



Alana Della Torre da Silva

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DA
CARCINOGENESE PROSTÁTICA EM CAMUNDONGOS TRAMP**

São José do Rio Preto
2021

Alana Della Torre da Silva

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DA
CARCINOGÊNESE PROSTÁTICA EM CAMUNDONGOS TRAMP**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES.

FAPESP – Proc. 2019/15109-4
2018/21891-4.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Maira Góes

São José do Rio Preto
2021

S586e Silva, Alana Della Torre Da
Efeitos dos ácidos graxos ômega-3 na modulação da carcinogênese
prostática em camundongos TRAMP / Alana Della Torre Da Silva. --
São José do Rio Preto, 2021
141 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Rejane Maira Góes

1. Câncer de próstata. 2. Dieta. 3. Ácidos graxos ômega-3. 4.
Camundongos TRAMP. 5. Morte celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Alana Della Torre da Silva

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA MODULAÇÃO DA
CARCINOGENESE PROSTÁTICA EM CAMUNDONGOS TRAMP**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES.

FAPESP – Proc. 2019/15109-4
2018/21891-4.

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr.^a Rejane Maira Góes
UNESP – Campus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Jaqueline de Carvalho Rinaldi
UEM - Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Marília de Freitas Calmon Saiki
UNESP – Campus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
02 de setembro de 2021

À memória de minha querida avó Geni Guarieiro Della Torre, sábia mulher analfabeta, que sempre incentivou minha educação formal e cuja presença foi essencial na minha vida. Você foi e sempre será meu maior exemplo. Te amo, vó!

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rejane Maira Góes, por ter me acolhido como aluna, pelos ensinamentos para a realização deste trabalho e pelos conselhos para a vida. Muito obrigada pela orientação, paciência, dedicação para a minha formação acadêmica e por embarcar na aventura de realizar mais um projeto.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e a Prof.^a Dr.^a Patricia Simone Leite Vilamaior, pela disponibilidade, pelo conhecimento transmitido, por sempre esclarecerem minhas dúvidas e pelos conselhos dados, vocês me ajudaram muito. Sempre serei grata.

Ao Me. Luiz Roberto Falleiros Jr, pelo apoio técnico no Centro de Microscopia e Microanálise do IBILCE, pela paciência em me ensinar e pelas brincadeiras que me alegam. À Me. Maysa Succi pelo apoio técnico no Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desregulação Endócrina do IBILCE.

Aos alunos do Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desregulação Endócrina, pela ajuda, pelas conversas, pelos happy-hour e pelos cafezinhos. Em especial, aos meus amigos Guilherme e Gustavo, obrigada por toda ajuda, desde práticas no laboratório, até análise de dados e dicas de redação e organização de trabalhos. Vocês foram essenciais desde quando entrei no Laboratório.

A Mariana Marcielo, rainha da organização, por toda ajuda com os experimentos, principalmente com o Western Blotting.

A todos os alunos que frequentam o Centro de Microscopia e Microanálise pela ajuda em tudo que precisei.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir.

A todos os professores que tive durante a graduação e pós-graduação. Conhecimento é o bem mais valioso do ser humano e vocês fizeram parte da construção do meu.

À minha mãe, Zilda, e aos meus tios Rosa e Irineu, que também foram meus pais, por todo carinho, por sempre estarem ao meu lado e nunca pouparem esforços e trabalho para que meus sonhos fossem realizados. Obrigada por todo apoio no início e continuidade da minha formação acadêmica. Vocês são os maiores exemplos de força e superação que eu poderia ter e graças a vocês, conclui mais esse trabalho com muito amor e dedicação.

As minhas irmãs, Amanda e Vanessa, e meus avôs, por acompanharem toda a minha jornada e pelo apoio e ajuda que sempre me deram.

Ao Leonardo, por sempre me estimular, por apoiar minhas decisões, nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis, nas frustrações e por me fazer acreditar que no fim tudo iria dar certo. Obrigada por toda a paciência, dedicação, companheirismo e por tornar minha vida mais leve e feliz!

Ao PET-Biologia, o qual fiz parte desde o primeiro ano da graduação. Meus sinceros agradecimentos a todas as oportunidades que me fizeram crescer muito. Todas as atividades que organizei, todos os eventos que fui, todos os trabalhos que apresentei e a todas as pessoas com as quais convivi lá e fiz grandes amizades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/15109-4 e 2018/21891-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todas estas pessoas e instituições, e todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, meu muito obrigada. A conclusão dele só foi possível graças a contribuição de cada um de vocês.

“Porque os detalhes, como se sabe, conduzem à virtude e à felicidade; as generalidades são males intelectualmente necessários.” (HUXLEY, 2013, p. 28)

RESUMO

O adenocarcinoma de próstata (CaP) é o câncer mais comum em homens no mundo e a segunda causa de mortalidade por câncer no Brasil. O consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω 3), como o ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA), tem sido relacionados com menor risco de CaP e melhor prognóstico, mas os dados ainda são conflitantes e essa questão é inconclusiva. O presente estudo avaliou os efeitos da dieta enriquecida em DHA/EPA (D ω 3) na progressão tumoral do CaP, no lobo dorsolateral (LDL) da próstata de camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP), e o impacto sobre os processos de morte celular regulada, usando para isso também experimentos *in vitro*. Os camundongos (8 sem. idade) foram alimentados pelo período de 1 ou 3 meses com dieta contendo 10% de óleo de peixe (grupos T12 e T20, respectivamente) ou dieta padrão para roedores (grupos C12 e C20). Também foram analisados camundongos com 8 sem. idade alimentados com ração padrão (C8), fase em que se iniciam os distúrbios proliferativos. Os LDLs foram processados para análises histopatológicas, estereológicas, imuno-histoquímicas, TUNEL e ensaio de caspase 3 ativa. A D ω 3 por 1 mês aumentou a frequência de áreas epiteliais saudáveis (2,4x) e reduziu as de lesões pré-malignas (2,7x) e de carcinoma *in situ* (2,3x), em comparação com o controle. 50% dos animais dos grupos C20 e T20 desenvolveram tumor primário e não houve variação do peso tumoral entre esses grupos. Contudo, nos demais animais, para os quais o LDL pode ser isolado, também se verificou aumento na frequência de áreas epiteliais saudáveis (2,2x) e redução nas de lesões pré-malignas (2,9x) e de carcinoma *in situ* (2,9x) em T20 comparado a C20. A histologia do LDL dos grupos T12 e T20 e proporção de áreas de tecido epitelial, lúmen e estroma se mantiveram semelhantes as do C8. Nos dois tempos de consumo, a D ω 3 reduziu a proliferação celular e a expressão tecidual epitelial de AR e ER- α . Também manteve as características estromais, evitando o aumento de fibras colágenas, de células α -SMA⁺ e de linfócitos T-CD3⁺ que ocorre durante a progressão da doença. A D ω 3 aumentou a autofagia em ambos os tempos e a taxa de apoptose no tempo mais longo de consumo (31,25%), mas não afetou a necroptose e piroptose que foram mais restritas às células imunes estromais. Experimentos com cultura de células epiteliais prostáticas benignas (PNT1A) e tumorais responsivas a andrógenos (22rv1), tratadas com DHA (100 μ M, 48h), aliados a análises de Western Blotting, mostraram que esse ω 3 aumenta 8,6% a autofagia e inibe 27,3% a piroptose na linhagem tumoral, enquanto reduz a necroptose (50%) na benigna. Conclui-se que a intervenção dietética com ω 3 no período mais curto diminui a gravidade e atrasa a progressão tumoral do CaP em camundongos TRAMP, via redução da expressão

tecidual de AR e ER- α , bloqueio da atividade proliferativa, modulação da morte celular regulada e preservação do microambiente estromal. Esses achados sugerem uma ação protetora dos ω 3 no CaP e seu possível uso como adjuvante terapêutico nos estágios iniciais da doença, mas reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre seu impacto nas fases mais avançadas da doença.

Palavras-chave: Ácidos graxos ômega-3. Câncer de próstata. Camundongos TRAMP. Ácido docosahexaenóico. Células prostáticas.

ABSTRACT

Prostate adenocarcinoma (CaP) is the most common cancer in men worldwide and the second leading cause of death by cancer-related cases in Brazil. The intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids ($\omega 3$), such as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), has been linked to lower risk of CaP development and positive prognostic, however, data regarding $\omega 3$ intake is still conflicting and inconclusive. Here, we evaluated the effects of a DHA/EPA-enriched diet (D $\omega 3$) in tumor progression in the dorsolateral lobe (LDL) of the prostate of the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP mice), and the impact on regulated cell death using both *in vivo* and *in vitro* approaches. Mice (8 wk) were fed for 1 or 3 months with a diet containing 10% fish oil (groups T12 and T20, respectively) or a standard rodent diet (groups C12 and C20). Additionally, 8 wk-old-mice fed standard diet (C8) were also analyzed once the proliferative disorders began to develop at this age. LDLs were processed for histopathological, stereological, immunohistochemical, TUNEL, and activated caspase 3 assays. D $\omega 3$ for 1 month increased the frequency of healthy epithelial areas (2.4x) and reduced the frequency of both premalignant lesions (2.7x) and carcinoma *in situ* (2.3x) compared to the control groups. Half of the animals at 20 weeks of age developed primary tumors regardless of their diet and there was no variation in tumor weight between these groups. However, T20 animals that did not develop primary tumors for which LDL was properly isolated displayed and an increase in the frequency of healthy epithelial areas (2.2x) and a reduction of premalignant lesions (2.9x) and carcinoma *in situ* (2.9x) in this lobe compared to C20. The morphology of LDL in T12 and T20 groups and the frequencies of acinar epithelium, lumen, and stromal areas remained similar to those of C8. In both periods, D $\omega 3$ reduced cell proliferation and tissue expression of AR and ER- α in the epithelium. It also maintained the stromal characteristics, preventing the increase in collagen fibers, α -SMA⁺ cells, and T-CD3⁺ lymphocytes that occurs during disease progression. D $\omega 3$ increased autophagy in both groups, but only the T20 group display an increase in apoptosis rate (31.25%), and no differences were observed in necroptosis and pyroptosis, which were more frequent restricted to stromal immune cells. Treatment of the benign prostatic epithelial (PNT1A) and androgen-responsive (22rv1) cell lines with DHA (100 μ M, 48h), showed that this $\omega 3$ increases autophagy by 8.6% and inhibits 27.3% pyroptosis in the tumor lineage, whereas it reduces necroptosis (50%) in the benign cell line. Thus, our data indicate that dietary intervention with $\omega 3$ in the shortest period decreases the severity of the disease and delays tumor progression in TRAMP mice, via downregulation of tissue expression of AR and ER- α , decrease of proliferative activity,

modulation of regulated cell death and improvement of the stromal microenvironment. These findings suggest a protective action of $\omega 3$ on CaP and highlight its possible application as a therapeutic adjuvant in the early stages of the disease although it reinforces the need for further studies of its impact in advanced stages of the disease.

Keywords: Omega-3 fatty acids. Prostate cancer. TRAMP mice. Docosahexaenoic acid. Prostatic Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Organização anatômica da próstata humana (A) e de roedores (B). Zona de transição (ZT), zona central (ZC), zona periférica (ZP), vesícula seminal (VS), estroma prostático (EP), uretra (U), ductos deferentes (DD) lobos ventrais (LV), lobos laterais (LL), lobos dorsais (LD), lobos anteriores (LA)... **29**
- Figura 2 -** Anatomia da próstata de camundongo, com visão geral dos órgãos urogenitais masculinos. (A) Aspectos anteriores e (C) posteriores do trato urogenital dissecado de um camundongo adulto. (B) e (D) mostram as mesmas imagens com linhas tracejadas e pontilhadas delineando os lobos da próstata ventral (VP), lateral (LP), anterior (AP) e dorsal (DP). (E) Visão anterolateral (lado esquerdo) dos lobos da próstata em relação à bexiga, vesículas seminais e uretra. (U) Uretra. (SV) Vesículas Seminais. Barra de escala: 1 cm **30**
- Figura 3 -** Esquema da próstata humana, suas regiões e os principais tipos celulares que a compõem. Em destaque para uma região de epitélio e estroma tem-se a representação de células Luminal KLK3+, Basal KRT14+, Hillock KRT13+, Club SCGB1A1+, Urotélio UPK+, Fibroblastos DCN+ e células de Músculo Liso MYH11+. Zona Central (ZC), Zona Periférica (ZP), Zona de Transição (ZT) e Uretra **32**
- Figura 4 -** Ação androgênica na próstata. A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrado) e à globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG). A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase. A ligação de DHT ao receptor de andrógeno (AR) induz a dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) e a fosforilação do receptor. O AR dimeriza e pode se ligar a elementos de resposta a andrógenos nas regiões promotoras de genes alvo. Coativadores (como ARA70) e correpressores (não mostrados) também se ligam ao complexo AR, facilitando ou impedindo, respectivamente, sua interação com o aparelho geral de transcrição (GTA). A ativação (ou repressão) de genes alvo leva a respostas biológicas, incluindo crescimento, sobrevivência e produção de antígeno específico da próstata (PSA) **36**

Figura 5 -	Estágios do processo de carcinogênese na próstata. Esquema e imagens do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP	37
Figura 6 -	O câncer de próstata metastático pode atingir órgãos como fígado, pulmão e ossos. O osso é o local mais comum de metástase, onde há uma interação entre as células cancerosas, osteoblastos e osteoclastos, por meio de moléculas como ET-1, TGF- β , IGFs, FGFs, PDGFs, BMPs, RANKL e PHT...	38
Figura 7 -	Estimativa de novos casos de câncer em 2020, em todo mundo, para homens de todas as idades	38
Figura 8 -	Estrutura química do EPA e DHA. EPA - ácido eicosapentaenóico, 20:5 ω 3; e DHA - ácido docosahexaenóico, 22:6 ω 3. Os átomos de carbono são numerados, começando na extremidade metil. Os números dentro de uma caixa cinza indicam a posição e o número de ligações duplas	42
Figura 9 -	Benefícios associados ao consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, como DHA e EPA. Embora muitos benefícios dos PUFA's ômega-3 para a saúde tenham sido relatados na literatura, também existem algumas controvérsias sobre sua eficácia para a saúde humana em alguns desses benefícios	44
Figura 10 -	Biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (esquerda) e ômega-3 (direita)	45
Figura 11 -	Camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP). A) Camundongo com 12 semanas de idade. B) Camundongo com 20 semanas de idade, sendo preparado para eutanásia, onde é possível observar uma protuberância no abdômen resultante de um tumor primário da próstata, confirmado por dissecação do animal	51
Figura 12 -	Modelo de camundongo TRAMP utilizado no estudo. (A) Camundongo mantido no biotério do Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP). (B) Camundongo alimentado com dieta rica em ômega-3.	56
Figura 13 -	Representação do delineamento experimental utilizado no estudo, com 5 grupos de animais (C8, C12, T12, C20 e T20). Os camundongos foram tratados com dieta rica em ômega-3 em dois tempos distintos. A primeira eutanásia ocorreu quando os animais apresentaram 12 semanas de idade (1	

mês de consumo) e a segunda quando atingiram 20 semanas de idade (3 meses de consumo) 59

Figura 14 - Fotomicrografias representando os diferentes tipos de lesões encontradas no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A) Região de tecido normal (sem lesão), caracterizada por epitélio simples (cabeça de seta) com células cúbicas a colunares e núcleos centrais. (B) Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) (seta), caracterizada por uma estratificação epitelial. Estroma hipertrofiado e hiperplásico (seta branca). Dobra epitelial (cruz). (C) Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN) (asterisco), caracterizada por estratificação epitelial e padrão arquitetônico cribriforme obstruindo o lúmen glandular. (D-E) Carcinoma *in situ* (quadrado descontínuo), caracterizado por descontinuidade da membrana basal e invasão estromal de células epiteliais. (F) Adenocarcinoma bem diferenciado (estrela branca). Ep: Epitélio; Es: estroma; L: Lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: A-E: 20µm; F: 50µm 110

Figura 15 - Parâmetros biométricos e fisiológicos dos camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A) Consumo semanal de ração. (B) Ingestão calórica semanal. (C) Ganho de peso. (D) Glicemia de jejum. (E) Triglicerídeos séricos. (F) Colesterol sérico. Dados expressos em média ± desvio padrão, n = 7. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001) 112

Figura 16 - Fotomicrografias representando o fenótipo geral da próstata dorsolateral de camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A) Grupo C8. (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20. Ac: Ácinos; Es: Estroma. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: 200µm 114

Figura 17 - Fotomicrografias do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A-C) Grupo C8: epitélio e estroma mostrando tecido glandular predominantemente saudável. Epitélio secretor simples com células colunares ou cúbicas (ponta de seta). Algumas LGPINs (seta). Em (C), estroma com células musculares lisas (Smc) e fibroblastos (Fi), estruturas glandulares com células lumbinais secretoras (Cl) e células basais (Cb) identificadas. (D-F) Grupo C12: Áreas menos frequentes de

epitélio secretor simples e presença de LGPIN (seta) e de HGPIN (asterisco). Em (F), HGPIN com destaque (triângulo descontinuado) para células em processo de morte celular em diferentes estágios – estágio mais inicial (triângulo descontinuado branco) e estágio mais tardio (triângulo descontinuado preto). (G-I) Grupo T12: maior frequência de epitélio saudável em relação ao controle e ocorrência de LGPIN e HGPIN. Características estromais semelhantes ao grupo C8, com distribuição regular dos elementos ao redor dos ácinos. Em (I), destaque para uma LGPIN com estratificação do epitélio diferenciada de uma dobra (cruz). (J-L) Grupo C20: ácinos apresentando HGPIN (asterisco) com características cribriformes e obstrução do lúmen. Estroma hipertrofiado e hiperplásico (seta branca), particularmente próximo a regiões de HGPIN (J). Em (L), destaque (círculo descontinuado) para células em processo de proliferação (figuras mitóticas) em uma HGPIN. (M-O) Grupo T20: áreas de epitélio saudável mais frequentes que no grupo controle e regiões apresentando LGPIN e menor frequência de HGPIN. Em (O), HGPIN com células se proliferando e células em processo de morte. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: 1ª e 2ª linha - 20µm; 3ª linha - 10µm 116

Figura 18 - Análise histopatológica do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A) Epitélio normal/saudável. (B) Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LPIN) e (C) de alto grau (HGPIN). (D) Carcinoma *in situ* (CIT). (E) Perfil histopatológico dos grupos experimentais. Dados expressos em média ± desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001) 118

Figura 19 - Comparação da média e desvio padrão dos compartimentos teciduais prostáticos dos camundongos TRAMP entre os diferentes grupos experimentais. (A) Epitélio. (B) Lúmen. (C) Estroma. (D) CM: camada muscular. (E) Vasos. (F) Perfil estereológico. Dados expressos em média ± desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos (** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001) 120

Figura 20 - Análise do ambiente estromal na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP. (A-E) Imuno-histoquímica para expressão tecidual de α -SMA. (F-J) Picrosirius-Hemataxolina. (K-O) Picrosirius-Hematoxilina sob luz polarizada. (P) Quantificação da imunomarcacão para α -SMA. (Q) Quantificação das fibras colágenas. Setas pretas indicam reatividade para α -SMA e setas brancas indicam deposição de colágeno peri-acinar. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: A-E: 20 μ m; F-O: 50 μ m ... 122

Figura 21 - Análise da proliferação celular no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. Imuno-histoquímica para a expressão tecidual de PHH3 (A-E) e de PCNA (G-K), nos diferentes grupos experimentais. Quantificação do número de células de PHH3-positivas (F) e da expressão tecidual de PCNA (L). Setas pretas indicam células positivas para a reação. Regiões de PIN apresentam mais células positivas. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (*** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m 124

Figura 22 - Análise da expressão tecidual de AR no lobo prostático dorsolateral. (A-E) Fotomicrografias da imuno-histoquímica para AR. (A) Grupo C8 e controle negativo (*inset*). (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20. Setas e cabeças de setas pretas indicam as células positivas (núcleo marrom) no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação (frequência) da expressão epitelial (F) e estromal (G) do AR. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m 126

Figura 23 - Análise da expressão tecidual de ER- α . (A-E) Fotomicrografias da imuno-histoquímica para ER- α no lobo prostático dorsolateral. (A) Grupo C8. (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20 e controle negativo (*inset*). Setas e cabeças de setas pretas indicam as células positivas

(núcleo marrom) no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação (frequência) da expressão epitelial (F) e estromal (G) do ER- α . Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (** p < 0,01; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m 128

Figura 24 - Análise da infiltração de linfócitos T no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A-E) Fotomicrografias da reação de imuno-histoquímica para CD3. (F) Quantificação das células CD3-positivas (setas pretas). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m 130

Figura 25 - Identificação de autofagia na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão (grupos C8, C12, C20) e com D ω 3 (grupos T12 e T20), por meio de reação imuno-histoquímica para LC3B. Os autofagossomos aparecem como pontos com coloração acastanhada (setas pretas), localizados na região supra-nuclear do citoplasma apical das células acinares. Nota-se o aumento evidente da frequência de autofagossomos nos grupos alimentados com D ω 3 (D), os quais são mais volumosos no grupo T20 (H, I). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Barras de escala: A-C, E-H: 20 μ m; D, I: 10 μ m 132

Figura 26 - Análise da atividade apoptótica no lobo dorsolateral de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão (grupos C8, C12, C20) e com D ω 3 (grupos T12 e T20). (A-F) Reação TUNEL (marcação nuclear). (G) Quantificação do TUNEL. (H) Quantificação da caspase-3 em extratos totais do lobo dorsolateral por ensaio fluorimétrico. (I-N) Imuno-histoquímica para PARP clivada (fragmento de 89 kDa, produzido por clivagem de caspase – marcação citoplasmática). As setas pretas indicam células em apoptose (coloração marrom). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5 (ensaio de caspase-3 ativa, n=4). Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p

< 0,01; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Barras de escala: A-F, I, K-N: 20 μ m; inset e J: 10 μ m 134

Figura 27 - Imuno-histoquímica para detecção de diferentes padrões de morte celular regulada. (A-D) Necroptose (células pMLKL+), em lobo prostático dorsolateral com estrutura íntegra (A-B) e em tumor primário (C-D). (E-H) Piroptose (células cGSDMD+), em lobo prostático dorsolateral com estrutura íntegra (E-F) e em tumor primário (G-H). Células em necroptose e piroptose foram pouco frequentes nos diferentes grupos experimentais, mas abundantes no tumor primário. Setas pretas indicam células positivas para a reação. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen; Tp: Tumor primário. Barras de escala: A, C, E, G: 20 μ m; B, D, F, H: 10 μ m 136

Figura 28 - Western Blotting para marcadores de piroptose, necroptose e apoptose, receptores relacionados (TNF-R1 e LXR- β) e autofagia, em linhagens de células epiteliais prostáticas benignas (PNT1A) e tumorais responsivas a andrógenos (22rv1). (A) Quantificação de Gasdermina D clivada (31 kDa, piroptose). (B) Quantificação de LXR- β (63 kDa). (C) Quantificação de MLKL fosforilada (54 kDa, necroptose). (D) Quantificação de TNF-R1 (55 kDa). (E) Quantificação de PARP clivada (89 kDa, apoptose). (F) Quantificação de LC3B (14, 16 kDa, autofagia). Valores de densidade relativa normalizados pela GAPDH (37 kDa). Amostras de passagens consecutivas foram consideradas ($n = 3$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). C - Controle; DHA - 100 μ M por 48h 138

Figura 29 - Síntese gráfica dos efeitos da D ω 3 nos diferentes lobos da próstata de camundongos TRAMP. Tanto no lobo dorsolateral e anterior, quanto no lobo ventral (analisado no mesmo laboratório por AMARO (2020)) a D ω 3 levou a um atraso na progressão tumoral, evidenciado por manutenção das frequências elevadas de áreas epiteliais saudáveis e redução de lesões pré-malignas e de carcinoma in situ (apenas no lobo dorsolateral). A D ω 3 reduziu a proliferação celular e a expressão tecidual epitelial de AR e ER- α em todos os lobos analisados. Também manteve as características estromais, evitando o aumento de fibras colágenas, de células α -SMA+ e de linfócitos T-CD3+

(com exceção do lobo anterior, onde a infiltração de linfócitos não foi alterada). A Dω3 aumentou a autofagia no lobo dorsolateral e a apoptose no lobos dorsolateral e anterior (não analisadas no lobo ventral). Houve redução da expressão tecidual epitelial e estromal de GR no lobo ventral dos animais alimentados com a Dω3 (único lobo em que GR foi analisado) **140**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização geral das linhagens celulares PNT1A e 22rv1, células prostáticas normais e tumorais, respectivamente	52
Tabela 2 - Informações nutricionais das dietas utilizadas	57
Tabela 3 - Composição nutricional do óleo de peixe utilizado na formulação da ração enriquecida com DHA/EPA, referente a três cápsulas (3g)	58
Tabela 4 - Características gerais dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica (IHC) e Western Blotting (WB). B: Biotechnology. T: Technology	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

22rv1	Linhagem epitelial de câncer de próstata humano andrógeno dependente
AA	Ácido araquidônico
ABC	Complexo avidina-biotina
ADT	Terapia de ablação androgênica
AKT	Proteína quinase B
ALA	Ácido alfa-linolênico
AMC	Aminometilcumarina
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AR	Receptor de andrógeno
BAD	Agonista de morte celular associado a BCL2
BCL-2	Proteína 2 da célula-B de linfoma
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina sérica bovina
C4-2	Linhagem celular de câncer de próstata resistente à castração
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CaP	Câncer de próstata
CD3	<i>Cluster</i> de diferenciação 3
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
cGSDMD	Gasdermina D clivada
CIT	Carcinoma <i>in situ</i>
CM	Camada muscular
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
cPARP	Poli (ADP ribose) polimerase clivada
CRCP	Câncer resistente à castração
CRP	Proteína C reativa
CYP	Citocromo P450
DAB	3,3'-diaminobenzidina

DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DHT	Di-hidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DU145	Linhagem celular de câncer de próstata
D ω 3	Dieta rica em ômega-3 (DHA+EPA)
EAPA2	Antígeno experimental da prostatite autoimune 2
ECL	Substrato quimioluminescente para detectar conjugados de HRP em imunoblots
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eIF2 α	fator de iniciação eucariótico 2 alfa
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ER	Receptor de estrógeno
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ER- α	Receptor de estrógeno alfa
FBS	Soro fetal bovino
FFAR 1/4	Receptor de ácido graxo livre 1 e 4
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGs	Fatores de crescimento
FXR	Receptor farnesóide X
GPR120	Receptor acoplado à proteína G 120
GR	Receptor de glicocorticoide
GTA	Aparelho geral de transcrição
HE	Hematoxilina-Eosina
HGPIN	Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau
HNF-4 α	Fator nuclear 4 α dos hepatócitos
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina bioativa-1
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
Klk3	Gene do antígeno específico da próstata
KRT13	Queratina 13

LA	Ácido linoleico
LC3B	Proteína associada a microtúbulos 1A/1B de cadeia leve 3B
LDL	Lobo dorsolateral
LGPIN	Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau
LNCaP	Linhagem de células prostáticas humanas andrógeno dependente
LOX	Lipo-oxigenase
LXR	Receptor X do fígado
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MCR	Morte celular regulada
MEC	Matriz extracelular
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mecanístico de Rapamicina
NE	Epitélio normal/saudável
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento nervoso
Nkx3	Gene da proteína Homeobox Nkx-3
NLRP3	Domínio pirina da família NLR contendo 3
P38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio p38
P53	Antígeno tumoral celular p53
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PC3	Linhagem de células prostáticas humanas andrógeno independente
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PDK1	Agonista de morte celular associado a Bcl2
pH	Potencial hidrogeniônico
PHH3	Histona H3 fosforilada
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
pMLKL	Proteína de linhagem mista semelhante a domínio de quinase fosforilada
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNT1A	Linhagem epitelial luminal terminal prostática humana normal
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PPAR α	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama
pPDPK1	Proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinosítídeo fosforilada
PSA	Antígeno específico da próstata
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
PYK2	Proteína-tirosina quinase 2
RAC1	Substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada a Ras
RANKL	Ativador do receptor do ligante NF-kB
RIP 1/3	Proteína 1/3 de interação com receptor
RIPK 1/3	Serina/treonina proteína quinase 1/3 de interação com o receptor
RPM	Rotações por minuto
SCGB1A1	Uteroglobina
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA (ácido ribonucleico) de célula única
SDC-1	Syndecan 1
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio
SHBG	Globulina de ligação ao hormônio sexual
SPMs	Mediadores especializados de pró-resolução
SQSTM1	Sequestossomo-1
SREBP	Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol
SV40	Vírus símio 40
TdT	Enzima desoxinucleotidil transferase terminal
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta
TGF- β 1	Fator do crescimento transformante beta 1
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL-R1	Receptor 1 da TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRAMP	Camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata
TUNEL	Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling
UGS	Seio urogenital
WPMY-1	Linhagem de células estromais de miofibroblastos
α -SMA	α -actina de musculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
Δ	Delta
γ	Gama
g	Gramma
g/dia	Gramma por dia
°C	Graus Celsius
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
$<$	Menor que
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ω	Ômega
%	Porcentagem
Kcal/g	Quilocaloria por grama
kDa	Quilodalton
x	Veze

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 A próstata	28
1.1.1 Estrutura e populações celulares.....	29
1.1.2 Os lobos dorsolaterais da próstata	34
1.1.3 Regulação	35
1.2 Câncer de próstata.....	37
1.2.1 Dieta e câncer de próstata	40
1.2.1.1 Consumo de lipídeos	40
1.3 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do tipo ômega 3	42
1.3.1 Implicações dos PUFAs ômega-3 no câncer	46
1.3.2 PUFAs ômega-3 na indução de morte celular regulada	48
1.4 Camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP), como modelo de estudo do CaP.....	49
1.5 Linhagens celulares para estudo do câncer de próstata	51
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	53
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivos específicos	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Abordagem <i>in vivo</i>	56
4.1.1 Animais e delineamento experimental.....	56
4.1.2 Análises biométricas e metabólicas	59
4.1.3 Análises morfológicas e histopatológicas.....	60
4.1.4 Análises Imuno-histoquímicas.....	61
4.1.5 Análise de TUNEL (<i>Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling</i>).....	63
4.1.6 Atividade de caspase-3	64
4.2. Abordagem <i>in vitro</i>	64
4.2.1 Cultivo celular	64
4.2.2 Tratamento das células com DHA	65
4.2.3 Western Blotting	65
4.3 Análise estatística	66
5 RESULTADOS	67

5.1 O consumo de uma dieta enriquecida com DHA/EPA melhora os níveis de lipídeos séricos em camundongos TRAMP	67
5.2 O consumo de DHA/EPA atrasa a progressão tumoral, mantendo o aspecto da glândula semelhante ao encontrado em estágios iniciais da carcinogênese	67
5.3 O consumo de uma dieta enriquecida com DHA/EPA preserva o microambiente estromal	69
5.4 O consumo de uma dieta enriquecida com ômega-3 reduz a proliferação celular no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP	70
5.5 O consumo de DHA/EPA reduz a expressão tecidual de receptores de hormônios esteroides	71
5.6 O consumo de DHA/EPA diminui a infiltração de linfócitos no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP	71
5.7 O consumo da D ω 3 aumenta a autofagia e a apoptose na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP	72
5.8 O DHA diminui a necroptose em células prostáticas benignas, já em células tumorais, aumenta a autofagia e diminui a piroptose e a expressão proteica de LXR- β	72
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A - FIGURAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 A próstata

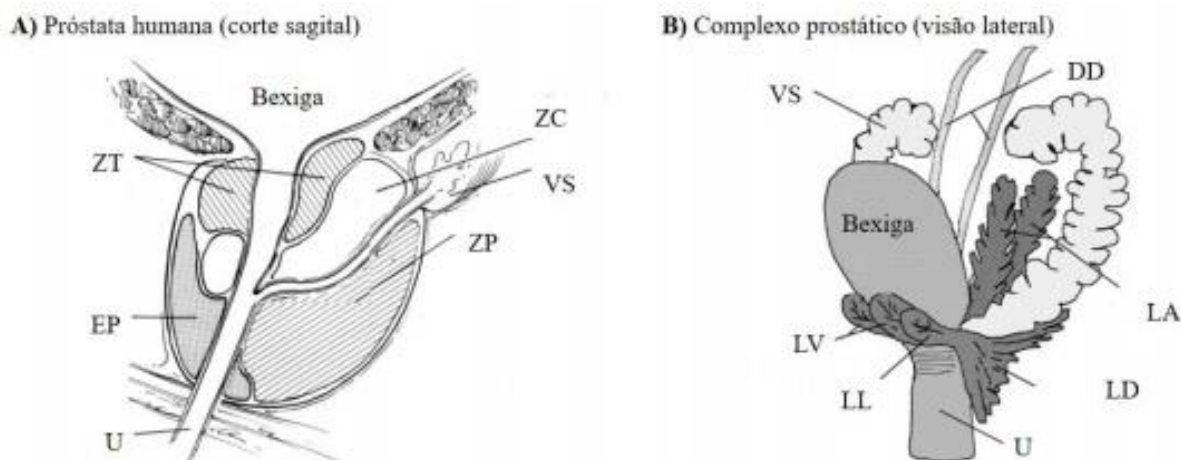
A próstata humana é um órgão do tamanho de uma noz (20g e 4×2,5cm) localizada na base da bexiga e envolvendo o trecho inicial da uretra (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016). É sede de três principais causas de morbidade: (1) hiperplasia prostática benigna (HPB), (2) câncer de próstata (CaP) e (3) prostatite (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016). Como tal, exige atenção, com constantes desenhos de novas terapias contra essas doenças. Por sua vez, isso depende de uma profunda compreensão morfológica e regulatória do órgão e da identidade e função de cada tipo de célula dentro dele.

