durante o envelhecimento, também modula positivamente a respiração mitocondrial, e função mitocondrial mediados pela AMPK/SIRT1 PPAR α /PGC1 α , tendo dessa forma, poderá ter ação preventiva nas lesões prostática decorrente do envelhecimento.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O envelhecimento associado ao estilo de vida sedentário são os principais agentes responsáveis por provocar alterações em diversos sistemas no organismo, dentre eles no microambiente prostático. Ao contrário da maioria das demais malignidades, que têm idade de pico de incidência, em casos de câncer prostático (CaP) a incidência continua a aumentar com o avanço da idade. O risco para toda a vida de um homem com 50 anos de idade para CP latente (detectado como achado casual durante a autópsia, e não relacionado à causa da morte) é de 40%; para CP clinicamente aparente, 9,5%; e para morte por CP, 2,9%. Assim, muitos cânceres de próstata são indolentes e sem maiores consequências para o paciente, enquanto outros são agressivos e, caso sejam detectados com demasiado atraso, ou não sejam tratados, resultarão na morte do paciente.

A atividade da proteína REV-ERB- α e expressão genica de *Nr1d1* pode ser alterada na senescência, influenciando no aumento na inflamação, produção das espécies reativas de oxigênios, déficit no metabolismo energético e hormonal e redução da atividade mitocondrial. Atualmente, as terapias para câncer de próstata apresentam baixo grau de eficácia no tratamento para câncer recorrentes e aqueles não responsivos ao quimioterápico. Com isso, os estudos sobre os mecanismos moleculares das doenças que acometem esta glândula tornam-se essenciais para entender a complexidade das interações que podem desencadear ou prevenir essas doenças e os fatores que modulam a glândula prostática têm tomado grandes proporções e atenção na comunidade científica. Desta forma, o entendimento da expressão da REV-ERB α durante a senilidade e seus efeitos no desenvolvimento de neoplasias prostáticas é de grande relevância.

Pesquisas em nosso laboratório evidenciam que prática de exercício físico é capaz de reduzir a secreção de citocinas inflamatórias e oxidantes de maneira sistemicamente e local, além de potencializar a produção de fatores anti-inflamatórios e antioxidantes. Ainda, o exercício físico pode impulsionar o balanço no metabolismo energético e hormonal, visando uma melhora da qualidade de vida em animais idosos e prevenção para o desenvolvimento de diversas outras patológicas. Porém, não sabemos como o efeito agudo do exercício físico no envelhecimento pode modificar os efeitos relacionados ao ritmo circadiano e proteínas relacionadas a ele. Para melhor entendimento desta vertente avaliamos a ação da proteína REV-ERB α e do gene *Nr1d1* como possíveis modeladores chaves do perfil hormonal e metabólico, ciclo celular e resposta inflamatória das células prostáticas, enfatizando o papel central do exercício físico nas alterações fisiológicas do envelhecimento.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Portanto, nosso objetivo foi caracterizar o perfil metabólico e histopatológico prostático durante o processo de envelhecimento em camundongos jovens (6 meses) e camundongos idosos (18 meses e 24 meses de idade). Em sequência, caracterizar a expressão gênica de *Nr1d1* e proteica da REV-ERB α e sua relação com as vias AMPK/SIRT1/PGC1 α , PI3K/AKT, p53/p21, PTEN e caspase 3 no microambiente prostático durante o envelhecimento, e verificar o efeito do exercício físico combinado em camundongos idosos.

Objetivos específicos

Capítulo 1

- Verificar o perfil glicêmico e desempenho motor (velocidade de corrida) de camundongos durante o processo do envelhecimento (6, 18 e 24 meses).
- Caracterizar a morfologia e Histopatologia da próstata de camundongos durante o processo do envelhecimento (6, 18 e 24 meses) em camundongos jovens e idosos

Capítulo 2

- Verificar o perfil glicêmico, desempenho motor (velocidade de corrida e força) entre camundongos jovens, idosos sedentário e idosos submetidos ao exercício físico combinado
- Avaliar o perfil redox (dano lipídico, capacidade oxidativa total, superóxido dismutase e capacidade antioxidante total) no soro de camundongos jovens, idosos sedentário e idosos submetidos ao exercício físico combinado
- Caracterizar a expressão de genes do ciclo circadiano (*Nr1d1* e *Bmal*) e expressão proteica da REV-ERB α , durante o envelhecimento e em resposta ao exercício físico na próstata.
- Verificar o efeito do treinamento físico na expressão prostática das proteínas relacionadas ao metabolismo energético AMPK, pAMPK/Thr172, SIRT1, PGC1- α entre camundongos jovens, idosos sedentário e idosos submetidos ao exercício físico combinado
- Verificar o efeito do treinamento físico na expressão prostática das proteínas relacionadas as proteínas p53, PTEN e Caspase 3, p21, entre camundongos jovens, idosos sedentário e idosos submetidos ao exercício físico combinado
- Verificar o efeito do treinamento físico na expressão prostática das proteínas relacionadas ao controle do metabolismo celular prostático AR, PI3K e AKT entre camundongos jovens, idosos sedentário e idosos submetidos ao exercício físico combinado.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

ENVELHECIMENTO E O DESENVOLVIMENTO PROGRESSIVO DE CÂNCER PRÓSTATIVO

Nesse capítulo 1, apresenta-se um estudo sobre a influência do processo do envelhecimento no perfil glicêmico, desempenho motor (velocidade de corrida) e morfologia prostática, bem como todo a saúde do microambiente prostático.

RESUMO

As doenças prostáticas acometem principalmente homens idosos, afetando negativamente na qualidade de vida. Entretanto, como se dá o processo de desenvolvimento de lesões prostática durante o ainda não estão estabelecidas. Com isso, o objetivo desse estudo foi analisar os efeitos metabólicos e alterações teciduais pré-neoplásicas em camundongos durante o envelhecimento. Foi utilizado 30 camundongos C57BL/6J, divididos em grupos com 3 idades diferentes: 6 meses de idade (n=10), 18 meses de idade, (n=10) e 24 meses de idade, (n=10). Aos 6, 18 e 24 meses de idade os animais foram submetidos à eutanásia, a bexiga urinaria, gordura epididimal e a próstata ventral foi coletada, pesada e processada para análises histológicas de Hematoxilina & Eosina, Picrosirius Red e Ácido Periódico de Schiff. As imagens de Hematoxilina & Eosina foi usada para a análise de histopatologias das seguintes incidências: neoplasia intraepitelial prostática (NIP I, NIP II, NIP III e NIP IV), metaplasia nuclear e foco inflamatório. Não houve diferença entre as idades no peso da próstata ventral, dorsolateral, e bexiga urinaria e glicogênio intracelular, entretanto, animais idosos de 24 meses reduziram o peso da gordura epididimal e colágeno, bem como obtiveram maior queda da curva da glicose e redução na velocidade máxima. Os animais idosos de 18 meses e 24 meses apresentaram maiores incidências para as lesões NIP de grau III e IV, com grande presença de infiltrado inflamatório e metaplasia nuclear. Concluímos que o envelhecimento reduz o desempenho motor e mesmo sem alterações no peso prostático, induz o desenvolvimento de lesões graves NIP IV associadas a metaplasia nuclear e infiltrado inflamatório, podendo evoluir para um adenocarcinoma.

Palavras chaves: senescência, testosterona, câncer de próstata, epigenética, morfologia.

INTRODUÇÃO

A hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) são etiológicamente e molecularmente distintos, porém, ambos têm alta prevalência em idosos [246]. A HPB acomete

cerca de 90% dos homens acima dos 80 anos de idade e está associada com redução da qualidade de vida e fragilidade [247], e o CaP, que é o 6º tipo de câncer maligno com maior taxa de mortalidade no mundo, está previsto cerca de 288.300 mil novos casos para o ano de 2023, acometendo prioritariamente homens acima de 60 anos [2].

A princípio o processo do envelhecimento influencia o microambiente prostático pela ação dos hormônios sexuais androgênicos, principalmente a testosterona e os estrogênios. A próstata é um órgão sensível a andrógenos do seu desenvolvimento fetal até o envelhecimento [248]. Durante o envelhecimento ocorre um declínio na produção da testosterona a partir dos 45 anos de idade, com uma redução de cerca de 1 % a 2% por ano [249]. Essa perda está relacionada com o aumento da sensibilidade ao estrogênio, o que também está relacionado com o aparecimento das doenças metabólicas em homens idosos [75]. A testosterona age na próstata a partir da conversão em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α -redutase. O DHT se liga ao receptor de andrógeno (AR) promovendo sua translocação para o núcleo, interação com a maquinaria transcricional básica e a transcrição de genes alvos relacionados a diferenciação e progressão do ciclo celular [250]. Park et al., [251], mostram que a indução de HPB em ratos jovens saudáveis mediada pela testosterona, levou a hiper estimulação de AR, aumento da sinalização inflamatória, além de supressão das proteínas de controle apoptótico, promovendo aumento do volume prostático. Contudo, a ação da testosterona/DHT no microambiente prostático, induz o crescimento natural, entretanto, a redução da testosterona no envelhecimento está relacionada com o desenvolvimento da HPB, aumento da ativação de fatores de crescimento e estrogênio, o mecanismo responsável por essa diminuição ainda é desconhecido [252].

Contudo, a testosterona possui efeitos anti-inflamatório e antioxidantes, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, dessa forma, a deficiência de testosterona está associada ao aumento da inflamação tecidual em homens idosos [249]. Sugere que existe uma intrínseca relação entre que a presença de um estado inflamatório associado ao fenótipo senescente a sinalização endócrina da testosterona, o que parece aumentar o feedback negativo da testosterona no eixo hipotálamo/hipófise/gônada, aumentando o declínio da testosterona em idosos [253].

A disfunção metabólica associada ao envelhecimento também pode ser um indutor de crescimento prostático [75,254]. A insuliménia, hipercolesterolemia e o aumento dos fatores de crescimento associados a disfunção metabólica [255], estão relacionadas com a estimulação de vias que promovem a sobrevivência celular e proliferação fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT) e a translocação de AR para o núcleo [248,256]. Estudos mostram que a ativação de AR por vias metabólicas, também favorece a estimulação de receptores Toll Like, e translocação do NF- κ B para o núcleo, favorecendo um ambiente inflamatório prostático [251].

Um dos pilares dos distúrbios do envelhecimento e das doenças prostáticas, principalmente do CaP, é a inflamação e o estresse oxidativo. Segundo de Marzo et al., [257], a inflamação e a geração de EROS, induzem as mutações epigenéticas e alterações epiteliais

provocando transformação do tecido saudável para tecido neoplásico. Para que ocorra a mutação epigenética e alterações teciduais, alguns genes são modificados e estimulados, os chamados de oncogenes, eles dão o “*start*” inicial para a proliferação exacerbada produzindo outra célula igual com alto potencial de propagação tumoral [258]. Inicialmente, em seu estudo Goldstein et al. [259], estimularam células basais do epitélio prostático com lentivírus dos genes condutores ERG (gene relacionado ao ETS) e AKT (proteína quinase B), e viram que as células foram capazes de desenvolver lesões de neoplasia intraepitelial prostática (NIP), e posteriormente, com a estimulação de AR nessas células, causou a transformação das lesões NIP para adenocarcinomas. Apoiando a premissa que o caráter histopatológico pode prever o estado de malignidade evolutiva do câncer [260].

O envelhecimento associado ao estilo de vida sedentário, uma dieta inadequada e ao fator genético são os principais agentes responsáveis por provocar alterações no microambiente prostático. Entretanto em qual momento que se inicia essas alterações epigenéticas e teciduais associadas ao envelhecimento ainda não são estabelecidas. Estudos sobre os mecanismos moleculares e histopatológicos das doenças prostáticas, tornam-se essenciais para entender a complexidade das interações que podem desencadear ou prevenir essas doenças. Com isso, o objetivo desse estudo é caracterizar os tipos de alterações teciduais pré-neoplásicas ou não em camundongos jovens de 6 meses de idade e idosos de 18 meses de idade e 24 meses de idade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - EEFERP/USP, com processo nº 2021.1.43.90.0.

Foram utilizados 30 camundongos machos C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) mantidos em ciclo claro/escuro de 12h ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com dieta padrão (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Os animais foram divididos randomicamente em 3 grupos de diferentes idades: animais de 6 meses de idade (n=10); animais de 18 meses de idade (n=10), animais de 24 meses de idade (n=10). Os camundongos foram pesados, e realizado laparotomia abdomino-pélvica, a bexiga urinária, gordura epididimal foram retirados e pesados, e a próstata exposta, retirada, pesada e processada para análises futuras.

Teste de tolerância à insulina (ITT)

Todos os grupos foram submetidos ao teste de tolerância a insulina para avaliar a curva glicêmica. O teste foi realizado 24 horas antes da eutanásia. A glicemia capilar caudal foi monitorada por meio do glicosímetro Accu-Chek Active® (ROCHE®, São Paulo, SP, Brazil),

sendo mensurada na condição basal e a cada 5 min após injeção intraperitoneal de insulina (1 UI/kg de peso corpóreo) até 30 min. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (kITT) foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 5 e 30 minutos após a injeção de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia. A interpretação da kITT se baseia enquanto mais rápida e intensa for a queda da glicemia, maior o valor do kITT, portanto, maior é a resposta a insulina.

Teste de tolerância a glicose (GTT)

Todos os grupos foram submetidos ao teste de tolerância a glicose para avaliar a curva glicêmica. A glicemia capilar caudal foi monitorada com glicosímetro Accu-Chek Active® (ROCHE®, São Paulo, SP, Brasil), sendo medida no início e a cada 5 minutos após a injeção intraperitoneal de glicose (4 UI/kg de peso corporal) até 120min. A constante de desaparecimento da glicose plasmática (GTT) foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 0 e 120 minutos após a injeção de glicose, intervalo em que ocorre a fase linear de queda da glicemia. A interpretação do GTT baseia-se no fato de que quanto mais rápida e intensa a queda da glicemia, maior o valor do GTT, portanto, maior a resposta à insulina [261].

Teste de Carga Incremental (TCI)

Todos os animais foram submetidos ao teste de carga incremental para avaliar a velocidade máxima. Os animais foram adaptados a esteira rolante por 5 dias, 10min/dia na velocidade de 6m/min. antes de iniciar o protocolo [262]. O teste de carga incremental tem velocidade inicial de 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3 m/min de velocidade a cada 3 min até a exaustão voluntária dos camundongos, que consiste em tocar cinco vezes a extremidade da esteira na esteira intervalo de um minuto.

Extração de próstata

Após uma semana de testes, os roedores tiveram um descanso de quatro dias antes de serem submetidos aos procedimentos de pesagem. A pesagem foi realizada em balança analítica (Toledo, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). Posteriormente, às 12h, os camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (100 mg/kg de peso corporal). A perda dos reflexos podais confirmou a eficácia da anestesia. Em seguida, a próstata foi extraída e preparada para análises histológicas.

Análises histológica e histopatológica

A próstata foi embebida em paraplástico e cortes histológicos com 5 µm foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histopatológica. E analisada quanto à incidência

das seguintes lesões: foco inflamatório, neoplasia intraepitelial prostática (NIP) foi classificada de acordo com Park et al., [92], em subtipos NIP I, NIP II, NIP III e NIP IV, bem como, foi identificado também foco inflamatório e metaplasia nuclear de acordo com Shappel et al., [263]. Foi realizado a coloração do PAS (ácido periódico de Schiff) para a quantificação do glicogênio intracelular e a coloração de Picrosirius Red para a quantificação do colágeno [264]. Todos os cortes foram fotografados em fotomicroscópio Zeiss Axiophoto do Laboratório Experimental de Biologia do Exercício – LEBioEx, localizado no Departamento de Educação Física FCT/UNESP. Para a quantificação da porcentagem da intensidade de coloração do glicogênio intracelular e do colágeno, foi avaliado em 60 campos por grupo usando o software ImageJ e o plug-in IHC Toolbox (versão 1.50i).

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média±desvio padrão da média, considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise de variância de médias (One-Way ANOVA) foi utilizada para comparar os três grupos analisados, seguida da comparação post hoc de Bonferroni. Para as ocorrências histopatológicas foi utilizada a análise de variância (Kruskal-Wallis test) seguido do teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas e gráficos foram realizados no software GraphPad Prism, versão 9.3.

RESULTADOS

Envelhecimento reduz captação da glicose, velocidade de corrida e gordura epididimal, mas não altera peso da próstata e bexiga urinaria

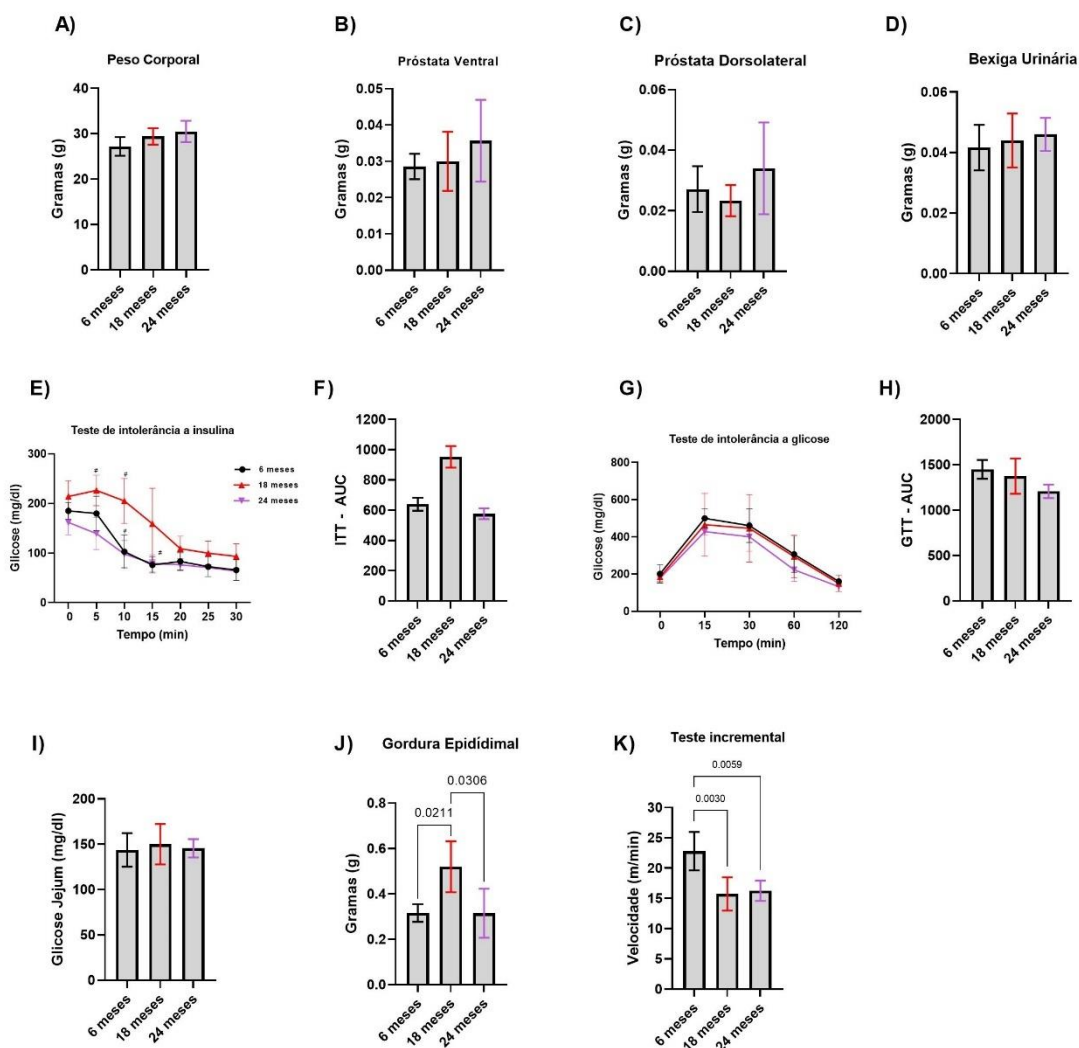
Não houve diferença significativa no peso corporal final dos animais (Figura 3 A). Para o entendimento do envelhecimento na próstata verificamos o peso absoluto da próstata ventral e dorsolateral. Foi possível observar que os grupos idosos (18 meses e 24 meses) apresentaram menor peso da próstata ventral em relação aos animais jovens (6 meses), sem diferença significativa (Figura 3 B). A próstata dorsolateral não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 3 C). O peso absoluto da bexiga urinaria, não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 3 D).

A gordura epididimal é um dos fatores que aumentam com o envelhecimento, com ou sem aumento do peso corporal [265]. Observamos que os animais de 18 meses apresentaram um aumento significativo da gordura epididimal em relação aos animais do grupo 6 meses (95% CI -0,3831 a -0,02486, $p = 0,0211$), entretanto, os animais 24 meses apresentou uma redução significativa da gordura epididimal em relação aos animais de 18 meses (95% CI 0,01499 a 0,3950, $p = 0,0306$, Figura 3 J).

Para verificar a queda glicêmica (captação de glicose) no decorrer do processo do envelhecimento realizamos os testes de tolerância a insulina (ITT) e o teste de tolerância a glicose (GTT). No ITT, podemos observar que todos os grupos apresentaram queda da curva da glicose. Os animais do grupo 24 meses apresentou queda dos níveis de glicose, com diferença significativa em relação ao grupo 18 meses, no tempo 5 (95% CI -168,2 a -5,824, $p=0,0189$) e no tempo 10 (95% CI -188,2 a -25,82, $p=0,0006$). Já o grupo 18 meses também apresentaram um aumento da curva glicêmica em relação ao grupo 6 meses no tempo 10 (95% CI 21,22 a 183,6, $p=0,0013$) e no tempo 15 (95% CI 1,624 a 164,0, $p=0,0382$, Figura 3 E – F). Para o teste de GTT observamos um padrão de curva e os grupos não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 3 G – H). A glicemia basal em jejum não apresentou diferença significativa (Figura 3 I).

O envelhecimento promove perda de função em diversos fatores, como desempenho motor e alterações no metabolismo energético [266]. Fatores que aumentam a capacidade física são importantes para promover o envelhecimento saudável e retardar doenças relacionadas à senilidade. Para isso realizamos o teste de velocidade máxima para avaliar o desempenho motor durante o envelhecimento. O teste incremental de velocidade máxima mostrou que o grupo 6 meses apresentou maior velocidade de corrida em relação ao grupo 18 meses (95% CI 2,173 a 11,99, $p=0,0030$) e em relação ao grupo 24 meses (95% CI 1,653 a 11,47, $p=0,0059$, Figura 3 K).

Figura 3



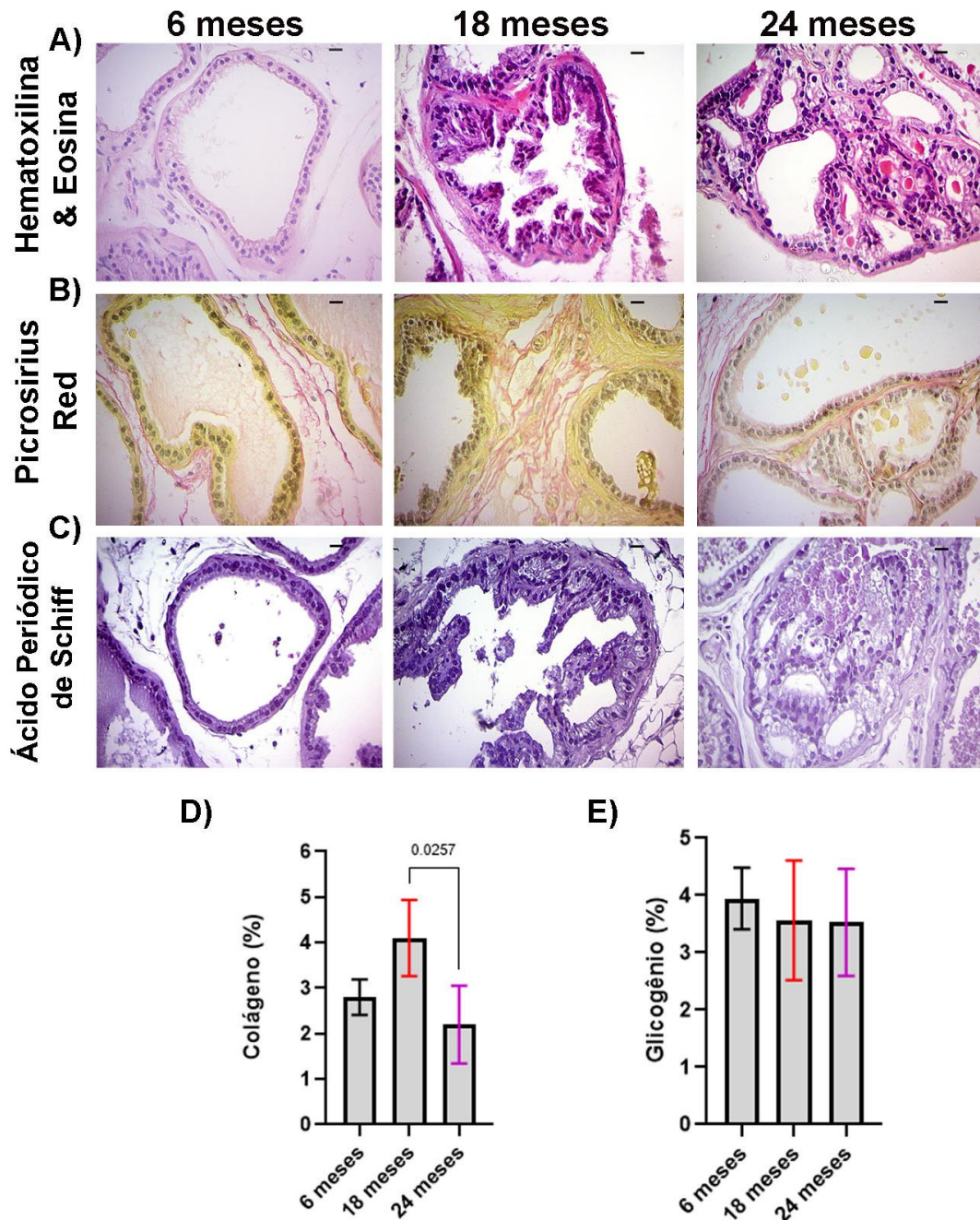
Legenda: Gráficos representativos das análises antropométricas e metabólicas. Gráfico representativo de peso corporal total (A); Gráfico representativo de peso absoluto da próstata ventral (B); Gráfico representativo de peso absoluto da próstata dorsolateral (C); Gráfico representativo de peso absoluto da bexiga urinária (D); Gráfico relativo da curva de glicemia obtida no teste de tolerância a insulina (E); Gráfico referente ao valores de área sob a curva do teste de intolerância a insulina (F); Gráfico relativo da curva de glicemia obtida no teste de tolerância a glicose (G); Gráfico referente ao valores de área sob a curva do teste de intolerância a glicose (H); Gráfico referente aos valores de glicemia em jejum (I); Gráfico representativo de peso absoluto da gordura epididimal (J); Gráfico referente ao teste incremental de velocidade máxima de corrida (K). Os dados correspondem à média $\pm$ DP de $n = 5$ camundongos/grupo.