A próstata é uma glândula, túbulo alveolar composta, acessória do sistema urogenital masculino, que contribui para a produção de uma secreção rica em glicoproteínas, enzimas e nutrientes para o fluido seminal e promove a manutenção do gradiente iônico e do pH apropriado nessa secreção (UNTERGASSER et al., 2005). Assim, fornece aos espermatozoides condições ideais de sobrevivência e de viabilidade durante e após a ejaculação, sendo fundamental para o sucesso reprodutivo (MOTRICH et al., 2018). Possui tanto um componente glandular quanto um fibromuscular que lhe permite realizar sua função reprodutiva (ALUKAL; LEPOR, 2016).

Encontrada na maioria dos mamíferos, sua estrutura difere consideravelmente entre as espécies (HENRY et al., 2018). Não é uma glândula exclusiva do organismo masculino, sendo encontrada em fêmeas de diversos organismos dessa classe, incluindo humanos (BIANCARDI et al., 2017). Vários estudos mostraram que a próstata feminina é homóloga a masculina, apresentando fortes semelhanças macroscópicas e microscópicas. Produz um fluido de composição semelhante ao do fluido prostático masculino, embora sua função biológica ainda seja controversa. Mesmo que as doenças que envolvem a próstata feminina sejam raras, a suscetibilidade desse órgão a desenvolver lesões, como hiperplasia e carcinoma, deve ser considerada (BIANCARDI et al., 2017).

Ainda que analogias sejam encontradas na morfogênese de diferentes espécies, existe uma variabilidade anatômica e histológica notável entre elas. No entanto, apesar dessas diferenças, os camundongos são o modelo animal mais utilizado para estudar aspectos biológicos e patológicos da próstata (MASER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2016; JURMEISTER et al., 2018). Assim, se torna importante conhecer um pouco mais das características prostáticas dos humanos e dos camundongos (Figura 1).

Figura 1 - Organização anatômica da próstata humana (A) e de roedores (B). Zona de transição (ZT), zona central (ZC), zona periférica (ZP), vesícula seminal (VS), estroma prostático (EP), uretra (U), ductos deferentes (DD) lobos ventrais (LV), lobos laterais (LL), lobos dorsais (LD), lobos anteriores (LA).

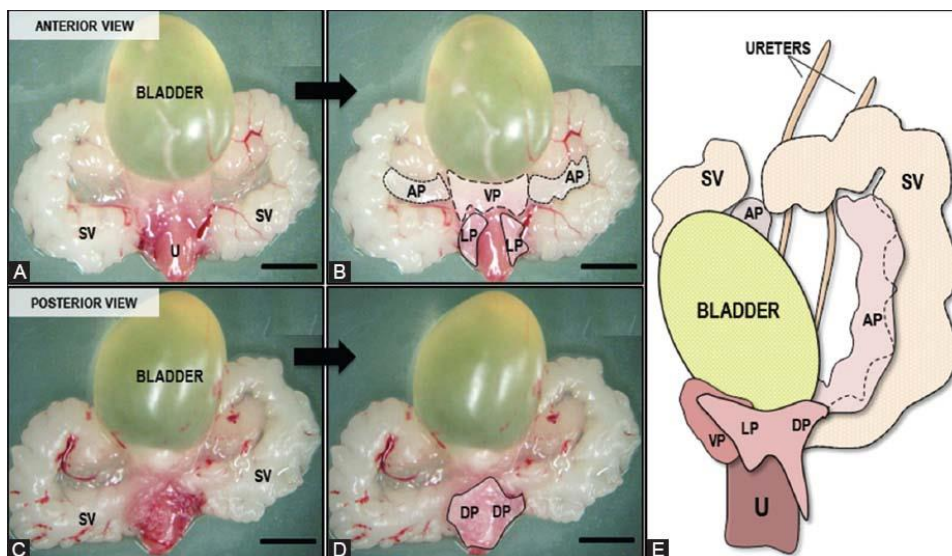


Fonte: TOIVANEN; SHEN, 2017, adaptado.

1.1.1 Estrutura e populações celulares

Na fase adulta, a próstata do camundongo apresenta estrutura multilobular, disposta em torno da uretra na base da bexiga, conhecida como complexo prostático, o qual é composto por quatro pares de lobos (Figura 2), que se originaram durante o desenvolvimento embrionário de pares de brotamentos glandulares distintos (MARKER et al., 2003). Esses lobos, nomeados segundo sua orientação espacial, são os lobos anterior, dorsal, ventral e lateral. Os lobos ventrais, situam-se anteriores à uretra e caudalmente à bexiga e apresentam aspecto rosado, envolvendo parcialmente a uretra, onde seus ductos se esvaziam (TOIVANEN; SHEN, 2017). São ladeados por dois lobos que se encontram em ambos os lados da uretra, conhecidos como próstata lateral. Já a próstata dorsal está localizada bilateralmente na base das vesículas seminais, que são facilmente reconhecidas. Devido à proximidade e fusão parcial em muitas espécies, os lobos lateral e dorsal são frequentemente referidos como próstata dorsolateral (OLIVEIRA et al., 2016). Os lobos anteriores da próstata, também conhecidos como glândulas coaguladoras, são translúcidos e bilateralmente ligados à menor curvatura das vesículas seminais (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

Figura 2 - Anatomia da próstata de camundongo, com visão geral dos órgãos urogenitais masculinos. (A) Aspectos anteriores e (C) posteriores do trato urogenital dissecado de um camundongo adulto. (B) e (D) mostram as mesmas imagens com linhas tracejadas e pontilhadas delineando os lobos da próstata ventral (VP), lateral (LP), anterior (AP) e dorsal (DP). (E) Visão anterolateral (lado esquerdo) dos lobos da próstata em relação à bexiga, vesículas seminais e uretra. (U) Uretra. (SV) Vesículas Seminais. Barra de escala: 1 cm.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2016.

A próstata humana adulta tem morfologia compacta, sem lobulação externa e apresenta regiões glandulares com características histológicas distintas, como uma zona periférica, uma zona central, uma zona de transição e uma região de estroma fibromuscular anterior não glandular (SELMAN, 2011). A zona periférica é a área que constitui a maior parte da região apical, posterior e lateral da próstata. Com base nas comparações anatômicas e moleculares interespecies, os lobos da próstata dorsolateral do camundongo são homólogos à zona periférica humana, onde 75-85% dos adenocarcinomas da próstata ocorrem (BERQUIN et al., 2005; DE MARZO et al., 2007). A zona central, que é considerada a contraparte humana dos lobos anteriores do camundongo, é uma região em forma de cone que circunda o ducto deferente e ocupa cerca de 25% do volume da próstata (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016). A zona de transição, uma região que não possui homólogo em camundongo e onde a maioria das lesões benignas da hiperplasia prostática se desenvolve em pacientes (DE MARZO et al., 2007), é a menor zona (5-10% do volume da próstata) e circunda a região distal da uretra prostática (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016). Apesar da homologia entre os lobos prostáticos do camundongo e de outros roedores com as zonas da próstata humana ter sido sugerida por vários autores, em particular devido à origem embrionária semelhante, muitos concluem que não há evidências suficientes para apoiar uma relação direta entre os lobos específicos da próstata de camundongos e as zonas específicas da próstata humana.

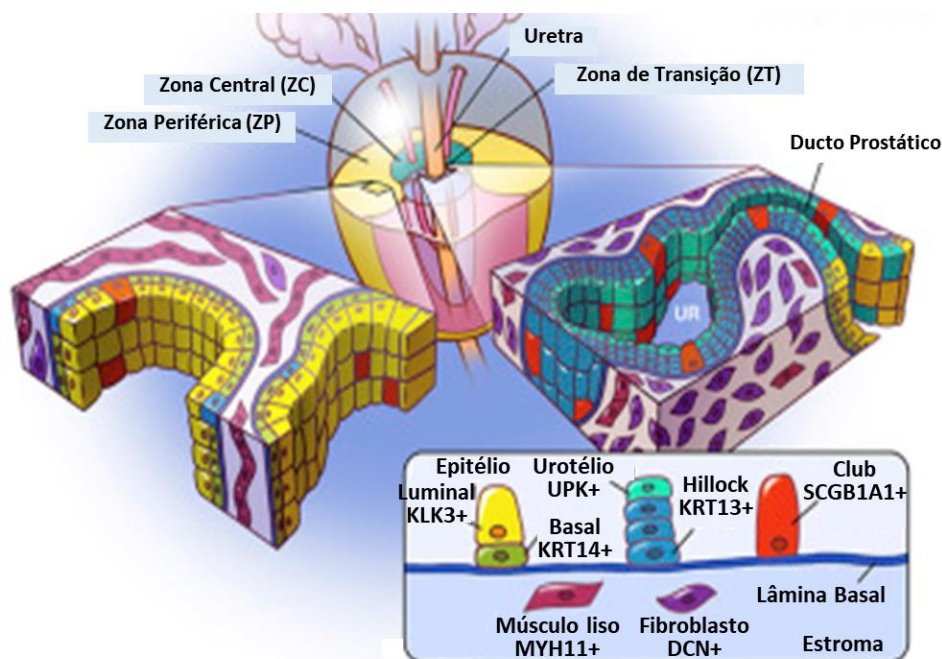
O órgão em questão, de ambas as espécies, origina-se embriologicamente do seio urogenital (UGS), uma estrutura endodérmica presente nos embriões durante o estágio ambissexual e sofre um rápido crescimento e maturação quando os níveis circulantes de andrógenos aumentam na puberdade (25-40 dias de idade em camundongos) (PRINS; LINDGREN, 2015). A atividade secretora glandular ocorre principalmente na porção alveolar, entretanto, os ductos também podem secretar alguns componentes para o conteúdo final da secreção prostática (RESSE et al., 1986). A próstata é composta por um arranjo complexo de estruturas ducto-acinares, nas quais é possível diferenciar três compartimentos de grande importância para a biologia prostática: o epitélio glandular, o lúmen glandular e o estroma.

Assim como nos seres humanos, a próstata dos camundongos contém ácinos e ductos com tipos de células epiteliais que incluem células secretoras luminais colunares, células basais (menos abundantes e em camadas descontínuas nos camundongos) e células neuroendócrinas (Figura 3). Esses tipos de células foram definidos por sua forma, expressão gênica, antígenos de superfície e posição relativa nos ácinos glandulares (SHEN; ABATE-SHEN, 2010). Em ambas as espécies as células basais expressam citoqueratina 5 e o fator de transcrição p63. As luminais expressam citoqueratina 8 e proteínas secretoras cuja síntese é regulada por andrógenos. Um estado celular intermediário putativo entre as linhagens basal e luminal foi definido com base na expressão compartilhada de citoqueratinas basal e luminal (HENRY et al., 2018). As células neuroendócrinas, com características neurais e epiteliais, encontradas em número muito baixo, intercaladas entre as células basais presentes nos ductos e ácinos, expressam marcadores como cromogranina A e sinaptofisina. Essas células estão mais presentes em humanos do que em roedores (SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

Por meio da técnica de sequenciamento de RNA de célula única (*scRNA-seq*), Henry et al. (2018) caracterizaram a identidade molecular de 5 tipos de células epiteliais. Além de confirmarem a existência dos 3 tipos de células epiteliais da próstata humana previamente descritos (basal, luminal e neuroendócrino) relataram dois tipos de células epiteliais anteriormente não reconhecidos, marcados por alta expressão de SCGB1A1 (uteroglobina) e KRT13 (queratina 13). As células da próstata SCGB1A1⁺ são semelhantes em morfologia e perfil transcriptômico às células Clara, ou *club*, presentes no trato respiratório. Estas são um tipo de célula secretora cuboidal não ciliada, não mucosa, que expressa proteínas antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias (MONTORO et al., 2018). Já as células KRT13⁺ da próstata são semelhantes em morfologia e perfil transcriptômico às células basais *hillock* do

pulmão, sendo enriquecidas em tumores de próstata localizados e em células-tronco que exibem resistência a andrógenos (HENRY et al., 2018).

Figura 3 – Esquema da próstata humana, suas regiões e os principais tipos celulares que a compõem. Em destaque para uma região de epitélio e estroma tem-se a representação de células Luminal KLK3+, Basal KRT14+, Hillock KRT13+, Club SCGB1A1+, Urotélio UPK+, Fibroblastos DCN+ e células de Músculo Liso MYH11+. Zona Central (ZC), Zona Periférica (ZP), Zona de Transição (ZT) e Uretra.



Fonte: HENRY et al, 2018, adaptado.

Entremeando as porções glandulares existe o estroma glandular ricamente vascularizado (LEVESQUE; NELSON, 2018), que contém as células musculares lisas com função contrátil e papel na expulsão no fluido prostático. O estroma também contém fibroblastos, responsáveis pela secreção de vários componentes da matriz extracelular (MEC), tais como: elementos fibrilares (i. e. colágeno, elastina), glicoproteínas e proteoglicanos, além de fatores de crescimento (FGs) que regulam a histofisiologia prostática (TUXHORN et al., 2002). Adicionalmente, encontram-se no estroma, vasos sanguíneos, células do sistema imune e nervos. A interação recíproca entre os compartimentos epitélio-estroma é essencial à manutenção da biologia dessa glândula e, conseqüentemente, fatores que afetem esse processo podem levar ao estabelecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (COLEMAN, 2018).

Além dessas células mencionadas, um outro tipo celular foi descrito, os telócitos. Esses são células intersticiais que possuem extensões citoplasmáticas longas e delgadas, chamadas telópodes, divididos em seções dilatadas, os podoms, e os podômeros, que são segmentos

alongados e delgados. Os telócitos apresentam morfologia bem definida, moniliforme ou frisada (SANCHES et al., 2020). Divergem dos fibroblastos na morfologia, proteoma e expressão gênica e podem ser considerados um componente celular típico do estroma, demonstrando profundas inter-relações com outros tipos de células do mesmo compartimento, bem como com o epitélio (SANCHES et al., 2020). Também há evidências de que os telócitos contribuem para a regeneração dos tecidos, manutenção das populações de células-tronco e do estroma e contração das células musculares lisas, entre outros; achados esses que atribuem a esse tipo celular um papel muito relevante na fisiologia prostática (SANCHES et al., 2020).

Ainda sobre o estroma, é o compartimento no qual reside a diferença histológica mais visível entre a próstata de humanos e camundongos. O estroma é muito desenvolvido em humanos, em particular na região fibromuscular anterior, enquanto em camundongos é escasso com um número menor de células musculares lisas (PRINS; LINDGREN, 2015). Além disso, todos os lobos da próstata dos camundongos são cercados por uma cápsula delicada revestida de mesotélio e separados um do outro por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (TOIVANEN; SHEN, 2017).

Em resumo, a próstata de camundongos e humanos possui uma anatomia e histologia distintas. Contudo, o desenvolvimento embriológico, composição celular e características moleculares são semelhantes, o que permite o uso de modelos de camundongos para estudos relacionados a doenças prostáticas humanas, fornecendo uma plataforma para encontrar novas terapias com o intuito de tratar pacientes que sofrem dessas doenças (VALKENBURG; WILLIAMS, 2011). Camundongos são um dos melhores animais para modelar o câncer humano devido alguns fatores como: a) serem tão suscetíveis ao câncer quanto os humanos; b) apresentarem genomas aproximadamente 95% idênticos e exibirem muitos genes estruturalmente semelhantes e alterações genômicas que foram implicadas no câncer; c) serem relativamente fáceis de modificar geneticamente e d) pequenos com tempo de gestação curto, tornando-os razoavelmente simples e baratos de abrigar e reproduzir para gerar grandes populações (VALKENBURG; WILLIAMS, 2011; IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013). A modelagem de camundongos deu uma contribuição significativa ao estudo do desenvolvimento e das doenças da próstata (IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013). Um importante exemplo seria os camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP), a serem descritos posteriormente.

1.1.2 Os lobos dorsolaterais da próstata

A próstata dorsal, em forma de borboleta, está localizada bilateralmente na base das vesículas seminais e a próstata lateral fica em ambos os lados da uretra. Esses lobos são frequentemente chamados de próstata dorsolateral, embora contenham algumas diferenças em sua histologia (PRINS; LINDGREN, 2015). Com relação a morfogênese das redes ductais, os lobos dorsolaterais são desenvolvidos em três etapas: primeiro, formação de ductos principais não ramificados (primeiros 10 dias); segundo, ramificação distal de cada ducto principal resultando em 3–5 ramos terminais por ducto principal (10–15 dias após o nascimento); terceiro, elaboração da dobra da mucosa intraductal nos ductos distais, após 30 dias de idade (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986).

Os lobos dorsais apresentam ácinos com diâmetro menor em comparação com os outros lobos, os quais são revestidos por epitélio colunar e circundados por um estroma relativamente denso. As células secretoras têm núcleos localizados centralmente e citoplasma levemente eosinofílico. A secreção luminal é homogênea e eosinofílica (OLIVEIRA et al., 2016). Os lobos laterais apresentam células epiteliais cuboidais a colunares baixas que formam pequenas dobras. O lúmen glandular é variável e contém secreção eosinofílica. Os núcleos das células secretoras são pequenos e localizados basalmente dentro de um citoplasma eosinofílico (OLIVEIRA et al., 2016)

O epitélio dorsolateral apresenta padrão de expressão gênica distinto do epitélio prostático anterior e ventral, com maior número de genes expressos em níveis mais elevados, assim como o estroma (BERQUIN et al., 2005). Além disso, a análise da expressão gênica, por microarrays de DNA, demonstrou um nível mais alto de expressão de moléculas relacionadas ao citoesqueleto de microtúbulos, por exemplo α -tubulina 1 e 2, β -tubulina 3 e 5, cinesina 2 e 5c e genes de proteína tau associados a microtúbulos, nos lobos dorsolaterais de camundongos (BERQUIN et al., 2005). As proteínas secretadas por esse lobo são altamente glicosiladas e incluem uma proteína semelhante à proteína de ligação à imunoglobulina e uma das proteínas do antígeno da prostatite autoimune experimental (EAPA2). Outras proteínas como a probasina, peroxiredoxina-6, calreticulina, proteína regulada por glicose 78, zinco- α 2-glicoproteína, fosfolipase $C\alpha$, proteína secretora prostática 94, proteína gradiente anterior 2 e proteína dissulfeto isomerase (PDI) também são secretadas (FUJIMOTO et al., 2006). O padrão de expressão gênica estabelece uma equivalência funcional entre o lobo dorsolateral do camundongo e a zona periférica da próstata humana, onde se origina a maioria dos cânceres de próstata humanos (BERQUIN et al., 2005).

1.1.3 Regulação

As interações recíprocas entre o epitélio e o estroma desempenham papéis importantes no desenvolvimento normal e na carcinogênese da próstata (CUNHA et al., 2004; LEVESQUE; NELSON, 2018). Por meio dessas interações são regulados a morfogênese epitelial, o crescimento, a diferenciação e a função durante o desenvolvimento normal (HAYWARD; CUNHA, 2000; TIMMS, 2008). Na idade adulta, as interações homeostáticas entre o epitélio e o estroma são necessárias para manter o estado funcional altamente diferenciado desses compartimentos teciduais (CUNHA et al., 2004).

Os hormônios esteroides sexuais desempenham um papel central na biologia da próstata, controlando o seu desenvolvimento, maturação e homeostasia (LEACH; BUCHANAN, 2017; TOIVANEN; SHEN, 2017). Esses hormônios, via ativação de receptores específicos, medeiam a fisiologia celular nos compartimentos da próstata influenciando a diferenciação, morfologia, função secretora, metabolismo, proliferação e sobrevivência (LEE et al., 2011; ZHOU et al., 2015; AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

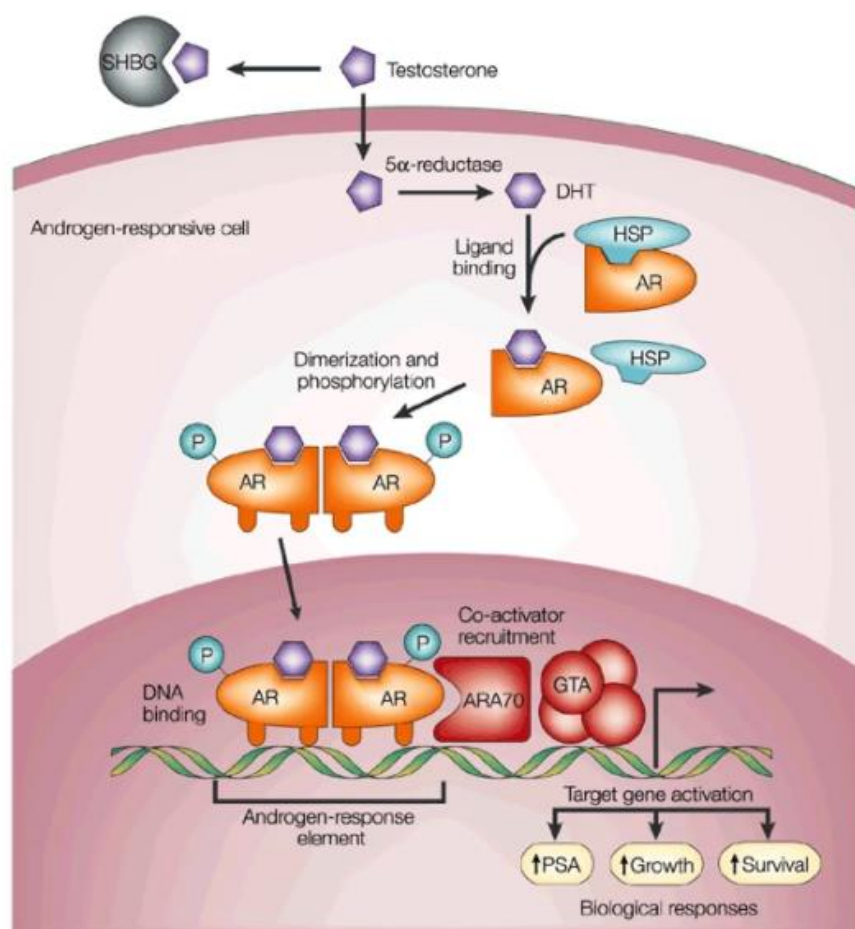
A próstata é um dos órgãos-alvo para a ação dos andrógenos, mas além deles outros hormônios esteroides como o estrogênio e a progesterona também regulam o crescimento e homeostase (NELLES; HU; PRINS, 2011).

O AR (receptor de andrógeno) é o principal mediador da ação dos andrógenos em tecidos-alvo, como a próstata (FUJITA; NONOMURA, 2019) e os mecanismos envolvidos na sua ativação estão ilustrados na Figura 4. A testosterona é o andrógeno mais abundante na circulação, mas a ação androgênica na próstata ocorre principalmente via seu principal metabólito, a DHT (di-hidrotestosterona); também agem na próstata os andrógenos produzidos pelo córtex da adrenal, como a deidroepiandrosterona e a androstenediona (BANERJEE et al., 2018). No nível subcelular, os andrógenos, via ativação de AR, mantêm o epitélio prostático, o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático (TOIVANEN; SHEN, 2017). Também podem suprimir o crescimento do estroma e promover o aumento da altura epitelial e da atividade secretora (LEACH; BUCHANAN, 2017).

Os estrogênios, por meio de receptores de estrogênio (ERs) podem afetar profundamente o crescimento e a diferenciação prostática. Seus efeitos na próstata são complexos, envolvendo ações sistêmicas diretas e indiretas (NELLES; HU; PRINS, 2011). O estradiol, por meio do ER, exerce seu efeito antiandrogênico no epitélio de animais reduzindo as organelas celulares, a produção de secreção e a altura epitelial (OZTEN et al., 2019). Além da testosterona e dos estrogênios, a progesterona também regula a próstata em virtude de sua

atividade androgênica. Quando administrada a ratos machos castrados, a progesterona e as progestinas mantêm ou estimulam o peso, a citologia e as funções secretoras da próstata (BOIBESSOT; TOREN, 2018).

Figura 4 - Ação androgênica na próstata. A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrado) e à globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG). A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase. A ligação de DHT ao receptor de andrógeno (AR) induz a dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) e a fosforilação do receptor. O AR dimeriza e pode se ligar a elementos de resposta a andrógenos nas regiões promotoras de genes alvo. Coativadores (como ARA70) e correpressores (não mostrados) também se ligam ao complexo AR, facilitando ou impedindo, respectivamente, sua interação com o aparelho geral de transcrição (GTA). A ativação (ou repressão) de genes alvo leva a respostas biológicas, incluindo crescimento, sobrevivência e produção de antígeno específico da próstata (PSA).



Fonte: FELDMAN; FELDMAN, 2001.

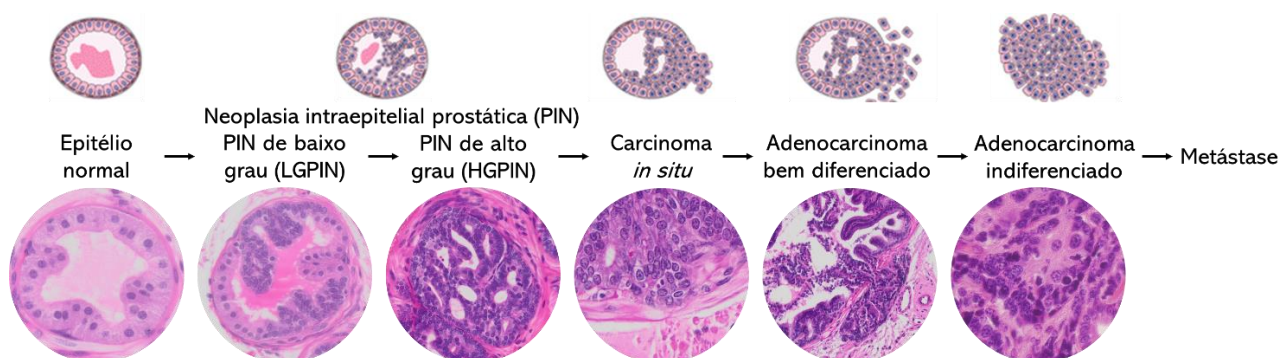
Fatores de crescimento, juntamente com vários moduladores de sobrevivência e proliferação celular presentes na próstata, também estão envolvidos na sinalização intracelular e em sua regulação (NIU; XIA, 2009). Durante o desenvolvimento existe um equilíbrio entre os fatores que ativam e os que suprimem o crescimento. As células estromais e epiteliais da próstata podem sintetizar e responder aos fatores de crescimento de maneira recíproca e

interativa, por intermédio de receptores específicos. Assim, vários fatores de crescimento agem na próstata, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento nervoso (NGF), dentre outros (KWABI-ADDU; OZEN; ITTMANN, 2004; NORDBY et al., 2017; CHEAITO et al., 2020). Perturbações na regulação e sinalização dos esteroides sexuais e desses fatores parácrinos favorecem o desenvolvimento de lesões pré-malignas e do câncer de próstata (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016).

1.2 Câncer de próstata

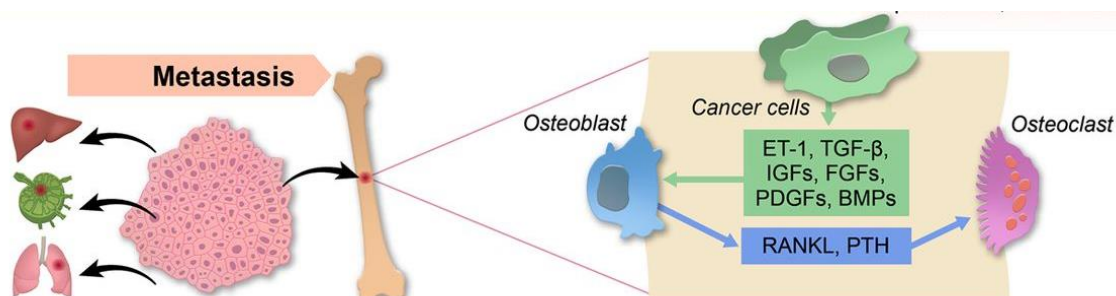
A transformação maligna da próstata segue um processo de várias etapas, iniciando como neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguida pelo adenocarcinoma de próstata (CaP) localizado e, posteriormente, por CaP avançado com invasão local, culminando em câncer de próstata metastático (SHEN; ABATE-SHEN, 2010; WANG et al., 2018) (Figura 5). A doença metastática é a principal causa de morte associada ao CaP (WANG et al., 2018), que metastatiza primeiro para os linfonodos drenantes e depois para órgãos distantes, incluindo ossos, fígado e pulmões, sendo o osso o local mais comum de metástase (WANG et al., 2018). Na metástase óssea, há uma interação dinâmica entre as células cancerosas, osteoblastos e osteoclastos, que resulta em um “ciclo vicioso” de formação e destruição óssea - um processo que apoia a sobrevivência das células cancerosas e o crescimento do tumor (Figura 6).

Figura 5 - Estágios do processo de carcinogênese na próstata. Esquema e imagens do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP.



Fonte: Adaptado pela autora a partir de IRSHAD; ABATE-SHEN, 2013.

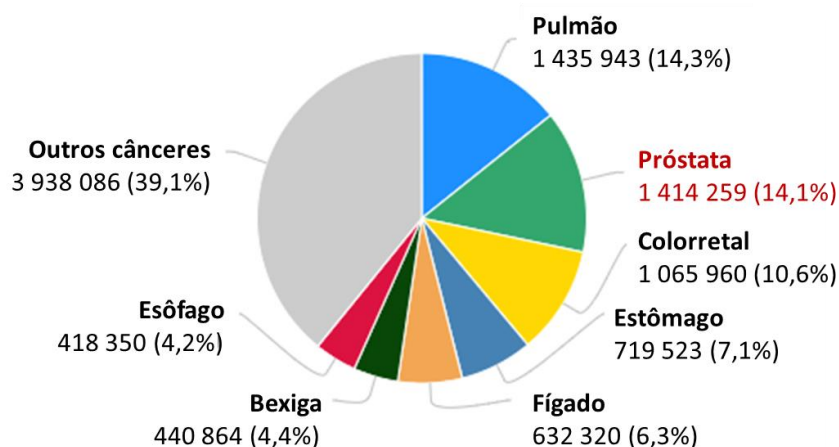
Figura 6 – O câncer de próstata metastático pode atingir órgãos como fígado, pulmão e ossos. O osso é o local mais comum de metástase, onde há uma interação entre as células cancerosas, osteoblastos e osteoclastos, por meio de moléculas como ET-1, TGF- β , IGFs, FGFs, PDGFs, BMPs, RANKL e PHT.



Fonte: WANG et al., 2018.

O CaP atualmente figura entre as neoplasias mais frequentes em indivíduos do sexo masculino em nível mundial (Figura 7) (GLOBOCAN, 2020; SIEGEL et al., 2021), sendo o câncer mais comum diagnosticado em homens, correspondendo, em 2021, a 26% dos diagnósticos (SIEGEL et al., 2021). No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata ocupa a primeira posição no país em todas as regiões (INCA, 2020). Trata-se de um câncer heterogêneo, abrigando tipos de células cancerígenas fenotipicamente diversas, por conta da instabilidade genômica elevada (SKVORTSOV et. al., 2018) e sua incidência e mortalidade em todo o mundo se correlacionam com o aumento da idade (RAWLA, 2019). Pode ser diagnosticado antes dos 45 anos, embora a incidência aumente constantemente dos 45 aos 70 anos e, em seguida, diminua (KENSLER; REBBECK, 2020).

Figura 7 – Estimativa de novos casos de câncer em 2020, em todo mundo, para homens de todas as idades.



Fonte: GLOBOCAN, 2020, adaptado.

No decorrer da carcinogênese prostática, observam-se distintas alterações na fisiologia e no microambiente celular, favorecendo a progressão tumoral. A sinalização androgênica e estrogênica - via ARs e ERs - são importantes no processo de iniciação e progressão do CaP (ZHOU et al., 2015). Assim, alterações na resposta à ativação desses receptores e, mesmo a insensibilidade aos seus respectivos hormônios, podem estar relacionadas ao desenvolvimento e agressividade do CaP (RAMALINGAM; RAMAMURTHY; NJAR, 2017). Nos estágios iniciais, o CaP é dependente de andrógenos para crescimento, no entanto, a maioria dos pacientes eventualmente evoluem para um fenótipo resistente à privação de andrógeno (CRCP), tornando a terapia antiandrogênica ineficiente nesse estágio do câncer (RAMALINGAM; RAMAMURTHY; NJAR, 2017).

Vários estudos genômicos em grande escala em tumores de próstata primários e CRCP metastático, identificaram alterações recorrentes no número de cópias de DNA, mutações, rearranjos e fusões gênicas (WANG et al., 2018). A heterogeneidade do CaP também se manifesta no nível funcional dentro da população de células cancerosas, particularmente no que diz respeito ao status de diferenciação e plasticidade da linhagem. Estudos de rastreamento de linhagem na próstata de camundongos revelaram que as células basais e luminais podem servir como células de origem para o CaP e que a desregulação da diferenciação epitelial é uma etapa crítica para o início dos cânceres de próstata de origem basocelular (WANG et al., 2018).

O CaP pode ser detectado com base em níveis plasmáticos elevados de antígeno específico da próstata (PSA > 4 ng/mL), mas uma biópsia de tecido é indicada para confirmar a presença do adenocarcinoma (RAWLA, 2019). Como tratamento, a cirurgia e a radioterapia são muito utilizadas para a doença localizada, mas têm efeitos adversos que podem afetar negativamente a qualidade de vida (LITWIN; TAN, 2017). Para doença metastática, a quimioterapia como tratamento inicial parece estender a sobrevida em comparação com a terapia de ablação androgênica (ADT) sozinha, visto que a maior parte dos indivíduos sob ADT desenvolvem um fenótipo resistente, i.e. câncer resistente à castração, o que resulta na progressão da doença (CORNFORD et al., 2017). A sobrevida também melhorou devido à administração precoce de docetaxel e novos medicamentos, como abiraterona, enzalutamida e outros agentes (LITWIN; TAN, 2017). Atualmente, novas vacinas e terapêuticas hormonais demonstraram eficácia em homens com câncer de próstata metastático resistente à terapia hormonal tradicional (LITWIN; TAN, 2017).

A etiologia do CaP é complexa e apesar de ser assunto de vários estudos, ainda permanece relativamente incompreendida (RAWLA, 2019). Os fatores de risco bem

estabelecidos são idade avançada, etnia, fatores genéticos e histórico familiar (BOSTWICK et al., 2004; KENSLER; REBBECK, 2020). Outros fatores correlacionados ao risco aumentado de CaP incluem dieta (aumento do consumo de gordura animal saturada e carne vermelha, menor ingestão de frutas, vegetais, vitaminas e café), obesidade e inatividade física, inflamação, hiperglicemia, infecções e exposição ambiental a produtos químicos ou radiação ionizante (MARKOZANNES et al., 2016; RAWLA, 2019).

A dieta, particularmente, desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do CaP. Fatores dietéticos estão principalmente associados às diferenças étnicas e mundiais observadas nas taxas de incidência de câncer de próstata (MATSUSHITA; FUJITA; NONOMURA, 2020). Muitos estudos indicam uma ligação entre certos hábitos alimentares e câncer (PEISCH et al., 2017; LABBÉ et al., 2019; MATSUSHITA; FUJITA; NONOMURA, 2020). Além disso, esses estudos permitiram identificar alguns dos mecanismos biológicos subjacentes que podem explicar essa ligação, mas o impacto de componentes dietéticos específicos nas diferentes fases do CaP ainda é pouco compreendido.

1.2.1 Dieta e câncer de próstata

Os efeitos da dieta e dos nutrientes na patogênese e progressão do CaP têm recebido atenção crescente. Estudos em animais mostram que certos nutrientes, incluindo gordura, proteína, carboidratos, vitaminas (A, D e E) e polifenóis, estão de fato envolvidos na patogênese e progressão do CaP por meio de diversos mecanismos, incluindo inflamação, efeitos antioxidantes e efeitos sobre a secreção e sinalização de hormônios esteroides (NELSON et al., 2014; MATSUSHITA; FUJITA; NONOMURA, 2020). O consumo de lipídeos assume um papel preponderante nas discussões (SUTCLIFFE; COLDITZ, 2013; STEWART; WILD, 2014; PEREZ-CORNAGO, 2017), em especial os ácidos graxos, devido as suas implicações clínicas e metabólicas (BHANDARKAR et al., 2018; KUDA et al., 2018). O termo ácido graxo é usado para designar um grupo de moléculas compostas por uma cadeia de ácido carboxílico e que podem ser hidrolisadas de fontes naturais como gorduras e óleos (RUSTAN; DREVON, 2005).

1.2.1.1 Consumo de lipídeos

A alimentação tem um impacto direto em nossa saúde (SHANG et al., 2017; ZÁRATE et al., 2017), havendo grande destaque para o consumo de lipídeos, para os quais sugere-se que não ultrapasse 30% do total de calorias ingeridas diariamente (LICHTENSTEIN et al., 2006).

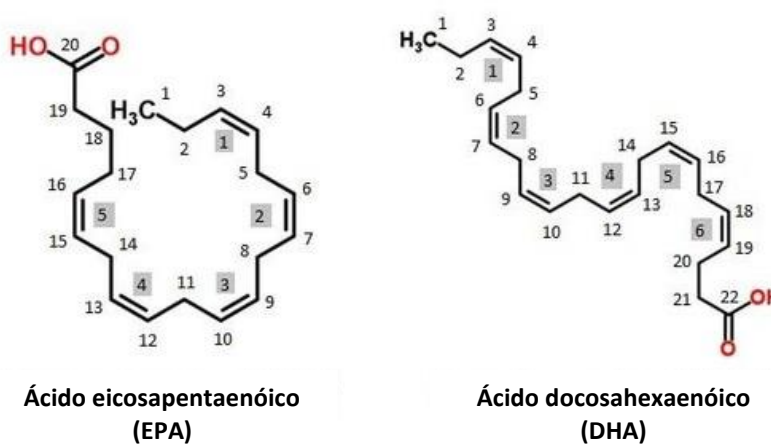
Estudos experimentais e clínicos revelam que o excesso lipídico na alimentação pode alterar as vias de proliferação celular, a expressão de receptores nucleares na próstata e os níveis séricos de hormônios e de citocinas inflamatórias (DE JESUS et al., 2015; PYTLOWANCIV et al., 2016; LISS et al., 2019). O consumo prolongado estimula remodelação estromal e alterações na proliferação de células epiteliais, podendo induzir hiperplasia prostática benigna (HPB), aumento da incidência de lesões patológicas, focos inflamatórios e até mesmo favorecer o CaP (NGO et al., 2003; DE JESUS et al., 2015; SILVA et al. 2015). Além disso, os lipídeos podem alterar a sinalização IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina bioativa-1)/PI3K (fosfoinosítideo 3-quinase)/AKT (proteína quinase B), visto que são capazes de aumentar a quantidade circulante de IGF-I, um fator de crescimento que promove o desenvolvimento de muitos tipos de câncer (MAVROPOULOS et al., 2009; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2010; RIBEIRO et al., 2012).

O consumo de ácidos graxos saturados altera a expressão de receptores nucleares envolvidos na resposta hormonal (AR e ER) e no metabolismo de lipídeos (PPAR γ – receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), promovendo um estado hiperproliferativo no epitélio glandular (PYTLOWANCIV et al., 2016) e até mesmo acelerando a progressão do câncer de próstata (HAYASHI et al., 2018; LIU et al., 2019). Por outro lado, o consumo de ALA (ácido α -linolênico) reduz a expressão do AR e PPAR γ , efeito associado a menor proliferação celular (ESCOBAR et al., 2009). Assim, apesar da quantidade de lipídeos da dieta ser um fator relevante a ser considerado, estudos demonstraram que a natureza dos ácidos graxos na dieta, bem como o período de exposição levam a uma resposta tecidual prostática diferente (BOSTWICK et al., 2004; SONN; ARONSON; LITWIN, 2005).

Substituir a gordura saturada por gordura insaturada é benéfico para a saúde geral (PEISCH et al., 2017). Várias pesquisas relataram que a ingestão de gordura saturada está associada a um risco aumentado de desenvolver CaP avançado, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa estão associados a menor risco (CHAVARRO et al., 2007; ALLOTT et al., 2017; LABBÉ et al., 2019; GEVARIYA et al., 2019; MOUSSA et al., 2019; LIANG et al., 2020; SATO et al., 2021). Dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados cooperam com alterações que levam a iniciação e progressão do câncer, por meio do aumento da transcrição de MYC, um dos principais oncogenes impulsionadores da tumorigênese e progressão do câncer de próstata humano (LABBÉ et al., 2019). Entre os ácidos graxos insaturados com possível ação protetora contra o CaP, destacam-se o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) (Figura 8), ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

(n-3) da série marinha. Assim, tem sido constatado que o consumo de $\omega 3$, especialmente os presentes em peixes, podem levar a uma redução clinicamente significativa do risco de CaP e morte por esse tipo de câncer (PEISCH et al., 2017). Um ensaio clínico entre homens agendados para cirurgia de CaP mostrou que a ingestão de óleo de peixe por 4-6 semanas antes da cirurgia inibiu o crescimento do tumor (GALET et al., 2014). Além disso, os dados de um ensaio clínico com homens em acompanhamento relataram que maior concentração de EPA medido no tecido da próstata foi associado a um menor risco de progressão do CaP (GALET et al., 2014).

Figura 8 - Estrutura química do EPA e DHA. EPA - ácido eicosapentaenóico, 20:5 $\omega 3$; e DHA - ácido docosahexaenóico, 22:6 $\omega 3$. Os átomos de carbono são numerados, começando na extremidade metil. Os números dentro de uma caixa cinza indicam a posição e o número de ligações duplas.



Fonte: MORENO et al., 2012, adaptado.

1.3 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) do tipo ômega 3

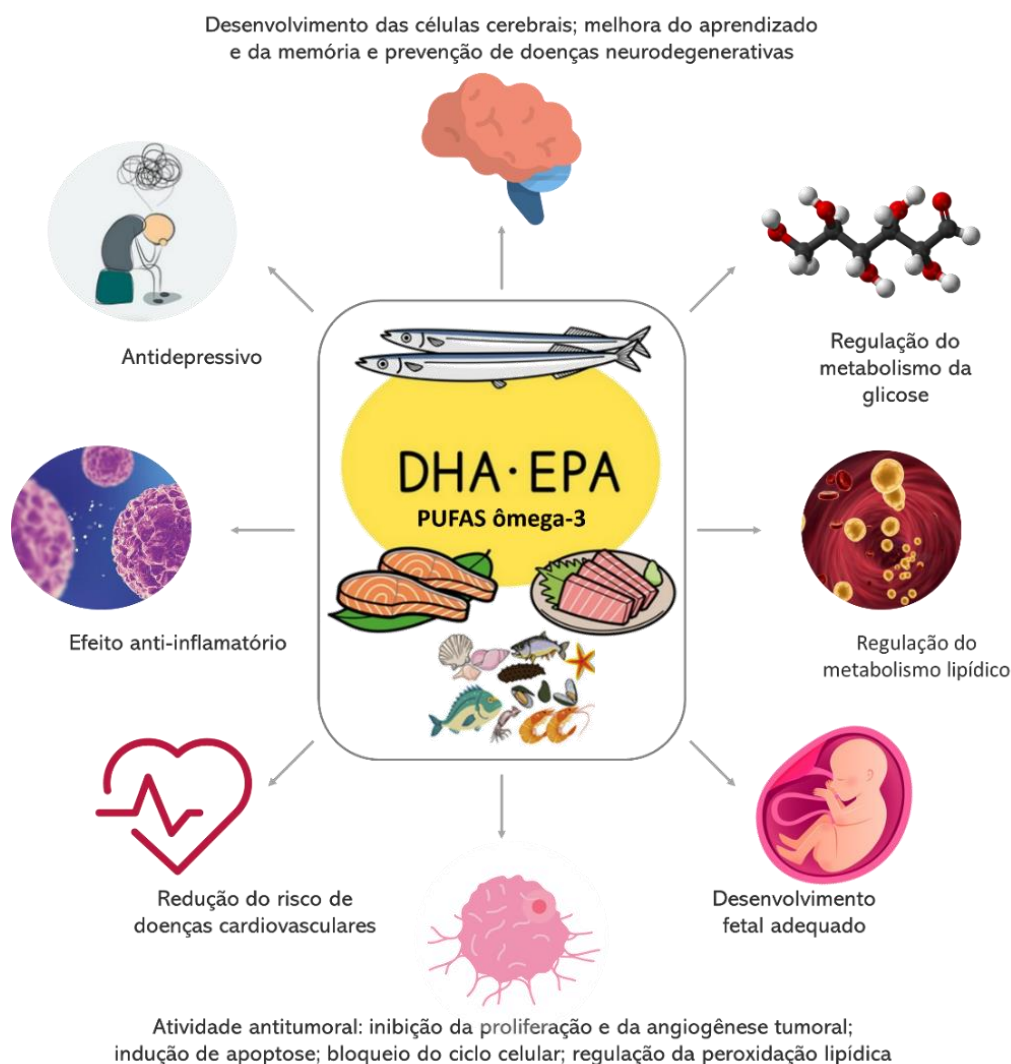
Conforme mencionado, algumas classes de lipídeos são preferíveis ao consumo devido aos diversos benefícios à saúde, como os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (PLOURDE; CUNNANE, 2007; ZÁRATE et al., 2017), entre eles, o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, $\omega 3$) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 $\omega 3$).

Os ácidos graxos de ocorrência natural podem ser classificados em três categorias com base no número de ligações duplas presentes nas cadeias laterais: saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (uma ligação dupla) e poli-insaturados (PUFAs, ≥ 2 ligações duplas). Podem ser classificados também pelo comprimento da cadeia de carbono e pela posição da primeira ligação dupla no terminal metila (ômega; ω ; ou n-) (SAINI; KEUM, 2018). Alguns ácidos graxos são essenciais pois não podem ser produzidos pelos seres humanos, como o ômega-6 ($\omega 6$) ácido linoleico (LA, C18:2) e o $\omega 3$ ácido α -linolênico (ALA, C18:3).

Os PUFA são metabolizados principalmente no fígado, no retículo endoplasmático liso, e então exportados para os demais órgãos, onde podem ser incorporados aos fosfoglicerídeos de membrana (DAVIDSON, 2013; KUDA et al., 2018). Dessa forma, podem, então, ser recrutados e metabolizados pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX), lipo-oxigenase (LOX) e citocromo P450 (CYP) (ZELDIN, 2001), levando a formação de vários lipídeos bioativos que modulam diferencialmente a fisiologia celular.

Geralmente, considera-se que os PUFA têm efeitos benéficos à saúde. No entanto, os $\omega 3$ e $\omega 6$ têm efeitos opostos nas funções metabólicas do corpo. As dietas enriquecidas com PUFA $\omega 6$ estão associadas à inflamação, constrição dos vasos sanguíneos e agregação plaquetária (DENNIS; NORRIS, 2015). Em contraste, PUFA $\omega 3$ ajudam a resolver a inflamação e alteraram a função de biomarcadores vasculares e carcinógenos, reduzindo assim o risco de câncer e doenças cardiovasculares (DEL GOBBO et al., 2016; LI et al., 2017; SAINI; KEUM, 2018; GEVARIYA et al., 2019). Além de doenças cardiovasculares e câncer, PUFA $\omega 3$ fornecem proteção substancial contra outras doenças crônicas e metabólicas, como diabetes, obesidade, osteoporose, degeneração neurológica e fraturas ósseas (Figura 9) (LUO et al., 2016; CHE et al., 2018; SAINI; KEUM, 2018).

Figura 9 - Benefícios associados ao consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, como DHA e EPA. Embora muitos benefícios dos PUFAs ômega-3 para a saúde tenham sido relatados na literatura, também existem algumas controvérsias sobre sua eficácia para a saúde humana em alguns desses benefícios.



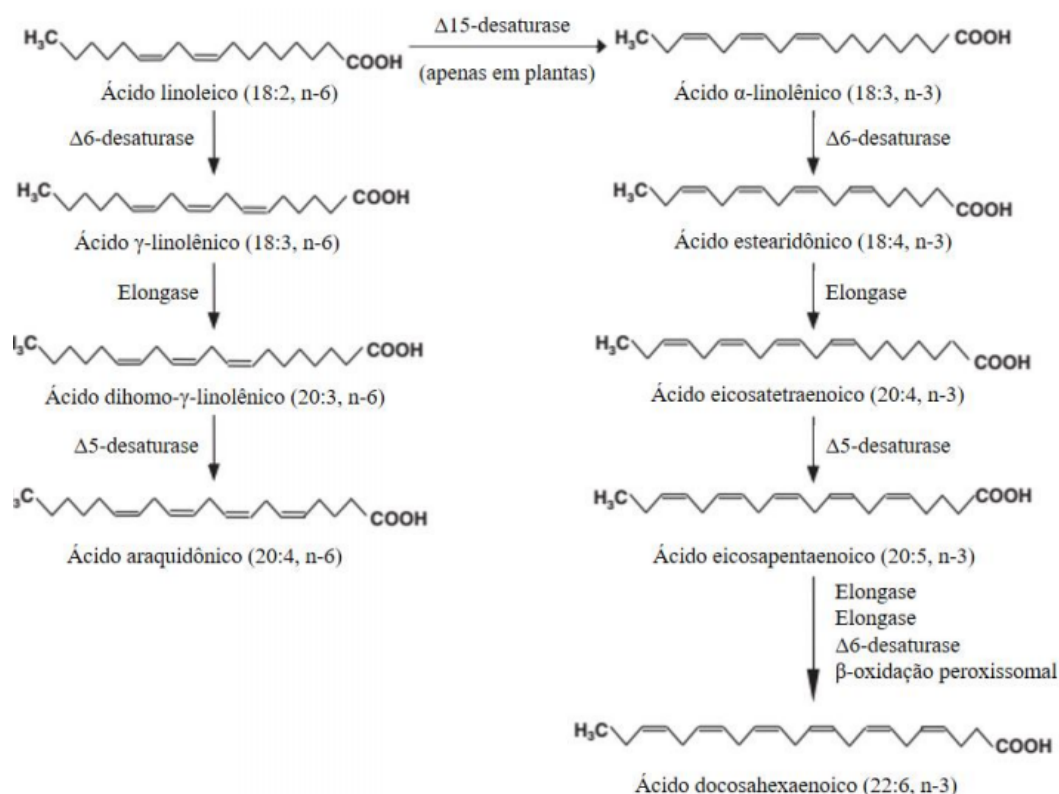
Fonte: Elaborado pela autora com figuras retiradas do Google Imagens.

Na maioria dos países a ingestão de ácidos graxos $\omega 3$ é geralmente inadequada por causa de suas fontes limitadas (MOGHADASI et al., 2008). A obtenção de PUFAs $\omega 3$ como EPA e DHA ocorre majoritariamente pela dieta, através do consumo de peixes, principalmente marinhos de águas frias – e pela suplementação alimentar com óleo de peixe (SCHUCHARDT; HAHN, 2013; JACOBSEN, 2015). Sementes de chia, perilla e linho são abundantes em ALA, assim como vegetais de folhas verdes. No organismo, ALA pode ser convertido em PUFAs de cadeia longa por acil-CoA sintetases, $\Delta 6$ - e $\Delta 5$ -desaturases e suas respectivas elongases, em EPA e DHA (Figura 10) (SAINI; KEUM, 2018). No entanto, o processo de bioconversão é particularmente ineficiente (PLOURDE; CUNNANE, 2007; SAINI; KEUM, 2018).

A conversão de ALA em EPA e DHA depende de vários fatores dietéticos e genéticos, incluindo a proporção de LA e ALA na dieta, deficiência de outros nutrientes, diferença de gênero e polimorfismos em dessaturases e elongases (SAINI; KEUM, 2018). A eficiência de conversão para gerar DHA a partir de ALA é melhor em mulheres jovens em comparação com os homens devido ao efeito dos estrógenos, capazes de aumentarem a expressão de uma das enzimas envolvidas no processo (GILTAY et al., 2004). Uma vez que LA e ALA competem pela mesma elongase e dessaturase durante a biossíntese de PUFA's de cadeia longa, a baixa razão de LA para ALA favorece a biossíntese de PUFA's ômega-3 como EPA e DHA (MEESAPYODSUK; QIU, 2012.).

A proporção dietética recomendada de ômega-6/ômega-3 para benefícios à saúde é 1:1-2:1, estando próxima ao observado em alguns países orientais como o Japão (4:1); no entanto, em dietas ocidentais típicas, a proporção é 15/1 a 16,7/1 (SIMOPOULOS, 2006). Assim, considerando que a dieta ocidental é rica em PUFA's ω_6 , (SIMOPOULOS, 2006; SCHMITZ; ECKER, 2008), a suplementação alimentar com PUFA's ω_3 tem sido recomendada por profissionais da saúde, em doses que variam de 200mg à até 4g/dia, dependendo da condição de saúde do indivíduo (PLOURDE; CUNNANE, 2007).

Figura 10 - Biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (esquerda) e ômega-3 (direita).



Fonte: CALDER, 2015, adaptado.

1.3.1 Implicações dos PUFAs ômega-3 no câncer

Abordagens *in vitro* e *in vivo* sugerem que o EPA e, principalmente, o DHA, podem inibir o crescimento do CaP (SONN; ARONSON, 2005; GEVARIYA et al., 2019; AMARO et al., 2020; TAMARINDO; GÓES, 2020).

Amplas evidências demonstram que os PUFAs ω 3, como o DHA, inibem a promoção e progressão da carcinogênese por diversos mecanismos moleculares que incluem: 1) supressão da biossíntese de eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA, 20: 4, n-6), que resulta na modulação do microambiente inflamatório, alteração na cinética de proliferação e morte celular, metástase e angiogênese (CRAWFORD et al., 2000; LARSSON et al., 2004; WANG; DUBOIS, 2010; CALDER, 2015); 2) modulação da expressão e atividade de fatores de transcrição, alteração no padrão de expressão gênica e transdução de sinal, levando a mudanças no metabolismo, crescimento e diferenciação celular (MURRAY et al., 2002; BERQUIN et al., 2007); 3) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CALDER; GRIMBLE, 2002; SHIN et al., 2013); 4) regulação da peroxidação lipídica não enzimática que induz a apoptose em células tumorais (BERQUIN; EDWARDS; CHEN, 2008); 5) mecanismos envolvendo sensibilidade à insulina e fluidez da membrana (HIGO et al., 1997; LIANG et al., 2018), alterando sua composição lipídica e a interação entre as células T e as células apresentadoras de antígenos e 6) alteração da atividade metabólica dos estrógenos seguida por uma diminuição no crescimento celular estimulado pelos mesmos (SAINI; KEUM, 2018).