Envelhecimento não modifica glicogênio intracelular prostático, mas aumenta a deposição de colágeno

Para avaliar o perfil morfológico da próstata ventral durante o envelhecimento verificamos a expressão de glicogênio intracelular e expressão de colágeno (Figura 4). Não houve diferença entre os grupos para a expressão de glicogênio intracelular prostático (Figura 4 C – E). Já em relação ao colágeno, o grupo 18 meses apresentou maior deposição de colágeno em relação ao grupo 6 meses, sem diferença significativa (Figura 4 B – D). Já os animais do grupo 24 meses

apresentaram uma diminuição significativa da expressão de colágeno em relação aos animais 18 meses (95% CI 0,1950 a 3,610, $p=0,0257$, Figura 4 B – D).

Figura 4



Legenda: Imagens representativas das análises morfológicas na próstata ventral de camundongos idosos. (A) Imagens representativas da técnica de Hematoxilina & Eosina; (B) Imagens representativas da técnica de picrosirius red para a coloração de colágeno; (C) Imagens representativas da técnica de ácido periódico de Schiff para a coloração de glicogênio intracelular; (D) Gráfico representativo de colágeno prostático; (E) Gráfico representativo de glicogênio intracelular prostático. Os dados correspondem à média $\pm$ DP de $n=5$ camundongos/grupo.

Envelhecimento aumenta o número de ocorrência e porcentagem de alterações neoplásicas na próstata de camundongos idosos

A caracterização das alterações neoplásicas prostáticas no processo do envelhecimento foi realizada de maneira quantitativa (Figura 4 e Tabela 1). Observamos que os animais jovens de 6 meses de idade, apresentam maior porcentagem de NIP I (28.87%), em relação aos animais idosos de 18 meses (11.86%) e 24 meses (3.13%). Com focos de NIP I relativamente pequenos, com duas camadas de células. Nas lesões NIP II, com focos maiores, com duas ou mais camadas de células atípicas, os animais jovens de 6 meses apresentam menor porcentagem de NIP II (10.87%) sem metaplasia nuclear, entretanto animais 18 meses apresentam altas porcentagens de NIP II (42.46%), com a presença de metaplasia nuclear (5.33%), em relação aos demais grupos (Tabela 1). Os animais 24 meses apresentou grande quantidade de metaplasia nuclear (40.84%) em relação aos demais grupos (Figura 4 e Tabela 1).

Os animais idosos 18 meses apresentam maior porcentagem de NIP III (20.48%) em relação aos animais idosos de 24 meses (17.77%) e aos animais jovens 6 meses (10.65%, Tabela 1). Os animais jovens 6 meses não apresentam focos de NIP IV, enquanto os animais 18 meses apresentam (3.10%), em conjunto com os focos de metaplasia nuclear (5.33%) e foco inflamatório (1.67%, Tabela 1). Animais de 24 meses houve aumento da porcentagem de focos de NIP IV (27.45%), metaplasia nuclear (40.84%) e foco inflamatório (10.82%) (Figura 4 e Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de distúrbios histopatológicos da próstata em camundongos idosos

	6 meses +	18 meses *	24 meses #
NIP I	20.00 (72) – 25.87%	8.00 (65) – 11.86%	1.00 (45) – 3.13% +
NIP II	7.00 (72) – 10.87%	28.00 (65) – 42.46%+	0.00 (45) – 0.00% +*
NIP III	7.00 (72) – 10.65%	13.00 (65) – 20.48%	7.00 (45) – 17.77%
NIP IV	0.00 (72) – 0%	2.00 (65) – 3.10%	13.00 (45) – 27.45%
Metaplasia Nuclear	0.00 (72) – 0%	3.00 (65) – 5.33%	19.00 (45) – 40.84% +*
Foco Inflamatório	0.00 (72) – 0%	1.00 (65) – 1.67%	5.00 (45) – 10.82%

Legenda: Os dados foram expressos em números absolutos e percentuais de ocorrência. Teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann Whitney por tabela de contingência. Neoplasia intraepitelial prostática (NIP-subdividida em 4 subtipos de NIP). + $p \geq 0,0159$; * $p \leq 0,0079$. Número de ocorrências e número de fotos entre parênteses e porcentagem.

DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos os efeitos metabólicos e as alterações teciduais pré-neoplásicas em diversos períodos do processo do envelhecimento na próstata ventral de camundongos. Os principais achados foram: A) Animais jovens de 6 meses de idade apresentam maiores

porcentagem de lesões NIP I, porém sem a presença de metaplasia nuclear e foco inflamatório; B) Camundongos de 18 meses apresentam aumento gravidade das lesões NIP (NIP II e NIP III) com baixa presença de metaplasia nuclear e foco inflamatório; C) Animais idosos de 24 meses apresentam grandes focos de lesões NIP III e NIP IV com maiores porcentagens de metaplasia nuclear e muitos focos inflamatórios.

Os modelos atuais de carcinogênese defendem a existência de um estado pré-maligno com a presença e extensão das lesões mais graves de NIP em idades mais avançadas [267]. A identificação de NIP IV com metaplasia nuclear está presente 5% das biopsias de carcinoma invasivo da próstata, e parece ser uma lesão neoplásica precursora de adenocarcinoma prostático [268]. Diversos genes estão implicados no início das lesões NIP, em 65% dos casos, os mais modificados são a redução dos supressores tumorais PTEN, NKX3.1, p53, ERG e aumento de AR [269]. A perda desses supressores tumorais promove aumento da atividade da PI3K/AKT, diferenciação celular, aumentando a proliferação celular, reduzindo apoptose e aumentando a atividade androgênica na próstata [270]. As taxas altas proliferativas epiteliais promovem a transformação de tecido saudável em epitélio NIP, com aumento mutação das células luminais, levando a diferenciação carcinogênica [91]. Em biopsias da próstata de homens idosos, a marcação positiva de β -galactosidase está associada com maiores porcentagens de focos de NIP de alto grau, assim, podemos inferir que a indução da senescência em lesões pré-neoplásicas ocorre como resultado da perda de um gene supressor de tumor ou da ativação de um oncogene [271]. Em nossos animais, as lesões de NIP baixo grau (NIP I e NIP II) em camundongos jovens não necessariamente ocorreram no contexto de lesões pré-neoplásica, entretanto em animais mais idosos, pode se dizer que os focos já evoluíram para lesões NIP mais graves (NIP III e NIP IV), estando relacionado com o desenvolvimento de câncer prostático.

O dano aos tecidos devido a inflamação crônica também é um fator que leva ao aumento das lesões NIP de graus elevados [272]. Podemos observar nesses animais o aumento da quantidade de focos inflamatórios com a idade [273]. O fenótipo secretor associado a senescência (SASP) secretado por células senescentes promove dano ao DNA, aumento de citocinas inflamatórias e seus receptores e perda da função de p53, contudo células senescentes são resistentes a proliferação, mas a sua secreção SASP pode influenciar de forma parácrina outras células não senescentes ao desenvolvimento de alterações pré-neoplásicas e carcinogênese tardia [274]. Com isso, nossos achados mostram que o envelhecimento além de modificar a resposta insulínica, aumentando a captação e oxidação de glicose, para o suprimento bioenergético rápido, utilizado para crescimento tumoral (NIP IV) [275], bem como, aumento do infiltrado de células inflamatórias em tecidos estromal e epitelial, provocando modificações no metabolismo mitocondrial, promovendo dano genômico e um microambiente propício a lesões e a carcinogênese.

Entender os mecanismos moleculares que leva a transição do epitélio saudável para epitélio neoplásico com alterações teciduais e possível progressão tumoral. Caracterizar as vias que podem estar envolvidas na superexpressão de vias proliferativas, e repressão das vias apoptóticas, bem como ação dos oncogenes, e a modulação negativa dos supressores tumorais, pode alavancar o entendimento dos possíveis mecanismos alvos terapêuticos na prevenção e tratamento do CaP. Além de, ampliar os conhecimentos sobre possíveis métodos mais eficientes de diagnósticos precoces para o câncer de próstata. Dessa forma, o principal fator limitante do nosso estudo foi a ausência de marcadores moleculares dos mecanismos que possivelmente podem estar envolvidos nas lesões de NIP IV principalmente nos animais idosos de 24 meses. Como também, análises para marcadores tumorais para classificar os possíveis focos de câncer de próstata nas lesões NIP IV.

Dessa maneira, é possível concluir que camundongos idosos apresentavam mudanças no metabolismo energético celular e lesões NIP IV associadas a metaplasia nuclear e infiltrado inflamatório, que podem contribuir para a evolução da alteração tecidual pré-neoplásica para um adenocarcinoma, podendo ainda estar associada a modificações moleculares de vias de sinalização intracelulares como REV-ERB α prostático.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

O EXERCÍCIO FÍSICO COMBINADO RESTAURA A EXPRESSÃO DE *Bmal1* E REV-ERB α E REGULA POSITIVAMENTE A APOPTOSE E O METABOLISMO NA PRÓSTATA DURANTE O ENVELHECIMENTO

Nesse capítulo 2, apresenta-se um estudo sobre a influência do exercício físico combinado (aeróbico e força) na expressão dos genes do ritmo circadiano (*Nr1d1* e *Bmal1*) e proteína REV-ERB α (codificada pelo *Nr1d1*), supressores tumorais, marcadores de metabolismo energético, apoptose e metabolismo celular prostático no microambiente prostático de camundongos de 6 meses e 18 meses. Os dados foram submetidos na revista *GeroScience* (Tavares MEA, Pinto AP, da Rocha AL, Sampaio LV, Correia RR, Veras ASC, Batista VRG, Chaves-Neto AH, da Silva ASR, Teixeira GR. Combined physical exercise restores expression of *Bmal1* and REV-ERB α and up-regulates apoptotic and metabolism in the prostate during aging).

RESUMO

O envelhecimento aumenta a prevalência do câncer de próstata. O relógio circadiano coordena o metabolismo, o ciclo celular e o supressor tumoral do p53. Embora o exercício físico tenha diversos efeitos na prevenção de doenças prostáticas, seu efeito na regulação do ritmo circadiano das células prostáticas precisa ser mais bem avaliado. O presente estudo verificou a expressão proteica e gênica do REV-ERB α (*Nr1d1*), apoptose, supressores tumorais, marcadores do metabolismo energético e receptores androgênicos no microambiente prostático em camundongos de 18 meses de idade submetidos a treinamento físico combinado. Trinta camundongos C57BL/6J foram divididos em 2 grupos: 6 meses (n= 10) e 18 meses (n= 20). Os animais com 18 meses de idade foram divididos em 2 subgrupos: sedentários (n=10, 18m Sed) e submetidos ao treinamento físico combinado (n=10, 18m TR). O protocolo de treinamento físico combinado foi realizado com corrida em esteira (40–60% do teste de carga incremental) e treinamento de força em escalada (40–50% de 1 RM), consistindo em 5x/semana (3 dias aeróbicos e 2 dias de força). Por 3 semanas. A próstata foi preparada para análise de Western blotting e RT-qPCR, e o plasma foi preparado para análise bioquímica. O exercício físico combinado durante o envelhecimento levou ao aumento dos níveis de *Bmal1* e diminuição dos níveis de REV-ERB α na próstata. Esses resultados foram acompanhados por uma redução nas proteínas AMPK/SIRT1/PGC-1 α e um aumento nas vias PI3K/AKT e p53/PTEN/caspase 3, promovendo potencial apoptótico. Esses achados sugerem que o exercício físico de força e aeróbico pode ser

preventivo no desenvolvimento de alterações moleculares pré-neoplásicas e características relacionadas à idade, restaurando *Bmal1* e REV-ERB α nos tecidos prostáticos.

Palavras-chave: Senescência, Nr1d1, AMPK/SIRT1, PI3K/AKT, PTEN.

INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento proporciona um ambiente propício à carcinogênese prostática. Alterações no envelhecimento, como declínio hormonal e metabólico, redução do potencial apoptótico, aumento da inflamação e estresse oxidativo, são fatores críticos para o desenvolvimento de doenças genitourinárias [49]. O câncer de próstata (CaP) é um dos cânceres com maior incidência e taxa de mortalidade oncológica no mundo todo [1]. Foi previsto para o ano de 2023 cerca de 288.300 novos casos de CaP e aproximadamente 34.700 mortes apenas nos EUA [2]. Segundo os autores, a maior taxa de incidência de CaP está entre os 60 anos ou mais [2]. Portanto, o desenvolvimento de terapias que retardem o desenvolvimento e a progressão do câncer de próstata é de extrema importância para a população idosa.

Evidências acumuladas fornecem informações convincentes sobre mudanças na regulação do relógio circadiano durante a senescência [163,276]. O ritmo circadiano (*Circa Diem*) é um processo biológico que controla a atividade fisiológica durante as 24 horas, gerado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo [277]. A maquinaria do relógio central é governada pelo complexo de dois loops de feedback, compostos de ativadores transcricionais, como *Circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) e *Brain and muscle Arntl-like1* (BMAL1), dois ativadores transcricionais básicos de heterodímero helix-loop-helix, que se ligam a E-boxes no promotor de vários genes, incluindo período (PER) e criptocromo (CRY) [119]. As proteínas PER e CRY formam oligômeros que se translocam do citoplasma para o núcleo, onde interferem na atividade de CLOCK/BMAL1, formando assim o ciclo de feedback negativo central do ritmo circadiano. Adicionando ainda mais complexidade, os heterodímeros CLOCK/BMAL1 induzem a expressão do receptor nuclear órfão REV-ERB α , resultando na repressão transcricional de BMAL1 através da ligação direta a um elemento de resposta REV-ERB α no promotor BMAL1 [119].

Essas proteínas regulam a homeostase fisiológica por meio de um mecanismo de feedback ativando receptores nucleares órfãos, incluindo o receptor alfa órfão relacionado ao RAR (ROR α) e REV-ERB α ou REV-ERB β [19]. O gene *Nr1d1* codifica a proteína REV-ERB α , que atua como um repressor transcricional e desempenha um papel crucial na regulação dos ritmos circadianos de vários órgãos, incluindo cérebro, fígado, músculo esquelético, útero e próstata [278–281]. REV-ERB α suprime a transcrição de genes como *Bmal1* e os genes *Cry*. O glicogênio sintase quinase (GSK 3 β) fosforila o REV-ERB α em seu terminal amino, contribuindo para a estabilidade da proteína. Os efeitos opostos de REV-ERB α e ROR α sintonizam com precisão a regulação

circadiana de BMAL1. ROR α estimula a expressão de BMAL1, enquanto REV-ERB α e REV-ERB β suprimem sua expressão. Além disso, a sincronização dos relógios moleculares nos tecidos periféricos, o controle da secreção hormonal e a regulação do ciclo sono-vigília têm sido associados à modulação do metabolismo celular, à homeostase mitocondrial e à atividade de enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio redox [282].

Ritmo circadiano desregulado tem sido associado ao crescimento acelerado de tumores malignos na próstata [283]. Estudos recentes forneceram evidências de que as interrupções nos padrões circadianos dos genes do relógio, juntamente com alterações nos genes relacionados ao tumor, como p53, c-Myc, homólogo da fosfatase e tensina (PTEN) e p21, estão associados ao desenvolvimento de câncer [284,285]. Essas observações sugerem que o próprio processo de carcinogênese pode impactar os ritmos circadianos celulares e moleculares. A intrínseca interação entre a regulação circadiana e o câncer destaca a importância de entender os mecanismos subjacentes e explorar as possíveis implicações terapêuticas da modulação dos padrões circadianos na prevenção e tratamento do câncer [286]. Além disso, a expressão de PER2 mostrou uma correlação negativa com os níveis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, alfa catalítica (PIK3CA) e p53, enquanto exibia uma correlação positiva com os níveis de PTEN e Caspase 8 [287]. Esses achados destacam as intrigantes associações entre PER2 e as vias p53-PI3K/AKT.

Investigações adicionais sobre essas associações podem revelar novos alvos terapêuticos para várias doenças, incluindo câncer PTEN, um gene supressor de tumor, também é um controlador molecular chave da via de sinalização das fosfoinositídeos 3-quinases (PI3K), e a perda de PTEN resulta na ativação da proteína BMAL1, que por fim conecta a via de sinalização PI3K à regulação do ritmo circadiano. Notavelmente, uma via cruzada REV-ERB- α /PGC-1 α regula a capacidade oxidativa no fígado e no músculo [288] e modula a expressão e função de PGC-1 α modulando a sinalização de proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e sirtuina (SIRT1). Pouco se sabe sobre os efeitos do REV-ERB- α na ativação metabólica da próstata.

O treinamento físico combinado aumentou a força, melhorou a capacidade aeróbica, controle do metabolismo oxidativo e glicolítico, manutenção da resposta inflamatória/anti-inflamatória e redox oxidativa e controle do envelhecimento celular. Em estudos com camundongos de 24 meses de idade, Cordeiro et al. [242] descobriram que 4 semanas de treinamento físico em esteira de intensidade moderada aumentam o conteúdo de SIRT1 e a biogênese mitocondrial no músculo e no fígado [241]. Além disso, Lenhare et al. [243] verificaram que animais de 24 meses submetidos a um único treinamento de natação aumentaram a resposta autofágica muscular e melhoraram a sensibilidade à insulina por meio da estimulação da AMPK. Esses achados mostram qual mecanismo o exercício físico agudo contribui para a função muscular e hepática no envelhecimento [243]. Portanto, ainda existe uma lacuna literária

relacionada aos mecanismos do ritmo circadiano no envelhecimento prostático associado ao exercício físico combinado.

Para avaliar as respostas do REV-ERB α ao exercício físico na próstata, empregamos um modelo de exercício físico combinado. O exercício aeróbico na próstata tem sido associado a modificações metabólicas, enquanto o treinamento de força tem o potencial de modular a apoptose celular e reduzir a proliferação celular [226,228,289–293]. O modelo de intervenção combinado envolvendo exercícios aeróbicos e de força forneceu informações sobre o papel do REV-ERB α na próstata de animais idosos. Inicialmente, examinamos a resposta do REV-ERB α na próstata de camundongos velhos e jovens. Posteriormente, avaliamos a resposta ao exercício físico combinado e a expressão do REV-ERB α , investigando sua correlação com genes e proteínas envolvidas no metabolismo celular. Nossa hipótese postula que o REV-ERB- α se correlacionaria positivamente com a resposta ao exercício, regulando concomitantemente os supressores tumorais p53/p21, PTEN e caspase 3, marcadores do metabolismo energético, e o receptor androgênico (AR) no microambiente prostático de 18 meses de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados seguindo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - EEFERP/ USP, com número do processo N. 2021.1.43.90.0.

Camundongos machos C57BL/6J (*Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA*) foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h (23 $\pm$ 2°C), com uma dieta padrão (Nuvital feed da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: animais com 6 meses de idade (n=10, 6m Sed); Animais com 18 meses de idade (n=20, 18m Sed). Os animais do grupo de 18 meses foram divididos em dois subgrupos, animais sedentários (n=10, 18m Sed) e animais treinados (n=10, 18m TR), submetidos a exercícios físicos combinados (protocolos de treinamento aeróbico e de força) por 3 semanas (Figura 5 O).

Teste de carga incremental (TCI) e teste de força (repetição máxima - RM)

Todos os animais foram submetidos ao teste de carga incremental para avaliar a velocidade máxima. No entanto, apenas os animais do grupo 18m TR foram avaliados antes e após o protocolo de treinamento físico. Os animais foram adaptados ao exercício físico em esteira por 5 dias, 10min/dia na velocidade de 6m/min. antes de iniciar o protocolo [262]. O teste de carga incremental tem velocidade inicial de 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3

m/min de velocidade a cada 3 min até a exaustão voluntária dos camundongos, que consiste em tocar cinco vezes a extremidade da esteira na esteira intervalo de um minuto. Os animais também foram submetidos ao teste de força de uma repetição máxima (RM) para determinação da carga de treinamento. O teste começa com uma carga correspondente a 40% do peso corporal presa à cauda dos camundongos. O animal saía da base da escada e percorria a distância proposta. A cada tentativa bem-sucedida foram adicionados aumentos de 10% até que o animal não conseguisse completar o percurso total, sendo considerado exaustão e adicionando 5% do peso corporal a cada 2 repetições realizadas até a carga em que o animal pudesse completar apenas 1 repetição máxima [294].

Protocolo de Treinamento Físico Combinado

Aos 17 meses de idade, os animais do grupo de 18 meses foram divididos em 2 subgrupos, um grupo sedentário e um grupo submetido ao protocolo de treinamento físico combinado. Todos os animais do grupo 18mTR foram submetidos ao período de adaptação aos dois protocolos e, após o período de adaptação, os animais foram submetidos a testes físicos para ajuste de carga. O teste de carga incremental foi utilizado para ajustar a carga de exercício físico aeróbico e o teste de uma repetição máxima (1RM) para ajustar a carga de treinamento de força. O protocolo de treinamento físico combinado foi desenvolvido durante 3 semanas e consistiu em 3 sessões de exercícios aeróbicos e 2 sessões de exercícios físicos de força aplicados por semana (Tabela 2). O período de treinamento físico total durou 1 semana de adaptação ao protocolo para ambos os tipos de exercício físico e 3 semanas de treinamento físico efetivo, totalizando 4 semanas de treinamento físico combinado. Todos os animais do grupo TR 18m foram reavaliados ao final do período experimental.

Tabela 2. Características de intensidade, volume, frequência e intervalo entre as sessões de treinamento.

Semanas	Incremento (%1RM)	Repetições (subidas)	Seções	Intervalo entre as seções (hr)
1	-	20	1	24
2	40	20	1	24
3	50	20	1	24
4	50	20	1	24
Semanas	Intensidade (%Pmax)	Tempo (min)	Seções	Intervalo entre as seções (hr)
1	-	10	1	24
2	40	30	1	24
3	50	45	1	24
4	60	60	1	24

Extração de próstata

Após uma semana de testes, os roedores tiveram um descanso de quatro dias antes de serem submetidos aos procedimentos de pesagem. A pesagem foi realizada em balança analítica (Toledo, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). Posteriormente, às 12h, os camundongos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (100 mg/kg de peso corporal). A perda dos reflexos podais confirmou a eficácia da anestesia. Em seguida, a próstata foi extraída e preparada para análises, transcrição-reação em cadeia da polimerase quantitativa (RTq-PCR) e western blotting.

Análises Bioquímicas do Estado Redox Plasmático

O sangue da ponta da cauda foi coletado e os níveis de glicemia de jejum foram medidos antes da eutanásia usando um sistema de monitoramento glicêmico (modelo Accu-Chek™ Active, Roche, Santo André, SP, Brasil). O soro foi utilizado para análises bioquímicas. A capacidade oxidante total foi avaliada com o método de Erel [295]. Os oxidantes oxidam o complexo íon ferroso-o-dianisidina ao íon férrico. O íon férrico produziu um complexo de xilenol de cor laranja em meio ácido. O ensaio foi calibrado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e os resultados são expressos em termos de H₂O₂ micromolar por grama de proteína. O dano oxidativo aos lipídios foi avaliado pela concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) [296]. O coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) calculou o número de aldeídos formados.

O Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP) determinou a capacidade antioxidante total, conforme descrito por Benzie e Strain [297]. Os resultados foram calculados usando um padrão de FeSO₄. Para determinar a defesa antioxidante enzimática, avaliou-se a atividade da Superóxido Dismutase (SOD), medindo-se a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA). Uma unidade SOD será definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% [298]. A intensidade da cor no espectrofotômetro quantificou todas as análises.

Análise de Western Blotting (WB)

As amostras de próstata de cada grupo experimental foram homogeneizadas com um tampão de extração. A concentração de proteína total (15 mg) foi submetida à eletroforese em SDS - gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e então transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose, e a eficiência de transferência para membranas de nitrocelulose foi verificada por

coloração com vermelho de Ponceau. Posteriormente incubado com um anticorpo primário das proteínas AMPK (sc-398861), pAMPK (Thr172) (sc-33524), PGC1-alpha (sc-518025), SIRT1 (sc-74465), PTEN (sc-7974), p53 (sc-126), REV-ERB α (sc-393215), PI3K p85A (sc-376112), AKT1 (sc-5298), p21 WAF1/CIP1/CDKN1A (sc-817), CASPASE 3 (sc-56053), AR (sc-7305) e Beta-actina (sc- 47778) (Santa Cruz Technology, Texas, USA); e GAPDH (#2118) (Cell Signaling Technology, MA, USA). Posteriormente, incubados com anticorpo secundário anti-m-IgG ou anti-coelho. As imagens foram adquiridas pelo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) e quantificadas usando o software Image Studio. Cada proteína foi normalizada pelos valores de sua respectiva Beta-actina/GAPDH. As imagens do WB foram verificadas quanto à integridade dos dados usando o pipeline Proofing (<https://www.proofig.com>).

Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Amostras de próstata de cada grupo experimental foram coletadas. Os procedimentos de RT-q-PCR foram implementados sob condições padrão livre de RNase para evitar contaminação exógena de RNase. O RNA total das amostras da próstata foi extraído com o reagente TRIzol® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). Posteriormente, o RNA total foi quantificado por espectrofotômetro (BioDrop μ Lite, Biochrom, Holliston, MA). O kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA) sintetizou cDNA. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o StepOne Plus PCR System (Applied Biosystems) para analisar a expressão relativa de mRNA dos genes (Tabela 3). Todos os valores serão corrigidos pelo valor obtido na amplificação da Beta-actina. A quantificação relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ usando o Thermo Fisher Cloud Software, RQ versão 3.7 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA)

Tabela 3. Especificações dos genes analisados

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Nr1d1</i>	CTGCCAGCAATGTCGCTTCAAG	TGGCTGCTCAACTGGTTGTTGG
<i>Bmal1</i>	CTGGCTAGAGTGTATACGTTTGG	GGTCACCTCAAAGCGATTTTC
<i>Prkaa1</i>	CCAGGTCATCAGTACACCATCT	TTTCCTTTTCGTCCAACCTTCC
<i>Sirt1</i>	TTGGCACC GATCCTCGAAC	CCCAGCTCCAGTCAGAACTAT
<i>Ppargc1-alpha</i>	GAGTTGAAAAAGCTTGACTGGC	CAGCACACTCTATGTCACTCCA
<i>Beta-actina</i>	CGCCCCGGCTCTGACTGACC	CCTCGGGGCACCTGAACCTCTC

Conjuntos de dados transcriptômicos publicamente disponíveis da próstata

O conjunto de dados de camundongos foi obtido do número de acesso GEO Series GSE122367 e GSE128724. As próstatas de camundongos C57BL/6 foram coletadas com 3 ou 24 meses de idade e depois dissociadas em células únicas. Células basais (Lin-EpCAM+ CD49fhi), Trop2+ luminal (Lin-EpCAM+ CD49fmid Trop2+) e Trop2- luminal (Lin-EpCAM+ CD49fmid Trop2-) foram isoladas em um classificador de células FACS Aria II (BD Biosciences). O mapa de calor foi construído usando Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) para verificar os efeitos da idade (jovem e velho) e tipos de células da próstata (basal e luminal) em REV-ERB α , apoptose e tumor vias supressoras. O gráfico de dispersão foi construído usando GraphPad Prism 8 para investigar a relação de duas variáveis, o Trop2 e a idade. ANOVA two-way seguido de post hoc de Tukey foi usado.

Análises estatísticas

Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise de variância de médias (One-Way ANOVA) foi utilizada para comparar os três grupos analisados, seguida da comparação post hoc de Bonferroni. Para verificar os efeitos dos momentos pré e pós-treinamento físico combinado, foi utilizado o teste t *Student* pareado. As correlações de Pearson foram utilizadas para investigar possíveis correlações entre o nível da proteína REV-ERB α , genes e proteínas envolvidas no metabolismo celular. As análises estatísticas e gráficos foram realizados no software GraphPad Prism, versão 9.3.

RESULTADOS

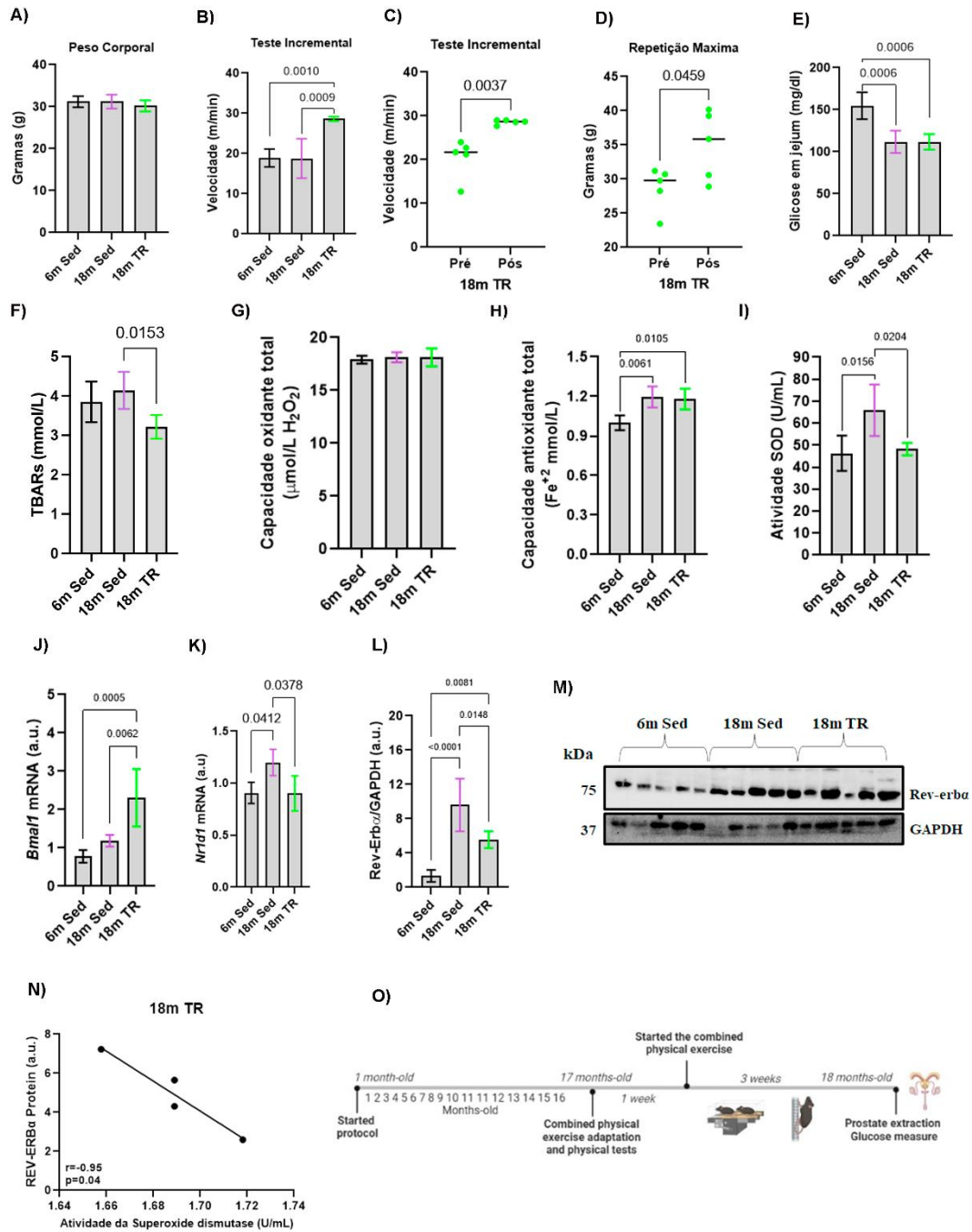
O exercício físico combinado aumentou a velocidade de corrida e a força, mas reduziu os TBARS

Analizamos o peso corporal, velocidade, força e glicemia de jejum para estudar os efeitos do exercício físico combinado na composição corporal. O peso corporal não apresentou diferença entre os grupos (Figura 5 A). O protocolo de treinamento físico combinado no grupo 18m TR aumentou a velocidade de corrida em relação ao 6m Sed (95% CI -14,98 a -4,423, $p=0,0010$) e 18m Sed (95% CI -15,12 a -4,563, $p=0,0009$, Figura 5 B). Houve aumento da velocidade de corrida (momento pré x pós) nos animais 18m TR após 3 semanas de treinamento (95% CI 3,499 a 12,78, $p=0,0037$, Figura 5 C), bem como aumento da força (95% CI 0,1468 a 12,41, $p=0,0459$,

Figura 5 D). O grupo 18m Sed apresentou valores de glicemia de jejum mais baixos do que o grupo 6m Sed (95% CI 20,78 a 65,22, $p=0,0006$, Figura 5 E). No entanto, o grupo 18m TR reduziu os valores de glicemia de jejum em comparação com o grupo 6m Sed (95% CI 20,78 a 65,22, $p=0,0006$, Figura 5 E).

Para investigar as mudanças dependentes da idade associadas ao exercício físico combinado na peroxidação lipídica (TBARS), a capacidade oxidativa total e a SOD no plasma foram medidas. As concentrações de TBARS foram significativamente reduzidas no grupo 18m TR em comparação com o grupo 18m Sed (95% CI 0,1884 a 1,664; $p=0,0153$; Figura 5 F). Não houve diferença entre os grupos na capacidade oxidativa total (Figura 5 G). Os grupos 18m Sed (95% CI -0,3303 a -0,06136, $p=0,0061$) e 18m TR (95% CI -0,3142 a -0,04529, $p=0,0105$, Figura 5 H) apresentaram capacidade antioxidante total aumentada quando comparados ao grupo 6m Sed (Figura 5 H). O nível de SOD no grupo 18m TR mostrou uma diminuição significativa com o envelhecimento mais exercício físico combinado (95% CI 2,938 a 32,36, $p=0,0204$, Figura 5 I), enquanto não houve diferença significativa entre 18m TR e 6m Sed (Figura 5 I). O grupo 18m Sed apresentou aumento na atividade SOD em comparação com os animais 6m Sed (95% CI -35,02 a -4,010, $p=0,0156$, Figura 5 I).

Figura 5



Legenda: Representação gráfica do peso corporal (A); representação gráfica do teste de carga incremental (B); representação gráfica do teste de carga incremental (pré e pós) (C); representação gráfica da repetição máxima (pré e pós) (D); representação gráfica da glicemia de jejum (E); representação gráfica dos TBARs (F); representação gráfica da capacidade oxidante total (G); representação gráfica da capacidade antioxidante total (H); representação gráfica da atividade SOD (I); representação gráfica dos valores de mRNA de *Bmal1* (J); representação gráfica dos valores de mRNA de *Nr1d1* (K); representação gráfica dos valores das proteínas REV-ERB α (L); membranas representativas de REV-ERB α e GAPDH (M); correlações representativas gráficas entre níveis de proteína REV-ERB- α e atividade SOD no grupo 18m TR (N); e Apresentação esquemática dos procedimentos experimentais (O) - criada com BioRender.com. Os dados correspondem à média $\pm$ DP de $n = 4$ camundongos/grupo. au = unidades arbitrárias.

O exercício físico combinado aumentou os níveis de mRNA de Bmal1 e baixou o Nr1d1 na próstata

O BMAL1 desempenha um papel crucial na regulação dos ritmos circadianos, formando um complexo com a proteína CLOCK. Juntos, eles iniciam loops de feedback primários que subsequentemente ativam loops de feedback secundários, levando à expressão de REV-ERB α . Essa cascata regulatória influencia significativamente os processos de metabolismo energético e celular [299]. A REV-ERB α reprime o promotor BMAL1. Observamos que o protocolo de treinamento físico combinado por 3 semanas aumentou os níveis de mRNA de *Bmal1* em comparação com animais idosos sedentários 18m Sed (95% CI -2.879 to -0.2451, $p=0.0191$) e animais jovens 6m Sed (95% CI -3.025 to -0.3911, $p=0.0108$, Figura 5 J). Em amostras de próstata, o exercício físico combinado reduziu os níveis de mRNA de *Nr1d1* no grupo 18m TR em comparação com 18m Sed (95% CI 0.01651 to 0.5790, $p=0.0378$, Figura 5 K). Os níveis de mRNA de *Nr1d1* em 18m Sed foram maiores em comparação com 6m Sed (95% CI -0.5740 to -0.01149, $p=0.0412$, Figura 5 K).

O exercício físico regulou negativamente o REV-ERB α e modulou negativamente as vias do metabolismo energético mitocondrial na próstata

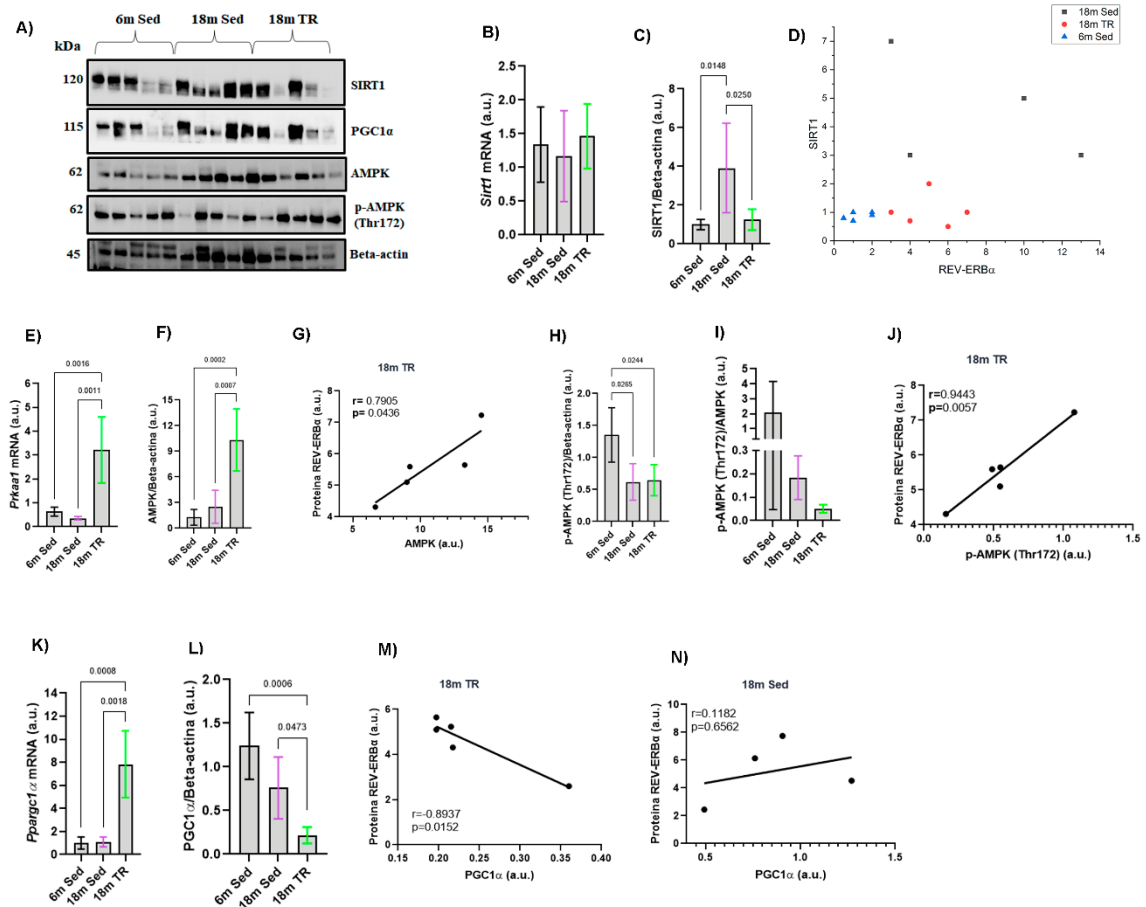
Nós investigamos o significado funcional do receptor nuclear REV-ERB α (codificado por *Nr1d1*) na expressão de proteínas prostáticas em camundongos. Observamos que o grupo 18m Sed apresentou aumento do REV-ERB α em relação ao 6m Sed (95%CI -11.46 to -5.054, $p<0.0001$, Figura 5 L – M), e ao 18m TR (95% CI 0.8407 to 7.250, $p=0.0148$, Figura 5 L – M). O 18m TR aumentou a proteína REV-ERB α no 18m TR comparado ao 6m Sed (95%CI -7.234 to -1.192, $p=0.0081$, Figura 5 L – M). O conteúdo da proteína REV-ERB α mostrou forte correlação negativa de Pearson com a atividade SOD no grupo 18m TR ($r=-0.95$, $p=0.04$, Figura 5 N).

A REV-ERB α , um receptor nuclear e regulador transcricional, mostrou interagir e modular a expressão de SIRT1 diretamente. SIRT1 é uma desacetilase dependente de NAD⁺ crucial em vários processos celulares, incluindo metabolismo energético, reparo de DNA e longevidade [300]. O nível de mRNA *Sirt1* não teve diferença significativa entre os grupos (Figura 6 B). No entanto, o nível de proteína SIRT1 foi significativamente maior em 18m Sed (4.07 ± 0.22 ng/ml) comparado a 6m Sed (95% CI -5.506 to -0.3301, $p=0.0263$) e 18m TR (95% CI 0.03247 to 5.523, $p=0.0471$, Figura 6 A – C). Os resultados do gráfico de dispersão revelam uma disposição do SIRT1 em relação ao REV-ERB α de acordo com a idade (Figura 6 D). Os pontos no gráfico mostraram dispersão geral, mas uma descida pôde ser identificada no grupo Sed de 18m. Esses achados sugerem que a idade promove um aumento gradativo do SIRT1 em relação ao REV-ERB α , onde o exercício combinado manteve relação semelhante ao grupo jovem.

O ritmo circadiano regula a atividade da AMPK e, para entender os efeitos da modulação dos genes do ritmo circadiano na próstata, avaliamos o conteúdo da AMPK. O AMPK é ativado quando os suprimentos de energia estão baixos, como durante o jejum ou o exercício. O grupo exercitado apresentou maiores níveis de mRNA de *Prkaa1* quando comparado ao 18m Sed (95% CI -10.45 to -3.025, $p=0.0018$) e 6m Sed (95% CI -10.15 to -3.514, $p=0.0008$, Figura 6 E). O teor proteico da AMPK total também seguiu o mesmo comportamento da expressão gênica, onde animais 18m TR apresentaram aumento em relação aos 18m Sed (95% CI -12.69 to -3.095, $p=0.0022$) e animais 6m Sed (95% CI -13.93 to -4.329, $p=0.0007$, Figura 6 F). Encontramos uma correlação significativa entre REV-ERB- α e proteína AMPK no grupo 18m TR ($r=0.7905$, $p=0.0436$, Figura 6 G). No entanto, quando avaliamos a expressão da forma ativa da proteína pAMPK (fosforilação no sítio Treonina 172), animais idosos sedentários (95% CI 0.02383 to 1.444, $p=0.0424$) e treinados (95% CI 0.1156 to 1.463, $p=0.0216$, Figura 6 H – I) apresentaram redução em relação aos animais jovens de 6m Sed, respectivamente. Além disso, o grupo TR 18m mostrou uma alta correlação positiva ($r=0,9443$, $p=0,0057$) entre o REV-ERB- α e a proteína pAMPK (Thr172) (Figura 6 J).

A expressão de REV-ERB- α aumentou o mRNA de *Ppargc1 α* . Na próstata, o mRNA de *Ppargc1 α* mostrou um aumento em animais 18m TR em comparação com animais 18m Sed (95% CI -10.5 to -3.025, $p=0.0018$) e 6m Sed (95% CI -10.15 to -3.514, $p=0.0008$, Figura 6 K). No entanto, a expressão da proteína PGC1 α em animais 18m TR apresentou uma regulação negativa quando comparada a 18m Sed (95% CI -0.06096 to 1.148, $p=0.0831$) e animais 6m Sed (95% CI 0.4200 to 1.629, $p=0.0017$, Figura 6 L). O grupo 18m TR mostrou uma forte correlação negativa entre REV-ERB- α e PGC1 α ($r=0.8937$, $p=0.0152$, Figura 6 M). Por outro lado, o grupo 18m Sed não apresentou correlação entre REV-ERB- α e PGC1 α (Figura 6 N).

Figura 6



Legenda: Membranas representativas de SIRT1, PGC-1α, AMPK, p-AMPK (thr172) e Beta-actina (A); representação gráfica dos valores de *Sirt1* mRNA (B); representação gráfica dos valores da proteína SIRT1 (C); representação gráfica da disposição da SIRT1 (D); representação gráfica dos valores de mRNA de *Prkaa1* (E); representação gráfica dos valores da proteína AMPK (F); gráfico representativo das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-α e os níveis de proteína AMPK no grupo 18m TR (G); representação gráfica dos valores da proteína p-AMPK (H); representação gráfica da relação p-AMPK/AMPK (I); representação gráfica das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-α e os níveis de proteína p-AMPK no grupo 18m TR (J); representação gráfica do mRNA de *Ppargc1α* (K); representação gráfica dos valores da proteína PGC1α (L); representação gráfica das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-α e os níveis de proteína PGC1α no grupo 18m TR (M); gráfico representativo das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-α e os níveis de proteína PGC1α no grupo Sed 18m (N). Os dados correspondem à média ± DP de n = 4 camundongos/grupo. au = unidades arbitrárias.

Redução do REV-ERBα em animais exercitados modifica mecanismos intracelulares prostáticos em animais idosos

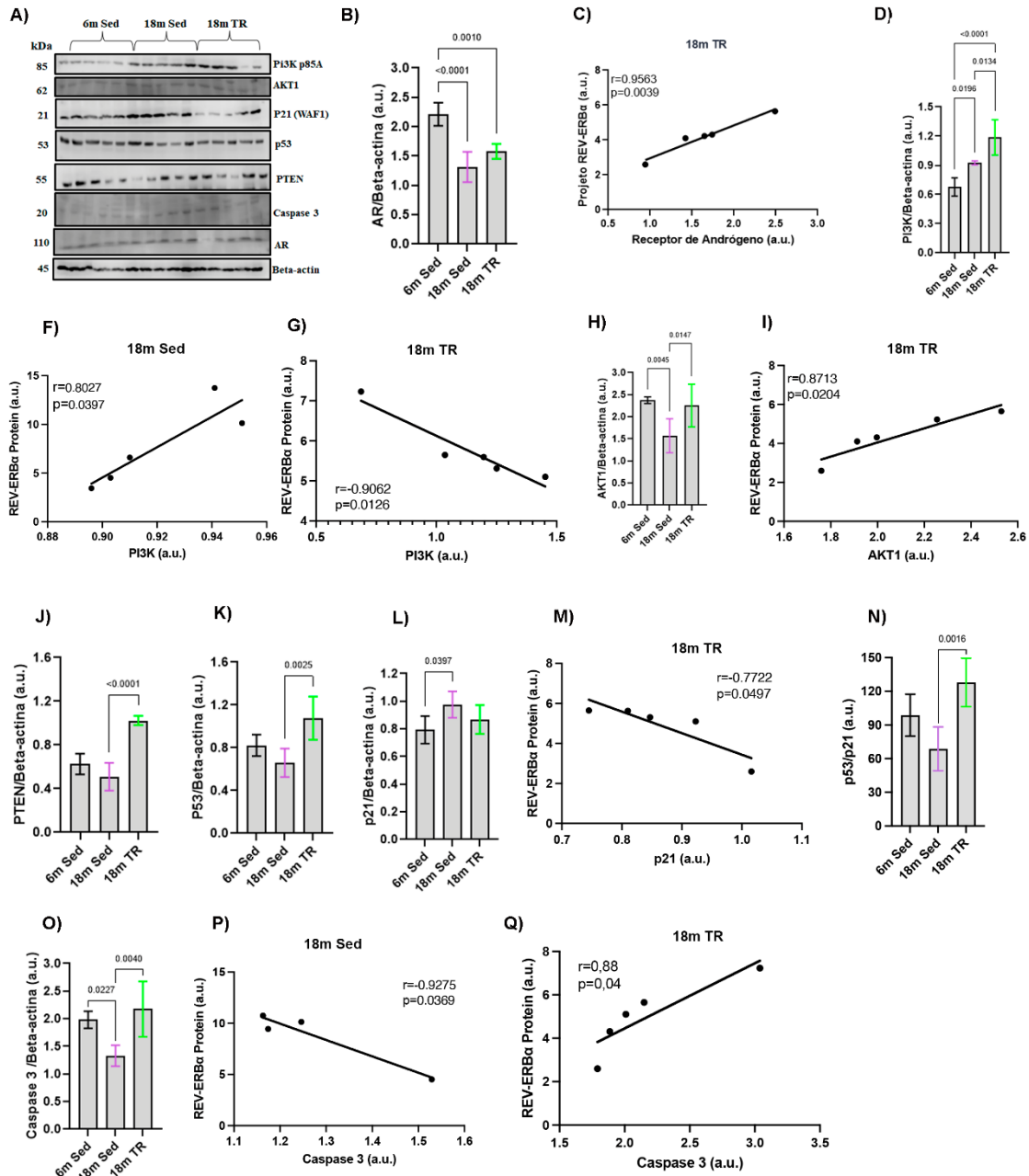
Para verificar o efeito dos genes do relógio na modulação prostática com o envelhecimento e o exercício físico, avaliamos a expressão do AR. O grupo 18m Sed (95%CI 0.5414 to 1.252, $p < 0.0001$, Figura 7 A – B) e o grupo 18m TR (95%CI 0.2758 to 0.9866, $p = 0.0010$, Figura 7 A – B) mostrou uma diminuição na expressão de AR em comparação com o grupo 6m Sed (Figura 7 A – B). O grupo 18m TR mostrou uma forte correlação positiva entre REV-ERB-α e expressão de AR ($r = 0.9563$, $p = 0.0039$, Figura 7 C).