Esses PUFAs ω 3 podem atuar através de mediadores de sinalização celular, incluindo proteína quinase C, proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e fator nuclear kappa B (NF- κ B); atuar diretamente como ligantes para receptores nucleares, como receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e receptor retinóide X tipo alfa, ou controlar a homeostase intracelular através da regulação dos canais de Ca^{++} na membrana plasmática para ativar a quinase eIF2 α que pode diminuir a expressão de oncogenes e ciclinas G1 (SAINI; KEUM, 2018; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2018).

Interessantemente, estudos com cultura de células indicam que os efeitos do EPA e do DHA parecem diferir quanto à sensibilidade androgênica. Em linhagens de células prostáticas cancerígenas andrógeno-independentes, PC3, o tratamento com DHA leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, inativando a via AKT-mTOR (alvo mecanístico de Rapamicina) (SHIN et al., 2013) e modulando a expressão de fatores de sobrevivência (CAVAZOS et al., 2011; SUN et al., 2017). Em células prostáticas cancerígenas andrógeno-dependentes, LNCaP, o tratamento com esses ácidos graxos é capaz de modular a atividade

transcricional do AR devido ao aumento na expressão do fator de transcrição *c-Jun* (CHUNG et al., 2001), estimular a degradação proteassomal do AR (WANG et al., 2012; HU et al., 2015) e reduzir a expressão de fatores antiapoptóticos (ESER et al., 2013).

Majoritariamente, os estudos com DHA e EPA são focados em análises *in vitro* e atribuem a esses PUFA, principalmente, um efeito anti-proliferativo (ESER et al., 2013; OONO et al., 2017). Contudo, no que diz respeito à próstata, pouco se sabe da ação do DHA/EPA em um microambiente normal e a literatura é particularmente escassa quando se trata de estudos *in vivo* (EDWARDS et al., 2008; JING et al., 2011; SHIN et al., 2013; TAMARINDO et al., 2019).

Mesmo com todos os achados que demonstram que DHA/EPA podem atuar em diferentes vias de sinalização celular, ainda não se tem um panorama conclusivo quanto ao seu papel no desenvolvimento e progressão do CaP. Além disso, os benefícios do DHA para a saúde da próstata vêm sendo questionados em trabalhos recentes. Estudos populacionais que buscaram avaliar o impacto do consumo desses lipídeos sobre o desenvolvimento do CaP levaram a respostas contraditórias no que diz respeito ao risco de desenvolvimento desse câncer. Alguns autores não constataram associação entre o consumo de DHA e o risco de desenvolvimento de CaP (CROWE et al., 2008; DINWIDDIE et al., 2016) ao passo que outros indicaram que a ingestão desses ácidos graxos pode aumentar o risco do desenvolvimento de CaP (WALLSTRÖM et al., 2007; CROWE et al., 2008; BRASKY et al., 2011; SORONGON-LEGASPI et al., 2013). Lange e colaboradores (2019), relatam que a suplementação em altas doses por longos períodos de tempo com PUFA $\omega 3$ pode estar associada ao aumento do risco de câncer, possivelmente devido a presença de contaminantes e desreguladores endócrinos em peixes e óleos de peixe e devido a seus produtos de oxidação, já que os PUFA são altamente propensos à degradação oxidativa em peróxidos lipídicos e produtos de oxidação secundária, que podem torná-los ineficazes ou prejudiciais.

Dessa forma, nota-se que as repercussões do consumo de PUFA $\omega 3$ sobre o sistema reprodutor ainda é um tema controverso e que precisa ser melhor esclarecido. Apesar das evidências experimentais indicando que diferentes tipos de lipídeos são capazes de afetar a proliferação celular e contribuir com o estabelecimento de lesões e focos inflamatórios na próstata (ESCOBAR et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012; DE JESUS et al., 2015; PYTLOWANCIV et al., 2016), pouco ainda é conhecido sobre a ação do EPA e do DHA sobre essa glândula.

1.3.2 PUFA ω -3 na indução de morte celular regulada

Um aspecto ainda pouco explorado diz respeito ao papel dos ω 3 nas vias de morte celular regulada (MCR). Sabe-se que o desequilíbrio entre proliferação e morte celular é um evento chave para a progressão tumoral (GRIVICICH et al., 2007) e um dos marcos do câncer é a tendência a evasão da MCR que proporciona uma vantagem pró-sobrevivência (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A MCR pode ser definida como processos de destruição de células isoladas por mecanismos que envolvam um programa intrínseco geneticamente controlado (GALLUZZI et al., 2018). A elucidação dos sinais moleculares de indução e das proteínas efetoras tem permitido caracterizar os diferentes tipos de MCR quanto aos seus aspectos genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais e diferenciar novos tipos de MCR como a piroptose, a necroptose, entre outras (GALLUZZI et al., 2018). A piroptose é um tipo de MCR desencadeada por fatores inflamatórios como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou outros produtos de danos teciduais, que envolve a formação de uma plataforma de sinalização, o inflamassoma, e a subsequente ativação de caspases inflamatórias 1 e 11 (JORGENSEN; MIAO, 2015; GALLUZZI et al., 2018). A ativação dessas caspases leva a clivagem proteolítica da proteína gasdermina D, que se polimeriza formando grandes poros na membrana celular, culminando com o aumento do volume celular, rompimento da membrana, fragmentação nuclear e condensação da cromatina, resultando em um morfótipo necrótico (JORGENSEN; MIAO, 2015; WANG et al., 2021). A necroptose também é um tipo de MCR inflamatória com morfótipo necrótico e induzida por PAMPs ou produtos de danos teciduais, mas ocorre via ativação de receptores específicos como o TNF-R ou TLR (*Tool-like receptors*) em situação de inibição das caspases. Essa ativação desencadeia a formação da via de sinalização do necrossomo, ativação da proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudoquinase*) com consequente formação de poros na membrana plasmática (GALLUZZI et al., 2018; WANG et al., 2021).

Existem evidências que o DHA pode induzir MCR em diferentes tipos de células tumorais sendo a via apoptótica a mais descrita (DIEP; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000; SHIN et al., 2013; LUZETE, 2015; XUE et al., 2017). No caso das células tumorais prostáticas, esse ω 3 induz apoptose pela via intrínseca através da inibição de AKT/PIP3 (DU TOIT-KOHN et al., 2009; GU et al., 2013) e PDK1/AKT/BAD (agonista de morte celular associado a Bcl2) (SHAIKH et al., 2008; HU et al., 2010). Também pela inibição da via IKT/NF- κ B (SCHLEY et al., 2005; BERQUIN et al., 2007; GU et al., 2013). O DHA inibe a atividade transcrricional

do NF- κ B pois impede sua translocação para o núcleo (SONG et al., 2006; CAVAZOS et al., 2011). Observou-se também que esse $\omega 3$ ocasiona morte apoptótica associada à autofagia em células tumorais de próstata, por meio da regulação da proteína p53 e inativação de vias de sobrevivência e proliferação celular (SHIN et al., 2013).

A apoptose é a MCR mais descrita e praticamente a única relacionada à morte celular induzida pelo DHA em células tumorais prostáticas e a interferência nas vias de piroptose e da necroptose permanece por ser elucidada. Uma vez que a apoptose é frequentemente prejudicada em cânceres humanos, a indução de outros padrões de MCR, como a necroptose ou piroptose, pode superar a resistência à apoptose, abrindo novas oportunidades para matar células cancerosas (WANG et al., 2021). Nota-se, entretanto, que o papel dos subtipos de morte celular ainda é pouco conhecido para os diferentes cenários metabólicos da próstata, em especial em modelos *in vivo* de carcinogênese prostática.

1.4 Camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP), como modelo de estudo do CaP

Muitos esforços são voltados para compreender melhor os processos envolvidos na iniciação e progressão do CaP, com base em modelos *in vivo* e *in vitro*, o que possibilita traçar novas abordagens terapêuticas (HAO et al., 2018; WATT et al., 2019). Assim, o uso de camundongos transgênicos da linhagem TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*), estabelecida em 1995 por Greenberg e colaboradores, constitui um bom modelo para a investigação do CaP (Figura 11 A).

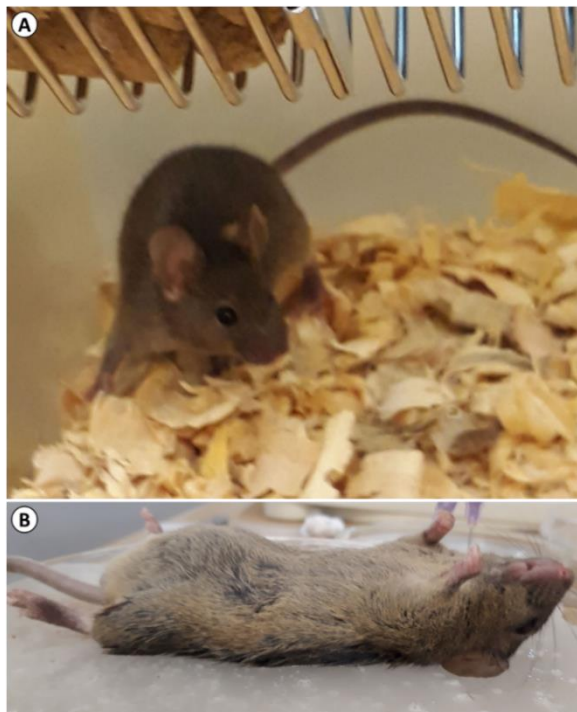
A carcinogênese prostática nesses animais é dada pela expressão do antígeno T (Tag) do vírus símio 40 (SV40) e pequenas oncoproteínas t, sob controle da probasina de rato, um elemento andrógeno-dependente (GREENBERG et al., 1995). O Tag do SV40 tem sua expressão restrita ao epitélio prostático e age como uma oncoproteína inativando produtos de genes de supressão tumoral como a proteína p53 e retinoblastoma (GREENBERG et al., 1995). Assim, esse modelo desenvolve lesões que variam de pré-neoplásica a metástase (CaP progressivo), possibilitando a investigação em diferentes graus do perfil tumoral, além de independência androgênica (GINGRICH; GREENBERG, 1996; KIDO et al., 2019). Sua semelhança com o CaP humano tem fornecido conhecimentos essenciais sobre o desenvolvimento da doença (KIDO et al., 2019).

Em relação à presença de processos proliferativos nos diferentes lobos prostáticos, verificou-se que a expressão do transgene em camundongos TRAMP está principalmente

relacionada aos lobos dorsolateral e ventral, com progressão lenta do CaP no lobo anterior (SILVA et al., 2018). Nesse modelo, já entre 4-6 semanas de idade, alterações nucleares podem ser observadas em regiões dispersas do epitélio acinar na próstata ventral e dorsolateral, consistentes com aquelas observadas em PINs humanas de baixo grau (GINGRICH et al., 1999). Hiperplasia grave e CaP são verificados em camundongos com 18 semanas de idade e de acordo com Greenberg (2000), 100% dos camundongos TRAMP apresentam tumores primários entre 24-30 semanas de idade. O lobo dorsolateral da próstata em camundongos TRAMP desenvolve neoplasia intraepitelial prostática com 8 semanas de idade e adenocarcinoma bem diferenciado com 12 semanas de idade, assim como tumores primários podem ser encontrados com 20 semanas de idade (BERMAN-BOOTY et al., 2012).

O uso desse modelo animal fornece vantagens ao permitir monitorar a progressão da lesão prostática em um curto espaço de tempo, trazendo resultados relevantes para os estudos, incluindo a caracterização morfológica do tecido prostático e de outros órgãos; metabolismo do câncer; diagnóstico; prevenção; tratamento e descoberta de novas drogas (KIDO et al., 2016; SILVA et al., 2018; AMARO, 2020). Modelos transgênicos, como o TRAMP, podem desenvolver tumores *in situ* e em um contexto fisiológico apropriado (interações epiteliais estromais) com acesso sanguíneo e linfático adequado, permitindo, assim, caracterizar os mecanismos moleculares responsáveis pela progressão do câncer (GINGRICH et al., 1999). Outra vantagem, segundo Balmain (2002) é a capacidade de controle de aspectos como a exposição ambiental, que leva ao aparecimento do câncer, o que ainda não é possível em seres humanos. Além disso, esses camundongos contribuíram para elucidar diferentes processos biológicos envolvidos no perfil agressivo do adenocarcinoma prostático e fornecem uma fonte praticamente inesgotável de material de pesquisa rapidamente renovável.

Figura 11 - Camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP). A) Camundongo com 12 semanas de idade. B) Camundongo com 20 semanas de idade, sendo preparado para eutanásia, onde é possível observar uma protuberância no abdômen resultante de um tumor primário da próstata, confirmado por dissecação do animal.



Fonte: Fotografado pela autora.

1.5 Linhagens celulares para estudo do câncer de próstata

Segundo Cunningham e You (2015), o modelo *in vitro* mais útil que se tem de CaP é a cultura de células, devido ao extenso número de linhagens celulares disponíveis para estudo e devido ao fato de que o CaP pode surgir de uma das várias fontes de células na próstata. Nas últimas décadas, estudos moleculares avançaram no campo da pesquisa do CaP, com base no estabelecimento de linhagens e sub-linhagens específicas, desenvolvidas para esclarecer mecanismos complexos subjacentes ao desenvolvimento, tratamento e resistência do CaP (NAMEKAWA et al., 2019). Como essas linhagens celulares mostram capacidade de proliferação ilimitada e capacidade de triagem de drogas de alto rendimento elas são recursos importantes para o estudo do câncer, apesar de apresentarem como uma limitação a falta de um microambiente e ausência da influência imunológica.

Duas linhagens de células utilizadas na pesquisa do CaP serão empregadas nesse estudo: a PNT1A e a 22rv1 (Tabela 1). A linhagem de células humanas PNT1A foi estabelecida por imortalização de células epiteliais prostáticas adultas normais por transfecção com um plasmídeo contendo genoma SV40 com uma origem de replicação defeituosa (DEGEORGES

et al., 1995). A cultura primária foi obtida da próstata de um homem de 35 anos *post mortem*. Apesar de ser adotada como uma linhagem não tumoral na maioria das pesquisas é um bom modelo para estudar os primeiros estágios da carcinogênese prostática tendo em vista alterações pré-malignas que conferem alta capacidade de proliferação. Isto porque possui metabolismo e fenótipo de células epiteliais secretoras normais, mas apresenta características observadas no adenocarcinoma prostático, como perda do braço curto do cromossomo 10, expressão amplificada de c-myc e capacidade de transformação e formação de CaP indiferenciado em camundongos (DEGEORGES et al., 1995)

A 22Rv1 é uma linhagem de células epiteliais de carcinoma de próstata humano derivada em 1999 de um xenoenxerto CWR22R isolado de um paciente com metástase óssea. O xenoenxerto foi propagado em série em camundongos após regressão induzida por castração e recidiva do xenoenxerto CWR22 parental dependente de andrógeno. Em camundongos, as células 22Rv1 formam tumores com morfologia semelhante à de seu xenoenxerto parental (SRAMKOSKI et al., 1999).

Tabela 1 - Caracterização geral das linhagens celulares PNT1A e 22rv1, células prostáticas normais e tumorais, respectivamente.

Linhagem	Origem	Tipo	AR	Cariótipo	Modo de crescimento	Tempo de duplicação
PNT1A	Epiteliais luminais imortalizadas com SV40	Normal	RNA _m / proteína	Aneuploide	Aderente	Aprox. 30 horas
22rv1	Epiteliais derivadas de xenoenxerto CWR22R	Tumoral responsiva a andrógeno	RNA _m / proteína	49, XY	Aderente	35-40 horas

Fonte: DEGEORGES et al., 1995; CUNNINGHAM; YOU, 2015; NAMEKAWA et al., 2019; www.atcc.org.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Como mencionado, o CaP, atualmente, figura entre as principais causas de morte no cenário mundial (SIEGEL et al., 2021) e carece de estratégias terapêuticas eficazes. Visto que sua etiologia é extremamente complexa, com predomínio dos fatores ambientais, entre os quais a dieta assume um papel preponderante, nos últimos anos tem havido crescente interesse sobre o papel dos lipídeos na dieta (RIBEIRO et al., 2012; DE JESUS et al., 2015; PYTLOWANCIV et al., 2016; OCZKOWSKI et al., 2021; GUPTA; SERAJUDDIN, 2021).

Nesse cenário, estudos experimentais e epidemiológicos têm buscado esclarecer as repercussões dos PUFA $\omega 3$ sobre a saúde prostática (SONN; ARONSON, 2005; WALLSTRÖM et al., 2007; CROWE et al., 2008; BRASKY et al., 2011; GEVARIYA et al., 2019). Embora os estudos experimentais demonstrem que eles podem atuar em diferentes vias de sinalização celular e indiquem uma ação protetora contra o CaP, os estudos epidemiológicos são conflitantes. Enquanto alguns estudos demonstram que a ingestão de PUFA $\omega 3$ da série marinha e os altos níveis séricos desses lipídeos reduzem o risco de desenvolvimento do CaP (NORRISH et al., 1999; LEITZMANN et al., 2004), outros não constata essa associação (CROWE; KEY; et al., 2008; DINWIDDIE et al., 2016) e alguns trabalhos indicam que a alta ingestão desses ácidos graxos pode aumentar o risco do desenvolvimento do CaP (WALLSTRÖM et al., 2007; CROWE; ALLEN; et al., 2008; BRASKY et al., 2011; SORONGON-LEGASPI et al., 2013). Portanto, ainda se tem um panorama inconclusivo quanto ao papel dos $\omega 3$ no desenvolvimento e progressão do CaP.

São escassas as investigações dos efeitos da ingestão de óleo de peixe com elevada concentração de DHA e EPA como é vendido comercialmente, sobre a próstata. A maioria dos estudos disponíveis foi realizado com células em cultura e a literatura é particularmente limitada quando se trata de estudos *in vivo* (EDWARDS et al., 2008; JING et al., 2011; SHIN et al., 2013; TAMARINDO et al., 2019). Embora ainda pouco se saiba sobre as propriedades dos $\omega 3$ em células com fenótipo normal e com alterações pré-malignas iniciais. Com isso, se faz necessário investigar melhor a ação desses lipídeos no que diz respeito à progressão do CaP, principalmente em modelos *in vivo*, como os camundongos TRAMP. Esses camundongos são uma ótima alternativa, visto que a progressão da doença se assemelha aos humanos e o contexto fisiológico é preservado, mantendo as interações epitélio-estromais, estímulos hormonais e processos inflamatórios, permitindo a análise de eventos e mecanismos envolvidos na progressão tumoral e metástase (GINGRICH et al., 1996).

Dada a resposta diferencial de cada lobo prostático, a investigação no lobo dorsolateral é importante para conhecer melhor suas respostas frente ao consumo de $\omega 3$. A expressão do transgene é significativamente maior nesse lobo, com uma consequente progressão mais rápida da doença. Alguns autores, ainda, relacionam os lobos da próstata dorsolateral do camundongo a zona periférica da próstata humana, onde a maioria dos adenocarcinomas de próstata ocorrem (BERQUIN et al., 2005; DE MARZO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2016). Logo, se tem o lobo dorsolateral como um bom modelo para o estudo do adenocarcinoma prostático com progressão rápida.

Para mais, a investigação do DHA com cultura de células permanece pertinente uma vez que as respostas celulares frente a este lipídio ainda são inconclusivas. Alguns autores ainda apontam para uma resposta individual e dose dependente entre linhagens prostáticas normais e cancerígenas (MENG et al., 2013). Da mesma maneira, o efeito quimioprotetor pela suplementação com DHA ainda não é compreendido em todos os estágios da carcinogênese e os mecanismos envolvidos não são completamente elucidados, podendo envolver modulação de diferentes padrões de MCR, além da apoptose, o que ainda não foi avaliado na próstata.

Assim, investigar os mecanismos pelos quais os PUFA $\omega 3$ são capazes de modular a fisiologia celular em diferentes estágios de desenvolvimento tumoral, permitirá identificar novas estratégias na prevenção e tratamento do câncer de próstata.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados tipo ômega-3, DHA e EPA ($D\omega 3$), provenientes do óleo de peixe, na progressão do câncer de próstata no lobo dorsolateral (LDL) de camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP). Também se investigou os impactos do DHA+EPA sobre os processos de morte celular regulada nesse lobo e do DHA em linhagens de células prostáticas epiteliais humanas não tumorais (PNT1A) e tumorais andrógeno-responsivas (22rv1).

3.1 Objetivos específicos

Os efeitos da $D\omega 3$ foram avaliados em dois períodos de consumo (1 e 3 meses) a partir de análises das alterações:

- a. teciduais e na incidência de lesões prostáticas;
- b. no ambiente estromal, tais como a expressão tecidual de α -actina do musculo liso (α -SMA) e distribuição de fibras colágenas;
- c. nos níveis de proliferação celular (células PHH3- e PCNA-positivas);
- d. na expressão tecidual de receptores de andrógeno (AR) e estrógeno (ER- α);
- e. na população de linfócitos T CD3+;

Essas alterações teciduais e patológicas foram correlacionadas com parâmetros biométricos e metabólicos (ingestão de alimento, ingestão calórica, ganho de peso, glicemia em jejum e níveis séricos de triglicérides e colesterol).

Para examinar o impacto dos $\omega 3$ sobre os diferentes padrões de morte celular regulada no estudo *in vivo* foram avaliados os níveis de apoptose (ensaio de caspase-3 ativa, reação TUNEL e imuno-histoquímica para PARP clivada), necroptose, piroptose e atividade autofágica (imuno-histoquímica para proteína de linhagem mista semelhante a domínio de quinase fosforilada - pMLKL, gasdermina D clivada – cGSDMD e proteína associada a microtúbulos 1A/1B de cadeia leve 3B - LC3B, respectivamente). Nos estudos *in vitro*, os efeitos do DHA foram avaliados com o uso de Western Blotting para os marcadores específicos acima mencionados e para os receptores relacionados a morte (TNF-R1 e LXR- β).

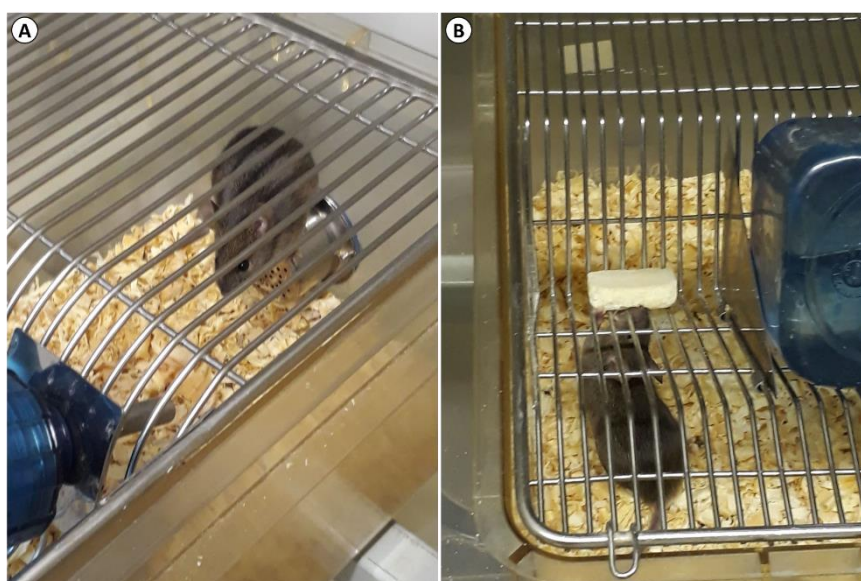
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Abordagem *in vivo*

4.1.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) transgênicos para adenocarcinoma de próstata da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP)8247Ng/J X FVB/Unib) (Figura 12), obtidos com 7 semanas de idade do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), campus de São José do Rio Preto (SP), em caixas de policarbonato cristal, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro), sendo fornecida água e ração sem restrições de quantidade (*ad libitum*). Todo o cuidado e os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes brasileiras para o cuidado e uso de animais para fins científicos e educacionais - CONCEA e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - IBILCE/UNESP (Protocolo: 198/2018) e UNICAMP (Protocolo: 5117-1/2019).

Figura 12 - Modelo de camundongo TRAMP utilizado no estudo. (A) Camundongo mantido no biotério do Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP). (B) Camundongo alimentado com dieta rica em ômega-3.



Fonte: Fotografado pela autora.

Os animais foram alimentados com uma ração padrão (dieta AIN-93) (REEVES et al., 1993) e com uma ração enriquecida com DHA/EPA (D ω 3; Tabela 2), a partir da 8ª semana de vida. A ração foi baseada em estudo prévio para camundongos (SAW et al., 2011) e nela se usou como base a dieta AIN-93, substituindo 10% do amido de milho por óleo de peixe (10g por 100g de ração), contendo a proporção 5DHA:1EPA (DHA 500TG, Naturalis®, São Paulo, Brasil, Tabela 3).

Tabela 2 – Informações nutricionais das dietas utilizadas.

Ingredientes	Dieta padrão (g/100g)	Dieta ômega-3 (g/100g)
Caseína	20	20
Amido de milho	52,950	42,950
Sacarose	10	10
Óleo de soja	7	7
Óleo de peixe	-	10
Celulose	5	5
Mix de minerais AIN-93G	3,5	3,5
Mix de vitaminas AIN-93G	1	1
Bitartarato de colina	0,25	0,25
L-cistina	0,3	0,3
Hidroxitolueno butilado	0,476	0,476
Total (g)	100,476	100,476
Quantidade de energia (kcal/g)	3,9	4,8

Fonte: REEVES et al., 1993.

Tabela 3 - Composição nutricional do óleo de peixe utilizado na formulação da ração enriquecida com DHA/EPA, referente a três cápsulas (3g).

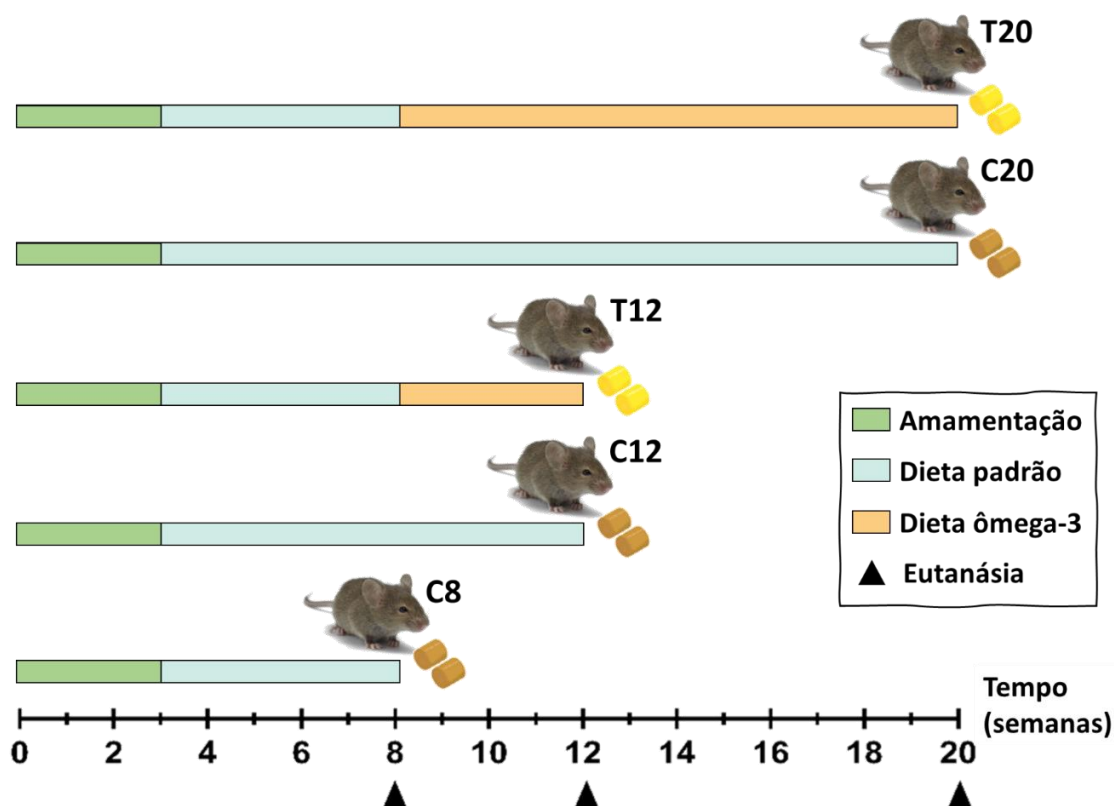
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Ácidos graxos saturados	0g
Ácidos graxos trans	0g
Ácidos graxos insaturados	0,4g
EPA	0,3g
DHA	1,5g
Colesterol	5,3mg
Fibras	0g
Sódio	0g
Vitamina E	2,5mg

Fonte: Naturalis®.

Com isso, os camundongos TRAMP com 7 semanas de idade foram divididos aleatoriamente (n=10/grupo) segundo consumo de ração e idade de eutanásia, em cinco grupos (Figura 13), como descrito a seguir:

- **C8:** grupo controle de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão e eutanasiados com 8 semanas de idade. Utilizado a fim de comparar a progressão do câncer nos demais grupos.
- **C12:** grupo controle de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão e eutanasiados com 12 semanas de idade.
- **T12:** grupo de camundongos TRAMP alimentados com D ω 3 a partir da oitava semana de vida, até a 12^a semana, quando foram eutanasiados (1 mês de consumo).
- **C20:** grupo controle de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão e eutanasiados com 20 semanas de idade.
- **T20:** grupo de camundongos TRAMP alimentados com D ω 3 a partir da oitava semana de vida, até a 20^a semana, quando foram eutanasiados (3 meses de consumo).

Figura 13 - Representação do delineamento experimental utilizado no estudo, com 5 grupos de animais (C8, C12, T12, C20 e T20). Os camundongos foram tratados com dieta rica em ômega-3 em dois tempos distintos. A primeira eutanásia ocorreu quando os animais apresentaram 12 semanas de idade (1 mês de consumo) e a segunda quando atingiram 20 semanas de idade (3 meses de consumo).



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, utilizando Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg, intramuscular) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, intramuscular). Após a eutanásia, os animais foram pesados em balança analítica e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do ventrículo esquerdo e armazenadas em tubos com gel de separação a 2°C para posterior processamento para análises bioquímicas. Em seguida foi realizada a dissecação para a retirada do complexo prostático e isolamento dos lobos dorsolaterais, que foram divididos para congelamento a - 80°C, para fixação em Bouin para análises em microscopia de luz e para fixação em solução de fixação (2% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído e 0,25% CaCl₂ em 0,1M de tampão cacodilato de sódio), para análises em microscopia eletrônica de transmissão.

4.1.2 Análises biométricas e metabólicas

Durante o experimento, o peso dos animais foi monitorado, assim como a ingestão de ração. Os animais foram pesados e posteriormente calculou-se o ganho relativo de peso (RW)

através da fórmula: $RW = (FG - IG * 100) / IG$, onde FG representa o peso do animal ao final do experimento e IG o peso do animal ao início do experimento. O consumo da ração foi acompanhado a cada dois dias, no mesmo horário, o que permitiu calcular a quantidade de alimento (em gramas) consumida em uma semana. Com isso, também se calculou a ingestão energética, multiplicando a média do consumo de ração semanal pelo valor energético de cada dieta.

O sangue coletado durante a eutanásia foi usado para medir o nível de glicose em jejum (12 horas de jejum) por meio do aparelho Accu-chek (Roche Diagnostics) de fitas *one touch*. O restante do sangue coletado foi centrifugado a 1620 g por 20 minutos e armazenado a -80°C. Amostras de soro foram posteriormente submetidas a testes enzimáticos (In vitro Diagnóstica Ltda, Itabira, MG, Brasil) para a determinação dos níveis de colesterol total (variação intra-ensaio: 1,20%, variação inter-ensaio: 2,89%) e triglicerídeos (variação intra-ensaio: 1,40%, variação inter-ensaio: 2,02%), realizados segundo as instruções do fabricante, com as absorbâncias da amostra lidas em leitor SpectraMax-Plus 384 Reader (Molecular Devices).

4.1.3 Análises morfológicas e histopatológicas

Na eutanásia os camundongos TRAMP foram examinados para identificação de tumores palpáveis e dissecados para remoção do complexo prostático. Os tumores palpáveis foram isolados, pesados e fixados em Boiun. O LDL foi isolado, pesado e fixado em solução de Bouin por 24 horas. Em seguida, foram lavados em etanol a 70% e desidratados em uma série crescente de etanol, diafanizados em xilol e embebidos em polímeros plásticos (Paraplast, Merck, Darmstadt, Alemanha). Esses lobos foram seccionados no micrótomo em cortes de 4 µm de espessura e a seguir corados com hematoxilina-eosina (HE), para as análises morfológicas gerais e histopatológica. Para analisar o sistema de fibras colágenas, os cortes também foram corados pelo método do Picrosirius-Hematoxilina.

Objetivando obter a frequência relativa dos diferentes compartimentos teciduais do lobo estudado, foi realizada uma análise estereológica. Para isso, foram utilizados 5 animais de cada grupo, dos quais foram capturados 15 campos microscópicos (75 imagens por grupo) e as medidas foram realizadas de acordo com o sistema de teste de multipontos M130 proposto por Weibel (1963) e aplicado à próstata por Huttunen et al. (1981). Assim, a partir dos dados obtidos para cada campo analisado, foi calculada a frequência relativa dos compartimentos: epitélio, lúmen, estroma muscular (CM), estroma não muscular e vasos sanguíneos.

As análises histopatológicas, para quantificação da incidência dos diferentes graus de lesões prostáticas, foram realizadas segundo Kido e colaboradores (2016), com modificações. Analisou-se cinco animais e 15 campos microscópicos aleatórios e não sobrepostos capturados no aumento de 400x do lobo dorsolateral da próstata (coloração com hematoxilina-eosina) por animal, totalizando 75 regiões por grupo experimental. Cada um dos campos foi dividido em quatro quadrantes por meio do software de imagem Image Pro Plus (Media Cybernetics). Em cada quadrante foi classificada a característica morfológica predominante da seguinte forma: epitélio saudável (NE), isto é, livre de lesão; neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN), representada pela estratificação das células epiteliais; neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN), caracterizada por apresentar focos de proliferação celular com crescimento cribriforme, levando à oclusão do lúmen glandular e carcinoma *in situ* (CIT), caracterizado pela invasão das células epiteliais tumorais no estroma glandular circundante (Figura 14). Posteriormente, foi calculado o número total de cada lesão encontrada em cada animal, assim como a porcentagem relativa de cada lesão por grupo, sendo então realizada a análise estatística dos resultados.

4.1.4 Análises Imuno-histoquímicas

Foram realizadas reações de imuno-histoquímica com o uso dos anticorpos relacionados na Tabela 4, para detecção da histona H3 fosforilada (PHH3), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), do receptor de andrógeno (AR), do receptor de estrógeno α (ER- α), da alfa-actina do músculo liso (α -SMA), do marcador de linfócitos T *cluster* de diferenciação 3 (CD3), da proteína de linhagem mista semelhante a domínio de quinase fosforilada (pMLKL), da gasdermina D clivada (cGSDMD), da poli (ADP ribose) polimerase clivada (cPARP) e da proteína associada a microtúbulos 1A/1B de cadeia leve 3B (LC3B). Utilizou-se amostras do lobo dorsolateral da próstata de cinco animais de cada grupo.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão Tris-EDTA (10mM Trizma Base, 1mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9,0), para detecção de PHH3 e tampão citrato (10mM, pH 5,8), para detecção de PCNA, AR, ER- α , α -SMA, CD3, pMLKL, cGSDMD, cPARP e LC3B, por 20-60 minutos à 98°C em banho-Maria. Após, os cortes descansaram 20 minutos em temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido com submersão dos cortes em peróxido de hidrogênio 3%, protegido da luz, por 15-20 minutos. A incubação dos cortes em albumina sérica bovina (BSA a 3% em tampão TBS-T) por 40-60 minutos à temperatura ambiente foi feita para bloquear ligações inespecíficas. Para detecção de LC3B o

bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite desnatado 5% (em tampão TBS-T) por 30 minutos. Incubou-se os cortes, armazenados em câmara úmida, com o anticorpo primário específico por 1 hora a 37°C e depois *overnight* à 4°C (para PCNA apenas 1 hora a 37°C). Os dados dos anticorpos primários utilizados e suas diluições encontram-se listados na Tabela 4. Para detecção da PHH3 e PCNA o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado após a incubação com anticorpo primário.

O complexo antígeno-anticorpo foi detectado utilizando o sistema de polímero para o AR, PCNA, pMLKL, cGSDMD, cPARP e LC3B (Novolink™ Max Polymer Detection System, RE7280-K, Leica Biosystems) e o complexo avidina-biotina (ABC) para PHH3, ER- α , α -SMA e CD3 (ImmunoCruz® rabbit ABC Staining System, sc-2018, Santa Cruz Biotechnology). Na detecção com ABC os cortes foram incubados com anticorpos secundários biotinilados (diluídos em BSA a 1%) por 45 minutos a 37°C e após a lavagem em TBS-T, incubados com o complexo avidina-biotina por 45 minutos a 37°C. Na detecção com polímero os cortes foram incubados com pós-primário por 40 minutos a temperatura ambiente e após a lavagem em TBS-T, incubados com o polímero também por 40 minutos a temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi detectada utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Leica Biosystems) como cromógeno e a Hematoxilina de Harris foi utilizada para contra-coloração. As lâminas foram desidratadas em uma série crescente de etanol e xilol e montadas com bálsamo do Canadá e lamínula. Os controles negativos realizados para todas as análises imuno-histoquímicas foram obtidos omitindo o anticorpo primário. A marcação positiva para cada antígeno foi determinada pela presença da coloração acastanhada da reação do DAB.

As avaliações foram efetuadas em microscopia de luz e as imagens histológicas foram digitalizadas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de Imagens Image Pro Plus (Media Cybernetics). A estimativa da frequência de células AR, ER- α e α -SMA positivas foi realizada por meio do sistema de multiponto de Weibel (WEIBEL, 1963) com 160 intersectos. Para tanto, dez campos microscópicos não sobrepostos do lobo dorsolateral da próstata foram capturados aleatoriamente por animal, no aumento de 400x, totalizando 50 campos por grupo (DA SILVA et al., 2017). Uma grade com 750 pontos foi utilizada para quantificação da marcação para PCNA e cPARP (modificado de DA SILVA et al., 2017). A imunorreatividade foi determinada pela razão dos intersectos positivos (localizados em cima da coloração acastanhada) para o antígeno dividido pelo número total de intersectos, sendo os dados expressos em frequência relativa (%). Já para a quantificação de células em proliferação (PHH3) e de linfócitos T (CD3), considerou-se o número absoluto de

células positivas em 10 campos microscópicos não sobrepostos capturados aleatoriamente por animal, no aumento de 400x, em cinco animais por grupo (MATEUS et al., 2019).

Tabela 4 - Características gerais dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica (IHC) e Western Blotting (WB). B: Biotechnology. T: Technology.

	Espécie hospedeira	Especificidade ao epítipo	Fornecedor	Código	Diluição
AR	Coelho	Policlonal	Santa Cruz B.	sc-816	1:75 em BSA 1% (IHC)
ER	Camundongo	Monoclonal	Santa Cruz B.	sc-8005	1:75 em BSA 1% (IHC)
PHH3	Coelho	Policlonal	Cell Signaling T.	#97015	1:75 em BSA 1% (IHC)
PCNA	Camundongo	Monoclonal	Santa Cruz B.	sc-56	1:100 em BSA 1% (IHC)
CD3	Coelho	Monoclonal	Abcam	ab16669	1:100 em BSA 1% (IHC)
α-SMA	Camundongo	Monoclonal	Santa Cruz B.	sc-32251	1:100 em BSA 1% (IHC)
TNF-R1	Coelho	Policlonal	Santa Cruz B.	sc-7895	1:200 em BSA 1% (WB)
LXR-β	Coelho	Monoclonal	Cell Signaling T.	#13519	1:500 em BSA 5% (WB)
GAPDH	Mouse	Monoclonal	Sigma-Aldrich	G8795	1:10.000 em BSA 1% (WB)
pMLKL	Coelho	Monoclonal	Cell Signaling T.	#37333	1:50 (IHC) ou 1:500 (WB) em BSA 1%
cGSDMD	Coelho	Monoclonal	Cell Signaling T.	#10137	1:50 (IHC) ou 1:500 (WB) em BSA 1%
LC3B	Coelho	Monoclonal	Cell Signaling T.	#43566	1:100 (IHC) ou 1:700 (WB) em BSA 1%
cPARP	Coelho	Monoclonal	Cell Signaling T.	#5625	1:100 (IHC) ou 1:700 (WB) em BSA 1%

Fonte: Abcam®, Cell Signaling Technology®, Santa Cruz Biotechnology®.

4.1.5 Análise de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*)

As células apoptóticas foram detectadas pelo ensaio de fragmentação de DNA associado à morte celular, baseado na reação TUNEL, de acordo com as instruções do kit (*ApopTag Plus in situ, Apoptose Detection Kit*, Millipore, 57101, CA, EUA). Após desparafinação, as lâminas com os cortes histológicos foram permeabilizadas com Triton X-100 0,02%, por 15 minutos, submetidas a digestão enzimática por proteinase K (20 minutos) e ao processo de inativação da peroxidase endógena (3% H₂O₂ em PBS, 5 minutos). Posteriormente, ficaram 10 minutos no *Equilibration Buffer* e então foram incubados com a enzima desoxinucleotidil transferase

terminal (TdT) durante 1 hora a 37 ° C. Passaram pelo *Stop/Wash Buffer* (10 minutos) e ao final da reação, os cortes foram incubados com anti-digoxigenina peroxidase por 30 minutos, revelados com DAB e contrastados com Hematoxilina de Harris. As imagens foram obtidas com uso de microscópio Olympus BX-60 acoplado à câmera digital (Olympus Corporation, Japão). Para quantificação, considerou-se o número absoluto de células positivas em 10 campos microscópicos não sobrepostos capturados aleatoriamente por animal, no aumento de 400x, em cinco animais por grupo, totalizando 50 campos por grupo.

4.1.6 Atividade de caspase-3

A atividade proteolítica da caspase-3 foi medida por ensaio de fluorescência usando o kit de ensaio EnzChek Caspase-3 (E13183). O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados extratos totais do LDL de 4 animais por grupo. Amostras de tecido congeladas do LDL foram lisadas mecanicamente e homogeneizadas em tampão RIPA (Sigma-Aldrich, EUA), acrescido de 10% de coquetel de inibidor de protease, ortovanadato de sódio (1:100), PMSF (1:1000) e Triton-X100. Após, foram incubadas no gelo por 2 horas e depois centrifugadas a 14000rpm por 20 minutos a 4°C. As proteínas dos sobrenadantes foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas com 30ug de proteínas foram utilizadas para determinação da atividade proteolítica da caspase-3 de acordo com as especificações do fabricante do kit (Thermo Fisher Scientific). O princípio do ensaio baseia-se no fornecimento do substrato da caspase-3, derivado de aminometilcumarina (AMC), chamado Z-DEVD-AMC (fracamente fluorescente), que ao ser clivado fluoresce em azul. A placa foi lida em fluorímetro (excitação/emissão 342/441nm), sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional a quantidade de caspase-3 ativa nas amostras.

4.2. Abordagem *in vitro*

4.2.1 Cultivo celular

Foram utilizadas células prostáticas humanas epiteliais (luminais) benignas - PNT1A (# 95012614 - Health Protection Agency, Inglaterra) – e células prostáticas tumorais epiteliais andrógeno-responsivas - 22rv1 (CRL2505; AR-positivas). O cultivo foi feito em meio RPMI 1640 (#R6504 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (FBS) (#S0011 - Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil), 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (# 15240062 - Life Technologies, Paisley, Reino Unido) em

incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Para a manutenção das células, o meio foi substituído a cada 2-3 dias e o repique feito quando as células atingiram 70-85% de confluência. As células foram incubadas em garrafas pequenas a 5x10⁵ células, mantendo a mesma densidade por tratamento em cada ensaio, e permitida aderência por 24 horas.

4.2.2 Tratamento das células com DHA

As células incubadas foram tratadas com DHA a 100µM por 48 horas. O tratamento se deu de acordo com resultados anteriores do laboratório, que demonstraram a concentração de DHA e o tempo de incubação que primeiro exerceu efeitos antiproliferativos (TAMARINDO et al, 2019; TAMARINDO; GÓES, 2020). A concentração de 100µM DHA (#D2534-Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi preparada no dia do experimento, em meio de cultura RPMI 1640 a partir de uma solução estoque de 20mM DHA em etanol absoluto (veículo), e adicionado 0,14% de BSA.

Para todas as análises, para garantir que os efeitos observados foram principalmente devidos ao DHA, os ensaios de controle foram incubados com o mesmo volume de veículo. Além disso, a concentração de veículo no meio nunca excedeu 0,5% o que não exerceu alteração na proliferação celular, conforme já verificado (TAMARINDO et al., 2019).

4.2.3 Western Blotting

Com o objetivo de elucidar a influência do DHA sobre processos de morte celular e autofagia, cGSDMD, pMLKL, cPARP, LXR-β, TNF-R1 e LC3B foram quantificadas nas linhagens PNT1A e 22rv1, por Western Blotting.

As células (5x10⁵) foram lisadas em tampão RIPA acrescido de 10% de coquetel de inibidor de protease, ortovanadato de sódio (1:100) e PMSF (1:1000), e então removidas mecanicamente. A solução foi colocada no gelo para incubação por 30 minutos. Em seguida, centrifugada a 14000rpm por 15 minutos a 4°C para remoção do *debris* celular. O sobrenadante foi transferido para microtubos eppendorff e armazenado a -80°C. A quantificação de proteínas total foi determinada com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e medida em leitor de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) a 595nm.

Alíquotas com 40 µg de proteína foram misturadas com solução tampão para correr o gel (tampão de amostra Laemmli) e β-mercaptoetanol, ambos adquiridos de BioRad Laboratories (EUA), a 93°C por 5 min. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e, após eletroforese, transferidas, por 2 horas, para uma membrana de nitrocelulose, em sistema úmido.

O bloqueio de ligações inespecíficas para as proteínas fosforiladas foi realizado com BSA 5% em TBST por 1 hora (2 vezes de 30 minutos) a temperatura ambiente no agitador. As demais proteínas tiveram o bloqueio realizado com leite desnatado 5% em TBST por 30-60 minutos a temperatura ambiente no agitador. Após lavagem rápida com TBST, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário (anti-pMLKL; anti-cGSDMD; anti-cPARP; anti-TNF-R1; anti-LXR-β; anti-LC3B e anti-GAPDH para normalização). Os dados dos anticorpos primários utilizados e suas diluições encontram-se listados na Tabela 4. Após a incubação, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 4°C, sendo os anticorpos secundários preparados na diluição de 10x do respectivo anticorpo primário. A revelação foi realizada com sistema ECL e as bandas visualizadas com auxílio de fotodocumentador G:BOX Chemi (Syngene, Synoptics Ltd). Como controle interno, cada membrana foi removida do primeiro anticorpo e posteriormente examinada com anti-GAPDH. A quantificação de proteínas foi realizada para todas as amostras na mesma eletroforese, uma proteína por membrana, além do controle. A densitometria relativa foi avaliada utilizando o software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e a normalização pelo GAPDH. Os dados são apresentados em valores da densitometria relativa e desvio padrão. As análises foram realizadas com três amostras de eventos independentes.

4.3 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análises estatísticas realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.0.1). Na abordagem *in vivo*, comparou-se os grupos experimentais por teste de análise de variância - *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de intervalo múltiplo de Bonferroni. Na abordagem *in vitro*, após a distribuição das amostras ser analisada com os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, os grupos que assumiram perfil paramétrico foram submetidos ao Teste t ou ANOVA *one-way*, seguido do teste de Tukey (*post-hoc*). Os não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (*post-hoc*). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 O consumo de uma dieta enriquecida com DHA/EPA melhora os níveis de lipídeos séricos em camundongos TRAMP

Houve um aumento no consumo da dieta padrão em C20, quando comparado com C12, acompanhado de um aumento na ingestão energética. Ao comparar os grupos tratados com seus respectivos controles, houve redução no consumo de ração no grupo T20, em comparação com C20, acompanhado também de uma redução na ingestão energética (Figura 15 A-B). Com relação ao ganho de peso não houve diferença entre os grupos alimentados com a D ω 3 e seus controles de mesma idade, apenas um aumento esperado no grupo controle de maior idade – C20 – com relação aos camundongos de menor idade (C8 e C12) (Figura 15 C).

Não foram observadas variações na glicemia de jejum, independente da dieta ou idade, entre os diferentes grupos experimentais (Figura 15 D). O consumo da D ω 3 tanto por 1 (grupo T12) quanto por 3 meses (grupo T20), foi capaz de reduzir os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos nos camundongos TRAMP, quando comparados aos animais dos respectivos grupos controle – C12 e C20 (Figura 15 E-F). Além disso, entre os animais sob dieta padrão, um aumento do colesterol sérico foi observado em camundongos com 20 semanas de idade quando comparados aos camundongos mais jovens de 8 e 12 semanas (Figura 15 F).

5.2 O consumo de DHA/EPA atrasa a progressão tumoral, mantendo o aspecto da glândula semelhante ao encontrado em estágios iniciais da carcinogênese

A análise histopatológica do lobo dorsolateral (Figura 18) demonstrou que a D ω 3 manteve as frequências elevadas de áreas de epitélio saudável nos dois tempos de consumo (1 e 3 meses), aumentou a frequência de LGPINs no grupo alimentado por 3 meses, em comparação ao grupo controle de mesma idade e levou a uma diminuição de lesões mais agressivas como HGPIN e CIT em ambos os tempos de consumo (Figura 18).

Não foram encontradas variações no peso úmido do LDL (média de 6,4mg às 8 e 12,4mg às 12 semanas de idade). Como esperado, não foram detectados tumores palpáveis nos animais dos grupos C8, C12 e T12. O grupo C8 (Figuras 16 A e 17 A-C), apresentou o LDL com predominância de tecido glandular sem lesões proliferativas (46%), uma frequência de 39% de LGPIN, a menor ocorrência de HGPIN (12,7%) e focos de CIT (2,3%) (Figura 18). O tecido glandular sem alterações caracterizou-se por ácinos constituídos de células secretoras colunares com núcleos centrais, ou cúbicas com núcleos de localização mais basal, entremeadas

por células basais. A lesão do tipo LGPIN caracterizou-se pela estratificação da camada de células epiteliais prostáticas classificadas pelo padrão arquitetural plano. O grupo C12 (Figuras 16 B e 17 D-F) apresentou uma menor porcentagem de tecido saudável (normal) no LDL (15,6%), com relação aos camundongos de menor idade (46%). Além de uma frequência de 42,2% de LGPIN e um aumento na frequência de HGPIN (37,5%), em relação ao grupo C8. Também foi identificado nesse lobo a presença de CIT, que representou frequência de 4,6% (Figura 18). O CIT caracterizou-se pela descontinuidade da membrana basal com infiltração das células epiteliais no estroma glandular. O grupo T12 (1 mês de consumo de $\omega 3$) (Figuras 16 C e 17 G-I) apresentou um aumento na porcentagem de epitélio saudável (38,3%) acompanhado de uma redução de HGPIN (14%) e CIT (2%), com relação ao grupo controle (C12) de mesma idade. As LGPINs representaram uma frequência de 45,6% (Figura 18).

Em C20 e T20 metade dos animais apresentaram tumores palpáveis (5 de 10 animais). O peso úmido desses tumores não diferiu significativamente entre C20 e T20 (C20: $2,1 \pm 2,4$; T20: $2,5 \pm 2,4$ g), nem o peso úmido dos lobos dorsolaterais da próstata (média de 118,8mg) que foram removidos independentemente.

A análise histopatológica mostrou que no grupo C20 (Figuras 16 D e 17 J-L) a área de tecido glandular sem lesões proliferativas correspondeu a uma frequência de 20% apenas, uma das menores dentre todos os grupos experimentais, o que já era esperado para o modelo com o aumento da idade. Comparado com o encontrado nos grupos C8 (de menor idade) e T20 (alimentado com $D\omega 3$), essa redução nas áreas de epitélio saudável foi significativa. Ainda, nessa idade observou-se uma frequência de LGPIN de 21% e a maior porcentagem de HGPIN (54%) e de CIT (5%) dentre todos os grupos experimentais (Figura 18). As HGPINs foram identificadas pela estratificação das células epiteliais projetadas em direção ao lúmen glandular, com um padrão cribriforme, que frequentemente levavam à sua oclusão (Figura 17 J).

O LDL do grupo T20 (Figuras 16 E e 17 M-O) exibiu epitélio secretor mais saudável (43,3%) em relação ao controle C20, com frequência mais semelhante a encontrada no grupo C8, de menor idade. Além disso, foi observada uma frequência de 36,6% de LGPIN e uma redução de HGPIN (18,3%) e CIT (1,6%, a menor ocorrência dentre todos os grupos experimentais) em relação a C20 (Figura 18).

A análise estereológica (Figura 19) indicou que a $D\omega 3$ altera a proporção dos compartimentos teciduais prostáticos. Ela reforçou os resultados da análise histopatológica ao demonstrar, para os dois tempos de consumo, uma diminuição na frequência relativa do epitélio prostático dos camundongos alimentados com $D\omega 3$ quando comparados aos seus respectivos

controles (C12 -61,6%; T12 - 40,6%; C20 -59,0% e T20- 36,7%), acompanhado de um aumento do lúmen glandular (C12- 12,3%; T12- 28,9%; C20- 18,7% e T20- 33,7) (Figura 19 A-B). Portanto, tal análise demonstrou que as frequências de epitélio e lúmen dos grupos alimentados com D ω 3 assemelharam-se mais às do grupo de menor idade, C8 (epitélio - 37,7%; lúmen - 27,8%), do que dos grupos alimentados com dieta padrão de mesma idade. Ademais, verificou-se uma diminuição do estroma não muscular nos grupos controle de maior idade, C12 (5,6%) e C20 (6,5), com relação ao grupo controle mais jovem, C8 (18,9%) e aumento do estroma não muscular no grupo que consumiu D ω 3 por 3 meses, T20 (15,8%), comparado aos camundongos de mesma idade alimentados com dieta padrão (C20: 6,5%) (Figura 19 C).

Juntamente a isso, pode-se perceber que os compartimentos prostáticos mantiveram um padrão em todos os grupos experimentais (Figura 19 F), com as maiores frequências sendo do epitélio e lúmen, respectivamente, e a menor frequência dos vasos sanguíneos (Figura 19 E), que não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

5.3 O consumo de uma dieta enriquecida com DHA/EPA preserva o microambiente estromal

O grupo C8 (Figura 20 A, F, K) exibiu características estromais aparentemente normais, caracterizadas pela disposição preferencial de colágeno entre as células musculares lisas e fibroblastos periacinares, além de uma disposição concêntrica dos elementos fibrilares ao redor das estruturas glandulares. A imunorreatividade para α -SMA foi de 17,9%, enquanto a quantificação das fibras colágenas resultou em uma frequência relativa de 8,7% (Figura 20 P-Q). O grupo C12 (Figura 20 B, G, L) demonstrou áreas de espessamento de fibras colágenas, além de hipertrofia das células musculares lisas, especialmente próximas a regiões morfológicamente alteradas. A imunorreatividade para α -SMA foi de 37,1%, enquanto a quantificação das fibras colágenas resultou em uma frequência relativa de 23,3% (Figura 20 P-Q), ambos com aumento em relação ao encontrado no grupo C8 de camundongos mais jovens. No grupo T12 (Figura 20 C, H, M), de animais alimentados com a D ω 3 por 1 mês, o estroma glandular também exibiu um fenótipo aparentemente normal semelhante ao encontrado no grupo C8, com imunorreatividade para α -SMA (16,2%) significativamente menor do que a encontrada no grupo de camundongos de mesma idade alimentados com dieta padrão e uma baixa densidade de elementos fibrilares (10,7%), também significativamente menor (Figura 20 P-Q).

No grupo C20 (Figura 20 D, I, N) foi evidenciada elevada densidade de elementos estromais próximo as lesões, caracterizada pela hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas e áreas de espessamento de fibras colágenas (Figura 20 N), especialmente próximas a regiões morfológicamente alteradas. Além disso, este grupo exibiu um estroma com fibras colágenas mais abundantes ao redor dos ácinos (26,9%) e aumento da imunorreatividade para α -SMA (37%), quando comparado com o grupo controle de camundongos mais jovens (C8). Já os animais de mesma idade alimentados por 3 meses com D ω 3 (T20 – Figura 20 E, J, O), quando comparados com esse grupo controle apresentaram uma redução significativa tanto da imunorreatividade para α -SMA (22,9%), quanto da frequência relativa de fibras colágenas (16,9%) (Figura 20 P-Q). Também apresentando pontos de hipertrofia estromal mais ocasionais e localizados particularmente em áreas adjacentes ao epitélio com distúrbios proliferativos.

Assim, a análise do microambiente estromal demonstrou uma redução da expressão tecidual de α -SMA e da densidade de fibras colágenas tanto no grupo alimentado com D ω 3 por 1 mês, quanto no grupo alimentado por 3 meses, em relação aos respectivos controles alimentados com dieta padrão (Figura 20).

5.4 O consumo de uma dieta enriquecida com ômega-3 reduz a proliferação celular no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP

O aumento da proliferação celular (células PCNA- e PHH3-positivas) ocorreu conforme à progressão das lesões prostáticas, indicando maior agressividade da doença. Em C8, observou-se menor índice de proliferação (Células PCNA+: $14,3 \pm 0,7\%$ e PHH3+: $1,6 \pm 0,4$). Como esperado para o modelo TRAMP, um aumento de células em proliferação foi detectado nos camundongos mais velhos, de 20 semanas de idade (C20 – PCNA+: $32,7 \pm 3,5\%$; PHH3+: $4,9 \pm 0,5$), em comparação com C8 (Figura 21 F, L). As maiores concentrações de células positivas para os dois marcadores utilizados foram encontradas em locais acometidos por HGPIN (Figura 21 D, J). Ambos os tempos de consumo da D ω 3 proporcionaram a redução das células PCNA+ (T12: $8,3 \pm 2,1\%$; T20: $22,1 \pm 1,9\%$) e PHH3+ (T12: $1,6 \pm 0,4$; T20: $2,4 \pm 0,3$), em relação aos controles de mesma idade alimentados com dieta padrão, C12 (PCNA+: $15,3 \pm 2,2\%$; PHH3+: $4,7 \pm 0,3$) e C20 (Figura 21 F, L).

5.5 O consumo de DHA/EPA reduz a expressão tecidual de receptores de hormônios esteroides

As reações imuno-histoquímicas para AR e ER- α (Figuras 22 e 23) mostraram que o consumo de DHA/EPA nos dois tempos avaliados reduziu a expressão tecidual desses receptores no epitélio do lobo prostático dorsolateral. O consumo por 1 mês levou a redução estromal da expressão de AR.