A ativação da via PI3K/AKT induz a homodimerização e translocação do AR para o núcleo, promovendo diferenciação celular e sobrevivência na próstata [301]. Para analisar a relação entre REV-ERB- α e a modulação do crescimento, sobrevivência e proliferação celular na próstata, avaliamos a via PI3K/AKT. Os animais 18m TR apresentaram um aumento no PI3K em comparação com os 18m Sed (95%CI 0.05350 to 0.4713, $p=0.0134$, Figura 7 D) e grupo 6m Sed (95%CI -0.3003 to 0.7181, $p<0.0001$, Figura 7 D). Os animais 18m Sed apresentou PI3K alto em comparação com o 6m Sed (95%CI 0.03790 to 0.4557, $p=0.0196$, Figura 7 D). Existe uma forte correlação positiva entre REV-ERB- α e PI3K ao grupo 18m Sed ($r=0.8027$, $p=0.0397$, Figura 7 F) e mostrou uma alta correlação negativa entre REV-ERB- α e PI3K para o grupo 18m TR ($r=0.9062$, $p=0.0126$, Figura 7 G). A proteína AKT1 foi reduzida na próstata do grupo 18m Sed em comparação com 18m TR (95%CI -1.244 to -0.1251, $p=0.0147$, Figura 7 H) e o grupo 6m Sed (95%CI 0.2446 to 1.363, $p=0.0045$, Figura 7 H). A Figura 7 I mostra uma alta correlação positiva entre REV-ERB- α e AKT1 na próstata do grupo 18m TR ($r=0.8713$, $p=0.0204$, Figura 7 I).

A PTEN é a proteína essencial que regula a via PI3K/AKT. Seu papel como supressor tumoral decorre de sua atividade fosfatase, que desfosforila PIP3 em PIP2, modulando assim a ativação da via PI3K/AKT [270]. O grupo 18m TR mostrou uma regulação positiva da proteína PTEN na próstata em comparação com o grupo 18m Sed (95% CI -0.7017 to -0.3261, $p=<0.0001$, Figura 7 J). A proteína p53 é caracterizada como um supressor tumoral, induzindo parada do ciclo celular e apoptose em tecidos prostáticos [302]. O grupo 18m TR apresentou aumento significativo de p53 em relação aos animais 18m Sed (95% CI -0.6838 to -0.1506, $p=0.0028$, Figura 7 K). A proteína multifuncional p21 está relacionada ao controle do ciclo celular e atividade anti-apoptótica [303]. Observamos que o grupo 18m Sed apresentou um aumento de p21 em relação ao grupo 6m Sed (95% CI -0.3590 to -0.007811, $p=0.0397$, Figura 7 L). Não houve diferença significativa entre os grupos 18m Sed e 18m TR (Figura 7 L). Existe uma correlação positiva moderada entre REV-ERB- α e grupo p21 a 18m TR ($r=0.7722$, $p=0.0497$, Figura 7 M). Como p21 é um alvo de p53, depende da atividade de p53. portanto, analisamos a ação da p53 na indução da parada do ciclo celular, regulando a atividade da p21. O grupo 18m TR apresentou um aumento significativo na relação p53/p21 em comparação com os animais 18m Sed (95% CI -94.33 to -24.12, $p=0.0016$, Figura 7 N).

No entanto, o grupo 18m Sed apresentou uma redução significativa na expressão da caspase 3 em relação ao grupo 6m Sed (95% CI 0.08653 to 1.217, $p=0.0227$). Por outro lado, o grupo exercitado 18m TR apresentou um aumento significativo da caspase 3 em relação ao grupo 18m Sed (95% CI -1.410 to -0.2795, $p=0.0040$, Figura 7 O). O grupo 18m Sed mostrou uma forte correlação negativa existente entre REV-ERB e caspase 3 na próstata ($r=0.9275$, $p=0.0369$, Figura 7 P). A relação entre REV-ERB e proteína caspase 3 no grupo 18m TR mostrou uma forte correlação positiva com os níveis de proteína caspase 3 ($r=0.90$, $p=0.03$, Figura 7 Q).

Figura 7



Legenda: Membranas representativas de PI3K P85A, AKT1, PTEN, p21 (WAF1), Caspase 3, Receptor de Andr geno (AR), p53 e Beta-actina (A), representação gráfica dos valores da proteína AR (B); gráfico representativo das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-  e os níveis de proteína AR no grupo 18m TR (C); representação gráfica dos valores da proteína PI3K (D); representação gráfica das correlações entre os níveis da proteína REV-ERB-  e os níveis da proteína PI3K no grupo Sed 18m (F); representação gráfica das correlações entre os níveis da proteína REV-ERB-  e os níveis da proteína PI3K no grupo TR 18m (G); representação gráfica dos valores da proteína AKT1 (H); representação gráfica das correlações entre os níveis da proteína REV-ERB-  e os níveis da proteína AKT1 no grupo 18m TR (I); representação gráfica dos valores da proteína PTEN (J); representação gráfica dos valores da proteína p53 (K); representação gráfica dos valores da proteína p21 (L); gráfico representativo das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-  e os níveis de proteína p21 no grupo 18m TR (M); representação gráfica da relação p53/p21 (N); representação gráfica dos valores da proteína Caspase 3 (O); gráfico representativo das correlações entre os níveis de proteína REV-ERB-  e os níveis de proteína Caspase 3 no grupo Sed 18m (P); gráfico representativo das correlações

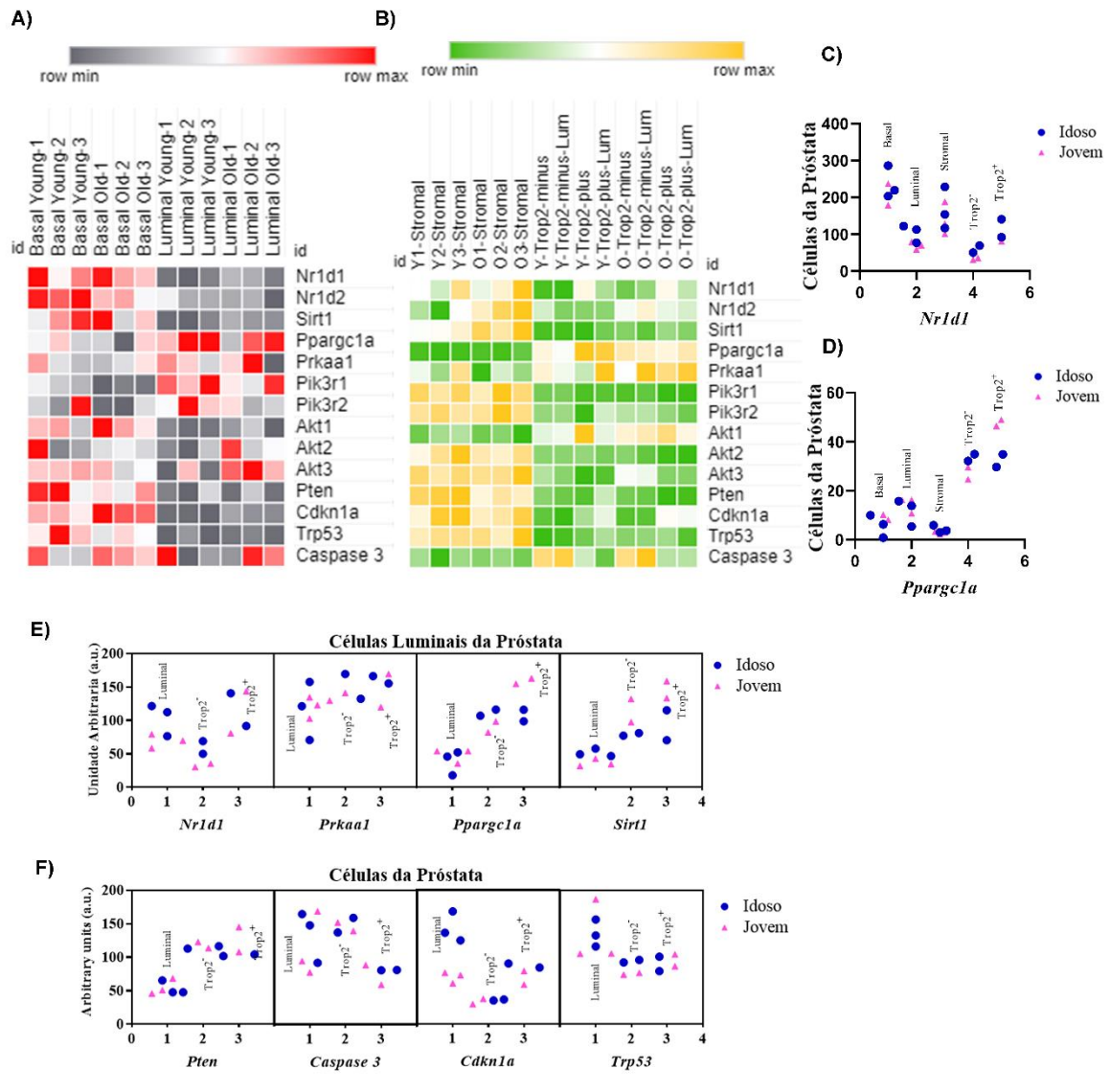
entre os níveis de proteína REV-ERB- α e os níveis de proteína Caspase 3 no grupo 18m TR (Q). Os dados correspondem à média $\pm$ DP de n = 4 camundongos/grupo. au = unidades arbitrárias.

Células basais e luminais da próstata mostram diferentes expressões nos genes Nr1d1 e Ppargc1 α em camundongos jovens e velhos de dados públicos

Para obter uma compreensão mais profunda, analisamos os níveis de mRNA prostático em amostras de camundongos jovens e velhos. De acordo com a Figura 8 A, independente dos efeitos da idade, as expressões gênicas de *Nr1d1*, *Nr1d2*, *Sirt1*, *Akt1*, *Pten*, *Cdkn1a*, e *Trp53* foram modulados pelos diferentes tipos de células da próstata (basal versus luminal). O *Nr1d2* e *Cdkn1a* foram diferentes entre jovens e idosos em células basais. O *Akt3* foi diferente nas células luminais de jovens e idosos.

Trop2 (antígeno de superfície celular trofoblástica-2) é uma proteína transmembrana transdutora de sinal de cálcio. É altamente expresso em células epiteliais prostáticas e está associado à malignidade tumoral [304]. A expressão Trop2 marca um subconjunto exclusivo de células luminais na próstata adulta que produzem grandes organoides [305,306]. Trop2 é uma glicoproteína de superfície celular considerada superexpressa em muitos tipos de carcinomas com expressão mínima em tecidos normais. Na Figura 8 B, é possível visualizar a presença de Trop2+ modulando *Ppargc1* e *Sirt1* ao comparar jovens e idosos.

Figura 8



Legenda: Análise bioinformática de células da próstata de camundongos C57Bl/6J de amostras de 3 meses (jovens) e 24 meses (velhos) de um banco de dados público. Mapa de calor mostrando *Nr1d1*, *Nr1d2*, apoptose, supressores tumorais, metabolismo celular da próstata e marcadores do metabolismo energético, nas células da próstata (basal e luminal) em camundongos jovens ou velhos, com baixo/alto (A); Mapa de calor mostrando *Nr1d1*, *Nr1d2*, apoptose, supressores tumorais, metabolismo celular da próstata e marcadores do metabolismo energético, nas células da próstata (estromal, Trop2+ ou Trop2-) em camundongos jovens ou velhos, com baixo/alto (B); Níveis de mRNA de *Nr1d1* nas células da próstata (basal, luminal, estromal, Trop2+ ou Trop2-) em camundongos jovens ou velhos (C); Níveis de mRNA de *Ppargc1a* nas células prostáticas (basal, luminal, estromal, Trop2+ ou Trop2-) em camundongos jovens ou velhos (D); *Nr1d1*, *Prkaa1*, *Ppargc1a* e níveis de mRNA *Sirt1* nas células luminais da próstata em camundongos jovens e velhos (E); Níveis de mRNA de *Pten*, *Caspase3*, *Cdkn1a* e *Trp53* nas células luminais da próstata em camundongos jovens e velhos (F).

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do exercício físico combinado sobre proteínas relacionadas ao ritmo circadiano, marcadores de estresse oxidativo e vias do metabolismo energético na próstata de animais idosos. Os principais achados da presente investigação foram: 1) O exercício físico combinado melhorou a velocidade de corrida, a força e reduziu os níveis de peroxidação lipídica (TBARS); 2) O exercício físico combinado aumentou os níveis de mRNA de *Bmal1*, *Prkaa1*, *Ppargc1a*, diminuiu o mRNA de *Nr1d1* e baixou o conteúdo da proteína REV-ERB α ; 3) Houve uma correlação significativa entre os níveis de proteína REV-ERB α e SIRT1 na próstata; 4) O exercício físico combinado aumentou o conteúdo de proteína total AMPK e reduziu o conteúdo de proteína PGC1 α ; 5) O exercício físico combinado aumentou p53, PTEN, AR e caspase 3 na próstata. Essas observações contribuem para nossa compreensão dos potenciais benefícios e mecanismos subjacentes do exercício na próstata durante o processo de envelhecimento.

O envelhecimento promove perda de função em diversos fatores, como cognição, desempenho motor e comportamental, além de alterações no metabolismo [266]. Fatores que aumentam a capacidade física são importantes para promover o envelhecimento saudável e retardar doenças relacionadas à senilidade. Nossos resultados mostram que o protocolo de exercício físico combinado de 3 semanas melhorou a força e a velocidade de corrida em comparação com animais sedentários de 18 meses de idade, uma vez que o declínio neuromuscular é um dos primeiros sinais de fragilidade associados ao envelhecimento [307]. Outros estudos também mostram que o exercício físico beneficia o processo de envelhecimento, Reynolds et al., [308] e Leuchtmann et al., [309], observaram que animais idosos submetidos ao exercício físico aeróbico melhoraram a capacidade aeróbica na esteira, a força de preensão e a marcha.

A REV-ERB α na próstata está envolvido na regulação do ritmo circadiano, metabolismo energético, inflamação e proliferação celular [310]. O REV-ERB α , controlado pelo gene *Nr1d1*, é um receptor nuclear que desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica e na manutenção do ritmo circadiano. Os níveis de mRNA *Nr1d1* e os conteúdos da proteína REV-ERB α foram aumentados no grupo 18m Sed. REV-ERB- α tem um papel regulador direto na expressão de BMAL1. Em contraste, os animais experimentais BMAL1 -/- mostraram fenótipos de envelhecimento acelerado [311]. Além da perda dos ritmos circadianos, camundongos com deficiência de BMAL1 também desenvolveram sintomas de envelhecimento prematuro, como catarata e encolhimento de órgãos [311]. O exercício físico combinado exibiu um efeito estabilizador na expressão do gene *Bmal1* em tecidos prostáticos. Da mesma forma, como demonstrado por Pinto et al., [21] nos tecidos do fígado de animais idosos, houve um declínio notável na expressão no mRNA *Bmal* e a implementação do exercício físico restaurou com

sucesso a expressão gênica e restabeleceu as alterações do ritmo circadiano. No entanto, neste estudo, observamos que, apesar de não haver alterações no mRNA de *Nr1d1*, o mRNA de *Bmal1* está aumentado em animais treinados, podendo influenciar potencialmente a saúde da próstata e os processos de doença. As evidências sobre o papel do gene *Bmal1* relacionado à ativação do REV-ERB α na próstata são conflitantes. Embora vários estudos tenham demonstrado que o BMAL1 promove a progressão do tumor [312,313], numerosos estudos também revelaram o papel supressor de tumor de BMAL1 [314,315]. Descobrimos que o exercício físico realizado em camundongos velhos aumentou o mRNA de *Bmal1* em vez de diminuí-lo, sugerindo um potencial papel sinérgico no combate ao câncer de próstata durante a senescência. Os mecanismos específicos subjacentes à regulação positiva de BMAL1 induzida por exercício permanecem desconhecidos e devem ser investigados em estudos adicionais.

O receptor nuclear REV-ERB α é expresso em tecidos periféricos como fígado e tecido adiposo, onde modula o metabolismo de lipídios, ácidos biliares e glicose [316]. Com o envelhecimento, o tempo diário dos processos metabólicos em nosso corpo muda [15]. Neste estudo, observamos níveis reduzidos de glicose no sangue em camundongos de 18 meses de idade (sedentários e treinados). A diminuição nos níveis de glicose em jejum em camundongos velhos também foi relatada por [317] e pode estar relacionado a oscilações do ritmo circadiano. Durante o envelhecimento, as oscilações cíclicas de BMAL/REV-ERB α afetam principalmente o metabolismo energético [318]. A REV-ERB- α regula a via AMPK/SIRT1/PGC-1 α , que envolve a ativação da AMPK e a desacetilase da SIRT1, ambas desempenhando papéis cruciais na flexibilidade metabólica. A SIRT1 forma um complexo proteico com PGC-1 α e o Fator Nuclear Alfa 4 dos hepatócitos (HNF4 α), um fator de transcrição essencial na função gliconeogênica do PGC-1 α . No câncer de próstata, também foi relatado que a expressão elevada de SIRT1 promove o crescimento, a invasão e a diferenciação neuroendócrina das células cancerígenas [319]. Neste estudo, observamos níveis elevados de SIRT1 correlacionados com níveis elevados de REV-ERB- α na próstata. Este mecanismo regulatório mediado pelo REV-ERB- α fornece uma base molecular de como ele influencia a função mitocondrial e o metabolismo energético na próstata.

O exercício físico combinado reduziu a fosforilação da AMPK e, consequentemente, diminuiu os conteúdos proteicos de SIRT1 e PGC1 α , o que se correlacionou com a repressão do REV-ERB- α na próstata de animais idosos. A redução do REV-ERB α no músculo esquelético após o exercício físico também foi destacada por, da Rocha et al., [22]. A ablação global de REV-ERB α resulta em atividade reduzida da via de sinalização AMPK/SIRT1/PGC-1 α no músculo esquelético [320]. Por outro lado, esses reguladores de adaptação ao exercício são ativados pelo REV-ERB α . Houve aumento da ativação do REV-ERB α e maior expressão da via AMPK/SIRT1/PGC-1 α na próstata de camundongos idosos. Por outro lado, o exercício físico reduziu o REV-ERB α , levando à diminuição do conteúdo proteico da via. O estresse oxidativo ativa a AMPK para aumentar a glicólise. A ativação da AMPK pode reprogramar a disfunção

mitocondrial resultante do estresse oxidativo, alterando o status redox celular e a expressão de enzimas antioxidantes por meio de alterações na fosfofrutoquinase 2 (PFK2), forkhead box O3 (FOXO3), PGC1- α e mTOR [321]. Neste estudo, o aumento da defesa antioxidante total e da atividade da SOD em camundongos idosos sedentários pode refletir o ajuste do sistema de defesa antioxidante ao processo de envelhecimento, o que explicaria as concentrações semelhantes de oxidação lipídica entre animais sedentários jovens e idosos. Por sua vez, o exercício físico combinado manteve o aumento da defesa antioxidante em camundongos velhos, além de restaurar o dano oxidativo aos lipídeos e SOD a valores semelhantes em camundongos jovens, o que comprova seu efeito benéfico no estado redox. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas pelas mitocôndrias e pelos sistemas de transporte de elétrons do retículo endoplasmático contribuem para o envelhecimento [322]. Neste estudo, o exercício físico combinado reduziu TBARS e aumentou a capacidade antioxidante total em comparação com camundongos jovens. Os sistemas antioxidantes, especialmente SOD e catalase (CAT), desempenham um papel importante no controle de ERO em níveis baixos. O sistema circadiano e as proteínas do relógio circadiano podem estar envolvidos no reparo do DNA e na regulação do acúmulo celular de ROS [323]. Esses achados reforçam que a atividade do REV-ERB α controla a adaptação metabólica por meio da regulação da capacidade oxidativa mitocondrial.

O ritmo circadiano na próstata pode ser influenciado por andrógenos [324]. Com o envelhecimento, a deficiência de andrógenos pode levar a desregulações na expressão dos genes do relógio central, causando padrões de regulação negativa e de regulação positiva [324]. Chatterjee, [325] constataram que a expressão de AR na próstata de animais de 18 a 24 meses é reduzida, correlacionada com o aumento da hiperplasia prostática benigna [326]. Neste estudo, a expressão de AR na próstata de camundongos sedentários (Sed) e treinados (TR) de 18 meses de idade foi regulada negativamente em comparação com camundongos jovens. BMAL1 e CLOCK são regulados positivamente pela testosterona, indicando sua sensibilidade à sinalização androgênica [327]. Por outro lado, a expressão de *Per2* e *Nr1d1* é regulada negativamente em resposta à testosterona [324]. Curiosamente, o efeito estimulador da testosterona na expressão de BMAL1 e CLOCK pode envolver a supressão de *Nr1d1*, destacando ainda mais a intrincada relação entre andrógenos e o relógio molecular na biologia da próstata [310]. A baixa expressão do REV-ERB- α prostático no grupo treinado de 18 meses apresenta correlação positiva com a expressão do AR. Por outro lado, o exercício físico combinado pode ter um efeito estimulador na expressão de *Bmal1* em parte por meio da regulação negativa de *Nr1d1* e REV-ERB α e modificação da expressão de AR.

Por outro lado, a regulação negativa de AR levaria à regulação negativa da via PI3K/AKT [328]. As moléculas PI3K/AKT e PTEN interagem com diversas vias no microambiente prostático, potencialmente ativando vias proliferativas e inibindo vias apoptóticas [329]. A principal causa que leva ao aumento da via PI3K/AKT nos cânceres de próstata é a mutação

genética que promove a perda da função da PTEN, enzima cujo papel é inibir a via PI3K/AKT, a sobrevivência celular e a progressão proliferativa, sendo um fator crítico supressor tumoral no microambiente prostático [330]. Aqui, verificamos que o exercício físico combinado aumentou a expressão de PI3K/AKT e PTEN. O BMAL1 desempenha um papel regulador na fosforilação de PTEN, levando a um aumento da atividade de GSK-3 α/β através da inibição da via de sinalização PI3K/AKT [331]. Além disso, BMAL1 atua como um contrarregulador para a expressão de REV-ERB α . Notavelmente, o grupo treinado de 18 meses mostrou uma correlação negativa entre REV-ERB α e PI3K, mas uma correlação positiva com AKT. Essas descobertas lançam luz sobre a complexa interação entre os genes do relógio circadiano, o exercício e a via PI3K/AKT na próstata, enfatizando o potencial do treinamento físico combinado como um modulador das vias relacionadas ao câncer de próstata.

Além de suas funções reguladoras circadianas, foi relatado que o REV-ERB α também regula a proliferação e diferenciação celular. Existe uma forte relação entre PTEN e p53, e ambos regulam a proliferação e morte celular [332]. Neste estudo, camundongos sedentários exibiram um aumento na expressão de REV-ERB α e p21 enquanto experimentaram uma diminuição nos níveis de p53 e caspase 3. O p21 também é um alvo crucial da ativação do p53 após danos no DNA [333]. Os genes do relógio REV-ERB α e ROR α podem suprimir ou estimular a expressão de p21 [334]. Por outro lado, quando o exercício combinado foi introduzido em camundongos idosos, *Bmal1* aumentou, REV-ERB α diminuiu e a expressão de p53 e caspase 3 elevou, enquanto a expressão de p21 permaneceu inalterada.