Em relação à expressão de AR, houve um aumento na marcação epitelial durante a progressão da doença, em C12 ($37,8 \pm 2,1\%$) e C20 ($43,8 \pm 2,1\%$), quando comparado ao grupo C8 ($17,6 \pm 2,4\%$). A D ω 3 foi capaz de preservar uma baixa reatividade do AR no compartimento epitelial nos dois tempos de consumo, em T12 ($19,7 \pm 5,3\%$) e T20 ($34,8 \pm 3,6\%$), quando comparados com os controles de mesma idade (Figura 22 F). Somente o grupo T12, alimentado com D ω 3 por 1 mês, apresentou uma diminuição na marcação estromal de AR ($1,7 \pm 0,7\%$) em comparação ao grupo controle C12 ($3,4 \pm 0,6\%$) (Figura 22 G).

A expressão tecidual de ER- α no epitélio glandular também apresentou um aumento durante a progressão da doença em C12 ($47,9 \pm 4,7\%$) e C20 ($48,6 \pm 3,1\%$), quando comparado ao grupo C8 ($23,4 \pm 1,2\%$). Assim como a marcação estromal, que aumentou em C12 ($4,8 \pm 2,8\%$) em comparação com o grupo mais jovem, C8 ($1,5 \pm 0,6\%$) (Figura 23 G). A D ω 3 diminuiu a imunomarcação epitelial para ER- α nos grupos experimentais correspondentes aos dois tempos de consumo (T12: $34,4 \pm 3,8\%$; T20: $34,5 \pm 1,5\%$), em comparação aos controles de mesma idade (Figura 23 F).

5.6 O consumo de DHA/EPA diminui a infiltração de linfócitos no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP

Detectou-se maior número de linfócitos T CD3+ no epitélio acinar do que no estroma glandular (Figura 24). Houve aumento do número destas células em C20 ($4,5 \pm 0,9$ linfócitos), em relação ao C12 ($3,1 \pm 0,5$ linfócitos) e ao C8 ($1,4 \pm 0,08$ linfócitos), aumento este proporcional à idade dos animais e severidade da doença. Nos grupos alimentados com a D ω 3 a população de linfócitos também se mostrou majoritariamente intraepitelial, e ocorreu uma redução na população desses linfócitos, tanto no grupo alimentado por 1 (T12: $1,5 \pm 0,2$ linfócitos) quanto no grupo alimentado por 3 meses (T20: $2,5 \pm 0,1$ linfócitos), em relação aos controles de mesma idade (grupos C12 e C20) (Figura 24 F).

5.7 O consumo da D ω 3 aumenta a autofagia e a apoptose na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP

A imuno-histoquímica para LC3B mostrou que o consumo de D ω 3 aumenta a autofagia no LDL dos camundongos TRAMP (Figura 25). Assim, o número de autofagossomos aumenta visivelmente nos grupos que consumiram a D ω 3, sendo observados principalmente na região supranuclear no citoplasma apical das células acinares (Figura 25). Esses autofagossomos são mais volumosos no grupo T20, em comparação com o T12.

A atividade apoptótica foi avaliada com base em três métodos diferentes – o método do TUNEL (Figura 26 A-G), a detecção de caspase-3 ativa (Figura 26 H) e imuno-histoquímica para o fragmento citoplasmático de 89 kDa da PARP, resultante de clivagem proteolítica por caspase-3/7 (Figura 26 I-O). Verificou-se maior densidade de células apoptóticas nas lesões proliferativas de maior gravidade, e em consequência a frequência de apoptose aumentou em C12 comparado com C8. Também se verificou alta incidência de apoptose nas áreas centrais do tumor primário (Figura 26 F). Tanto o método do TUNEL como a detecção de caspase-3 ativa revelaram aumento da apoptose em T20 quando comparado a C20 (aumento de 1,3 vezes – TUNEL, e 1,1 vezes no ensaio de caspase-3 ativa).

Por meio das reações de imuno-histoquímicas para identificação de necroptose (pMLKL – Figura 27 A-D) e piroptose (cGSDMD – Figura 27 E-H), foi constatado que esses tipos de morte são ocasionais no LDL da próstata de camundongos TRAMP e não ocorrem de maneira maciça nos grupos estudados, a exceção da área necrótica central do tumor primário (Figura 27 C-D, G-H). A necroptose e piroptose acometeram principalmente as células imunes estromais, sendo bem menos frequentes no epitélio prostático, observando-se um número inferior a 5 células epiteliais afetadas por esses tipos de morte por corte histológico. Assim, aparentemente a D ω 3 não interferiu na necroptose e piroptose *in vivo*.

5.8 O DHA diminui a necroptose em células prostáticas benignas, já em células tumorais, aumenta a autofagia e diminui a piroptose e a expressão proteica de LXR- β

O tratamento com DHA não alterou a expressão proteica de cPARP (Figura 28 E) e nem de TNF-R1 (Figura 28 D) nas duas linhagens celulares investigadas. Já, a expressão de MLKL fosforilada (Figura 28 C), marcador de necroptose, diminuiu 1,8 vezes na linhagem benigna PNT1A, mas não se alterou na linhagem tumoral 22rv1. A expressão de LC3B (Figura 28 F) aumentou 1,1 vezes na linhagem tumoral, após incubação com DHA, mas não se alterou na linhagem benigna. As células tumorais andrógeno-responsivas 22rv1 também apresentaram

uma diminuição (1,4 vezes) na expressão da gasdermina D clivada (Figura 28 A), marcador de piroptose, acompanhada por uma diminuição (1,1 vezes) na expressão de LXR- β (Figura 28 B) após incubação com DHA. Já na linhagem benigna PNT1A, o tratamento com DHA não alterou a expressão da Gasdermina D clivada e nem de LXR- β (Figura 28 A-B).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho é parte de um estudo mais amplo que analisa comparativamente os efeitos da D ω 3 nos diferentes lobos prostáticos dos camundongos TRAMP. Nesse estudo foram examinados os efeitos da dieta rica em DHA/EPA do óleo de peixe sobre a progressão do CaP no lobo dorsolateral desses camundongos, após dois períodos de consumo – um mês (animais de 12 semanas de idade) e três meses (animais de 20 semanas de idade). Constatamos que, para o período mais longo, metade dos animais desenvolveram tumores palpáveis, independente da dieta consumida. Esses tumores, que não diferiram em peso e morfologia entre os grupos, dificultaram o isolamento dos diferentes lobos prostáticos e análises dos mecanismos envolvidos não foram realizadas. Assim, as análises realizadas no período maior de consumo restringiram-se aos animais cujos lobos dorsolaterais puderam ser isolados adequadamente, para os quais vários parâmetros foram examinados. Nesse caso, foi possível constatar que o consumo de PUFA ω 3 atrasam a progressão do CaP no LDL, bem como nos lobos ventral e anterior (Figura 29). Mas, a inibição da carcinogênese é mais efetiva no LDL, o único onde foi verificado redução da frequência de carcinoma *in situ*.

Ao analisar os LDL que puderam ser adequadamente isolados nos animais de 12 e 20 semanas, verificou-se que a D ω 3 atrasa a progressão tumoral nesse lobo, pois preserva a proporção de áreas normais (saudáveis), reduz as áreas de HGPIN e CIT, lesões mais agressivas, e mantém o aspecto histopatológico geral da próstata semelhante ao encontrado nos estágios iniciais da carcinogênese (grupo C8). Esse atraso na progressão tumoral envolveu vários mecanismos e foi relacionado à redução da atividade proliferativa, regulação negativa de AR e ER- α , preservação do microambiente estromal, redução da infiltração de linfócitos T, aumento de autofagia e apoptose e melhora do metabolismo lipídico sistêmico.

O atraso na progressão tumoral evidenciado pela análise histopatológica, frente ao consumo da D ω 3 é reforçado pela análise microscópica e estereológica da glândula que demonstra uma redução da frequência de epitélio e aumento da frequência de lúmen e estroma não muscular nos animais alimentados com ω 3, a curto e longo prazo. Esse achado se deve, provavelmente, à menor proporção de áreas acometidas por lesões intraepiteliais prostáticas (distúrbios proliferativos), que aumentam a porção de epitélio e tendem a ocluir o lúmen do ácino, explicando porque essa redução epitelial foi acompanhada de um aumento do compartimento luminal.

Ainda, o atraso aqui constatado para os camundongos TRAMP corrobora várias pesquisas pré-clínicas e evidências epidemiológicas mostrando que as intervenções dietéticas

podem conter a progressão do CaP estabelecido e melhorar a eficácia dos tratamentos (APTE et al., 2013; KIDO et al., 2020). Foi demonstrado que os $\omega 3$ da dieta atrasam a progressão do câncer de próstata, exercendo efeitos antineoplásicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo os estudos desse último meio mais escassos (SAW et al., 2011; APTE et al., 2013; GEVARIYA et al., 2019). Em um trabalho com camundongos TRAMP, Saw e colaboradores (2011) relataram que os animais alimentados com uma dieta enriquecida com $\omega 3$ de óleo de peixe (10%) apresentaram uma diminuição da incidência de tumores palpáveis e carcinomas, além de redução do peso do tumor de próstata e ausência de metástase em comparação com o grupo alimentado com dieta rica em gordura (típica dieta ocidental), sugerindo efeitos benéficos dos $\omega 3$. Contudo, esse estudo restringe-se a dados de incidência e peso do tumor e não se aprofunda nos mecanismos envolvidos. Já os estudos *in vitro* têm apoiado cada vez mais o potencial anticâncer desses ácidos graxos, por meio da identificação de uma série de possíveis mecanismos biológicos e moleculares subjacentes aos seus efeitos (FASANO et al., 2015).

Alterações metabólicas

Nossos dados experimentais com camundongos TRAMP sugerem que o consumo de PUFA's atrasa a progressão tumoral via melhora do metabolismo lipídico e redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos.

Sabe-se que níveis séricos elevados de colesterol e triglicerídeos aumentam o risco de desenvolvimento e/ou recorrência do CaP (WUERMLI et al., 2005; ALLOTT et al., 2014; GABITOVA et al., 2014; JAMNAGERWALLA et al., 2018; MURTOLA et al., 2019). Estudos epidemiológicos, como os de Jamnagerwalla e colaboradores (2018) e Murtola e colaboradores (2019), demonstram que altos níveis de colesterol sérico total foram associados ao risco aumentado de CaP. Uma pesquisa recente com camundongos knockout para PTEN reportou que o aumento do colesterol sérico está correlacionado positivamente com o peso da próstata, proliferação celular epitelial do tumor e com uma maior concentração intra-tecidual de andrógenos (ALLOTT et al., 2018). Esses mesmos autores relataram que a redução do colesterol promoveu a diminuição nos níveis de andrógenos intraprostáticos e retardou o crescimento do tumor, evidenciando seu papel na promoção da progressão do CaP (ALLOTT et al., 2018). Além disso, Arthur e colaboradores (2016) identificaram que entre os homens com hipertrigliceridemia houve uma tendência de aumento no risco de CaP localizado de nível intermediário e avançado, sendo os níveis mais elevados de triglicerídeos associados positivamente ao CaP de alto grau. Ainda, a hipertrigliceridemia é associada ao estabelecimento

de quadros de resistência à insulina (BJORNSTAD; ECKEL, 2019) e estresse oxidativo (KLAFKE et al., 2015), ambos considerados fatores de risco para o desenvolvimento do CaP (ARCIDIACONO et al., 2012). Com base nessas informações, a redução nos níveis séricos desses lipídeos pelos PUFA's da dieta, aqui observada, ganha uma importância significativa, podendo ser explicada pela ação dos $\omega 3$ tanto na produção como na degradação de ácidos graxos e colesterol.

Os PUFA's DHA/EPA diminuem a produção hepática de ácidos graxos (inibição da lipogênese), pois suprimem a expressão gênica de proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBP), levando a redução da expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de colesterol, triglicerídeos e ácidos graxos, como a complexo de sintetase de ácidos graxos e acetil-coenzima A carboxilase (JUMP et al., 2005; TORREJON; JUNG; DECKELBAUM, 2007; ZHANG et al., 2019). O EPA e o DHA podem estimular degradação de ácidos graxos via ativação do PPAR α (receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa) e PPAR γ , promovendo sua β -oxidação (SAMPATH; NTAMBI, 2005). Podem, ainda, aumentar a depuração de triglicerídeos e o metabolismo por meio da ativação de PPARs e da lipoproteína lipase (WEI; JACOBSON, 2011; SO et al., 2020), útil para a eliminação deles das partículas de quilomícrons circulantes. Na modulação dos níveis de triglicerídeos, os $\omega 3$ influenciam os receptores nucleares adicionais relacionados, como o receptor farnesóide X (FXR), o receptor X do fígado (LXR) e o fator nuclear 4 α dos hepatócitos (HNF-4 α) (KOMAL et al., 2020). Assim, nossos dados são coerentes com a literatura e indicam que esses PUFA's podem ter atrasado a progressão tumoral por meio desses mecanismos mencionados. Também chamam atenção para necessidade de avaliação dos efeitos diretos desses ômega-3 nos lobos dorsolaterais, via modulação de receptores nucleares como os PPARs.

Atividade proliferativa e expressão de AR e ER- α

A carcinogênese prostática caracteriza-se por diversas alterações moleculares ou genéticas em genes relacionados a proliferação e sobrevivência celular (DEMARZO et al., 2003). Nossos resultados mostram que, o DHA/EPA da dieta são capazes de reduzir a proliferação celular e a expressão tecidual de AR e ER- α .

Vários estudos demonstram que os PUFA's $\omega 3$ são capazes de regular negativamente múltiplas vias de proliferação e sobrevivência celular, impedindo a progressão do câncer. Usando camundongos knockout *Pten* específicos da próstata e dietas com níveis definidos de PUFA's $\omega 3$, Gu e colaboradores (2013) descobriram que esses ácidos graxos reduziram o

crescimento do tumor, melhoraram o perfil histopatológico da glândula e aumentaram a sobrevivência dos animais. No estudo em questão, os autores demonstraram que o DHA inibiu a proteína AKT, além de alterar a localização celular da proteína PIP3 e fosfo-AKT, diminuiu a interação pPDK1 (proteína quinase 1 dependente de 3- fosfoinositídeo fosforilada)-AKT e AKT-BAD e consequentemente suprimiu o crescimento do tumoral. Hu e colaboradores (2010) reportaram que os ácidos graxos ômega-3 também podem diminuir a proliferação celular e induzir a morte celular apoptótica em células cancerosas humanas, diminuindo a transdução de sinal da via de sobrevivência celular AKT / NFB e modulando a via PI3K / AKT / p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitogênio p38) (SUN et al., 2017; YIN et al., 2017). Estudos *in vitro* também relataram que esses PUFA ω 3, como DHA/EPA são eficazes em diminuir a sobrevivência, proliferação, invasão e migração de células cancerígenas PC3 da próstata (OONO et al., 2017), dependente da indução de espécies reativas de oxigênio e por meio da inibição da fosforilação de PYK2 (proteína-tirosina quinase 2) (OONO et al., 2020). Na linhagem celular PNT1A (linhagem epitelial luminal terminal prostática humana normal) o DHA dobrou a produção de ânion superóxido e teve uma ação antiproliferativa relacionada a diminuição da capacidade de reserva bioenergética mitocondrial, associada a inativação de AKT (TAMARINDO et al., 2019). Chung e colaboradores (2001) descobriram que o DHA inibe o crescimento celular estimulado por andrógeno das células LNCaP (linhagem de células prostáticas humanas andrógeno dependente) e reprime a expressão de genes responsivos ao andrógeno, como *Klk3* (gene do antígeno específico da próstata) e *Nkx3* (gene da proteína Homeobox Nkx-3). Além da redução da fosforilação da AKT/mTOR (SHIN et al., 2013; TAMARINDO et al., 2019), o DHA também é capaz de modular a ação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), reduzindo sua atividade transcricional (CAVAZOS et al., 2011). Um estudo de revisão demonstrou que os alimentos ricos em DHA/EPA podem inibir a proliferação de células tumorais possivelmente por inibição da angiogênese tumoral, indução de apoptose, regulação da peroxidação lipídica (causando danos nas membranas da célula tumoral) e bloqueio do ciclo celular (ZHANG et al., 2019).

Dessa forma, a redução na densidade de células em proliferação encontrada no grupo de animais alimentados com esses PUFA pode ter sido modulada por essas mesmas vias de sinalização já descritas em estudos *in vitro*. Nossos resultados com o modelo TRAMP validam os resultados de estudos anteriores indicando a regulação negativa das vias proliferativas e de sobrevivência pelo DHA e reforçando seu uso potencial na intervenção dietética durante a progressão do CaP.

Outro fator importante para a manutenção estrutural, funcional e homeostase global da próstata são os hormônios androgênicos e estrogênicos (COOKE et al., 2017; SILVA et al., 2018). Sabe-se que os andrógenos e os receptores de andrógenos têm importante papel na morfogênese e manutenção da próstata normal (GELMANN, 2002), no entanto, eles têm sido fortemente sugeridos como fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do CaP (GELMANN, 2002; SILVA et al., 2018). Os resultados aqui relatados mostraram uma diminuição significativa na expressão epitelial de AR, independente do tempo de consumo de DHA/EPA. No estroma, essa diminuição foi observada apenas no grupo alimentado com a D ω 3 por um mês (T12). Resultado interessante visto que a apoptose e a proliferação epitelial são reguladas por receptores androgênicos estromais e que a transformação maligna induzida por testosterona e estradiol envolve mecanismos parácrinos, ressaltando a importância das interações estromal-epiteliais também na regulação hormonal do desenvolvimento prostático normal e neoplásico (CUNHA et al., 2004).

Nossos resultados de regulação negativa da expressão do AR ganham uma importância quando se sabe que o AR é o principal impulsionador da progressão do CaP e necessário nos estágios da doença para a manutenção do tumor (CHEN; SAWYERS; SCHER, 2008; KNUDSEN; PENNING, 2010). Alterações em fatores regulatórios a montante e/ou regulação positiva de cofatores necessários, além de uma expressão aumentada de AR contribuem significativamente para sua atividade no CaP (KNUDSEN; PENNING, 2010), tanto que a hiperexpressão desse receptor na próstata de camundongos mostrou evidências claras do desenvolvimento de hiperplasia e carcinoma *in situ* (STANBROUGH et al., 2001), que sustentam suas funções pró-tumorigênicas no microambiente glandular. Constata-se que a expressão de AR aumenta gradualmente e se correlaciona com a gravidade da doença tanto no modelo humano quanto nos camundongos TRAMP, indo de acordo com nossos achados. Além disso, a expressão de AR é importante para regular a diferenciação de células tumorais e sua atividade proliferativa (CUNHA et al., 2004). Niu e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos TRAMP nocautes para AR tinham tumores de próstata menores com baixas taxas de proliferação celular, apontando o papel do receptor na atividade de proliferação prostática no CaP primário nesse modelo animal.

Estudos demonstram a ação do DHA sobre o AR e fornecem possíveis mecanismos pelos quais esse PUFA pode ter levado à redução da expressão tecidual de AR em nosso estudo. Foi relatado que o DHA é capaz de aumentar a expressão de *c-Jun* interrompendo a atividade transcricional de AR (CHUNG et al., 2001; WANG et al., 2012). Wang e colaboradores (2016)

em estudo *in vitro*, demonstraram que o DHA não apenas reduz os níveis proteicos de AR e ER- α , mas também reduz significativamente os níveis de mRNA de ambos os receptores em células WPMY-1 (linhagem de células estromais de miofibroblastos). Assim como o tratamento com DHA parece acelerar a degradação dependente de proteassoma do AR em células C4-2 de câncer de próstata resistentes à castração e em células LNCaP (WANG et al., 2012; HU et al., 2015). Os resultados apresentados aqui podem sugerir uma correlação entre a diminuição da imunomarcagem de AR e a diminuição da atividade proliferativa (imunomarcagem de PCNA e PHH3) em ambos os tempos de consumo. De tal modo, concluímos que a ingestão da dieta rica em $\omega 3$ foi eficaz na redução do nível de AR, contribuindo para o retardo da progressão da lesão na próstata dorsolateral.

Além do AR, sabe-se que o ER- α atua como um oncogene e tem efeitos relacionados à diferenciação e proliferação de células epiteliais, podendo ser um precursor de lesões prostáticas (CUNHA et al., 2001) e participando do desenvolvimento de lesões mais agressivas (ŚLUSARZ et al., 2012; DA SILVA et al., 2017). A expressão desse receptor está significativamente associada a alto escore de Gleason e baixa sobrevida em pacientes com CaP (TAKIZAWA et al., 2015). Ainda, sua expressão e atividade em células epiteliais são reguladas positivamente em CaP humano de alto grau (NELSON et al., 2014). Em neoplasias intraepiteliais prostáticas de alto grau (HGPIN - precursor mais provável do câncer de próstata em homens), o ER- α também é superexpresso.

Da mesma forma como acontece para o AR, Lu e colaboradores (2010) evidenciaram que o DHA também pode induzir a degradação dependente de proteassoma de ER- α em cultura de células. Segundo o autor, a diminuição induzida por DHA na expressão proteica de ER- α provavelmente envolve a sinalização de PPAR γ , visto que foi sugerido que os metabólitos do DHA são ligantes desse receptor, que também estimula a via dependente do proteassoma para aumentar a degradação de ER- α (QIN et al., 2003; ITOH; YAMAMOTO, 2008). Isto posto, os efeitos antiestrogênicos do DHA podem servir como uma nova referência e fornecer informações para a pesquisa e o tratamento do CaP resistente à castração. Portanto, esses achados experimentais dos efeitos do DHA/EPA em camundongos TRAMP na redução da expressão tecidual de AR e ER- α sinalizam para o uso terapêutico desses PUFA's no tratamento do CaP.

Alterações estromais

O microambiente tumoral tem profunda influência no desenvolvimento e progressão das lesões neoplásicas. É relatado o papel fundamental do ambiente estromal na manutenção da homeostase dos tecidos e sua forte influência na sinalização epitelial, plasticidade celular, bem como no desenvolvimento de algumas doenças (LEVESQUE; NELSON, 2018; KIDO et al., 2019). O compartimento estromal mantém a homeostase do compartimento epitelial e da matriz extracelular, sendo que os fibroblastos estromais, em condições normais, regulam negativamente a proliferação e a migração de células epiteliais (RINELLA et al., 2020). A alta capacidade de responder prontamente ao distúrbio da homeostase do tecido pode tornar o estroma um ambiente propício para o estabelecimento do câncer (TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001).

Na próstata, o fenótipo do estroma reativo parece estar associado à expressão elevada de algumas proteínas, que não estão apenas ligadas à transformação do estroma, mas também definem as características-chave dos miofibroblastos e fibroblastos associados ao câncer (CAFs), as principais células do estroma reativo (BARRON; ROWLEY, 2012). Essas células passam por alterações fenotípicas e co-expressam α -actina do músculo liso e participam ativamente da oncogênese no modelo de camundongo TRAMP (NOGUEIRA-PANGRAZI et al., 2018; VENDRAMINI-COSTA et al., 2018; MATEUS et al., 2019). A hipertrofia do estroma, caracterizada pelo aumento da expressão de α -SMA e de fibras de colágeno, aqui observada, já é um evento relatado em camundongos TRAMP, de forma que se observa uma correlação positiva dos níveis desses componentes estromais com a idade e com a severidade das lesões (NOGUEIRA-PANGRAZI et al., 2018; VENDRAMINI-COSTA et al., 2018), indicando que a reação estromal está ligada com o processo de progressão da neoplasia (YU et al., 2011; MONTICO et al., 2015). Montico e colaboradores (2015) observaram que o estroma circundante de lesões epiteliais invasivas em camundongos TRAMP apresenta-se hipertrófico, hiperplásico e com a presença de células inflamatórias. Ademais, a presença de miofibroblastos no estroma reativo indica que pode haver aumento na produção de componentes da matriz extracelular, como nas fibras de colágeno, e remodelação geral da matriz durante a progressão do CaP (TUXHORN; AYALA; ROWLEY, 2001; PANKOVA et al., 2016; NISSEN; KARSDAL; WILLUMSEN, 2019). Os CAFs, que expressam altos níveis de α -SMA e colágeno tipo I, e promovem a proliferação e migração de células epiteliais tumorais, são os principais participantes no *turnover* desregulado do colágeno que leva à fibrose tumoral (NISSEN; KARSDAL; WILLUMSEN, 2019). Uma grande quantidade de fibras colágenas produzidas por

esses fibroblastos está diretamente correlacionada com um pior resultado para o paciente (NISSEN; KARSDAL; WILLUMSEN, 2019).

Em conhecimento disso, nossos dados terem indicado que a ingestão de DHA/EPA melhorou o microambiente do estroma na próstata, uma vez que preservou seu aspecto microscópico, distribuição das fibras de colágeno e expressão tecidual de α -SMA é um resultado positivo. Estudos demonstram que esses PUFA ω 3 utilizados em nossa dieta são capazes de atuar no estroma prostático. Bianchini e colaboradores (2012) demonstraram em experimentos com co-culturas de fibroblastos e células PC3 (linhagem de células prostáticas humanas andrógeno independente) ou células extraídas de biópsia de CaP, que o DHA inibe a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e a tumorigênese. Trabalhos anteriores também demonstraram que o DHA/EPA é capaz de reduzir a expressão de α -SMA em modelo de HBP (WANG et al., 2016) e diminuir a fibrogênese em camundongos com fibrose hepática, suprimindo aumento nos fatores fibrogênicos, expressão de α -SMA, nível de TGF- β 1 (fator do crescimento transformante beta 1) e níveis de RNA mensageiro de procolágenos e fator de crescimento do tecido conjuntivo (KAJIKAWA et al., 2011). Dessa forma, a manutenção das características estromais é um mecanismo importante pelo qual o DHA previne a progressão do tumor.

Resposta inflamatória

A resposta inflamatória é projetada para ajudar a combater e eliminar infecções, remover produtos químicos prejudiciais e reparar tecidos e sistemas orgânicos danificados. Embora esse processo, em geral, seja protetor, a falha em resolver a inflamação e retornar o tecido-alvo à homeostase pode resultar no estabelecimento de diversas patologias (CHAPKIN et al., 2009). Atualmente, diferentes estudos têm demonstrado o envolvimento do processo inflamatório no desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o CaP (CHAPKIN et al., 2009; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; THAPA; GHOSH, 2015).

Nossos resultados mostram uma redução no número de linfócitos T CD3⁺ no LDL em ambos os tempos de consumo da D ω 3, demonstrando uma ação relevante dos ω 3 na progressão tumoral prostática, visto que em relação à próstata é relatado que o principal subtipo encontrado em amostras de CaP é o linfócito T CD4⁺ (T *helper*, positivo para CD3) (MERCADER et al., 2001). Ademais, autores que investigaram o perfil celular inflamatório associado ao CaP registraram que os linfócitos T CD3⁺ eram mais frequentes em amostras de pacientes com

câncer em relação ao tecido prostático normal e que o número de células CD3⁺ nas áreas tumorais e estromais foi significativamente maior nos tumores primários de pacientes com CaP metastático do que naqueles de pacientes sem metástases (SFANOS et al., 2018). Ainda, a presença desses linfócitos infiltrantes de tumor CD3⁺ associou-se significativamente à redução da sobrevida livre de recorrência (SFANOS et al., 2018).

A redução da infiltração desses linfócitos no tecido prostático, demonstrada aqui, pode ser explicada devido a potente ação anti-inflamatória pela qual os PUFA ω 3 são conhecidos (ZÁRATE et al., 2017). Eles são capazes de reduzir a liberação de fatores inflamatórios, como a produção de eicosanoides pró-inflamatórios, ao diminuir relativamente a concentração de ácido araquidônico nos tecidos e competir com ele como substrato das enzimas COX-2 (ciclooxigenase-2) e 5-LOX (5-lipoxigenase) (KOMPRDA, 2012). Também são capazes de diminuir os níveis plasmáticos de marcadores pró-inflamatórios IL-6 (interleucina-6), TNF- α (fator de necrose tumoral α), INF- γ (interferon- γ) e CRP (proteína C reativa), e aumentar a concentração de marcadores anti-inflamatórios IL-10 (interleucina-10) e TGF- β (KOMPRDA, 2012), além de regular negativamente o fator de transcrição NF- κ B e seus genes alvos (CAVAZOS et al., 2011).

Outro mecanismo anti-inflamatório desses PUFA é a biossíntese, a partir dos ω 3, de mediadores especializados de pró-resolução (SPMs) como resolvinas, protectinas e maresinas que atuam regulando a infiltração de neutrófilos e a depuração dessas células apoptóticas por macrófagos, promovendo um retorno à homeostase do tecido (DUVALL; LEVY, 2016). Na sua capacidade de reduzir a infiltração de células inflamatórias (ZHANG et al., 2019) também se tem o conhecimento de que a ativação e função das células T depende da formação de domínios de membrana (SCHIEFFER et al., 2014) e uma alta incorporação de PUFA ω 3 na membrana celular remodela esses domínios devido à natureza altamente insaturada de DHA e EPA (FAN et al., 2018). Como consequência, tem-se o comprometimento da dinâmica do citoesqueleto resultando na diminuição da atividade das pequenas Rho GTPases, Rho α e RAC1 (substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada a Ras), o que leva à redução da mobilidade celular (CUCCHI et al., 2020).

Assim, conforme exposto, constata-se outro mecanismo importante pelo qual o DHA/EPA da dieta podem atuar na prevenção do estabelecimento e progressão tumoral: a alteração do perfil de linfócitos na próstata, em especial a diminuição da infiltração de linfócitos T CD3⁺.

Autofagia e morte celular

A autofagia desempenha um papel citoprotetor central na manutenção da homeostase metabólica e celular e tem um papel de supressor tumoral nas fases iniciais do câncer devido ao bloqueio do dano induzido por EROs e da preservação do equilíbrio celular (COOPER, 2018; ONORATI et al., 2018; VERZELLA et al., 2020). Os mecanismos adicionais pelos quais a autofagia suprime a carcinogênese incluem a preservação da estabilidade genômica, a eliciação da resposta imune anticâncer e a contenção da inflamação, além de evitar o acúmulo de oncoproteínas (VERZELLA et al., 2020).