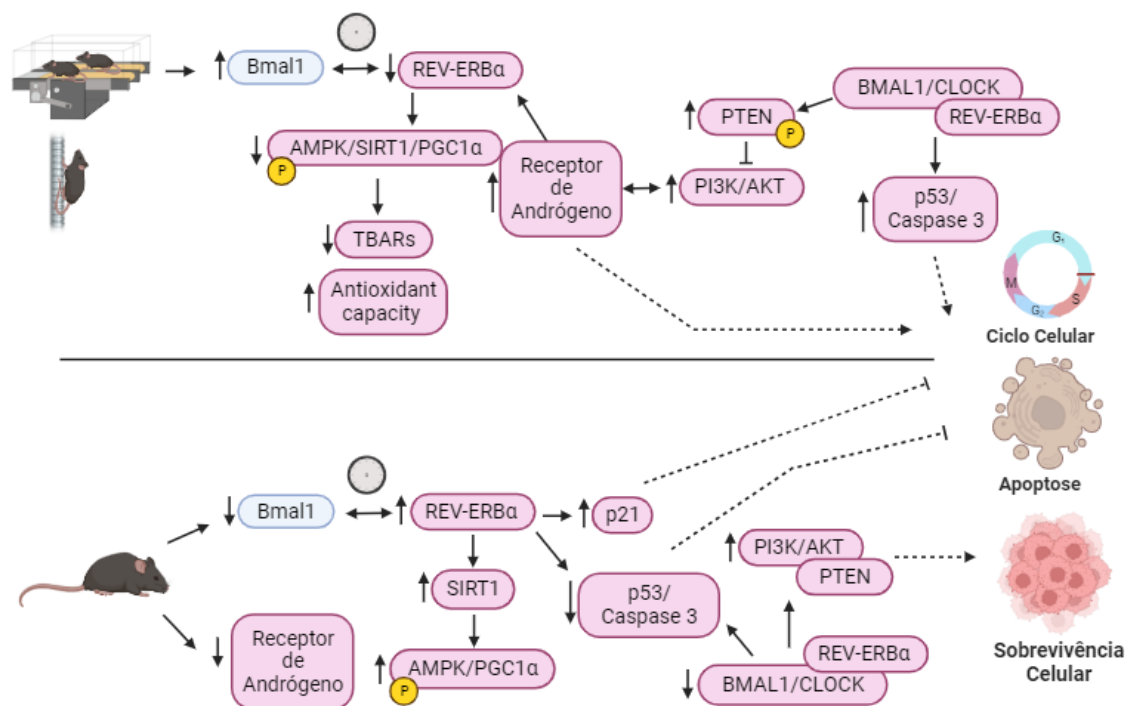
Investigando roedores submetidos a um protocolo de treinamento de força de 13 semanas, [290], verificaram aumento de BAX e Caspase 3, ambas proteínas envolvidas na cascata de indução da apoptose, bem como redução da proteína BCL-2 que inibe a liberação do citocromo C e o início da apoptose. No câncer de próstata, o reparo do DNA é danificado, promovendo inibição ou redução da capacidade de induzir apoptose e um aumento significativo na proliferação de células mutantes, levando à malignidade carcinogênica [335]. A inibição de BMAL1 ou CLOCK interrompe o ciclo celular na fase S/G2, o que provavelmente está associado ao aumento da expressão de p53 e p21 e níveis reduzidos de CICLINA B1 [336]. Esses achados sugerem que o exercício físico combinado durante o envelhecimento promove aumento da expressão de Bmal, concomitante com a regulação positiva de p53/PTEN/caspase 3, potencializando o potencial apoptótico. Essas mudanças moleculares podem contribuir para uma regulação mais equilibrada da proliferação celular e apoptose, impactando potencialmente a saúde celular geral e os processos de envelhecimento.

Por meio do conjunto de dados GEO, modulações significativas em genes circadianos (*Nr1d1* e *Nr1d2*), marcadores mitocondriais (*Sirt1* e *Ppargc1a*), marcadores metabólicos (*Pik3r2*, *Akt1* e *Akt2*), apoptose (Caspase 3) e oncogenes (*Pten* e *Trp53*) foram observados. Curiosamente, camundongos idosos mostraram níveis de mRNA *Nr1d1* alterados. Essa ideia de que mudanças

no ritmo circadiano podem ter efeitos metabólicos na próstata, conforme publicado anteriormente [26]. Essas descobertas destacam os efeitos metabólicos potenciais do ritmo circadiano na saúde da próstata. Além disso, os marcadores mitocondriais mudam com a idade, sugerindo envolvimento circadiano no envelhecimento da próstata.

O exercício físico combinado durante o envelhecimento promoveu aumento de *Bmal1* e redução de *REV-ERB α* na próstata, concomitantemente com diminuição das proteínas *AMPK/SIRT1/PGC-1 α* e aumento de *PI3K/AKT* e *p53/PTEN/caspase 3* promovendo potencial apoptótico (Figura 2.5). Aqui relatamos que o papel preventivo do exercício físico de força e aeróbico no desenvolvimento de alterações moleculares pré-neoplásicas e características de senilidade foi devido à restauração de *Bmal1* e *REV-ERB α* em tecidos prostáticos (Figura 2.5). Estudos futuros são necessários para vincular essas observações moleculares ao risco de câncer mediado pela modulação circadiana e aos efeitos do exercício físico na próstata.

Figura 9



Legenda: O papel do exercício físico combinado durante o envelhecimento. O aumento da expressão de *Bmal1* reduz o *REV-ERB α* , concomitante com o upregulation de *p53/PTEN/caspase 3*, promovendo potencial apoptótico em camundongos velhos treinados. A expressão reduzida de *Bmal1* e aumentada de *REV-ERB α* em camundongos idosos sedentários promove a progressão do ciclo celular e reduz a apoptose. Essas alterações moleculares podem contribuir para regular a proliferação celular e apoptose prostática e compreender o papel preventivo do exercício físico combinado no desenvolvimento de alterações moleculares pré-neoplásicas. Imagem criada com BioRender.com.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças prostáticas são originadas principalmente durante o envelhecimento. O qual é um processo natural e fisiológico, interfere em diversos mecanismos celulares, hormonais, metabólicos e imunológicos de maneira sistêmica. Modificações nesses processos, favorecem o desenvolvimento de alterações inicialmente intracelulares prostáticas, que evoluem para alterações teciduais e lesões pré-neoplásicas, sendo consideradas precursora de câncer prostático. Com isso, podemos dizer que o envelhecimento leva ao desenvolvimento de câncer de próstata, principalmente em idades avançadas.

Inicialmente, a carcinogênese prostática pode ser identificada através de modificações morfológicas nas células prostáticas, com núcleo alterado, epitélio disfuncional, estroma ativado, e presença de infiltrado inflamatório. A fim de caracterizar o perfil histopatológico prostático durante o processo de envelhecimento em camundongos jovens e camundongos idosos, verificamos a incidência de lesões na próstata ventral, e verificamos que apesar de não haver alteração no peso prostático, os animais com idade mais avançadas, principalmente os animais de 24 meses de idade, possuem maiores incidências de lesões pré-neoplásicas, associadas a metaplasia nuclear e focos inflamatórios teciduais. Essas alterações estão relacionadas com os fenótipos associados a senescência celular que possivelmente podem estar interferindo na manutenção da resposta ao dano no DNA, bem como sinalização carcinogênica em tecidos prostáticos.

Posterior a esse resultado hipotetizamos que o controle saudável das células prostáticas pudesse sofrer interferência da modulação do ritmo circadiano no envelhecimento. O que poderia ser um alvo promissor na prevenção e tratamento do alterações prostáticas que levam a carcinogênese. Com isso, verificamos que o envelhecimento promove redução nos níveis gênicos de *Bmal1* e aumento dos níveis de *Nr1d1* e valores proteicos de REV-ERB α . E observamos que o exercício físico combinado realizado durante o envelhecimento promove efeitos contrário ao processo do envelhecimento, como o aumento nos níveis gênicos de *Bmal1* e redução dos níveis de *Nr1d1* e valores proteicos de REV-ERB α . Ainda, observamos que esse mecanismo associados ao exercício físico promovem a redução de proteínas relacionados ao funcionamento e biogênese mitocondrial como AMPK/SIRT1/PGC1 α , onde ambas estão reduzidas com o protocolo de treinamento físico combinado e apresentam correlação positiva com a REV-ERB α . A fim de entender como a REV-ERB α pode modular as vias intracelulares prostáticas, verificamos que a REV-ERB α tem correlação positiva com o receptor androgênio e com AKT1 e caspase 3. Ainda animais idosos treinados apresentaram maiores valores proteicos dos supressores tumorais PTEN e p53/p21, proteínas de checkpoint importantes no desenvolvimento carcinogênico prostático, pelo mecanismo de controle de progressão ou parada do ciclo celular em uma célula com alto teor mutagênico. Por outro lado, os animais idosos sedentários não apresentam esse mesmo fenótipo molecular. Dessa forma podemos dizer que o envelhecimento leva a alterações moleculares

circadianas, modificando todo o microambiente prostático para o desenvolvimento tumoral, e a prática de exercício físico combinado mesmo em animais já considerados idosos, é capaz de reverter os danos associados ao envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G. Gandaglia, R. Leni, F. Bray, N. Fleshner, S.J. Freedland, A. Kibel, P. Stattin, H. Van Poppel, C. La Vecchia, *Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer*, *Eur Urol Oncol.* 4 (2021) 877–892. <https://doi.org/10.1016/J.EUO.2021.09.006>.
- [2] R.L. Siegel Mph, K.D. Miller, N. Sandeep, W. Mbbs, | Ahmedin, J. Dvm, R.L. Siegel, *Cancer statistics, 2023*, *CA Cancer J Clin.* 73 (2023) 17–48. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21763>.
- [3] INCA, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer, 2023. <https://www.gov.br/inca/pt-br> (accessed November 21, 2023).
- [4] M.B.B. Culp, I. Soerjomataram, J.A. Efstathiou, F. Bray, A. Jemal, *Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates*, *Eur Urol.* 77 (2020) 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.005>.
- [5] K.D. Miller, L. Nogueira, T. Devasia, A.B. Mariotto, K.R. Yabroff, A. Jemal, J. Kramer, R.L. Siegel, *Cancer treatment and survivorship statistics, 2022*, *CA Cancer J Clin.* 72 (2022) 409–436. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21731>.
- [6] N.A. Berger, *Obesity and cancer pathogenesis.*, *Ann N Y Acad Sci.* 1311 (2014) 57–76. <https://doi.org/10.1111/nyas.12416>.
- [7] S.E. Ackerman, O.A. Blackburn, F. Marchildon, P. Cohen, *Insights into the Link Between Obesity and Cancer*, *Curr Obes Rep.* 6 (2017) 195–203. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0263-x>.
- [8] D.K. Sarkar, *Fetal Alcohol Exposure Increases Susceptibility to Carcinogenesis and Promotes Tumor Progression in Prostate Gland*, in: 2015: pp. 389–402. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_23.
- [9] E.Z. Pytlowanciv, M.E. Pinto-Fochi, V. Reame, M.G. Gobbo, D.L. Ribeiro, S.R. Taboga, R.M. Góes, *Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood*, *Prostate.* 76 (2016) 662–678. <https://doi.org/10.1002/pros.23158>.
- [10] M. Shiota, M. Ushijima, K. Imada, E. Kashiwagi, A. Takeuchi, J. Inokuchi, K. Tatsugami, S. Kajioka, M. Eto, *Cigarette smoking augments androgen receptor activity and promotes resistance to antiandrogen therapy*, *Prostate.* (2019). 1147 – 115. <https://doi.org/10.1002/pros.23828>.
- [11] M. Ueda, J. Kono, A. Sengiku, Y. Nagumo, B.J. Mathis, S. Shimba, M.M. Taketo, T. Kobayashi, O. Ogawa, H. Negoro, *Bmal1 Regulates Prostate Growth via Cell-Cycle Modulation*, *Int J Mol Sci.* 23 (2022). 11272 – 11282. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911272>.
- [12] N. Torrealba, G. Rodríguez-Berriguete, R. Vera, B. Fraile, G. Olmedilla, P. Martínez-Onsurbe, M. Sánchez-Chapado, R. Paniagua, M. Royuela, *Homeostasis: apoptosis and cell cycle in normal and pathological prostate*, *Aging Male.* 23 (2020) 335–345. <https://doi.org/10.1080/13685538.2018.1470233>.
- [13] J.R. Packer, N.J. Maitland, *The molecular and cellular origin of human prostate cancer*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1863 (2016) 1238–1260. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.02.016>.

- [14] A. Montaruli, L. Castelli, A. Mulè, R. Scurati, F. Esposito, L. Galasso, E. Roveda, Biological Rhythm and Chronotype: New Perspectives in Health, *Biomolecules*. 11 (2021). 487- 507. <https://doi.org/10.3390/BIOM11040487>.
- [15] V.A. Acosta-Rodríguez, F. Rijo-Ferreira, C.B. Green, J.S. Takahashi, Importance of circadian timing for aging and longevity, *Nat Commun*. 12 (2021). 2862 – 2874. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-22922-6>.
- [16] J. Mattis, A. Sehgal, Circadian Rhythms, Sleep, and Disorders of Aging, *Trends Endocrinol Metab*. 27 (2016) 192 – 203. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2016.02.003>.
- [17] R.W. Logan, C.A. McClung, Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan, *Nat Rev Neurosci*. 20 (2019) 49–65. <https://doi.org/10.1038/S41583-018-0088-Y>.
- [18] H. Duez, B. Staels, Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism, *J Appl Physiol*. 107 (2009) 1972 – 1980. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00570.2009>.
- [19] J.E. Gibbs, J. Blaikley, S. Beesley, L. Matthews, K.D. Simpson, S.H. Boyce, S.N. Farrow, K.J. Else, D. Singh, D.W. Ray, A.S.I. Loudon, The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (2012) 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106750109>.
- [20] P. Bebas, C.P. Goodall, M. Majewska, A. Neumann, J.M. Giebultowicz, P.E. Chappell, Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice, *FASEB J*. 23 (2009) 523–533. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-113191>.
- [21] A.P. Pinto, V.R. Muñoz, M.E.A. Tavares, J.R. dos Santos, M.A. Rebelo, L.C. Alberici, F.M. Simabuco, G.R. Teixeira, J.R. Pauli, L.P. de Moura, D.E. Cintra, E.R. Ropelle, E.C. Freitas, D.A. Rivas, A.S.R. da Silva, Combined physical exercise reverses the reduced expression of Bmal1 in the liver of aged mice, *Life Sci*. 312 (2022). 121175 – 121189. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.121175>.
- [22] A.L. da Rocha, A.P. Pinto, B.L.S. Bedo, G.P. Morais, L.C. Oliveira, R.O.G. Carolino, J.R. Pauli, F.M. Simabuco, L.P. de Moura, E.R. Ropelle, D.E. Cintra, D.A. Rivas, A.S.R. da Silva, Exercise alters the circadian rhythm of REV-ERB- α and downregulates autophagy-related genes in peripheral and central tissues, *Sci Rep*. 12 (2022). 20006 – 20019. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-24277-4>.
- [23] C. Qi, S. Gery, A. Dashti, Y. Dong, Z. Yan, G. Jiang, H.P. Koeffler, A role for the clock gene per1 in prostate cancer, *Cancer Res*. 69 (2009) 7619–7625. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4199>.
- [24] M.G. Wendeu-Foyet, Y. Koudou, S. Cénée, B. Trétarre, X. Rébillard, G. Cancellassin, O. Cussenot, A. Boland, D. Bacq, J.F. Deleuze, P.J. Lamy, C. Mulot, P. Laurent-Puig, T. Truong, F. Menegaux, Circadian genes and risk of prostate cancer: Findings from the EPICAP study, *Int J Cancer*. 145 (2019) 1745–1753. <https://doi.org/10.1002/IJC.32149>.
- [25] J. Wang, J.X. Zou, X. Xue, D. Cai, Y. Zhang, Z. Duan, Q. Xiang, J.C. Yang, M.C. Louie, A.D. Borowsky, A.C. Gao, C.P. Evans, K.S. Lam, J. Xu, H.J. Kung, R.M.

- Evans, Y. Xu, H.W. Chen, ROR- γ drives androgen receptor expression and represents a therapeutic target in castration-resistant prostate cancer, *Nat Med.* 22 (2016) 488–496. <https://doi.org/10.1038/NM.4070>.
- [26] W.Z. Zhu, Q.Y. He, D.C. Feng, Q. Wei, L. Yang, Circadian rhythm in prostate cancer: time to take notice of the clock, *Asian J Androl.* 25 (2023) 184–191. <https://doi.org/10.4103/AJA202255>.
- [27] P. Kemoun, I. Ader, V. Planat-Benard, C. Dray, N. Fazilleau, P. Monsarrat, B. Cousin, J. Paupert, M. Ousset, A. Lorisgnol, I. Raymond-Letron, B. Vellas, P. Valet, T. Kirkwood, J. Beard, L. Pénicaud, L. Casteilla, A gerophysiology perspective on healthy ageing, *Ageing Res Rev.* 73 (2022) 101537 - 101540. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101537>.
- [28] L.K. Chen, Urbanization and population aging: Converging trends of demographic transitions in modern world, *Arch Gerontol Geriatr.* 101 (2022). 104709 – 104712. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHGER.2022.104709>.
- [29] IBGE | Portal do IBGE | IBGE, (n.d.). <https://www.ibge.gov.br/> (accessed August 22, 2023).
- [30] Population Pyramids of the World from 1950 to 2100 - PopulationPyramid.net, (n.d.). <https://www.populationpyramid.net/> (accessed July 27, 2023).
- [31] S.I. tsuko Ciosak, E. Braz, M.F. ernanda B.N. eves A. Costa, N.G. onçalves R. Nakano, J. Rodrigues, R.A. guiar Alencar, A.C. arolina A.L. da Rocha, Senescence and senility: the new paradigm in primary health care, *Rev Esc Enferm USP.* 45 Spec No 2 (2011) 1763–1768. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342011000800022>.
- [32] S.M. Friedman, Lifestyle (Medicine) and Healthy Aging, *Clin Geriatr Med.* 36 (2020) 645–653. <https://doi.org/10.1016/J.CGER.2020.06.007>.
- [33] L. Demetrius, Aging in Mouse and Human Systems, *Ann N Y Acad Sci.* 1067 (2006) 66–82. <https://doi.org/10.1196/ANNALS.1354.010>.
- [34] S. Dutta, P. Sengupta, Men and mice: Relating their ages, *Life Sci.* 152 (2016) 244–248. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2015.10.025>.
- [35] A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria, A. Alimonti, Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury, *Physiol Rev.* 99 (2019) 1047–1078. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00020.2018>.
- [36] L. Hayflick, P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res.* 25 (1961) 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).
- [37] C.P. Chiu, C.B. Harley, Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase, *Proc Soc Exp Biol Med.* 214 (1997) 99–106. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44075>.
- [38] C.E. Helt, W.A. Cliby, P.C. Keng, R.A. Bambara, M.A. O'Reilly, Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and ATM and Rad3-related Protein Exhibit Selective Target Specificities in Response to Different Forms of DNA Damage, *Journal of Biological Chemistry.* 280 (2005) 1186–1192. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410873200>.

- [39] A. Maréchal, L. Zou, DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5 (2013). 12716 – 12730. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012716>.
- [40] P. Wang, L. Han, H. Shen, P. Wang, C. Lv, G. Zhao, J. Niu, L. Xue, Q.J. Wang, T. Tong, J. Chen, Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (2014) 7683–7688. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1310972111>.
- [41] R. Horbay, R. Bilyy, Mitochondrial dynamics during cell cycling, *Apoptosis.* 21 (2016) 1327–1335. <https://doi.org/10.1007/S10495-016-1295-5>.
- [42] N.S. Gasek, G.A. Kuchel, J.L. Kirkland, M. Xu, Strategies for Targeting Senescent Cells in Human Disease, *Nat Aging.* 1 (2021) 870–879. <https://doi.org/10.1038/S43587-021-00121-8>.
- [43] R. Shmulevich, V. Krizhanovsky, Cell Senescence, DNA Damage, and Metabolism, *Antioxid Redox Signal.* 34 (2021) 324–334. <https://doi.org/10.1089/ARS.2020.8043>.
- [44] Z. Weng, Y. Wang, T. Ouchi, H. Liu, X. Qiao, C. Wu, Z. Zhao, L. Li, B. Li, Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies, *Stem Cells Transl Med.* 11 (2022) 356–371. <https://doi.org/10.1093/STCLTM/SZAC004>.
- [45] T. Ahmad, I.K. Sundar, C.A. Lerner, J. Gerloff, A.M. Tormos, H. Yao, I. Rahman, Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease, *FASEB J.* 29 (2015) 2912–2929. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-268276>.
- [46] W.H. Chappell, L.S. Steelman, J.M. Long, R.C. Kempf, S.L. Abrams, R.A. Franklin, J. Bäsecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, M.C. Mazzarino, F. Nicoletti, M. Libra, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, G. Montalto, M. Cervello, P. Laidler, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, C. Evangelisti, L. Cocco, A.M. Martelli, J.A. McCubrey, Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health, *Oncotarget.* 2 (2011) 135–164. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.240>.
- [47] P. Davalli, T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola, D. D’Arca, ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases, *Oxid Med Cell Longev.* 2016 (2016). 10 – 25. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>.
- [48] B.E. Engel, W.D. Cress, P.G. Santiago-Cardona, THE RETINOBLASTOMA PROTEIN: A MASTER TUMOR SUPPRESSOR ACTS AS A LINK BETWEEN CELL CYCLE AND CELL ADHESION, *Cell Health Cytoskelet.* 7 (2015) 1 – 10. <https://doi.org/10.2147/CHC.S28079>.
- [49] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, Hallmarks of Cellular Senescence, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
- [50] R. Kumari, P. Jat, Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype, *Front Cell Dev Biol.* 9 (2021). 9 – 29. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.645593>.

- [51] C. Franceschi, P. Garagnani, P. Parini, C. Giuliani, A. Santoro, Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases, *Nat Rev Endocrinol.* 14 (2018) 576–590. <https://doi.org/10.1038/S41574-018-0059-4>.
- [52] A.C. Da Cruz, F. Petronilho, C.C.V. Heluany, F. Vuolo, S.P. Miguel, J. Quevedo, M.A. Romano-Silva, F. Dal-Pizzol, Oxidative stress and aging: correlation with clinical parameters, *Aging Clin Exp Res.* 26 (2014) 7–12. <https://doi.org/10.1007/S40520-013-0176-9>.
- [53] J.P. de Magalhães, J.F. Passos, Stress, cell senescence and organismal ageing, *Mech Ageing Dev.* 170 (2018) 2–9. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.07.001>.
- [54] J. Beck, I. Horikawa, C. Harris, Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models, *Vet Pathol.* 57 (2020) 747–757. <https://doi.org/10.1177/0300985820943841>.
- [55] C.L. Chen, C.Y. Lin, H.J. Kung, Targeting Mitochondrial OXPHOS and Their Regulatory Signals in Prostate Cancers, *Int J Mol Sci.* 22 (2021). 13435 – 13451. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413435>.
- [56] P. Verze, T. Cai, S. Lorenzetti, The role of the prostate in male fertility, health and disease, *Nat Rev Urol.* 13 (2016) 379–386. <https://doi.org/10.1038/NRUROL.2016.89>.
- [57] C.H. Lee, O. Akin-Olugbade, A. Kirschenbaum, Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 40 (2011) 565–575. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>.
- [58] J.E. McNeal, The zonal anatomy of the prostate, *Prostate.* 2 (1981) 35–49. <https://doi.org/10.1002/PROS.2990020105>.
- [59] D.S.M. Oliveira, S. Dzinic, A.I. Bonfil, A.D. Saliganan, S. Sheng, R.D. Bonfil, The mouse prostate: A basic anatomical and histological guideline, *Bosn J Basic Med Sci.* 16 (2016) 8–13. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.917>.
- [60] A.H. Wilson, The Prostate Gland: A Review of its Anatomy, Pathology, and Treatment, *JAMA.* 312 (2014) 13435 – 13451. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.279650>.
- [61] M. Ittmann, Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8 (2018). 5 – 9. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030346>.
- [62] J. Szczyrba, A. Niesen, M. Wagner, P.M. Wandernoth, G. Aumüller, G. Wennemuth, Neuroendocrine Cells of the Prostate Derive from the Neural Crest, *Journal of Biological Chemistry.* 292 (2017) 2021–2031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755082>.
- [63] L.T. Aaron, O.E. Franco, S.W. Hayward, Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia, *Urologic Clinics of North America.* 43 (2016) 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>.
- [64] G. Wang, D. Zhao, D.J. Spring, R.A. Depinho, Genetics and biology of prostate cancer, *Genes Dev.* 32 (2018) 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/GAD.315739.118>.

- [65] O. V Korshak, E.N. Sushilova, M.A. Voskresenskii, R. V Grozov, B.K. Komyakov, A.Y. Zarytsky, B. V Popov, [Basal-luminal epithelial cell differentiation in prostate cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition and epithelium migration in the mesenchyme]., *Urology*. (2016) 85–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28248026> (accessed May 12, 2019).
- [66] G.R. Cunha, C.M. Vezina, D. Isaacson, W.A. Ricke, B.G. Timms, M. Cao, O. Franco, L.S. Baskin, Development of the human prostate, *Differentiation*. (2018). 24 – 45. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2018.08.005>.
- [67] F. Pederzoli, M. Raffo, H. Pakula, F. Ravera, P.V. Nuzzo, M. Loda, “Stromal cells in prostate cancer pathobiology: friends or foes?,” *Br J Cancer*. 128 (2023) 930–939. <https://doi.org/10.1038/S41416-022-02085-X>.
- [68] I. Leav, K.M. Lau, J.Y. Adams, J.E. McNeal, M.E. Taplin, J. Wang, H. Singh, S.M. Ho, Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma, *Am J Pathol*. 159 (2001) 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61676-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61676-8).
- [69] G.R. Cunha, S.W. Hayward, Y.Z. Wang, Role of stroma in carcinogenesis of the prostate, *Differentiation*. 70 (2002) 473–485. <https://doi.org/10.1046/J.1432-0436.2002.700902.X>.
- [70] O. Imamov, G.J. Shim, M. Warner, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptor beta in health and disease, *Biol Reprod*. 73 (2005) 866–871. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.105.043497>.
- [71] M.A. Liss, I.M. Thompson, Prostate cancer prevention with 5-alpha reductase inhibitors: concepts and controversies, *Curr Opin Urol*. 28 (2018) 42–45. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000464>.
- [72] B.G. Keevil, J. Adaway, Assessment of free testosterone concentration, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 190 (2019) 207–211. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2019.04.008>.
- [73] Z. Weihua, M. Warner, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptor beta in the prostate, *Mol Cell Endocrinol*. 193 (2002) 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00089-8).
- [74] T.M. Nicholson, W.A. Ricke, Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future., *Differentiation*. 82 (2011) 184–99. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.04.006>.
- [75] L. Vignozzi, G. Rastrelli, G. Corona, M. Gacci, G. Forti, M. Maggi, Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease?, *J Endocrinol Invest*. 37 (2014) 313–322. <https://doi.org/10.1007/s40618-014-0051-3>.
- [76] D.-L. Yang, J.-W. Xu, J.-G. Zhu, Y.-L. Zhang, J.-B. Xu, Q. Sun, X.-N. Cao, W.-L. Zuo, R.-S. Xu, J.-H. Huang, F.-N. Jiang, Y.-J. Zhuo, B.-Q. Xiao, Y.-Z. Liu, D.-B. Yuan, Z.-L. Sun, H.-C. He, Z.-R. Lun, W.-D. Zhong, W.-L. Zhou, Role of GPR30 in estrogen-induced prostate epithelial apoptosis and benign prostatic hyperplasia, *Biochem Biophys Res Commun*. 487 (2017) 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.047>.

- [77] A.A. Sinha, F.E. Pomroy, M.J. Wilson, Concurrent Androgen and Estrogen Ablation and Inhibition of Steroid Biosynthetic Enzyme Treatment for Castration-resistant Prostate Cancer., *Anticancer Res.* 36 (2016) 3847–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466486> (accessed May 12, 2019).
- [78] L. Tang, M.E. Platek, S. Yao, C. Till, P.J. Goodman, C.M. Tangen, Y. Wu, E.A. Platz, M.L. Neuhaus, F.Z. Stanczyk, J.K. V Reichardt, R.M. Santella, A. Hsing, W.D. Figg, S.M. Lippman, I.M. Thompson, C.B. Ambrosone, Associations between polymorphisms in genes related to estrogen metabolism and function and prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial, *Carcinogenesis*. 39 (2018) 125–133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx144>.
- [79] H. Bonkhoff, Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression, *Prostate*. 78 (2018) 2–10. <https://doi.org/10.1002/PROS.23446>.
- [80] D. Tong, Selective estrogen receptor modulators contribute to prostate cancer treatment by regulating the tumor immune microenvironment, *J Immunother Cancer*. 10 (2022). 29 – 44. <https://doi.org/10.1136/JITC-2021-002944>.
- [81] P. Mak, J. Li, S. Samanta, C. Chang, D.J. Jerry, R.J. Davis, I. Leav, A.M. Mercurio, Prostate tumorigenesis induced by PTEN deletion involves estrogen receptor β repression, *Cell Rep.* 10 (2015) 1982–1991. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.02.063>.
- [82] A.M. De Marzo, A.K. Meeker, S. Zha, J. Luo, M. Nakayama, E.A. Platz, W.B. Isaacs, W.G. Nelson, Human prostate cancer precursors and pathobiology, *Urology*. 62 (2003) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.09.053>.
- [83] H.Y. Wong, Q. Sheng, A.B. Hesterberg, S. Croessmann, B.L. Rios, K. Giri, J. Jackson, A.X. Miranda, E. Watkins, K.R. Schaffer, M. Donahue, E. Winkler, D.F. Penson, J.A. Smith, S.D. Herrell, A.N. Luckenbaugh, D.A. Barocas, Y.J. Kim, D. Graves, G.A. Giannico, J.C. Rathmell, B.H. Park, J.B. Gordetsky, P.J. Hurley, Single cell analysis of cribriform prostate cancer reveals cell intrinsic and tumor microenvironmental pathways of aggressive disease, *Nat Commun*. 13 (2022). 6036 –6057 <https://doi.org/10.1038/S41467-022-33780-1>.
- [84] V.M. Carrero-López, J.M. Cózar-Olmo, B. Miñana-López, Hiperplasia prostática benigna y síntomas del tracto urinario inferior. Revisión de las evidencias actuales, *Actas Urol Esp.* 40 (2016) 288–294. <https://doi.org/10.1016/J.ACUIRO.2015.12.008>.
- [85] C.M. Devlin, M.S. Simms, N.J. Maitland, Benign prostatic hyperplasia – what do we know?, *BJU Int.* 127 (2021) 389–399. <https://doi.org/10.1111/BJU.15229>.
- [86] Z. Wang, A.F. Olumi, Diabetes, growth hormone-insulin-like growth factor pathways and association to benign prostatic hyperplasia, *Differentiation*. 82 (2011) 261–271. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2011.04.004>.
- [87] M. Cariello, S. Ducheix, S. Maqdasy, S. Baron, A. Moschetta, J.M.A. Lobaccaro, LXRs, SHP, and FXR in Prostate Cancer: Enemies or Ménage à Quatre With AR?, *Nucl Recept Signal.* 15 (2018). 1 – 10. <https://doi.org/10.1177/1550762918801070>.

- [88] X. Li, Y.-T. Chen, P. Hu, W.-C. Huang, Fatostatin displays high antitumor activity in prostate cancer by blocking SREBP-regulated metabolic pathways and androgen receptor signaling., *Mol Cancer Ther.* 13 (2014) 855–66. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0797>.
- [89] S. Wang, P.A.G. Clarke, R. Davis, S. Mumuni, B. Kwabi-Addo, Sex steroid-induced DNA methylation changes and inflammation response in prostate cancer, *Cytokine.* 86 (2016) 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.07.006>.
- [90] C.-Y. Kim, K.-S. Chung, S.-Y. Cheon, J.-H. Lee, Y.-B. Park, H.-J. An, Rice Hull Extract Suppresses Benign Prostate Hyperplasia by Decreasing Inflammation and Regulating Cell Proliferation in Rats, *J Med Food.* 19 (2016) 746–754. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3686>.
- [91] J.R. Packer, N.J. Maitland, The molecular and cellular origin of human prostate cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1863 (2016) 1238–1260. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.02.016>.
- [92] J.H. Park, J.E. Walls, J.J. Galvez, M. Kim, C. Abate-Shen, M.M. Shen, R.D. Cardiff, Prostatic Intraepithelial Neoplasia in Genetically Engineered Mice, *Am J Pathol.* 161 (2002) 727 - 735. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64228-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64228-9).
- [93] P.K. Majumder, C. Grisanzio, F. O’Connell, M. Barry, J.M. Brito, Q. Xu, I. Guney, R. Berger, P. Herman, R. Bikoff, G. Fedele, W.K. Baek, S. Wang, K. Ellwood-Yen, H. Wu, C.L. Sawyers, S. Signoretti, W.C. Hahn, M. Loda, W.R. Sellers, A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression, *Cancer Cell.* 14 (2008) 146–155. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2008.06.002>.
- [94] M.J. Droller, Medical approaches in the management of prostatic disease, *Br J Urol.* 79 Suppl 2 (1997) 42–52. <https://doi.org/10.1111/J.1464-410X.1997.TB16920.X>.
- [95] P. Davies, C.L. Eaton, Regulation of prostate growth, *J Endocrinol.* 131 (1991) 5–17. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1310005>.
- [96] J.M. Kaufman, B. Lapauw, A. Mahmoud, G. T’Sjoen, I.T. Huhtaniemi, Aging and the Male Reproductive System, *Endocr Rev.* 40 (2019) 906–972. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00178>.
- [97] J. Bain, Testosterone and the aging male: To treat or not to treat?, *Maturitas.* 66 (2010) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.01.009>.
- [98] F.B. Calmasini, C.G. McCarthy, C.F. Wenceslau, F.B.M. Priviero, E. Antunes, R.C. Webb, Toll-like receptor 9 regulates metabolic profile and contributes to obesity-induced benign prostatic hyperplasia in mice, *Pharmacological Reports.* 72 (2020) 179–187. <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00010-3>.
- [99] A.M. De Marzo, Y. Nakai, W.G. Nelson, Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis, *Urol Oncol.* 25 (2007) 398–400. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2007.05.007>.
- [100] A.M. De Marzo, V.L. Marchi, J.I. Epstein, W.G. Nelson, Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis, *Am J Pathol.* 155 (1999) 1985–1992. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65517-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65517-4).

- [101] M.J. Putzi, A.M. De Marzo, Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, *Urology*. 56 (2000) 828–832. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00776-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00776-7).
- [102] A. Vikram, G. Jena, P. Ramarao, Insulin-resistance and benign prostatic hyperplasia: The connection, *Eur J Pharmacol*. 641 (2010) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.05.042>.
- [103] D.P. Nguyen, J. Li, A.K. Tewari, Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6)., *BJU Int*. 113 (2014) 986–92. <https://doi.org/10.1111/bju.12452>.
- [104] L.M. Aaron-Brooks, T. Sasaki, R.E. Vickman, L. Wei, O.E. Franco, Y. Ji, S.E. Crawford, S.W. Hayward, Hyperglycemia and T Cell infiltration are associated with stromal and epithelial prostatic hyperplasia in the nonobese diabetic mouse, *Prostate*. (2019) 980 – 993. <https://doi.org/10.1002/pros.23809>.
- [105] M. Sellami, M. Gasmi, J. Denham, L.D. Hayes, D. Stratton, J. Padulo, N. Bragazzi, Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunological Parameters in the Elderly Aged: Can Physical Activity Counteract the Effects of Aging?, *Front Immunol*. 9 (2018). 2187 – 2204. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02187>.
- [106] V. Srinivasan, S. R. Pandi-Perumal, A. Brzezinski, K. P. Bhatnagar, D. P. Cardinali, Melatonin, immune function and cancer, *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 5 (2011) 109–123. <https://doi.org/10.2174/187221411799015408>.
- [107] S.H. Abidi, F. Bilwani, K. Ghias, F. Abbas, Viral etiology of prostate cancer: Genetic alterations and immune response. A literature review, *Int J Surg*. 52 (2018) 136–140. <https://doi.org/10.1016/J.IJSU.2018.02.050>.
- [108] G. Taverna, M. Seveso, G. Giusti, R. Hurle, P. Graziotti, S. Štifter, M. Chiriva-Internati, F. Grizzi, Senescent remodeling of the innate and adaptive immune system in the elderly men with prostate cancer, *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2014 (2014). 478126 – 478137. <https://doi.org/10.1155/2014/478126>.
- [109] G. Fiard, V. Stavrinides, E.S. Chambers, S. Heavey, A. Freeman, R. Ball, A.N. Akbar, M. Emberton, Cellular senescence as a possible link between prostate diseases of the ageing male, *Nature Reviews Urology* 2021 18:10. 18 (2021) 597–610. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00496-8>.
- [110] J.P. Coppé, C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Muñoz, J. Goldstein, P.S. Nelson, P.Y. Desprez, J. Campisi, Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol*. 6 (2008). 2855 – 2868. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060301>.
- [111] Z. Cao, L. Wei, W. Zhu, X. Yao, Meta-analysis of CDKN2A methylation to find its role in prostate cancer development and progression, and also to find the effect of CDKN2A expression on disease-free survival (PRISMA), *Medicine*. 97 (2018). 182 – 193. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010182>.
- [112] S. Parrinello, J.P. Coppe, A. Krtolica, J. Campisi, Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation, *J Cell Sci*. 118 (2005) 485–496. <https://doi.org/10.1242/JCS.01635>.

- [113] C. Bavik, I. Coleman, J.P. Dean, B. Knudsen, S. Plymate, P.S. Nelson, The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms, *Cancer Res.* 66 (2006) 794–802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1716>.
- [114] A.A. Sadighi Akha, Aging and the immune system: An overview, *J Immunol Methods.* 463 (2018) 21–26. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2018.08.005>.
- [115] H. Cho, X. Zhao, M. Hatori, R.T. Yu, G.D. Barish, M.T. Lam, L.W. Chong, L. Ditacchio, A.R. Atkins, C.K. Glass, C. Liddle, J. Auwerx, M. Downes, S. Panda, R.M. Evans, Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β , *Nature.* 485 (2012) 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11048>.
- [116] A.M. Rosenwasser, F.W. Turek, Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation, *Sleep Med Clin.* 10 (2015) 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.JSMC.2015.08.003>.
- [117] C. Benna, C. Helfrich-Förster, S. Rajendran, H. Monticelli, P. Pilati, D. Nitti, S. Mocellin, Genetic variation of clock genes and cancer risk: A field synopsis and meta-analysis, *Oncotarget.* 8 (2017) 23978–23995. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15074>.
- [118] E. Woltdt, Y. Sebt, L.A. Solt, C. Duhem, S. Lancel, J. Eeckhoutte, M.K.C. Hesselink, C. Paquet, S. Delhay, Y. Shin, T.M. Kamenecka, G. Schaart, P. Lefebvre, R. Nevière, T.P. Burris, P. Schrauwen, B. Staels, H. Duez, Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy, *Nat Med.* 19 (2013) 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/nm.3213>.
- [119] L. Yin, M.A. Lazar, The Orphan Nuclear Receptor Rev-erb α Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene, *Molecular Endocrinology.* 19 (2005) 1452–1459. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0057>.
- [120] J.E. Gibbs, J. Blaikley, S. Beesley, L. Matthews, K.D. Simpson, S.H. Boyce, S.N. Farrow, K.J. Else, D. Singh, D.W. Ray, A.S.I. Loudon, The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (2012) 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106750109>.
- [121] B. Tokat, D. Kanca-Demirci, N. Gul, I. Satman, O. Ozturk, A. Ozder, O. Kucukhuseyin, H. Yilmaz-Aydogan, Determination of genetic changes of Rev-erb beta and Rev-erb alpha genes in Type 2 diabetes mellitus by next-generation sequencing, *Gene.* 763 (2020) 145058 – 145072. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145058>.
- [122] E. Gonzalez-Sanchez, D. Firrincieli, C. Housset, N. Chignard, Nuclear Receptors in Acute and Chronic Cholestasis, *Digestive Diseases.* 33 (2015) 357–366. <https://doi.org/10.1159/000371688>.
- [123] N. Meyer, A.G. Harvey, S.W. Lockley, D.J. Dijk, Circadian rhythms and disorders of the timing of sleep, *Lancet.* 400 (2022) 1061–1078. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00877-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00877-7).

- [124] M. Gilat, A. Coeytaux Jackson, N.S. Marshall, D. Hammond, A.E. Mullins, J.M. Hall, B.A.M. Fang, B.J. Yee, K.K.H. Wong, R.R. Grunstein, S.J.G. Lewis, Melatonin for rapid eye movement sleep behavior disorder in Parkinson's disease: A randomised controlled trial, *Mov Disord.* 35 (2020) 344–349. <https://doi.org/10.1002/MDS.27886>.
- [125] B. Claustrat, J. Leston, Melatonin: Physiological effects in humans, *Neurochirurgie.* 61 (2015) 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.NEUCHI.2015.03.002>.
- [126] J. Liu, S.J. Clough, A.J. Hutchinson, E.B. Adamah-Biassi, M. Popovska-Gorevski, M.L. Dubocovich, MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 56 (2016) 361–383. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124742>.
- [127] L. Liang, T. Zeng, Y. Zhao, R. Lu, B. Guo, R. Xie, W. Tang, L. Zhang, Z. Mao, X. Yang, S. Wu, Y. Wang, H. Zhang, Melatonin pretreatment alleviates the long-term synaptic toxicity and dysmyelination induced by neonatal Sevoflurane exposure via MT1 receptor-mediated Wnt signaling modulation, *J Pineal Res.* 71 (2021). 12771 – 12797. <https://doi.org/10.1111/JPI.12771>.
- [128] N. Zisapel, New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation, *Br J Pharmacol.* 175 (2018) 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>.
- [129] G.M. Mason, S. Lokhandwala, T. Riggins, R.M.C. Spencer, Sleep and human cognitive development, *Sleep Med Rev.* 57 (2021). 101472 – 101498. <https://doi.org/10.1016/J.SMRV.2021.101472>.
- [130] C. Vasey, J. McBride, K. Penta, Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin, *Nutrients.* 13 (2021). 3480 – 3501. <https://doi.org/10.3390/NU13103480>.
- [131] B.A. Matenchuk, P.J. Mandhane, A.L. Kozyrskyj, Sleep, circadian rhythm, and gut microbiota, *Sleep Med Rev.* 53 (2020). 101340 – 101363. <https://doi.org/10.1016/J.SMRV.2020.101340>.
- [132] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan, R.M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, L. Qin, Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J Pineal Res.* 61 (2016) 253–278. <https://doi.org/10.1111/JPI.12360>.
- [133] C. Morén, R.M. deSouza, D.M. Giraldo, C. Uff, Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases, *Int J Mol Sci.* 23 (2022). 9328 – 9346. <https://doi.org/10.3390/IJMS23169328>.
- [134] D.X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou, R.J. Reiter, Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism, *Molecules.* 20 (2015) 18886–18906. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES201018886>.
- [135] T. Lange, S. Dimitrov, J. Born, Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system, *Ann N Y Acad Sci.* 1193 (2010) 48–59. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2009.05300.X>.
- [136] B. González-Fernández, D.I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J.O. de Urbina, J. González-Gallego, M.J. Tuñón, Melatonin attenuates dysregulation of the

circadian clock pathway in mice with CCl4-induced fibrosis and human hepatic stellate cells, *Front Pharmacol.* 9 (2018) 556 – 572. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00556>.

- [137] S.F. Pang, C.W. Tsang, G.X. Hong, P.C.Y. Yip, P.L. Tang, G.M. Brown, Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging, *J Pineal Res.* 8 (1990) 179–192. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.1990.TB00678.X>.
- [138] M. Sanchez-Hidalgo, C.A. de la Lastra, M.P. Carrascosa-Salmoral, M.C. Naranjo, A. Gomez-Corvera, B. Caballero, J.M. Guerrero, Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues, *Exp Gerontol.* 44 (2009) 328–334. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2009.02.002>.
- [139] R. Hardeland, Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks, *Int J Mol Sci.* 20 (2019). 1223 – 1256. <https://doi.org/10.3390/IJMS20051223>.
- [140] P.J. Murphy, B.L. Myers, P. Badia, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans, *Physiol Behav.* 59 (1996) 133–139. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02036-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02036-5).
- [141] G. Öztürk, K.G. Akbulut, Ş. Güney, Melatonin, aging, and COVID-19: Could melatonin be beneficial for COVID-19 treatment in the elderly?, *Turk J Med Sci.* 50 (2020) 1504–1512. <https://doi.org/10.3906/SAG-2005-356>.
- [142] B. Jung-Hynes, R.J. Reiter, N. Ahmad, Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer, *J Pineal Res.* 48 (2010) 9–19. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2009.00729.X>.
- [143] M.G. Wendeu-Foyet, Y. Koudou, S. Cénée, B. Trétarre, X. Rébillard, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, A. Boland, D. Bacq, J.F. Deleuze, P.J. Lamy, C. Mulot, P. Laurent-Puig, T. Truong, F. Menegaux, Circadian genes and risk of prostate cancer: Findings from the EPICAP study, *Int J Cancer.* 145 (2019) 1745–1753. <https://doi.org/10.1002/ijc.32149>.
- [144] M.G. Wendeu-Foyet, S. Cénée, Y. Koudou, B. Trétarre, X. Rébillard, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, A. Boland, R. Olaso, J.F. Deleuze, H. Blanché, P.J. Lamy, C. Mulot, P. Laurent-Puig, T. Truong, F. Menegaux, Circadian genes polymorphisms, night work and prostate cancer risk: Findings from the EPICAP study, *Int J Cancer.* 147 (2020) 3119–3129. <https://doi.org/10.1002/ijc.33139>.
- [145] L. Ercolani, A. Ferrari, C. De Mei, C. Parodi, M. Wade, B. Grimaldi, Circadian clock: Time for novel anticancer strategies?, *Pharmacol Res.* 100 (2015) 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.008>.
- [146] Z. Kiss, P.M. Ghosh, Circadian rhythmicity and the influence of “clock” genes on prostate cancer, *Endocr Relat Cancer.* 23 (2016) T123–T134. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0366>.
- [147] N.M. Kettner, C.A. Katchy, L. Fu, Circadian gene variants in cancer, *Ann Med.* 46 (2014) 208–220. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.914808>.
- [148] B. Jung-Hynes, W. Huang, R.J. Reiter, N. Ahmad, Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells, *J Pineal Res.* 49 (2010) 60–68. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2010.00767.X>.

- [149] G. Li, M. Fan, Z. Zheng, Y. Zhang, Z. Zhang, Z. Huang, W. Luo, W. Zhao, X. Lai, H. Chen, F. Zeng, F. Deng, Osteoblastic protein kinase D1 contributes to the prostate cancer cells dormancy via GAS6-circadian clock signaling, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1869 (2022). 119296 – 119303. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2022.119296>.
- [150] S. Rana, S. Mahmood, Circadian rhythm and its role in malignancy, *J Circadian Rhythms.* 8 (2010). 3 -16. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3>.
- [151] Chen, Choo, Hou, Shuyuan, Kuo, Chang, Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers, *Carcinogenesis.* 26 (2005) 1241–1246. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGI075>.
- [152] Hua, Wang, Wan, Liu, Zhu, Yang, Wang, Wang, Cornelissen-Guillaume, Halberg, Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis, *Cancer Sci.* 97 (2006) 589–596. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2006.00225.X>.
- [153] Chen-Goodspeed, Lee, Tumor suppression and circadian function, *J Biol Rhythms.* 22 (2007) 291–298. <https://doi.org/10.1177/0748730407303387>.
- [154] M. Kogevinas, A. Espinosa, A. Castelló, I. Gómez-Acebo, M. Guevara, V. Martin, P. Amiano, J. Alguacil, R. Peiro, V. Moreno, L. Costas, G. Fernández-Tardón, J.J. Jimenez, R. Marcos-Gragera, B. Perez-Gomez, J. Llorca, C. Moreno-Iribas, T. Fernández-Villa, M. Oribe, N. Aragones, K. Papantoniou, M. Pollán, G. Castano-Vinyals, D. Romaguera, Effect of mistimed eating patterns on breast and prostate cancer risk (MCC-Spain Study), *Int J Cancer.* 143 (2018) 2380–2389. <https://doi.org/10.1002/ijc.31649>.
- [155] Kinouchi, Sassone-Corsi, Metabolic rivalry: circadian homeostasis and tumorigenesis, *Nat Rev Cancer.* 20 (2020) 645–661. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-0291-9>.
- [156] A.J. Trott, J.S. Menet, Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1, *PLoS Genet.* 14 (2018). 1007156 – 1007190. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007156>.
- [157] A. Uriz-Huarte, A. Date, H. Ang, S. Ali, H.J.M. Brady, M.J. Fuchter, The transcriptional repressor REV-ERB as a novel target for disease, *Bioorg Med Chem Lett.* 30 (2020). 127395 – 127403. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127395>.
- [158] H. Duez, B. Staels, Rev-erb- α : An integrator of circadian rhythms and metabolism, *J Appl Physiol.* 107 (2009) 1972–1980. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00570.2009>.
- [159] A. Uriz-Huarte, A. Date, H. Ang, S. Ali, H.J.M. Brady, M.J. Fuchter, The transcriptional repressor REV-ERB as a novel target for disease, *Bioorg Med Chem Lett.* 30 (2020) 127395 – 127403. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127395>.
- [160] C.A. Piantadosi, H.B. Suliman, Redox regulation of mitochondrial biogenesis, *Free Radic Biol Med.* 53 (2012) 2043–2053. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.014>.