Interessantemente, evidências recentes indicam que a autofagia também pode ser considerada um mecanismo de morte celular quando a homeostase não pode ser alcançada, já que nesse caso as células podem escolher uma resposta de MCR (ONORATI et al., 2018). O acúmulo maciço de vacúolos autofágicos/autofagossomos no citoplasma das células pode levar a morte apoptótica, mas em células que não apresentam sinais de apoptose, a vacuolização autofágica maciça pode caracterizar a morte celular autofágica (COOPER, 2018).

O desequilíbrio entre proliferação e morte celular é um evento chave para a progressão tumoral (GRIVICICH et al., 2007) e a apoptose é um processo de morte celular regulada que controla a proliferação excessiva, removendo células indesejadas com mutações prejudiciais e/ou células com alterações críticas em processos biológicos vitais (WEINBERG; HANAHAN, 2000). Normalmente as taxas de apoptose aumentam na fase inicial do câncer, como uma tentativa de proteger os tecidos, eliminando células potencialmente malignas (LABI; ERLACHER, 2015; DA SILVA et al., 2020). Posteriormente, as células malignas adquirem mecanismos de resistência e evasão da apoptose durante a progressão tumoral, impedindo sua eliminação efetiva por mecanismos anticâncer (LOWE; LIN, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nossos resultados mostram que o aumento da autofagia e da apoptose estão entre os múltiplos mecanismos pelos quais a D ω 3 pode atrasar a progressão tumoral no lobo dorsolateral dos camundongos TRAMP. O consumo mais prolongado da D ω 3 (3 meses) aumentou o número de células TUNEL-positivas e, uma vez que a atividade da caspase-3 é necessária para induzir a apoptose, usando um ensaio fluorimétrico, constatamos que o consumo da D ω 3 por 3 meses também aumentou a ativação da caspase-3. Constatamos um aparente aumento nos autofagossomos nos grupos que consumiram a D ω 3 e a expressão proteica de LC3B aumentou após o tratamento com DHA na linhagem celular tumoral. Nas análises imuno-histoquímicas não foram encontrados muitos sinais de células com número elevado de autofagossomos que

pudesse sugerir morte autofágica, mas análises ultra-estruturais serão realizadas para melhor avaliar essa questão. Então, é possível que a autofagia possa ter contribuído para a apoptose em camundongos TRAMP tratados com D ω 3. Embora se acredite fortemente que o DHA mata as células tumorais por apoptose, o papel do DHA na indução da via autofágica no câncer ainda não foi extensamente examinado.

Jing e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com DHA leva à autofagia via sinalização AMPK/mTOR mediada por p53 (antígeno tumoral celular p53) e que a autofagia induzida por DHA sensibiliza as células tumorais à apoptose. Os pesquisadores concluem que o processo autofágico contribui para a citotoxicidade do DHA em células de câncer cervical, de câncer de pulmão e de câncer de mama humano, ocorrendo simultaneamente com a apoptose. No trabalho de Pettersen e colaboradores (2016) o DHA induziu vários transcritos relacionados à autofagia em células de câncer de cólon SW620, entre eles o LC3B. Em células de glioblastoma também foi demonstrado que o DHA em alta dose induz autofagia tendo SQSTM1/p62 atuante como um regulador (TAN et al., 2019). Já no câncer de próstata, Shin e colaboradores (2013) relataram que o DHA leva a morte celular apoptótica regulada por EROs, associada à autofagia que envolve a sinalização de Akt-mTOR em células com p53 mutante, PC3 e DU145. Seus resultados também mostraram aumento dos níveis de expressão da forma lipídica de LC3B. Contudo, ainda pouco se sabe sobre a relação dos ω 3 com a autofagia na próstata.

Já a ação pró-apoptótica dos PUFA ω 3 em células tumorais envolvem várias vias, como promoção da produção de espécies reativas de oxigênio (SHIN et al., 2013) e danos à membrana mitocondrial; a ativação de proteases de caspases e regulação da expressão gênica relacionada à apoptose (ZHANG et al., 2019) e o aumento da quantidade de produtos de peroxidação lipídica citotóxica com subsequente indução desse tipo de morte celular regulada (D'ELISEO; VELOTTI, 2016; NEWELL et al., 2017). Oono e colaboradores (2020) demonstraram que o EPA é capaz de aumentar a expressão das proteínas pró-apoptóticas TRAIL-R1 (receptor 1 da TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), caspase 8 e P53, e diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (proteína 2 da célula-B de linfoma) em células de câncer de próstata PC3. Ainda nessa linhagem celular, Wang e colaboradores (2018) reportaram que o DHA promove a fosforilação e inativação de YAP (proteína associada a Sim), por meio da ativação dependente de FFAR1/4 (receptor de ácido graxo livre 1 e 4) e com isso induz apoptose. Ademais, a supressão da fosforilação dependente de SDC-1 de PDK1/AKT /BAD medeia a apoptose induzida por PUFA ω -3 no câncer de próstata (HU et al., 2010). De

forma relevante tem sido indicado que esses PUFAs parecem causar citotoxicidade seletiva para células cancerosas com pouca ou nenhuma toxicidade em células normais (D'ELISEO; VELOTTI, 2016).

Além da apoptose, várias modalidades reguladas de morte celular foram descobertas nos últimos anos, entre elas a piroptose e a necroptose (também chamada de necrose programada) (DENTON; KUMAR, 2019).

A piroptose é um tipo lítico e inflamatório de morte celular regulada, caracterizada pelo inchaço e lise das células, com ativação e liberação de muitos fatores pró-inflamatórios, como IL-18 e IL-1 β (YU et al., 2021). Como um tipo de morte pró-inflamatória, e tendo em vista que a exposição a longo prazo de tecidos e/ou células ao ambiente inflamatório aumenta o risco de câncer, a piroptose pode formar um microambiente adequado para o crescimento de células tumorais e, assim, promover o crescimento tumoral (XIA et al., 2019). Recentemente, alguns estudos descobriram que a piroptose pode influenciar a proliferação, invasão e metástase do tumor (FANG et al., 2020). Além de que, suas vias de sinalização associadas e a liberação de vários mediadores inflamatórios estão intimamente relacionadas à tumorigênese e resistência à medicamentos (XIA et al., 2019).

A IL-1 β , ativada e liberada pela piroptose, é altamente expressa em vários cânceres e tem uma correlação negativa com o prognóstico de pacientes com tumor, desempenhando um papel importante no crescimento tumoral, invasividade, angiogênese e metástase (KRELIN et al., 2007; JU et al., 2021). Já a GSDMD, proteína efetora da morte piroptótica, inibe a apoptose de células de câncer de pulmão NSCLC reduzindo a ativação da caspase-3 e promovendo a proliferação dessas células (GAO et al., 2018). Ainda, foi demonstrado que a ativação de LXR- β induz piroptose de células cancerígenas de cólon humano e murino (DERANGERE et al., 2014). LXR β é amplamente expresso em todos os tecidos e funciona como fator de transcrição. Mas, sua localização citoplasmática tem um efeito não genômico, capaz de induzir ativação precoce da caspase-1 e ativação tardia da caspase-7, com ruptura da membrana celular, duas características principais da morte piroptótica (DERANGERE et al., 2014; WANG et al., 2018).

Nossos resultados com imuno-histoquímica para os marcadores específicos de necroptose e piroptose indicam que a D ω 3 não afeta esses tipos de MCR, os quais ocorrem em baixo nível no LDL, atingindo predominantemente as células do sistema imune. Por outro lado, o tratamento com DHA em linhagem de células prostáticas tumorais 22rv1 foi capaz de reduzir a expressão proteica da proteína efetora gasdermina D e a piroptose. Também reduziu a expressão proteica de LXR- β , sugerindo um possível mecanismo envolvido no controle da

piroptose nessa linhagem celular. Ao que sabemos esse é o primeiro relato da ação do DHA na modulação da piroptose em células prostáticas, contudo, alguns trabalhos sugerem que o DHA é capaz inibir a piroptose no fígado (LI et al., 2018; FAN et al., 2021;), através da interação de GPR120 com NLRP3 e da diminuição na expressão de NLRP3, GSDMD, IL-1 β , IL-18 (FAN et al., 2021).

A necroptose é uma morte celular regulada, independente de caspase, morfológicamente semelhante à necrose, com participação essencial da proteína MLKL e indução por diferentes receptores, como o TNFR (ZHU et al., 2019). A necroptose evoca respostas inflamatórias, assim como a piroptose, ao liberar padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Com a inflamação induzida por DAMPs, algumas vias de sinalização, como as vias de NF- κ B ou MAPK, são ativadas e muitos estudos demonstrando que sua ativação tem efeitos pró-tumorais (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Ainda, estudos recentes sugerem que tumores sofrem necroptose *in vivo* e a necroptose pode promover a tumorigênese e metástase do câncer, além de poder gerar um microambiente tumoral imunossupressor (QIN et al., 2019; GONG et al., 2019). Tem-se relatado também que alto nível de p-MLKL está associado a pior prognóstico para pacientes com câncer de cólon e esôfago (LALAOUI; BRUMATTI, 2017).

Nossos resultados mostraram que a necroptose era onipresente nas áreas de necrose tumoral na próstata de camundongos TRAMP e o tratamento com DHA na linhagem prostática benigna com alterações pré-malignas PNT1A reduziu a expressão de pMLKL. Outros autores também demonstraram a ação do DHA na inibição da necroptose. Yuan e colaboradores (2020) descreveram que o DHA suprimiu marcadamente a expressão proteica de necroptose (RIPK1, RIPK3, MLKL) em monócitos THP-1. Já Xiao e colaboradores (2019) evidenciaram que EPA e DHA regularam negativamente as expressões proteicas de moléculas relacionados à necroptose, incluindo TNFR1, RIP1, RIP3, e pMLKL em células epiteliais intestinais e Pacheco e colaboradores (2014) confirmaram que o DHA também é capaz de reduzir a necroptose induzida por TNF- α em células de fibrosarcoma L929.

Em conjunto, nossos dados mostram que o DHA pode modular diferentes padrões de morte celular dependendo da linhagem, com redução da necroptose na não tumoral e da piroptose na tumoral, mas no geral antagonizando a morte celular inflamatória, o que sustenta a importância do seu uso como adjuvante em terapias para o tratamento do CaP. Por outro lado, esses padrões de MCR inflamatórias não parecem ser afetados pelo consumo da D ω 3, que induz autofagia e apoptose no LDL.

Por fim, deve ser mencionado que o modelo utilizado é altamente eficiente e replica de maneira muito adequada a evolução do CaP humano e, portanto, o fato da D ω 3 não evitar a progressão para tumores primários mais volumosos no período mais prolongado era esperado. Tem-se conhecimento de que a dieta ocidental contém quantidades desproporcionalmente altas de PUFA ω 6 e baixas quantidades de PUFA ω 3. Enquanto a maioria dos dados sobre os efeitos das altas concentrações de PUFA ω 6 na dieta estão positivamente associados à incidência de CaP (BROWN et al., 2010; SCHUMACHER et al., 2013), estudos de coorte avaliando o risco de mortalidade pelo CaP sugeriram uma associação entre a maior ingestão de peixes (ricos em ômega-3) e diminuição do risco de morte relacionada ao câncer de próstata (AUCOIN et al., 2017). Os novos dados reforçam o caso de intervenção dietética como parte de novas estratégias terapêuticas potenciais que procuram impedir a progressão dos estágios iniciais do CaP, contudo eles chamam a atenção para a necessidade de mais estudos para esclarecer o efeito da D ω 3 no CaP por períodos prolongados de tempo.

7 CONCLUSÃO

A intervenção dietética com DHA/EPA, nas condições utilizadas neste estudo, diminuiu a gravidade do CaP no lobo prostático dorsolateral de camundongos TRAMP, em especial no período mais curto de consumo. O atraso evidenciado na progressão tumoral foi relacionado à redução da proliferação celular, a regulação negativa da expressão de AR e ER- α , a diminuição da infiltração de linfócitos T, o aumento da autofagia e da apoptose e a melhora das características metabólicas, como os níveis séricos de lipídeos. Assim, o consumo desses ômega-3 manteve as características histopatológicas da glândula (epiteliais e estromais) semelhante às encontradas em estágios iniciais da carcinogênese. Dessa forma, os resultados experimentais aqui obtidos sugerem uma ação positiva do DHA/EPA como potencial agente quimioprotetor nos estágios iniciais do CaP, ou pelo menos como um possível elemento para combinação com outras estratégias a fim de aumentar a eficácia terapêutica. Além disso, a exposição a 100 μ M de DHA por 48 horas em linhagens celulares prostáticas humanas também evidenciou sua propriedade quimioprotetora, mediada pelo aumento de autofagia e redução de tipos de morte celular que geram alta resposta inflamatória. Tendo em vista nossos resultados e o fato da incorporação desses ômega-3 na dieta ter se mostrado uma ferramenta eficaz para modular a progressão tumoral em suas fases iniciais, chamamos atenção para o uso da suplementação alimentar com estes ácidos graxos e para a necessidade de estudos mais detalhados a respeito dos seus efeitos em períodos de consumo mais prolongados.

REFERÊNCIAS

- AARON, L. T.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of prostate anatomy and embryology and the etiology of benign prostatic hyperplasia. **Urologic Clinics**, v. 43, n. 3, p. 279-288, 2016.
- ALLOTT, E. H.; MASKO, E. M.; FREEDLAND, S. J. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. **European urology**, v. 63, n. 5, p. 800-809, 2013.
- ALLOTT, E. H. et al. Serum Lipid Profile and Risk of Prostate Cancer Recurrence: Results from the SEARCH Database. **American Association for Cancer Research**, p. 1–9, 2014.
- ALLOTT, E. H. et al. Saturated fat intake and prostate cancer aggressiveness: results from the population-based North Carolina-Louisiana Prostate Cancer Project. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 20, n. 1, p. 48-54, 2017.
- ALLOTT, E. H. et al. Serum cholesterol levels and tumor growth in a PTEN-null transgenic mouse model of prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, 2018.
- ALUKAL, J. P.; LEPOR, H. Testosterone Deficiency and the Prostate. **Urol Clin North Am**, v. 43, n. 2, p. 203-208, 2016.
- APTE, S. A. et al. A low dietary ratio of omega-6 to omega-3 Fatty acids may delay progression of prostate cancer. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 4, p. 556-562, 2013.
- ARCIDIACONO, B. et al. Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.
- ARTHUR, R. et al. Association between baseline serum glucose, triglycerides and total cholesterol, and prostate cancer risk categories. **Cancer medicine**, v. 5, n. 6, p. 1307-1318, 2016.
- AUCOIN, M. et al. Fish-derived omega-3 fatty acids and prostate cancer: a systematic review. **Integrative cancer therapies**, v. 16, n. 1, p. 32-62, 2017.
- BALMAIN, A. Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 145-152, 2002.
- BANERJEE, P. P. et al. Androgen action in prostate function and disease. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 6, n. 2, p. 62, 2018.
- BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-related cancer**, v. 19, n. 6, p. R187-R204, 2012.
- BERMAN-BOOTY, L. D. et al. A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n.1, p. 5-17, 2012.

BERQUIN, I. M. et al. Expression signature of the mouse prostate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36442-36451, 2005.

BERQUIN, I. M. et al. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. **J Clin Invest**, v. 117, n. 7, p. 1866-1875, 2007.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; CHEN, Y. Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer letters**, v. 269, n. 2, p. 363-377, 2008.

BHANDARKAR, N. S. et al. Attenuation of Metabolic Syndrome by EPA/DHA Ethyl Esters in Testosterone-Deficient Obese Rats. **Marine drugs**, v. 182, n. 16, p. 1–22, 2018.

BIANCARDI, M. F. et al. Próstata feminina: perspectivas históricas, de desenvolvimento e morfológicas. **Cell Biology International**, v. 41, n. 11, p. 1174-1183, 2017.

BIANCHINI, F. et al. 22: 6n-3 DHA inhibits differentiation of prostate fibroblasts into myofibroblasts and tumorigenesis. **British journal of nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2129-2137, 2012.

BJORNSTAD, P.; ECKEL, R. H. Pathogenesis of Lipid Disorders in Insulin Resistance: A Brief Review. **Curr Diab Rep.**, v. 18, n. 12, 2019.

BOIBESSOT, C.; TOREN, P. Esteróides sexuais no microambiente tumoral e progressão do câncer de próstata. **Câncer relacionado ao endócrino**, v. 25, n. 3, p. R179-R196, 2018.

BOSTWICK, D. G. et al. Human prostate cancer risk factors. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 101, n. S10, p. 2371-2490, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASKY, T. M. et al. Serum phospholipid fatty acids and prostate cancer risk: Results from the prostate cancer prevention trial. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 12, p. 1429–1439, 2011.

BROWN, M. D. et al. Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on metastatic spread from prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 102, n. 2, p. 403-413, 2010.

CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur J Clin Nutr**, v.56, p.S14–19, 2002.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015.

CAVAZOS, D. A. et al. Docosahexaenoic Acid Selectively Induces Human Prostate Cancer Cell Sensitivity to Oxidative Stress Through Modulation of NF- κ B. **The Prostate**, v. 1428, n. February, p. 1420–1428, 2011.

CHAPKIN, R. S. et al. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 2-3, p. 187-191, 2009.

CHAVARRO, J. E. et al. A prospective study of polyunsaturated fatty acid levels in blood and prostate cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 1364-1370, 2007.

CHE, H. et al. EPA enriched ethanolamine plasmalogens significantly improve cognition of Alzheimer's disease mouse model by suppressing β amyloid generation. **Journal of Functional Foods**, v. 41, n. September 2017, p. 9–18, 2018.

CHEAITO, K. et al. Epidermal Growth Factor Is Essential for the Maintenance of Novel Prostate Epithelial Cells Isolated From Patient-Derived Organoids. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 1253, 2020.

CHEN, Y. U.; SAWYERS, C. L.; SCHER, H. I. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 440-448, 2008.

CHUNG, B. H. et al. Effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on androgen-mediated cell growth and gene expression in LNCaP prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1201-1206, 2001.

COLEMAN, W. B. Molecular Pathogenesis of Prostate Cancer. 2^a ed. **Elsevier Inc.**, 2018.

COOKE, P. S. et al. Estrogens in male physiology. **Physiological reviews**, v. 97, n. 3, p. 995-1043, 2017.

COOPER, K. F. Till death do us part: the marriage of autophagy and apoptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

CORNFORD, P. et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. **European Urology**, v. 71, p. 630–642, 2017.

CRAWFORD, M. et al. Spector AA. Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. **Ann Nutr Metab**, v. 44, p. 263-265, 2000.

CROWE, F. L. et al. Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition 1 – 3. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 1, p. 1353–1363, 2008.

CROWE, F. L. et al. Dietary fat intake and risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 5, p. 1405–1413, 2008.

CUCCHI, D. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids impinge on CD4⁺ T cell motility and adipose tissue distribution via direct and lipid mediator-dependent effects. **Cardiovascular research**, v. 116, n. 5, p. 1006-1020, 2020.

CUNHA, G. R. et al. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, n. 4, p. 285-296, 2001.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 4, p. 221-236, 2004.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of biological methods**, v. 2, n. 1, 2015.

D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Omega-3 fatty acids and cancer cell cytotoxicity: implications for multi-targeted cancer therapy. **Journal of clinical medicine**, v. 5, n. 2, p. 15, 2016.

DA SILVA, R. F. et al. Antiangiogenic therapy with Nintedanib affects hypoxia, angiogenesis and apoptosis in the ventral prostate of TRAMP animals. **Cell and tissue research**, v. 379, n. 2, p. 407-420, 2020.

DA SILVA, R.F. et al. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). **J Biomed Sci**, v. 24, n. 31, 2017.

DAVIDSON, M. H. Omega-3 fatty acids: new insights into the pharmacology and biology of docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. **Curr Opin Lipidol**, v. 24, n. 6, p. 467-474, 2013.

DE JESUS, M. M. et al. Histopathological alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl phthalate individually or in combination. **Reproductive Toxicology**, v. 52, p. 26-39, 2015.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.

DEGEORGES, A. et al. Recurrent cytogenetic alterations of prostate carcinoma and amplification of c-myc or epidermal growth factor receptor in subclones of immortalized PNT1 human prostate epithelial cell line. **International journal of cancer**, v. 62, n. 6, p. 724-731, 1995.

DEL GOBBO, L. C. et al. ω -3 polyunsaturated fatty acid biomarkers and coronary heart disease: pooling project of 19 cohort studies. **JAMA internal medicine**, v. 176, n. 8, p. 1155-1166, 2016.

DEMARZO, A. M. et al. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 955-964, 2003.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.

DENTON, D.; KUMAR, S. Morte celular dependente de autofagia. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 4, p. 605-616, 2019.

DERANGERE, V. et al. Liver X receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 12, p. 1914-1924, 2014.

DIEP, Q. N.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Hypertension**, v. 36, p. 851–855, 2000.

DINWIDDIE, M. T. et al. Omega-3 Fatty Acid Consumption and Prostate Cancer: A Review of Exposure Measures and Results of Epidemiological Studies. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 452–468, 2016.

DU TOIT-KOHN, J. L.; LOUW, L.; ENGELBRECHT, A. M. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in colorectal carcinoma cells by modulating the PI3 kinase and p38 MAPK pathways. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 106-114, 2009.

DUVALL, M. G.; LEVY, B. D. DHA-and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 144-155, 2016.

EDWARDS, I. J. et al. *In vivo* and *in vitro* regulation of syndecan 1 in prostate cells by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18441–18449, 2008.

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

ESER, P. O. et al. Marine- and plant-derived ω -3 fatty acids differentially regulate prostate cancer cell proliferation. **Molecular and clinical oncology**, v. 1, n. 3, p. 444–452, 2013.

FAN, G. et al. DHA/AA alleviates LPS-induced Kupffer cells pyroptosis via GPR120 interaction with NLRP3 to inhibit inflammasome complexes assembly. **Cell death & disease**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

FAN, Y. Y. et al. Remodelling of primary human CD4⁺ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 2, p. 163-175, 2018.

FANG, Y. et al. Pyroptosis: a new frontier in cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109595, 2020.

FASANO, E. et al. Long-chain n-3 PUFA against breast and prostate cancer: Which are the appropriate doses for intervention studies in animals and humans? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2245–2262, 2015.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34-45, 2001.

FUJITA, K.; NONOMURA, N. Role of androgen receptor in prostate cancer: a review. **The world journal of men's health**, v. 37, n. 3, p. 288, 2019.

FUJIMOTO, N. et al. Identificação de proteínas secretadas pela próstata em camundongos por análise de espectrometria de massa e avaliação da expressão de mRNA específico de lobo e dependente de andrógeno. **Journal of endocrinology**, v. 190, n. 3, pág. 793-803, 2006.

GABITOVA, L.; GORIN, A.; ASTSATUROV, I. Molecular Pathways: Sterols and Receptor Singaling in Cancer. **Clin Can Res.**, v. 20, n. 1, 2014.

GALET, C. et al. Effect of a low-fat fish oil diet on proinflammatory eicosanoids and cell-cycle progression score in men undergoing radical prostatectomy. **Cancer prevention research**, v. 7, n. 1, p. 97-104, 2014.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 486–541. 2018.

GAO, J. et al. Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non small cell lung cancer. **Oncology reports**, v. 40, n. 4, p. 1971-1984, 2018.

GEVARIYA, N. et al. Omega-3 fatty acids decrease prostate cancer progression associated with an anti-tumor immune response in eugonadal and castrated mice. **The Prostate**, v. 79, n. 1, p. 9-20, 2019.

GILTAY, E. J. et al. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1167-1174, 2004.

GINGRICH, J. R.; GREENBERG, N. M. A transgenic mouse prostate cancer model. **Toxicologic pathology**, v. 24, n. 4, p. 502-504, 1996.

GINGRICH, J. R. et al. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 2, n. 2, p. 70-75, 1999.

GREENBERG, N. M. et al. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specically to the prostate in transgenic mice. **Mol Endocrinology**, v. 8, p. 230-239, 1994.

GREENBERG, N. M. et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. **Medical Sciences**, v. 92, n. April, p. 3439–3443, 1995.

GREENBERG, N. M. Androgens and growth factors in prostate cancer: a transgenic perspective. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 3, n. 4, p. 224-228, 2000.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GU, Z. et al. Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

GU, Z. et al. Polyunsaturated fatty acids affect the localization and signaling of PIP3/AKT in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 9, p. 1968- 1975, 2013.

GUPTA, P.; SERAJUDDIN, M. Fish Lipid against Prostate Cancer (PC-3) through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. **Nutrition and cancer**, v. 73, n. 2, p. 300-306, 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HAYASHI, T. et al. High-Fat Diet-Induced Inflammation Accelerates Prostate Cancer Growth via IL6 Signaling. **Clin Cancer Res**, n. 16, p. 1–11, 2018.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiologic Clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000.

HENRY, G. H. et al. A cellular anatomy of the normal adult human prostate and prostatic urethra. **Cell reports**, v. 25, n. 12, p. 3530-3542. e5, 2018.

HU, Y. et al. Syndecan-1-dependent suppression of PDK1/Akt/bad signaling by docosahexaenoic acid induces apoptosis in prostate cancer. **Neoplasia**, v. 12, n. 10, p. 826-836, 2010.

HU, Z. et al. Docosahexaenoic acid inhibits the growth of hormone-dependent prostate cancer cells by promoting the degradation of the androgen receptor. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p. 3769–3774, 2015.

HUTTUNEN, E. et al. A histoquantitative study on the effects of castration on the rat ventral prostate lobe. **J Anatom**, v. 3, p. 357- 370, 1981.

HUXLEY, A. L. Admirável mundo novo. 22. ed. Globo de Bolso, 2013. 397 p.

IIGO, M. et al. Inhibitory effects of docosahexaenoic acid on colon carcinoma 26 metastasis to the lung. **Br J Cancer**, v.75, p.650–655, 1997.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

IRSHAD, S.; ABATE-SHEN, C. Modelagem de câncer de próstata em camundongos: algo antigo, algo novo, algo pré-maligno, algo metastático. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1, pág. 109-122, 2013.

ITOH, T.; YAMAMOTO, K. Peroxisome proliferator activated receptor γ and oxidized docosahexaenoic acids as new class of ligand. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 377, n. 4-6, p. 541-547, 2008.

JACOBSEN, C. Fish Oils: Composition and Health Effects. 1st ed. **Elsevier Ltd.**, 2015.

JAMNAGERWALLA, J. et al. Serum cholesterol and risk of high-grade prostate cancer: results from the REDUCE study. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 21, n. 2, p. 252, 2018.

JING, K.; SONG, K.-S.; SHIN, S. et al. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1348–1358, 2011.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 130-142, 2015.

JU, X. et al. Role of pyroptosis in cancer cells and clinical applications. **Biochimie**, v.185, p. 78-86, 2021.

JUMP, D. B. et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2503-2506, 2005.

JURMEISTER, S. et al. Identification of potential therapeutic targets in prostate cancer through a cross-species approach. **EMBO molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. e8274, 2018.

KAJIKAWA, S. et al. Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine-and choline-deficient diet. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 4, p. 1065-1074, 2011.

KENSLER, K. H.; REBBECK, T. R. Cancer Progress and Priorities: Prostate Cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 29, n. 2, p. 267-277, 2020.

KIDO, L. A. et al. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: Delay in PCa progression. **Endocrine-Related Cancer**, v. 23, n. 4, p. 235–250, 2016.

KIDO, L. A. et al. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. **Life sciences**, v. 217, p. 141-147, 2019.

KIDO, L. A. et al. Prevention of Prostate Cancer in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mice by Yellow Passion Fruit Extract and Antiproliferative Effects of Its Bioactive Compound Piceatannol. **J Cancer Prev.**, v. 25, p. 87-99, 2020.

KLAFKE, J. Z. et al. Association between hypertriglyceridemia and protein oxidation and proinflammatory markers in normocholesterolemic and hypercholesterolemic individuals. **Clinica Chimica Acta**, v. 448, p. 50–57, 2015.

KNUDSEN, K. E.; PENNING, T. M. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 315-324, 2010.

KOMAL, F. et al. Impact of different omega-3 fatty acid sources on lipid, hormonal, blood glucose, weight gain and histopathological damages profile in PCOS rat model. **J Transl Med**, v. 18, n. 349, 2020.

KOMPRDA, T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 25-38, 2012.

KRELIN, Y. et al. Interleukin-1 β –Driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen–Induced tumors. **Cancer research**, v. 67, n. 3, p. 1062-1071, 2007.

KUDA, O.; ROSSMEISL, M.; KOPECKY, J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue biology. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 2017, 2018.

KWABI-ADDU, B.; OZEN, M.; ITTMANN, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 11, n. 4, p. 709-724, 2004.

LABBÉ, D. P. et al. High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

LALAOUI, N.; BRUMATTI, G. Relevance of necroptosis in cancer. **Immunology and cell biology**, v. 95, n. 2, p. 137-145, 2017.

LANGE, K. W. et al. Are there serious adverse effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements?. **Journal of Food Bioactives**, v. 7, 2019.

LARSSON, S. C. et al. Dietary long-chain n– 3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 6, p. 935-945, 2004.

LEACH, D. A.; BUCHANAN, G. Stromal androgen receptor in prostate cancer development and progression. **Cancer**, v. 9, n. 1, p. 10, 2017.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, 2011.