- [161] J.W. Hwang, H. Yao, S. Caito, I.K. Sundar, I. Rahman, Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence, *Free Radic Biol Med.* 61 (2013) 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015>.
- [162] E.N. Stujanna, N. Murakoshi, K. Tajiri, D. Xu, T. Kimura, R. Qin, D. Feng, S. Yonebayashi, Y. Ogura, F. Yamagami, A. Sato, A. Nogami, K. Aonuma, Rev-erb agonist improves adverse cardiac remodeling and survival in myocardial infarction through an anti-inflammatory mechanism, *PLoS One.* 12 (2017). 189330 – 189349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189330>.
- [163] Musiek, Holtzman, Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration, *Science.* 354 (2016) 1004–1008. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAH4968>.
- [164] M.F. Megerian, J.S. Kim, J. Badreddine, S.H. Hong, L.E. Ponsky, J. Il Shin, R.A. Ghayda, Melatonin and Prostate Cancer: Anti-tumor Roles and Therapeutic Application, *Aging Dis.* 14 (2023) 840–857. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.1010>.
- [165] J.M. Memme, A.T. Erlich, G. Phukan, D.A. Hood, Exercise and mitochondrial health, *J Physiol.* 599 (2021) 803–817. <https://doi.org/10.1113/JP278853>.
- [166] S.D.R. Harridge, N.R. Lazarus, Physical Activity, Aging, and Physiological Function, *Physiology (Bethesda).* 32 (2017) 152–161. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00029.2016>.
- [167] G.N. Ruegsegger, F.W. Booth, Health Benefits of Exercise, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8 (2018). 11 – 23. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029694>.
- [168] T. Iwasa, T. Matsuzaki, K. Yano, Y. Mayila, R. Yanagihara, Y. Yamamoto, A. Kuwahara, M. Irahara, Effects of Low Energy Availability on Reproductive Functions and Their Underlying Neuroendocrine Mechanisms., *J Clin Med.* 7 (2018). 166 – 177. <https://doi.org/10.3390/jcm7070166>.
- [169] R. Stanton, P. Reaburn, Exercise and the treatment of depression: a review of the exercise program variables, *J Sci Med Sport.* 17 (2014) 177–182. <https://doi.org/10.1016/J.JSAMS.2013.03.010>.
- [170] P.H. Falcone, C.Y. Tai, L.R. Carson, J.M. Joy, M.M. Mosman, T.R. McCann, K.P. Crona, M.P. Kim, J.R. Moon, Caloric expenditure of aerobic, resistance, or combined high-intensity interval training using a hydraulic resistance system in healthy men, *J Strength Cond Res.* 29 (2015) 779–785. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000661>.
- [171] Z. Gan, T. Fu, D.P. Kelly, R.B. Vega, Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases, *Cell Res.* 28 (2018) 969–980. <https://doi.org/10.1038/S41422-018-0078-7>.
- [172] B. Sjodin, J. Svedenhag, Applied physiology of marathon running, *Sports Med.* 2 (1985) 83–99. <https://doi.org/10.2165/00007256-198502020-00002>.
- [173] L.A. Consitt, C. Dudley, G. Saxena, Impact of Endurance and Resistance Training on Skeletal Muscle Glucose Metabolism in Older Adults, *Nutrients.* 11 (2019). 2636 – 2651. <https://doi.org/10.3390/NU11112636>.

- [174] W.L. Westcott, Resistance training is medicine: effects of strength training on health, *Curr Sports Med Rep.* 11 (2012) 209–216. <https://doi.org/10.1249/JSR.0B013E31825DABB8>.
- [175] N.J. Kirk-Sanchez, E.L. McGough, Physical exercise and cognitive performance in the elderly: Current perspectives, *Clin Interv Aging.* 9 (2013) 51–62. <https://doi.org/10.2147/CIA.S39506>.
- [176] M.M. Atakan, Y. Guzel, N. Shrestha, S.N. Kosar, J. Grgic, T.A. Astorino, H.H. Turnagol, Z. Pedisic, Effects of high-intensity interval training (HIIT) and sprint interval training (SIT) on fat oxidation during exercise: a systematic review and meta-analysis, *Br J Sports Med.* (2022). 105181 – 105191. <https://doi.org/10.1136/BJSPORTS-2021-105181>.
- [177] L. Carvalho, R.M. Junior, J. Barreira, B.J. Schoenfeld, J. Orazem, R. Barroso, Muscle hypertrophy and strength gains after resistance training with different volume-matched loads: a systematic review and meta-analysis, *Appl Physiol Nutr Metab.* 47 (2022) 357–368. <https://doi.org/10.1139/APNM-2021-0515>.
- [178] D.C. Hughes, S. Ellefsen, K. Baar, Adaptations to Endurance and Strength Training, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8 (2018). 29769 – 29786. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029769>.
- [179] ACSM | The American College of Sports Medicine, (n.d.). https://www.acsm.org/?gclid=CjwKCAjwoqGnBhAcEiwAwK-Okawf4BE_WpTGpzqR8ylJV8L9kIYfX3pS86rH2spFabHh_OPPzsO-5RoCsRkQAvD_BwE (accessed August 24, 2023).
- [180] C.-Y. Hsu, P.-L. Hsieh, S.-F. Hsiao, M.-Y. Chien, Effects of Exercise Training on Autonomic Function in Chronic Heart Failure: Systematic Review., *Biomed Res Int.* 2015 (2015) 591708 – 591716. <https://doi.org/10.1155/2015/591708>.
- [181] M.C. Manio, S. Matsumura, K. Inoue, Low-fat diet, and medium-fat diets containing coconut oil and soybean oil exert different metabolic effects in untrained and treadmill-trained mice., *J Int Soc Sports Nutr.* 15 (2018) 29 - 45. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0234-y>.
- [182] S. Uslu, N. Alaca, K.D. Kilic, A. Uysal, H. Kurtel, The effects of aerobic exercise frequencies on liver fibrosis, α -fetoprotein and cytokeratin 19 in experimental type 2 diabetes-induced rats: an immunohistochemistry study, *Biotechnic & Histochemistry.* (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1517898>.
- [183] G. Colleluori, D.T. Villareal, Aging, obesity, sarcopenia and the effect of diet and exercise intervention, *Exp Gerontol.* 155 (2021). 111561 – 111587. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2021.111561>.
- [184] G. Distefano, B.H. Goodpaster, Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle, *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8 (2018). 297885 – 297900. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029785>.
- [185] C. Hurst, S.M. Robinson, M.D. Witham, R.M. Dodds, A. Granic, C. Buckland, S. De Biase, S. Finnegan, L. Rochester, D.A. Skelton, A.A. Sayer, Resistance exercise as a treatment for sarcopenia: prescription and delivery, *Age Ageing.* 51 (2022). 3 – 13. <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFAC003>.

- [186] D.G. Jakovljevic, Physical activity and cardiovascular aging: Physiological and molecular insights, *Exp Gerontol.* 109 (2018) 67–74. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2017.05.016>.
- [187] A. De la Rosa, G. Olaso-Gonzalez, C. Arc-Chagnaud, F. Millan, A. Salvador-Pascual, C. García-Lucerga, C. Blasco-Lafarga, E. Garcia-Dominguez, A. Carretero, A.G. Correas, J. Viña, M.C. Gomez-Cabrera, Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer’s disease, *J Sport Health Sci.* 9 (2020) 394–404. <https://doi.org/10.1016/J.JSHS.2020.01.004>.
- [188] N. Garatachea, H. Pareja-Galeano, F. Sanchis-Gomar, A. Santos-Lozano, C. Fiuza-Luces, M. Morán, E. Emanuele, M.J. Joyner, A. Lucia, Exercise attenuates the major hallmarks of aging, *Rejuvenation Res.* 18 (2015) 57–89. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1623>.
- [189] C.J. Lavie, C. Ozemek, S. Carbone, P.T. Katzmarzyk, S.N. Blair, Sedentary Behavior, Exercise, and Cardiovascular Health, *Circ Res.* 124 (2019) 799–815. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312669>.
- [190] C. Weyh, K. Krüger, B. Strasser, Physical Activity and Diet Shape the Immune System during Aging, *Nutrients.* 12 (2020). 633 – 639. <https://doi.org/10.3390/NU12030622>.
- [191] C. Phillips, Lifestyle Modulators of Neuroplasticity: How Physical Activity, Mental Engagement, and Diet Promote Cognitive Health during Aging, *Neural Plast.* 2017 (2017). 3589271 – 3589293. <https://doi.org/10.1155/2017/3589271>.
- [192] S. Stenholm, T.B. Harris, T. Rantanen, M. Visser, S.B. Kritchevsky, L. Ferrucci, Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 11 (2008) 693–700. <https://doi.org/10.1097/MCO.0B013E328312C37D>.
- [193] M.K. Karlsson, T. Vonschewelov, C. Karlsson, M. CÅster, B.E. Rosengen, Prevention of falls in the elderly: a review, *Scand J Public Health.* 41 (2013) 442–454. <https://doi.org/10.1177/1403494813483215>.
- [194] J. Galloza, B. Castillo, W. Micheo, Benefits of Exercise in the Older Population, *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 28 (2017) 659–669. <https://doi.org/10.1016/J.PMR.2017.06.001>.
- [195] K.J. Hsu, C. De Liao, M.W. Tsai, C.N. Chen, Effects of Exercise and Nutritional Intervention on Body Composition, Metabolic Health, and Physical Performance in Adults with Sarcopenic Obesity: A Meta-Analysis, *Nutrients.* 11 (2019). 2163 – 2178. <https://doi.org/10.3390/NU11092163>.
- [196] J. Bilski, P. Pierzchalski, M. Szczepanik, J. Bonior, J.A. Zoladz, Multifactorial Mechanism of Sarcopenia and Sarcopenic Obesity. Role of Physical Exercise, Microbiota and Myokines, *Cells.* 11 (2022). 160 -201. <https://doi.org/10.3390/CELLS11010160>.
- [197] T. Liu-Ambrose, J.C. Davis, J.R. Best, L. Dian, K. Madden, W. Cook, C.L. Hsu, K.M. Khan, Effect of a Home-Based Exercise Program on Subsequent Falls Among Community-Dwelling High-Risk Older Adults After a Fall: A Randomized Clinical Trial, *JAMA.* 321 (2019) 2092–2100. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2019.5795>.

- [198] U. Sadjapong, S. Yodkeeree, S. Sungkarat, P. Siviroj, Multicomponent Exercise Program Reduces Frailty and Inflammatory Biomarkers and Improves Physical Performance in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized Controlled Trial, *Int J Environ Res Public Health*. 17 (2020). 3760 – 3775. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17113760>.
- [199] A.A. Sadighi Akha, Aging and the immune system: An overview, *J Immunol Methods*. 463 (2018) 21–26. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2018.08.005>.
- [200] C. Weyh, K. Krüger, B. Strasser, Physical Activity and Diet Shape the Immune System during Aging, *Nutrients*. 12 (2020). 623 – 639. <https://doi.org/10.3390/NU12030622>.
- [201] M. Sellami, M. Gasmi, J. Denham, L.D. Hayes, D. Stratton, J. Padulo, N. Bragazzi, Effects of acute and chronic exercise on immunological parameters in the elderly aged: Can physical activity counteract the effects of aging?, *Front Immunol*. 9 (2018) 2187 – 2204. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02187>.
- [202] D.B. Bartlett, O. Fox, C.L. McNulty, H.L. Greenwood, L. Murphy, E. Sapey, M. Goodman, N. Crabtree, C. Thøgersen-Ntoumani, J.P. Fisher, A.J.M. Wagenmakers, J.M. Lord, Habitual physical activity is associated with the maintenance of neutrophil migratory dynamics in healthy older adults, *Brain Behav Immun*. 56 (2016) 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.02.024>.
- [203] Y.P.C. Rao, B.R. Lokesh, Down-regulation of NF- κ B expression by n-3 fatty acid-rich linseed oil is modulated by PPAR γ activation, eicosanoid cascade and secretion of cytokines by macrophages in rats fed partially hydrogenated vegetable fat, *Eur J Nutr*. 56 (2017) 1135–1147. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1163-7>.
- [204] M. Heming, S. Gran, S.-L. Jauch, L. Fischer-Riepe, A. Russo, L. Klotz, S. Hermann, M. Schäfers, J. Roth, K. Barczyk-Kahlert, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Modulates the Response of Macrophages to Lipopolysaccharide and Glucocorticoids., *Front Immunol*. 9 (2018) 893 – 909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00893>.
- [205] L.S. Silveira, H.A.P. Batatinha, A. Castoldi, N.O.S. Câmara, W.T. Festuccia, C.O. Souza, J.C. Rosa Neto, F.S. Lira, Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors γ deletion in macrophages, *J Cell Physiol*. (2018). 5241 – 5251. <https://doi.org/10.1002/jcp.27333>.
- [206] C. Drenowatz, G.A. Hand, R.P. Shook, J.M. Jakicic, J.R. Hebert, S. Burgess, S.N. Blair, The association between different types of exercise and energy expenditure in young nonoverweight and overweight adults., *Appl Physiol Nutr Metab*. 40 (2015) 211–7. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0310>.
- [207] A. Muscella, E. Stefàno, P. Lunetti, L. Capobianco, S. Marsigliante, The Regulation of Fat Metabolism During Aerobic Exercise, *Biomolecules*. 10 (2020) 1–29. <https://doi.org/10.3390/BIOM10121699>.
- [208] J.L. Durstine, P.W. Grandjean, P.G. Davis, M.A. Ferguson, N.L. Alderson, K.D. DuBose, Blood Lipid and Lipoprotein Adaptations to Exercise, *Sports Medicine*. 31 (2001) 1033–1062. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131150-00002>.

- [209] J.L. Durstine, Effect of Aerobic Exercise on High-Density Lipoprotein Cholesterol: A Meta-analysis, *Clinical Journal of Sport Medicine*. 18 (2008) 107–108. <https://doi.org/10.1097/01.jsm.0000307723.53749.00>.
- [210] F.S. Lira, J.C. Rosa Neto, B.M.M. Antunes, R.A. Fernandes, The relationship between inflammation, dyslipidemia and physical exercise: from the epidemiological to molecular approach., *Curr Diabetes Rev*. 10 (2014) 391–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418583> (accessed March 18, 2018).
- [211] C.J. Lavie, R. Arena, D.L. Swift, N.M. Johannsen, X. Sui, D. Lee, C.P. Earnest, T.S. Church, J.H. O’Keefe, R. V. Milani, S.N. Blair, Exercise and the Cardiovascular System, *Circ Res*. 117 (2015) 207–219. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305205>.
- [212] Z. Gan, T. Fu, D.P. Kelly, R.B. Vega, Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases, *Cell Res*. 28 (2018) 969–980. <https://doi.org/10.1038/S41422-018-0078-7>.
- [213] N. Sallam, I. Laher, Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging and Cardiovascular Diseases, *Oxid Med Cell Longev*. 2016 (2016) 1–32. <https://doi.org/10.1155/2016/7239639>.
- [214] J.F. Horowitz, T.C. Leone, W. Feng, D.P. Kelly, S. Klein, Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR α in the metabolic response to training, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 279 (2000) 348–355. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.2.E348>.
- [215] A. Sampath Kumar, A.G. Maiya, B.A. Shastri, K. Vaishali, N. Ravishankar, A. Hazari, S. Gundmi, R. Jadhav, Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis, *Ann Phys Rehabil Med*. 62 (2019) 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.REHAB.2018.11.001>.
- [216] S.F. Crouse, B.C. O’Brien, P.W. Grandjean, R.C. Lowe, J.J. Rohack, J.S. Green, Effects of training and a single session of exercise on lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic men., *J Appl Physiol* (1985). 83 (1997) 2019–28. <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.6.2019>.
- [217] R.M. Pereira, K.C. Da Cruz Rodrigues, C.P. Anaruma, M.R. Sant’Ana, T.D.P. De Campos, R.S. Gaspar, R. Dos Santos Canciglieri, D.G. De Melo, R.A. Mekary, A.S.R. Da Silva, D.E. Cintra, E.R. Ropelle, J.R. Pauli, L.P. De Moura, Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice, *Journal of Endocrinology*. 241 (2019) 59–70. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0567>.
- [218] P.L. Evans, S.L. McMillin, L.A. Weyrauch, C.A. Witczak, Regulation of Skeletal Muscle Glucose Transport and Glucose Metabolism by Exercise Training, *Nutrients*. 11 (2019). 2432 – 2452. <https://doi.org/10.3390/NU11102432>.
- [219] J.D. Mul, K.I. Stanford, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism, *Prog Mol Biol Transl Sci*. 135 (2015) 17–37. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2015.07.020>.
- [220] A.S. Ryan, G. Li, S. McMillin, S.J. Prior, J.B. Blumenthal, L. Mastella, Pathways in Skeletal Muscle: Protein Signaling and Insulin Sensitivity after Exercise

Training and Weight Loss Interventions in Middle-Aged and Older Adults, *Cells*. 10 (2021). 3490 – 3504. <https://doi.org/10.3390/CELLS10123490>.

- [221] J.S. Kim, D.R. Taaffe, D.A. Galvão, N.H. Hart, E. Gray, C.J. Ryan, S.A. Kenfield, F. Saad, R.U. Newton, Exercise in advanced prostate cancer elevates myokine levels and suppresses in-vitro cell growth, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 25 (2022) 86–92. <https://doi.org/10.1038/S41391-022-00504-X>.
- [222] J.S. Kim, D.A. Galvão, R.U. Newton, E. Gray, D.R. Taaffe, Publisher Correction: Exercise-induced myokines and their effect on prostate cancer, *Nat Rev Urol.* 19 (2022) 64 – 84. <https://doi.org/10.1038/S41585-021-00501-0>.
- [223] J.S. Kim, R.L. Wilson, D.R. Taaffe, D.A. Galvão, E. Gray, R.U. Newton, Myokine Expression and Tumor-Suppressive Effect of Serum after 12 wk of Exercise in Prostate Cancer Patients on ADT, *Med Sci Sports Exerc.* 54 (2022) 197–205. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002783>.
- [224] H. Rundqvist, M. Augsten, A. Strömberg, E. Rullman, S. Mijwel, P. Kharaziha, T. Panaretakis, T. Gustafsson, A. Östman, Effect of acute exercise on prostate cancer cell growth., *PLoS One.* 8 (2013) 67579 – 67588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067579>.
- [225] P.S. Leung, W.J. Aronson, T.H. Ngo, L.A. Golding, R.J. Barnard, Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells in vitro, *J Appl Physiol* (1985). 96 (2004) 450–454. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00871.2003>.
- [226] M.E.A. Tavares, A.S.C. Veras, H.H.A. Thorpe, D.B. Baptista, G.R. Teixeira, Physical exercise regulates apoptosis and prostatic inflammatory effects induced by high-fat diet in PPAR-alpha deleted mice, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 163 (2022). 106669 – 106682. <https://doi.org/10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2022.106669>.
- [227] D.B. Baptista, L.F. Dutra de Santana, A.S.C. Veras, V. Alves de Menezes, N.J. Dos Santos, M. Papoti, J.C.S. Camargo Filho, G.R. Teixeira, Effect of concurrent training and supplementation with β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on the prostate: Alterations in the androgen receptor and inflammation, *International Journal of Morphology.* 36 (2018) 74–79. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022018000100074>.
- [228] A.S.C. Veras, M.C. de Freitas, H.H.A. Thorpe, P.M. Seraphim, G.R. Teixeira, Strength Training Modulates Prostate of Wistar Rats Submitted to High-Fat Diet, *Reproductive Sciences.* (2020). 2187 – 2196. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00238-y>.
- [229] R.R. Correia, V.R.G. Batista, A.S.C. Veras, M.E. de A. Tavares, F.L.A. Souza, F.L. Pacagnelli, D.H.S. Campos, I.C. Giometti, G.R. Teixeira, High-intensity interval training attenuates the effects caused by arterial hypertension in the ventral prostate, *Prostate.* (2021). 373 – 387. <https://doi.org/10.1002/PROS.24285>.
- [230] C. Baglioni, Z. Bostanova, V. Bacaro, F. Benz, E. Hertenstein, K. Spiegelhalder, G. Rücker, L. Frase, D. Riemann, B. Feige, A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials Evaluating the Evidence Base of Melatonin, Light Exposure, Exercise, and Complementary and Alternative

Medicine for Patients with Insomnia Disorder, *J Clin Med.* 9 (2020) 1949 - 1974. <https://doi.org/10.3390/jcm9061949>.

- [231] K.J. Reid, K.G. Baron, B. Lu, E. Naylor, L. Wolfe, P.C. Zee, Aerobic exercise improves self-reported sleep and quality of life in older adults with insomnia, *Sleep Med.* 11 (2010) 934–940. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2010.04.014>.
- [232] P.Y. Yang, K.H. Ho, H.C. Chen, M.Y. Chien, Exercise training improves sleep quality in middle-aged and older adults with sleep problems: A systematic review, *J Physiother.* 58 (2012) 157–163. [https://doi.org/10.1016/S1836-9553\(12\)70106-6](https://doi.org/10.1016/S1836-9553(12)70106-6).
- [233] M. Chennaoui, P.J. Arnal, F. Sauvet, D. Léger, Sleep and exercise: A reciprocal issue?, *Sleep Med Rev.* 20 (2015) 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.06.008>.
- [234] M. Panagiotou, S. Michel, J.H. Meijer, T. Deboer, The aging brain: sleep, the circadian clock and exercise, *Biochem Pharmacol.* 191 (2021). 114563 – 114571. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2021.114563>.
- [235] G. Wolff, K.A. Esser, Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle, *Med Sci Sports Exerc.* 44 (2012) 1663–1670. <https://doi.org/10.1249/MSS.0B013E318255CF4C>.
- [236] Y. Hamaguchi, Y. Tahara, M. Hitosugi, S. Shibata, Impairment of Circadian Rhythms in Peripheral Clocks by Constant Light Is Partially Reversed by Scheduled Feeding or Exercise, *J Biol Rhythms.* 30 (2015) 533–542. <https://doi.org/10.1177/0748730415609727>.
- [237] Y. Tahara, S. Aoyama, S. Shibata, The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise, *J Physiol Sci.* 67 (2017). 1 -10. <https://doi.org/10.1007/S12576-016-0450-7>.
- [238] G.H. Tamarindo, M.G. Gobbo, S.R. Taboga, E.A. Almeida, R.M. Góes, Melatonin ameliorates degenerative alterations caused by age in the rat prostate and mitigates high-fat diet damages, *Cell Biol Int.* 45 (2021) 92–106. <https://doi.org/10.1002/cbin.11472>.
- [239] M.I. Nilsson, M.A. Tarnopolsky, Mitochondria and aging—the role of exercise as a countermeasure, *Biology (Basel).* 8 (2019). 40 -58. <https://doi.org/10.3390/biology8020040>.
- [240] A. Thirupathi, C.T. de Souza, Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise, *J Physiol Biochem.* 73 (2017) 487–494. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0576-y>.
- [241] N.W. Kan, C.S. Ho, Y.S. Chiu, W.C. Huang, P.Y. Chen, Y.T. Tung, C.C. Huang, Effects of Resveratrol Supplementation and Exercise Training on Exercise Performance in Middle-Aged Mice, *Molecules.* 21 (2016). 661 -673. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21050661>.
- [242] A. V. Cordeiro, R.S. Bricola, R.R. Braga, L. Lenhare, V.R.R. Silva, C.P. Anaruma, C.K. Katashima, B.M. Crisol, F.M. Simabuco, A.S.R. Silva, D.E. Cintra, L.P. Moura, J.R. Pauli, E.R. Ropelle, Aerobic Exercise Training Induces the Mitonuclear Imbalance and UPRmt in the Skeletal Muscle of Aged Mice, *The*

Journals of Gerontology: Series A. 75 (2020) 2258–2261.
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAA059>.

- [243] L. Lenhare, B.M. Crisol, V.R.R. Silva, C.K. Katashima, A. V. Cordeiro, K.D. Pereira, A.D. Luchessi, A.S.R. da Silva, D.E. Cintra, L.P. Moura, J.R. Pauli, E.R. Ropelle, Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice, *Exp Gerontol.* 97 (2017) 17–21. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2017.07.009>.
- [244] A. Mayeuf-Louchart, Q. Thorel, S. Delhay, J. Beauchamp, C. Duhem, A. Danckaert, S. Lancel, B. Pourcet, E. Woldt, A. Boulinguez, L. Ferri, M. Zecchin, B. Staels, Y. Sebt, H. Duez, Rev-erb- α regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass, *Sci Rep.* 7 (2017). 14383 – 14394. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14596-2>.
- [245] B.M. Gabriel, J.R. Zierath, Circadian rhythms and exercise - re-setting the clock in metabolic disease, *Nat Rev Endocrinol.* 15 (2019) 197–206. <https://doi.org/10.1038/S41574-018-0150-X>.
- [246] K. Welén, J.E. Damberg, Androgens, aging, and prostate health, *Rev Endocr Metab Disord.* 23 (2022) 1221–1231. <https://doi.org/10.1007/S11154-022-09730-Z>.
- [247] T.C. Bellos, L.I. Tzelives, I.S. Manolitsis, S.N. Katsimperi, M. V. Berdempes, A. Skolarikos, N.D. Karakousis, Frailty and benign prostatic hyperplasia: The thrilling underlying impact, *Arch Ital Urol Androl.* 94 (2022) 345–349. <https://doi.org/10.4081/AIUA.2022.3.345>.
- [248] R. Cannarella, R.A. Condorelli, F. Barbagallo, S. La Vignera, A.E. Calogero, Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts, *Front Endocrinol (Lausanne).* 12 (2021). 554078 – 554091. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.554078>.
- [249] J.M. Ketchum, E.J. Bowman, C.M. Isaacs, Male sex hormones, aging, and inflammation, *Biogerontology.* 24 (2023) 1–25. <https://doi.org/10.1007/S10522-022-10002-1>.
- [250] A. Jamroz, G. Chatta, D.G. Tang, Androgen receptor (AR) heterogeneity in prostate cancer and therapy resistance, *Cancer Lett.* 518 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.06.006>.
- [251] W.Y. Park, G. Song, J.Y. Park, K.S. Ahn, H.J. Kwak, J. Park, J.H. Lee, J.Y. Um, Ellagic acid improves benign prostate hyperplasia by regulating androgen signaling and STAT3, *Cell Death Dis.* 13 (2022). 554 – 565. <https://doi.org/10.1038/S41419-022-04995-3>.
- [252] A. Miernik, C. Gratzke, Current Treatment for Benign Prostatic Hyperplasia, *Dtsch Arztebl Int.* 117 (2020) 843–854. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2020.0843>.
- [253] M. Maggio, S. Basaria, A. Ble, F. Lauretani, S. Bandinelli, G.P. Ceda, G. Valenti, S.M. Ling, L. Ferrucci, Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 91 (2006) 345–347. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1097>.

- [254] G. Rastrelli, L. Vignozzi, G. Corona, M. Maggi, Testosterone and Benign Prostatic Hyperplasia, *Sex Med Rev.* 7 (2019) 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.10.006>.
- [255] X. Wang, L. Wei, J. Xiao, K. Shan, Q. He, F. Huang, X. Ge, X. Gao, N. Feng, Y.Q. Chen, Cholesterol and saturated fatty acids synergistically promote the malignant progression of prostate cancer, *Neoplasia.* 24 (2022) 86–97. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2021.11.004>.
- [256] E.H. Kim, J.A. Larson, G.L. Andriole, Management of Benign Prostatic Hyperplasia, *Annu Rev Med.* 67 (2016) 137–151. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-063014-123902>.
- [257] K.S. Sfanos, S. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, A.M. De Marzo, The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development, *Nature Reviews Urology* 2017 15:1. 15 (2017) 11–24. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.167>.
- [258] J.R. Packer, N.J. Maitland, The molecular and cellular origin of human prostate cancer, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1863 (2016) 1238–1260. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.016>.
- [259] A.S. Goldstein, J. Huang, C. Guo, I.P. Garraway, O.N. Witte, Identification of a cell of origin for human prostate cancer, *Science.* 329 (2010) 568–571. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1189992>.
- [260] P. Adamo, M.R. Ladomery, The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer, *Oncogene.* 35 (2016) 403–414. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.109>.
- [261] S. Andrikopoulos, A.R. Blair, N. Deluca, B.C. Fam, J. Proietto, Evaluating the glucose tolerance test in mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295 (2008). 1323 – 1332. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90617.2008>.
- [262] J.C.B. Ferreira, N.P.L. Rolim, J.B. Bartholomeu, C.A. Gobatto, E. Kokubun, P.C. Brum, Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34 (2007) 760–765. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x>.
- [263] S.B. Shappell, G. V. Thomas, R.L. Roberts, R. Herbert, M.M. Ittmann, M.A. Rubin, P.A. Humphrey, J.P. Sundberg, N. Rozengurt, R. Barrios, J.M. Ward, R.D. Cardiff, Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee, *Cancer Res.* 64 (2004) 2270–2305. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-0946>.
- [264] F. de C. Gomes, L.G. de A. Chuffa, W.J. Fávaro, W.R. Scarano, J.S. Melo-Neto, P.F.F. Pinheiro, R.F. Domeniconi, Nandrolone decanoate and resistance exercise affect prostate morphology and hormone receptor interface in adult rats with implications for the aging process, *Andrology.* 8 (2020) 211–220. <https://doi.org/10.1111/andr.12626>.
- [265] D. Brunetti, E. Bottani, A. Segala, S. Marchet, F. Rossi, F. Orlando, M. Malavolta, M.O. Carruba, C. Lamperti, M. Provinciali, E. Nisoli, A. Valerio, Targeting Multiple Mitochondrial Processes by a Metabolic Modulator Prevents Sarcopenia

- and Cognitive Decline in SAMP8 Mice, *Front Pharmacol.* 11 (2020). 1171 – 1187. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.01171>.
- [266] H. Shoji, T. Miyakawa, Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program, *Neuropsychopharmacol Rep.* 39 (2019) 100 – 118. <https://doi.org/10.1002/NPR2.12052>.
- [267] K. Arora, C.E. Barbieri, Molecular Subtypes of Prostate Cancer, *Curr Oncol Rep.* 20 (2018). 58 – 67. <https://doi.org/10.1007/S11912-018-0707-9>.
- [268] M. Zhou, High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate, *Mod Pathol.* 31 (2018) 71–79. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2017.138>.
- [269] R.A. Taylor, S.G. Farrelly, A.K. Clark, M.J. Watt, Early intervention exercise training does not delay prostate cancer progression in Pten-/- mice, *Prostate.* 80 (2020) 906–914. <https://doi.org/10.1002/PROS.24024>.
- [270] A.D. Choudhury, PTEN-PI3K pathway alterations in advanced prostate cancer and clinical implications, *Prostate.* 82 (2022) S60–S72. <https://doi.org/10.1002/PROS.24372>.
- [271] P.K. Majumder, C. Grisanzio, F. O’Connell, M. Barry, J.M. Brito, Q. Xu, I. Guney, R. Berger, P. Herman, R. Bikoff, G. Fedele, W.K. Baek, S. Wang, K. Ellwood-Yen, H. Wu, C.L. Sawyers, S. Signoretti, W.C. Hahn, M. Loda, W.R. Sellers, A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression, *Cancer Cell.* 14 (2008) 146–155. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2008.06.002>.
- [272] D. Karan, S. Dubey, From inflammation to prostate cancer: The role of inflammasomes, *Adv Urol.* 2016 (2016). 1– 5. <https://doi.org/10.1155/2016/3140372>.
- [273] A. Sciarra, G. Mariotti, S. Saliccia, A.A. Gomez, S. Monti, V. Toscano, F. Di Silverio, Prostate growth and inflammation, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 108 (2008) 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2007.09.013>.
- [274] J.P. Coppé, C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Muñoz, J. Goldstein, P.S. Nelson, P.Y. Desprez, J. Campisi, Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.* 6 (2008). 2853 – 2868. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0060301>.
- [275] C. Lin, T.C. Salzillo, D.A. Bader, S.R. Wilkenfeld, D. Awad, T.L. Pulliam, P. Dutta, S. Pudakalakatti, M. Titus, S.E. McGuire, P.K. Bhattacharya, D.E. Frigo, Prostate Cancer Energetics and Biosynthesis, *Adv Exp Med Biol.* 1210 (2019) 185–237. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_10.
- [276] Manoogian, Panda, Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging, *Ageing Res Rev.* 39 (2017) 59–67. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2016.12.006>.
- [277] A.M. Rosenwasser, F.W. Turek, Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation, *Sleep Med Clin.* 17 (2022) 141–150. <https://doi.org/10.1016/J.JSMC.2022.02.006>.

- [278] A. Sen, H.M. Hoffmann, Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis, *Mol Cell Endocrinol.* 501 (2020). 110655 – 110682. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2019.110655>.
- [279] M. Morrison, S.L. Halson, J. Weakley, J.A. Hawley, Sleep, circadian biology and skeletal muscle interactions: Implications for metabolic health, *Sleep Med Rev.* 66 (2022). 101700 -101710. <https://doi.org/10.1016/J.SMRV.2022.101700>.
- [280] V.A. Cuddapah, S.L. Zhang, A. Sehgal, Regulation of the Blood-Brain Barrier by Circadian Rhythms and Sleep, *Trends Neurosci.* 42 (2019) 500–510. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2019.05.001>.
- [281] R. Costa, C. Mangini, E.D. Domenie, L. Zarantonello, S. Montagnese, Circadian rhythms and the liver, *Liver Int.* 43 (2023) 534–545. <https://doi.org/10.1111/LIV.15501>.
- [282] E. Woldt, Y. Sebti, L.A. Solt, C. Duhem, S. Lancel, J. Eeckhoutte, M.K.C. Hesselink, C. Paquet, S. Delhay, Y. Shin, T.M. Kamenecka, G. Schaart, P. Lefebvre, R. Nevière, T.P. Burris, P. Schrauwen, B. Staels, H. Duez, Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy, *Nat Med.* 19 (2013) 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/nm.3213>.
- [283] B. Jung-Hynes, W. Huang, R.J. Reiter, N. Ahmad, Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells, *J Pineal Res.* 49 (2010) 60–68. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2010.00767.X>.
- [284] H. Ye, K. Yang, X.M. Tan, X.J. Fu, H.X. Li, Daily rhythm variations of the clock gene PER1 and cancer-related genes during various stages of carcinogenesis in a golden hamster model of buccal mucosa carcinoma, *Onco Targets Ther.* 8 (2015) 1419–1426. <https://doi.org/10.2147/OTT.S83710>.
- [285] H. Ye, K. Yang, X. Tan, D. Zhao, X. Lü, Q. Wang, Circadian variation of clock gene Per2 and cancer-related clock-controlled genes in buccal mucosa carcinoma of golden hamster at different cancer stages, *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 33 (2015) 513–518. <https://doi.org/10.7518/HXKQ.2015.05.016>.
- [286] X.J. Fu, H.X. Li, K. Yang, D. Chen, H. Tang, The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin-CDK-CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells, *Onco Targets Ther.* 9 (2016) 2237–2245. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100952>.
- [287] H. Xiong, Y. Yang, K. Yang, D. Zhao, H. Tang, X. Ran, Loss of the clock gene PER2 is associated with cancer development and altered expression of important tumor-related genes in oral cancer, *Int J Oncol.* 52 (2018) 279–287. <https://doi.org/10.3892/IJO.2017.4180>.
- [288] N. Wu, L. Yin, E.A. Hanniman, S. Joshi, M.A. Lazar, Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erb α , *Genes Dev.* 23 (2009) 2201–2209. <https://doi.org/10.1101/GAD.1825809>.
- [289] A.S.C. Veras, D.B. Baptista, N.J. dos Santos, H.H.A. Thorpe, P.M. Seraphim, A.R. Florido Neto, G.R. Teixeira, Impact of cigarette smoke and aerobic physical training on histological and molecular markers of prostate health in rats, *Brazilian*

Journal of Medical and Biological Research. 53 (2020). 9108 – 9119.
<https://doi.org/10.1590/1414-431x20209108>.

- [290] G.R. Teixeira, L.O. Mendes, A.S.C. Veras, H.H.A. Thorpe, W.J. Fávaro, L.G. De Almeida Chuffa, P.F.F. Pinheiro, F.E. Martinez, Physical resistance training-induced changes in lipids metabolism pathways and apoptosis in prostate, *Lipids Health Dis.* 19 (2020). 14 -23. <https://doi.org/10.1186/S12944-020-1195-0>.
- [291] A.S.C. Veras, R.L. Gomes, M.E. Almeida Tavares, I.C. Giometti, A.P.M.M. Cardoso, B. da Costa Aguiar Alves, S.A. Lenquiste, L.C.M. Vanderlei, G.R. Teixeira, Supplementation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and aerobic exercise improve functioning, morphology, and redox balance in prostate obese rats, *Sci Rep.* 11 (2021). 6282 – 6300. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85337-9>.
- [292] G.R. Teixeira, W.J. Fávaro, P.F.F. Pinheiro, L.G. a Chuffa, J.P. a Amorim, L.O. Mendes, B. a Fioruci, E. Oba, O. a Martins, M. Martinez, F.E. Martinez, Physical exercise on the rat ventral prostate: steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation., *Scand J Med Sci Sports.* 22 (2012) 86-92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2012.01501.x>.
- [293] G.R. Teixeira, L.G.A. Chuffa, L.O. Mendes, A.S.C. Veras, J. McCabe, W.J. Favaro, P.F.F. Pinheiro, J.P.A. Amorim, O.A. Martins, W. Mello-Junior, F.E. Martinez, Strength training protects against prostate injury in alcoholic rats, *J Cell Physiol.* 236 (2021) 3675–3687. <https://doi.org/10.1002/jcp.30108>.
- [294] D.G. de Melo, C.P. Anaruma, K.C. da Cruz Rodrigues, R.M. Pereira, T.D.P. de Campos, R.S. Canciglieri, C.O. Ramos, D.E. Cintra, E.R. Ropelle, A.S.R. da Silva, J.R. Pauli, L.P. de Moura, Strength training alters the tissue fatty acids profile and slightly improves the thermogenic pathway in the adipose tissue of obese mice, *Sci Rep.* 12 (2022). 6913 – 6927. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-10688-W>.
- [295] O. Erel, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem.* 38 (2005) 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2005.08.008>.
- [296] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- [297] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal Biochem.* 239 (1996) 70–76. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>.
- [298] S. MARKLUND, G. MARKLUND, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur J Biochem.* 47 (1974) 469–474. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1974.TB03714.X>.
- [299] E. Woldt, Y. Sebti, L.A. Solt, C. Duhem, S. Lancel, J. Eeckhoutte, M.K.C. Hesselink, C. Paquet, S. Delhay, Y. Shin, T.M. Kamenecka, G. Schaart, P. Lefebvre, R. Nevière, T.P. Burris, P. Schrauwen, B. Staels, H. Duez, Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy, *Nat Med.* 19 (2013) 1039- 1046. <https://doi.org/10.1038/NM.3213>.

- [300] C. Chen, M. Zhou, Y. Ge, X. Wang, SIRT1 and aging related signaling pathways, *Mech Ageing Dev.* 187 (2020). 111215 – 111222. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2020.111215>.
- [301] E. Tortorella, S. Giantulli, A. Sciarra, I. Silvestri, AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2046. 24 (2023) 2046 – 2064. <https://doi.org/10.3390/IJMS24032046>.
- [302] S. Kumari, V. Sharma, R. Tiwari, J.P. Maurya, B.B. Subudhi, D. Senapati, Therapeutic potential of p53 reactivation in prostate cancer: Strategies and opportunities, *Eur J Pharmacol.* 919 (2022) 174807 – 174815. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.174807>.
- [303] S. Lu, C. Ren, Y. Liu, D.E. Epner, PI3K-Akt signaling is involved in the regulation of p21WAF/CIP expression and androgen-independent growth in prostate cancer cells, *Int J Oncol.* 28 (2006) 245–251. <https://doi.org/10.3892/IJO.28.1.245/HTML>.
- [304] L.P. Stepan, E.S. Trueblood, K. Hale, J. Babcook, L. Borges, C.L. Sutherland, Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target, *J Histochem Cytochem.* 59 (2011) 701–710. <https://doi.org/10.1369/0022155411410430>.
- [305] P.D. Crowell, J.J. Fox, T. Hashimoto, J.A. Diaz, H.I. Navarro, G.H. Henry, B.A. Feldmar, M.G. Lowe, A.J. Garcia, Y.E. Wu, D.P. Sajed, D.W. Strand, A.S. Goldstein, Expansion of Luminal Progenitor Cells in the Aging Mouse and Human Prostate, *Cell Rep.* 28 (2019) 1499-1510. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.07.007>.
- [306] P.D. Crowell, J.M. Giafaglione, T. Hashimoto, A.S. Goldstein, Distinct cell-types in the prostate share an aging signature suggestive of metabolic reprogramming, *Am J Clin Exp Urol.* 8 (2020) 140 -151. [/pmc/articles/PMC7486537/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37486537/) (accessed August 10, 2023).
- [307] T.G. Graber, R. Maroto, C.S. Fry, C.R. Brightwell, B.B. Rasmussen, Measuring Exercise Capacity and Physical Function in Adult and Older Mice, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 76 (2021) 819 - 824. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAA205>.
- [308] J.C. Reynolds, R.W. Lai, J.S.T. Woodhead, J.H. Joly, C.J. Mitchell, D. Cameron-Smith, R. Lu, P. Cohen, N.A. Graham, B.A. Benayoun, T.L. Merry, C. Lee, MOTS-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis, *Nat Commun.* 12 (2021). 470 -481. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-20790-0>.
- [309] A.B. Leuchtmann, R. Furrer, S.A. Steurer, K. Schneider-Heieck, B. Karrer-Cardel, Y. Sagot, C. Handschin, Interleukin-6 potentiates endurance training adaptation and improves functional capacity in old mice, *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 13 (2022) 1164–1176. <https://doi.org/10.1002/JCSM.12949>.
- [310] Z. Kiss, P.M. Ghosh, WOMEN IN CANCER THEMATIC REVIEW: Circadian rhythmicity and the influence of “clock” genes on prostate cancer, *Endocr Relat Cancer.* 23 (2016) 123–134. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0366>.

- [311] R. V. Kondratov, A.A. Kondratova, V.Y. Gorbacheva, O. V. Vykhovanets, M.P. Antoch, Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock, *Genes Dev.* 20 (2006) 1868–1873. <https://doi.org/10.1101/GAD.1432206>.
- [312] J. Wang, S. Li, X. Li, B. Li, Y. Li, K. Xia, Y. Yang, S. Aman, M. Wang, H. Wu, Circadian protein BMAL1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9 expression, *Cancer Cell Int.* 19 (2019). 182 -194. <https://doi.org/10.1186/S12935-019-0902-2>.
- [313] M. Elshazley, M. Sato, T. Hase, R. Yamashita, K. Yoshida, S. Toyokuni, F. Ishiguro, H. Osada, Y. Sekido, K. Yokoi, N. Usami, D.S. Shames, M. Kondo, A.F. Gazdar, J.D. Minna, Y. Hasegawa, The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma, *Int J Cancer.* 131 (2012) 2820–2831. <https://doi.org/10.1002/IJC.27598>.
- [314] Z.L. Zeng, M.W. Wu, J. Sun, Y.L. Sun, Y.C. Cai, Y.J. Huang, L.J. Xian, Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity, *J Biochem.* 148 (2010) 319–326. <https://doi.org/10.1093/JB/MVQ069>.
- [315] K. Kinouchi, P. Sassone-Corsi, Metabolic rivalry: circadian homeostasis and tumorigenesis, *Nat Rev Cancer.* 20 (2020) 645–661. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-0291-9>.
- [316] L.A. Solt, Y. Wang, S. Banerjee, T. Hughes, D.J. Kojetin, T. Lundasen, Y. Shin, J. Liu, M.D. Cameron, R. Noel, S.H. Yoo, J.S. Takahashi, A.A. Butler, T.M. Kamenecka, T.P. Burris, Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists, *Nature.* 485 (2012) 62–68. <https://doi.org/10.1038/NATURE11030>.
- [317] H. Ando, K. Ushijima, S. Shimba, A. Fujimura, Daily Fasting Blood Glucose Rhythm in Male Mice: A Role of the Circadian Clock in the Liver, *Endocrinology.* 157 (2016) 463–469. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1376>.
- [318] H. Cho, X. Zhao, M. Hatori, R.T. Yu, G.D. Barish, M.T. Lam, L.W. Chong, L. Ditacchio, A.R. Atkins, C.K. Glass, C. Liddle, J. Auwerx, M. Downes, S. Panda, R.M. Evans, Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β , *Nature.* 485 (2012) 123–127. <https://doi.org/10.1038/NATURE11048>.
- [319] S. Natani, V.M. Dhople, A. Parveen, K.K. Sruthi, P. Khilar, S. Bhukya, R. Ummanni, AMPK/SIRT1 signaling through p38MAPK mediates Interleukin-6 induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1868 (2021) 119085 – 119093. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2021.119085>.
- [320] E. Woldt, Y. Sebti, L.A. Solt, C. Duhem, S. Lancel, J. Eeckhoutte, M.K.C. Hesselink, C. Paquet, S. Delhaye, Y. Shin, T.M. Kamenecka, G. Schaart, P. Lefebvre, R. Nevière, T.P. Burris, P. Schrauwen, B. Staels, H. Duez, Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy, *Nat Med.* 19 (2013) 1039–1046. <https://doi.org/10.1038/NM.3213>.

- [321] C.I. Onyiba, C.J. Scarlett, J. Weidenhofer, The Mechanistic Roles of Sirtuins in Breast and Prostate Cancer, *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 5118. 14 (2022) 5118 - 5148. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14205118>.
- [322] A. Bratic, N.G. Larsson, The role of mitochondria in aging, *J Clin Invest.* 123 (2013) 951–957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>.
- [323] V. Mezhnina, O.P. Ebeigbe, A. Poe, R. V. Kondratov, Circadian Control of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Homeostasis, *Antioxid Redox Signal.* 37 (2022) 647–663. <https://doi.org/10.1089/ARS.2021.0274>.
- [324] M. Kawamura, H. Tasaki, I. Misawa, G. Chu, N. Yamauchi, M.A. Hattori, Contribution of testosterone to the clock system in rat prostate mesenchyme cells, *Andrology.* 2 (2014) 225–233. <https://doi.org/10.1111/J.2047-2927.2013.00161.X>.
- [325] B. Chatterjee, The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer, *Mol Cell Biochem.* 253 (2003) 89–101. <https://doi.org/10.1023/A:1026057402945>.
- [326] G.L. Hong, K.H. Kim, Y.J. Kim, H.J. Lee, H.T. Kim, J.Y. Jung, Decreased mitophagy aggravates benign prostatic hyperplasia in aged mice through DRP1 and estrogen receptor α , *Life Sci.* 309 (2022). 120980 – 12990. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120980>.
- [327] J.D. Alvarez, A. Hansen, T. Ord, P. Bebas, P.E. Chappell, J.M. Giebultowicz, C. Williams, S. Moss, A. Sehgal, The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice, *J Biol Rhythms.* 23 (2008) 26–36. <https://doi.org/10.1177/0748730407311254>.
- [328] E. Tortorella, S. Giantulli, A. Sciarra, I. Silvestri, AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways, *Int J Mol Sci.* 24 (2023). 2046 – 2064 <https://doi.org/10.3390/IJMS24032046>.
- [329] B.Y. Shorning, M.S. Dass, M.J. Smalley, H.B. Pearson, The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling, *Int J Mol Sci.* 21 (2020) 1–47. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124507>.
- [330] H.M. Wise, M.A. Hermida, N.R. Leslie, Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis, *Clin Sci (Lond).* 131 (2017) 197–210. <https://doi.org/10.1042/CS20160026>.
- [331] M.C. Beker, B. Caglayan, A.B. Caglayan, T. Kelestemur, E. Yalcin, A. Caglayan, U. Kilic, A.T. Baykal, R.J. Reiter, E. Kilic, Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival, *Sci Rep.* 9 (2019). 19082 – 190099. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-55663-0>.
- [332] L. Wang, H. Xiong, F. Wu, Y. Zhang, J. Wang, L. Zhao, X. Guo, L.J. Chang, Y. Zhang, M.J. You, S. Koochekpour, M. Saleem, H. Huang, J. Lu, Y. Deng, Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth, *Cell Rep.* 8 (2014) 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.07.053>.
- [333] A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi, Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage, *DNA Repair (Amst).* 42 (2016) 63–71. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2016.04.008>.

- [334] M. Soták, L. Polidarová, P. Ergang, A. Sumová, J. Pácha, An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors, *Int J Cancer*. 132 (2013) 1032–1041. <https://doi.org/10.1002/IJC.27760>.
- [335] S. Sur, R. Steele, X. Shi, R.B. Ray, miRNA-29b Inhibits Prostate Tumor Growth and Induces Apoptosis by Increasing Bim Expression, *Cells* 2019, Vol. 8, Page 1455. 8 (2019) 1455 -64. <https://doi.org/10.3390/CELLS8111455>.
- [336] M. Qu, G. Zhang, H. Qu, A. Vu, R. Wu, H. Tsukamoto, Z. Jia, W. Huang, H.J. Lenz, J.N. Rich, S.A. Kay, Circadian regulator BMAL1::CLOCK promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma by controlling apoptosis and cell cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120 (2023). 1- 8. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2214829120>.

Anexo 1



Universidade de São Paulo
Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

AUTORIZAÇÃO

Autorizamos o projeto intitulado "Função do NR1D1 sobre a sarcopenia associada ao envelhecimento", processo nº 2021.1.43.90.0, sob responsabilidade de Adelino Sanchez Ramos da Silva que envolve a manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exoto homem) para fins de pesquisa científica a ser realizado, pois, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado em reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (CEUA-EEFERP) em 06/05/2021.

O relatório final da pesquisa (modelo disponível na página da CEUA-EEFERP) deverá ser encaminhado à CEUA, para apreciação e posterior emissão de certificado de conduta ética, em até 30 dias após o término da vigência do projeto de pesquisa.

Durante a vigência desta autorização, a CEUA-EEFERP fará um pedido anual, nos dois primeiros meses do ano, para que o responsável por este projeto de pesquisa informe a quantidade de animais que foi efetivamente utilizada durante o ano anterior.

Vigência do Projeto	01/08/2021 a 01/08/2026
Espécie/ Linhagem	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	100
Idade/ Peso	5 semanas / 20 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 06 de maio de 2021.

Prof. Dr. Tiago Rezende Figueira
Coordenador da CEUA-EEFERP