LEITZMANN, M. F. et al. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate. **Am J Clin Nutr**, n. 2, p. 204–216, 2004.

LEVESQUE, C.; NELSON, P. S. Cellular constituents of the prostate stroma: Key contributors to prostate cancer progression and therapy resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 8, p. a030510, 2018.

LI, J. et al. Dietary supplementation of α -linolenic acid induced conversion of n-3 LCPUFAs and reduced prostate cancer growth in a mouse model. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 136, 2017.

- LI, Z. et al. DHA attenuates hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting pyroptosis and activating PI3K/Akt pathway. **European journal of pharmacology**, v. 835, p. 1-10, 2018.
- LIANG, P. et al. Role of Host GPR120 in Mediating Dietary Omega-3 Fatty Acid Inhibition of Prostate Cancer. **J Nat Canc Inst**, v. 111, p. 1-8, 2018.
- LIANG, P. et al. Effect of dietary omega-3 fatty acids on castrate-resistant prostate cancer and tumor-associated macrophages. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 23, n. 1, p. 127-135, 2020.
- LICHTENSTEIN, A. H. et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006 A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, p. 82-96, 2006.
- LISS, M. A. et al. Higher baseline dietary fat and fatty acid intake is associated with increased risk of incident prostate cancer in the SABOR study. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 22, n. 2, p. 244-251, 2019.
- LITWIN, M. S.; TAN, H. J. The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. **Jama**, v. 317, n. 24, p. 2532-2542, 2017.
- LIU, Y.; WU, X.; JIANG, H. High dietary fat intake lowers serum equol concentration and promotes prostate carcinogenesis in a transgenic mouse prostate model. **Nutrition & Metabolism**, p. 1-7, 2019.
- LU, I. F. et al. Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor α and inhibits the downstream signaling target in MCF-7 breast cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 512-517, 2010.
- LUO, X. et al. Docosahexaenoic acid attenuates adipose tissue angiogenesis and insulin resistance in high fat diet-fed middle-aged mice via a sirt1- dependent mechanism. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 60, n. 4, p. 871- 885, 2016.
- LUZETE, B. C. Efeitos do ácido docosahexaenoico (DHA) e do ácido araquidônico (AA) sobre a morte celular da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. 69 páginas. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, Distrito Federal, 2015.
- MARKER, P. C.; DONJACOUR, A. A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol.**, v 253, p 165- 174, 2003.
- MARKOZANNES, G. et al. Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. **European Journal of Cancer**, v. 69, p. 61-69, 2016.
- MASER, R. S. et al. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 966-971, 2007.
- MATEUS, P. A. M. et al. Association of anti-inflammatory and antiangiogenic therapies negatively influences prostate cancer progression in TRAMP mice. **The Prostate**, v. 11, n. November 2018, p. 515-535, 2019.

- MATSUSHITA, M.; FUJITA, K.; NONOMURA, N. Influence of diet and nutrition on prostate cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1447, 2020.
- MAVROPOULOS, J. C. et al. The effects of varying dietary carbohydrate and fat content on survival in a murine LNCaP prostate cancer xenograft model. **Cancer prevention research**, v. 2, n. 6, p. 557-565, 2009.
- MEESAPYODSUK, D.; QIU, X. The front-end desaturase: Structure, function, evolution and biotechnological use. **Lipids**, v. 47, n. 3, p. 227–237, 2012.
- MENG, H. et al. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells *in vitro*. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–14, 2013.
- MERCADER, M. et al. T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. **PNAS**, v. 98, n. 25, p. 14565–14570, 2001.
- MOGHADASIAN, M. H. Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 5, p. 402-410, 2008.
- MONTICO, F. et al. Reactive Stroma in the Prostate During Late Life: The Role of Microvasculature and Antiangiogenic Therapy Influences. **Prostate**, v. 1661, p. 1643–1661, 2015.
- MONTORO, D. T. et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. **Nature**, v. 560, n. 7718, p. 319-324, 2018.
- MORENO, C. et al. Effects of n–3 polyunsaturated fatty acids on cardiac ion channels. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 245, 2012.
- MURRAY, N. R. et al. Protein kinase C betaII and TGFbetaRII in omega-3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. **J Cell Biol**, v. 157, p. 915–920, 2002.
- MURTOLA, T. J. et al. Serum cholesterol and prostate cancer risk in the Finnish randomized study of screening for prostate cancer. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 22, n. 1, p. 66-76, 2019.
- MOTRICH, R. D. et al. Implications of prostate inflammation on male fertility. **Andrologia**, v. 50, n. 11, p. e13093, 2018.
- MOUSSA, H. et al. Omega-3 fatty acids survey in men under active surveillance for prostate cancer: from intake to prostate tissue level. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1616, 2019.
- NAMEKAWA, T. et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 74, 2019.
- NELLES, J. L.; HU, W. Y.; PRINS, G. S. Estrogen action and prostate cancer. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 6, n. 3, p. 437-451, 2011.

NELSON, A. W. et al. Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe?. **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 4, p. T219-T234, 2014.

NELSON, W. G.; DEMARZO, A. M.; YEGNASUBRAMANIAN, S. The diet as a cause of human prostate cancer. **Advances in Nutrition and Cancer**, p. 51-68, 2014.

NEWELL, M. et al. A critical review on the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on cancer cell cycle progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1784, 2017.

NGO, T. H. et al. Effect of isocaloric low-fat diet on human LAPC-4 prostate cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice and the insulin-like growth factor axis. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2734-2743, 2003.

NISSEN, N. I.; KARSDAL, M.; WILLUMSEN, N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 38, n.115, 2019.

NIU, Y. et al. Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n. 34, p. 12188-12193, 2008.

NIU, Y. N.; XIA, S. J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 28, 2009.

NOGUEIRA-PANGRAZI, E. et al. Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial-stromal interaction balance. **Cell biology international**, v. 42, n. 2, p. 153-168, 2018.

NORDBY, Y. et al. High expression of PDGFR- β in prostate cancer stroma is independently associated with clinical and biochemical prostate cancer recurrence. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

NORRISH, A. E. et al. Prostate cancer risk and consumption of fish oils: a dietary biomarker-based casecontrol study. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. February, p. 1238–1242, 1999.

OCZKOWSKI, M. et al. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 496, 2021.

OLIVEIRA, D. S. M et al. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 1, p. 8, 2016.

ONORATI, A. V. et al. Targeting autophagy in cancer. **Cancer**, v. 124, n. 16, p. 3307-3318, 2018.

OONO, K. et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 217-220, 2017.

OONO, K. et al. Contribution of Pyk2 pathway and reactive oxygen species (ROS) to the anti-cancer effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in PC3 prostate cancer cells. **Lipids Health Dis**, v. 19, n. 15, 2020.

OZTEN, N. et al. Papel do estrogênio na carcinogênese da próstata induzida por androgênio em ratos NBL. **Hormones and Cancer**, v. 10, n. 2, p. 77-88, 2019.

PACHECO, F. J. et al. Docosahexanoic acid antagonizes TNF- α -induced necroptosis by attenuating oxidative stress, ceramide production, lysosomal dysfunction, and autophagic features. **Inflammation Research**, v. 63, n. 10, p. 859-871, 2014.

PANKOVA, D. et al. Cancer-associated fibroblasts induce a collagen cross-link switch in tumor stroma. **Mol Cancer Res.**, v. 14, n. 3, p. 287–295, 2016.

PEISCH, S. F. et al. Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. **World journal of urology**, v. 35, n. 6, p. 867-874, 2017.

PEREZ-CORNAGO A. et al. Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: results from the EPIC cohort study. **BMC Medicine, London**, v. 15, n. 1, p. 115, 2017.

PETTERSEN, K. et al. DHA-induced stress response in human colon cancer cells—Focus on oxidative stress and autophagy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 90, p. 158-172, 2016.

PLOURDE, M.; CUNNANE, S. C. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 619–634, 2007.

PRINS, G. S.; LINDGREN, M. Accessory sex glands in the male. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 14^a ed. London, UK: **Elsevier**, p. 773–804, 2015.

PYTLOWANCIV, E. Z. et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. **Prostate**, v. 76, n. 7, p. 662–678, 2016.

QIN, C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor α in MCF-7 breast cancer cells. **Cancer research**, v. 63, n. 5, p. 958-964, 2003.

QIN, X. et al. The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 259-266, 2019.

QU, L. G. et al. Effects of estrogen receptor signaling on prostate cancer carcinogenesis. **Translational Research**, v. 222, p. 56-66, 2020.

RAMALINGAM, S.; RAMAMURTHY, V. P.; NJAR, V. C. O. Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 166, p. 16-27, 2017.

RAWLA, P. Epidemiology of prostate cancer. **World journal of oncology**, v. 10, n. 2, p. 63, 2019.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, D. L. et al. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p.577–588, 2012.

RIBEIRO, D. L. et al. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 854–865, 2012.

RINELLA, L. et al. Modulating tumor reactive stroma by extracorporeal shock waves to control prostate cancer progression. **The Prostate**, v. 80, n. 13, p. 1087-1096, 2020.

ROBERTS, D. L.; DIVE, C.; RENEHAN, A. G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. **Annual review of medicine**, v. 61, p. 301-316, 2010.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1–7, 2005.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review. **Life sciences**, v. 203, p. 255-267, 2018.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 317-340, 2005.

SANCHES, B. D. A. et al. Telocytes contribute to aging-related modifications in the prostate. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.

SATO, H. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 enhances saturated fatty acid-induced prostate cancer progression. **Cancer Res**, 2021.

SAW, C. L. et al. Farmacodinâmica do óleo de peixe: efeitos protetores contra o câncer de próstata em camundongos TRAMP alimentados com uma dieta ocidental rica em gordura. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v. 12, n. 12, p. 3331-3334, 2011.

SCHIEFFER, D. et al. Lipid raft-based membrane order is important for antigen-specific clonal expansion of CD4+ T lymphocytes. **BMC immunology**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2014.

- SCHLEY, P. D. et al. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 92, n. 2, p. 187-195, 2005.
- SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 2, p. 147–155, 2008.
- SCHUCHARDT, J. P.; HAHN, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 1, p. 1–8, 2013.
- SCHUMACHER, M. C. et al. A comparative study of tissue ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in benign and malignant pathologic stage pT2a radical prostatectomy specimens. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, p. 318-324, 2013.
- SELMAN, S. H. The McNeal prostate: a review. **Urology**, v. 78, n. 6, p. 1224-1228, 2011.
- SFANOS, K. S. et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 1, p. 11-24, 2018.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. **Annual review of food science and technology**, v. 9, p. 345-381, 2018.
- SHAIKH, I. A. A. et al. Docosahexaenoic acid enhances the efficacy of docetaxel in prostate cancer cells by modulation of apoptosis: The role of genes associated with the NF- κ B pathway. **The Prostate**, v. 68, n. 15, p. 1635-1646, 2008.
- SHANG, T. et al. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.
- SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & development**, v. 24, n. 18, p. 1967-2000, 2010.
- SHIN, S. et al. The omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.
- SILVA, R. S. et al. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamine treatments in TRAMP mice. **Cell biology international**, v. 42, n. 8, p. 1006-1020, 2018.
- SILVA, S. A. et al. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. **International journal of experimental pathology**, v. 96, n. 1, p. 21-30, 2015.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 502-507, 2006.

SKVORTSOV, S. et al. Concise review: prostate cancer stem cells: current understanding. **Stem Cells**, v. 36, n. 10, p. 1457-1474, 2018.

ŚLUSARZ, A. et al. Aggressive prostate cancer is prevented in ER α KO mice and stimulated in ER β KO TRAMP mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4160-4170, 2012.

SONG, E.; KIM, H. Docosahexaenoic acid induces oxidative DNA damage and apoptosis, and enhances the chemosensitivity of cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1257, 2016.

SONG, H. J. et al. Induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation in human prostate cancer cells by the cis-9, trans-11 but not the trans- 10, cis12 isomer of conjugated linoleic acid. **Prostate**, v. 66, p. 839–846, 2006.

SONN, G. A.; ARONSON, W.; LITWIN, M. S. Impact of diet on prostate cancer: a review. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 304, 2005.

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

SRAMKOSKI, R. M. et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22R v1. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 35, n. 7, p. 403-409, 1999.

STANBROUGH, M. et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10823-10828, 2001.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: **IARC**, 2014.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biology of reproduction**, v. 34, n. 5, p. 961-971, 1986.

SUN, Y. et al. Involvement of apoptotic pathways in docosahexaenoic acid-induced benefit in prostate cancer: Pathway-focused gene expression analysis using RT 2 Profile PCR Array System. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2017.

SUTCLIFFE, S.; COLDITZ, G. A. Prostate cancer: is it time to expand the research focus to early-life exposures? **Nature Reviews. Cancer, London**, v. 13, n. 3, p. 208-518, 2013.

TAKIZAWA, I. et al. Estrogen receptor alpha drives proliferation in PTEN-deficient prostate carcinoma by stimulating survival signaling, MYC expression and altering glucose sensitivity. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 604, 2015.

TAMARINDO, G. H. et al. Melatonin and docosahexaenoic acid decrease proliferation of PNT1A prostate benign cells via modulation of mitochondrial bioenergetics and ROS production. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

TAMARINDO, G. H.; GÓES, R. M. Docosahexaenoic acid differentially modulates the cell cycle and metabolism-related genes in tumor and pre-malignant prostate cells. **Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 10, p. 158766, 2020.

TAN, X. et al. SQSTM1/p62 is involved in docosahexaenoic acid-induced cellular autophagy in glioblastoma cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 55, n. 9, p. 703-712, 2019.

THAPA, D.; GHOSH, R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. **Biochemical pharmacology**, v. 94, n. 2, p. 53-62, 2015.

TIMMS, B. G. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 565-577, 2008.

TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**, v. 144, n. 8, p. 1382-1398, 2017.

TORREJON, C.; JUNG, U. J.; DECKELBAUM, R. J. n-3 Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: ações e mecanismos moleculares. **Prostaglandinas, leucotrienos e ácidos graxos essenciais**, v. 77, n. 5-6, p. 319-326, 2007.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **The Journal of urology**, v. 166, n. 6, p. 2472-2483, 2001.

TUXHORN, J. A. et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2912-2923, 2002.

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 3, p. 121-128, 2005.

VALKENBURG, K. C.; WILLIAMS, B. O. Mouse models of prostate cancer. **Prostate cancer**, v. 2011, 2011.

VENDRAMINI-COSTA, B. D.; CARVALHO, E. J. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.

VENDRAMINI-COSTA, B. et al. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamine treatments in TRAMP mice. **Cell Biol Int**, v. 42, p. 1006–1020, 2018.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 7, p. 379-386, 2016.

VERZELLA, D. et al. Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. **Cell death & disease**, v. 11, n. 3, p. 1-14, 2020.

WALLSTRÖM, P. et al. A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmö, Sweden). **Cancer Causes and Control**, v. 18, n. 10, p. 1107–1121, 2007.

WANG, C. et al. The therapeutic effects of docosahexaenoic acid on oestrogen/androgen-induced benign prostatic hyperplasia in rats. **Experimental Cell Research**, v. 345, n. 2, p. 125–133, 2016.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 181–193, 2010.

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 2018.

WANG, J. et al. FFAR1-and FFAR4-dependent activation of Hippo pathway mediates DHA-induced apoptosis of androgen-independent prostate cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 506, n. 3, p. 590-596, 2018.

WANG, L. et al. Induction of Pyroptosis: A Promising Strategy for Cancer Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

WANG, S. et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on castration-resistant Pten-null prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 404-412, 2012.

WANG, Q. et al. Treatment of colon cancer with liver X receptor agonists induces immunogenic cell death. **Molecular carcinogenesis**, v. 57, n. 7, p. 903-910, 2018.

WATT, M. J. et al. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. **Science translational medicine**, v. 11, n. 478, 2019.

WEI, M. Y.; JACOBSON, T. A. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Current atherosclerosis reports**, v. 13, n. 6, p. 474-483, 2011.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v 12, p 131-155, 1963.

WUERMLI, L. et al. Hypertriglyceridemia as a possible risk factor for prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 8, p. 316–320, 2005.

XIA, X. et al. The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? **Cell death & disease**, v. 10, n. 9, p. 1-13, 2019.

XUE, M. et al. Apoptosis is induced by docosahexaenoic acid in breast cancer cells via death receptor and mitochondria-mediated pathways. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 1, p. 978-982, 2017.

YIN, Y. et al. The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K/Akt pathway. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2017.

YU, P. et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-21, 2021.

YU, S. et al. Altered prostate epithelial development and IGF-1 signal in mice lacking the androgen receptor in stromal smooth muscle cells. **Prostate**, v. 71, n. 5, p. 517–524, 2011.

YUAN, S. et al. DHA attenuates A β -induced necroptosis through the RIPK1/RIPK3 signaling pathway in THP-1 monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 126, p. 110102, 2020.

ZÁRATE, R. et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 25, 2017.

ZELDIN, D. C. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36059–36062, 2001.

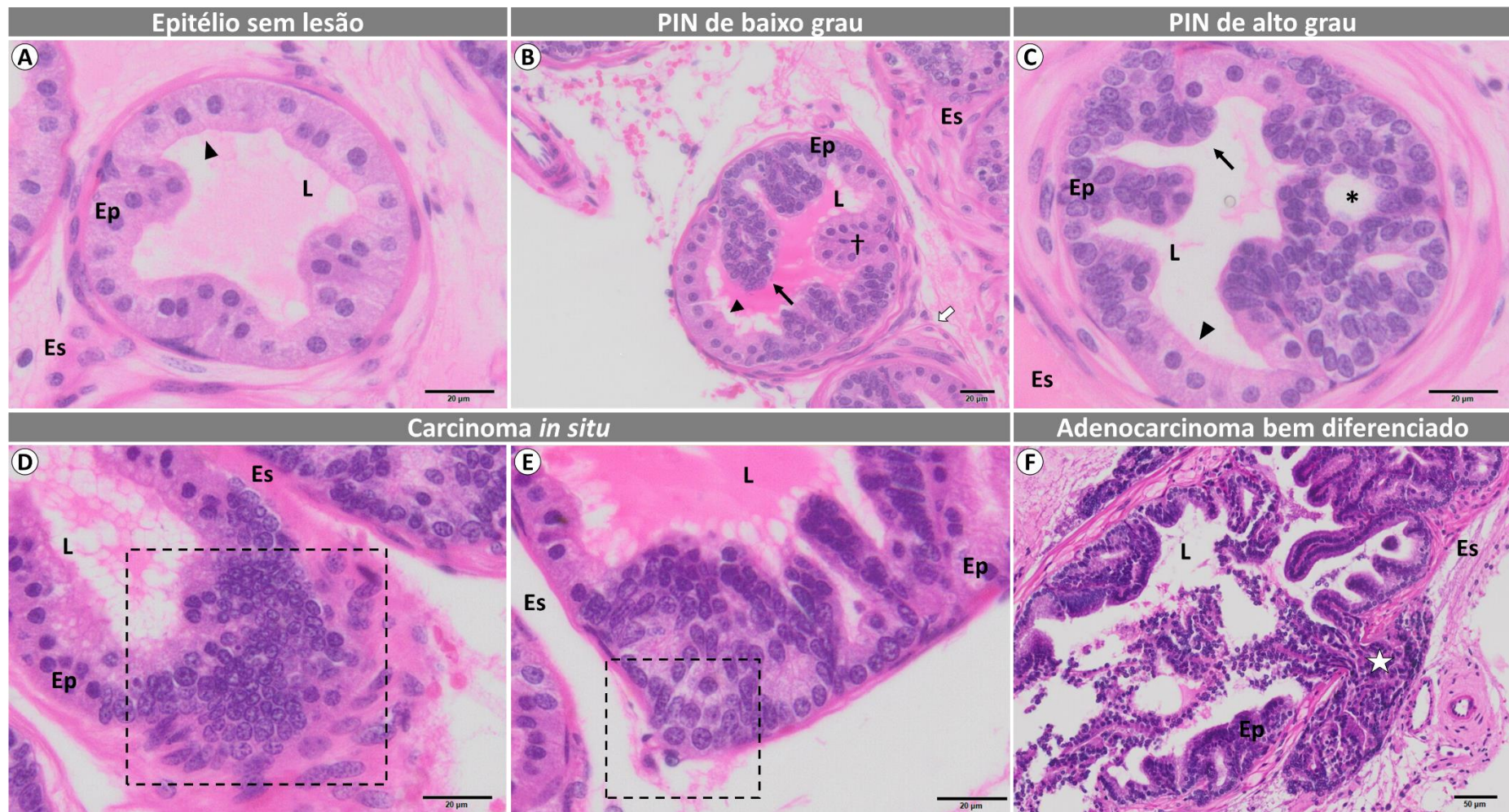
ZHANG, T. T. et al. Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids. **Progress in lipid research**, v. 75, p. 100997, 2019.

ZHOU, Y.; BOLTON, E. C.; JONES, J. O. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.54, n. 1, p. R15–R29, 2015.

ZHU, F. et al. Complex roles of necroptosis in cancer. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 20, n. 5, p. 399-413, 2019.

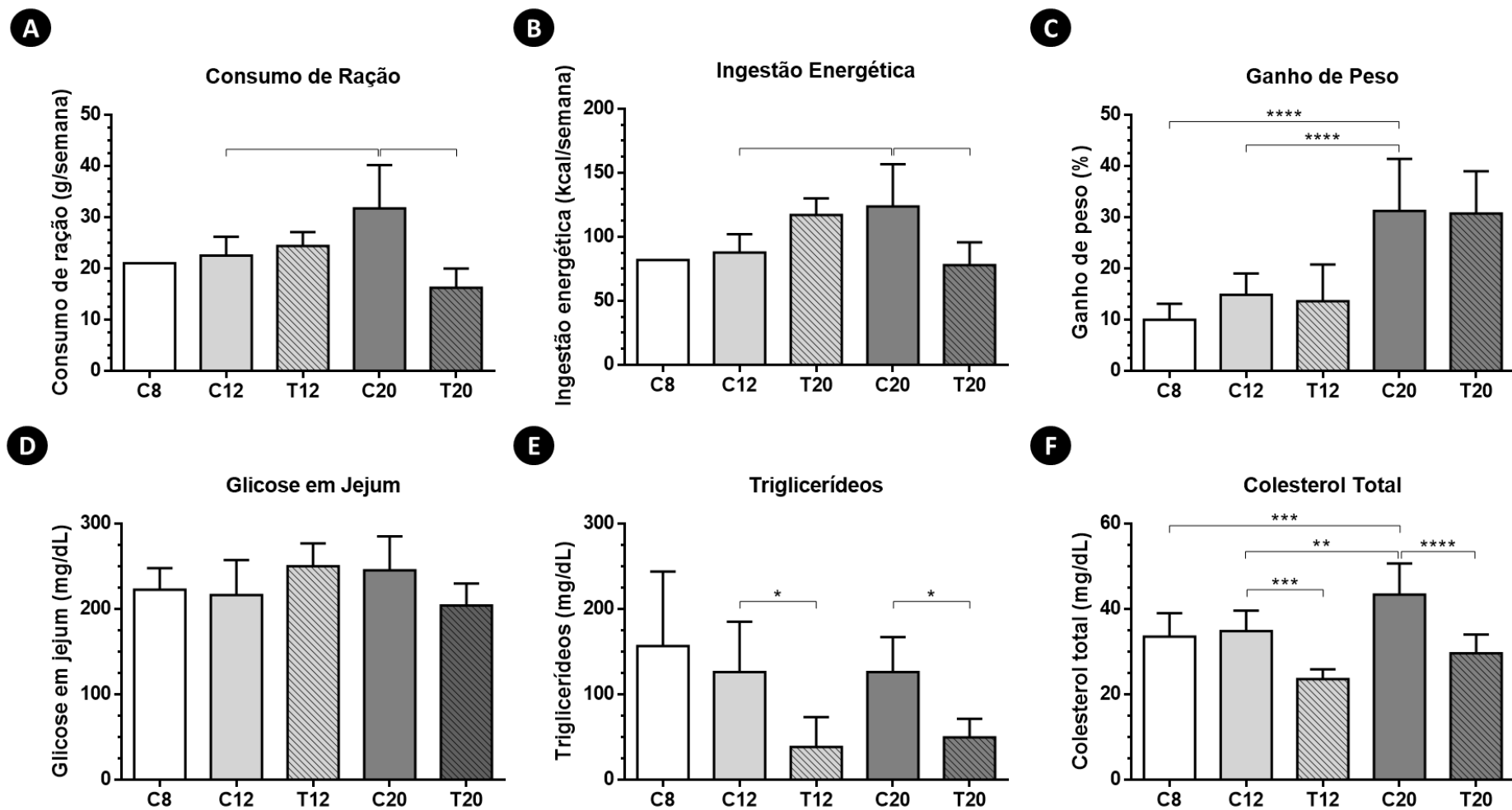
APÊNDICE A - FIGURAS

Figura 14 - Fotomicrografias representando os diferentes tipos de lesões encontradas no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A) Região de tecido normal (sem lesão), caracterizada por epitélio simples (cabeça de seta) com células cúbicas a colunares e núcleos centrais. (B) Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) (seta), caracterizada por uma estratificação epitelial. Estroma hipertrofiado e hiperplásico (seta branca). Dobra epitelial (cruz). (C) Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN) (asterisco), caracterizada por estratificação epitelial e padrão arquitetônico cribriforme obstruindo o lúmen glandular. (D-E) Carcinoma *in situ* (quadrado descontinuado), caracterizado por descontinuidade da membrana basal e invasão estromal de células epiteliais. (F) Adenocarcinoma bem diferenciado (estrela branca). Ep: Epitélio; Es: estroma; L: Lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: A-E: 20µm; F: 50µm.



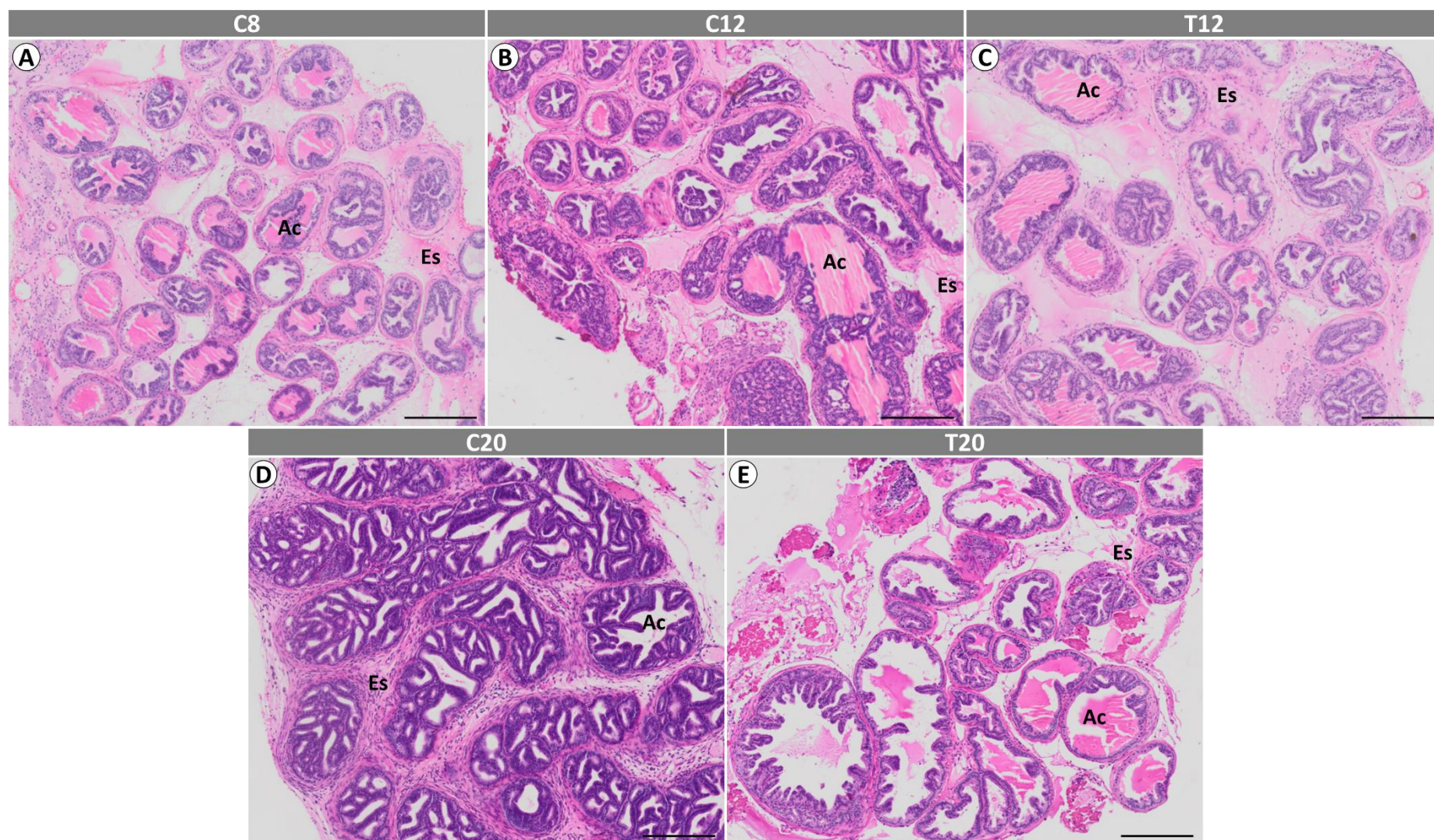
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15 - Parâmetros biométricos e fisiológicos dos camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A) Consumo semanal de ração. (B) Ingestão calórica semanal. (C) Ganho de peso. (D) Glicemia de jejum. (E) Triglicerídeos sérico. (F) Colesterol sérico. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 7. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).



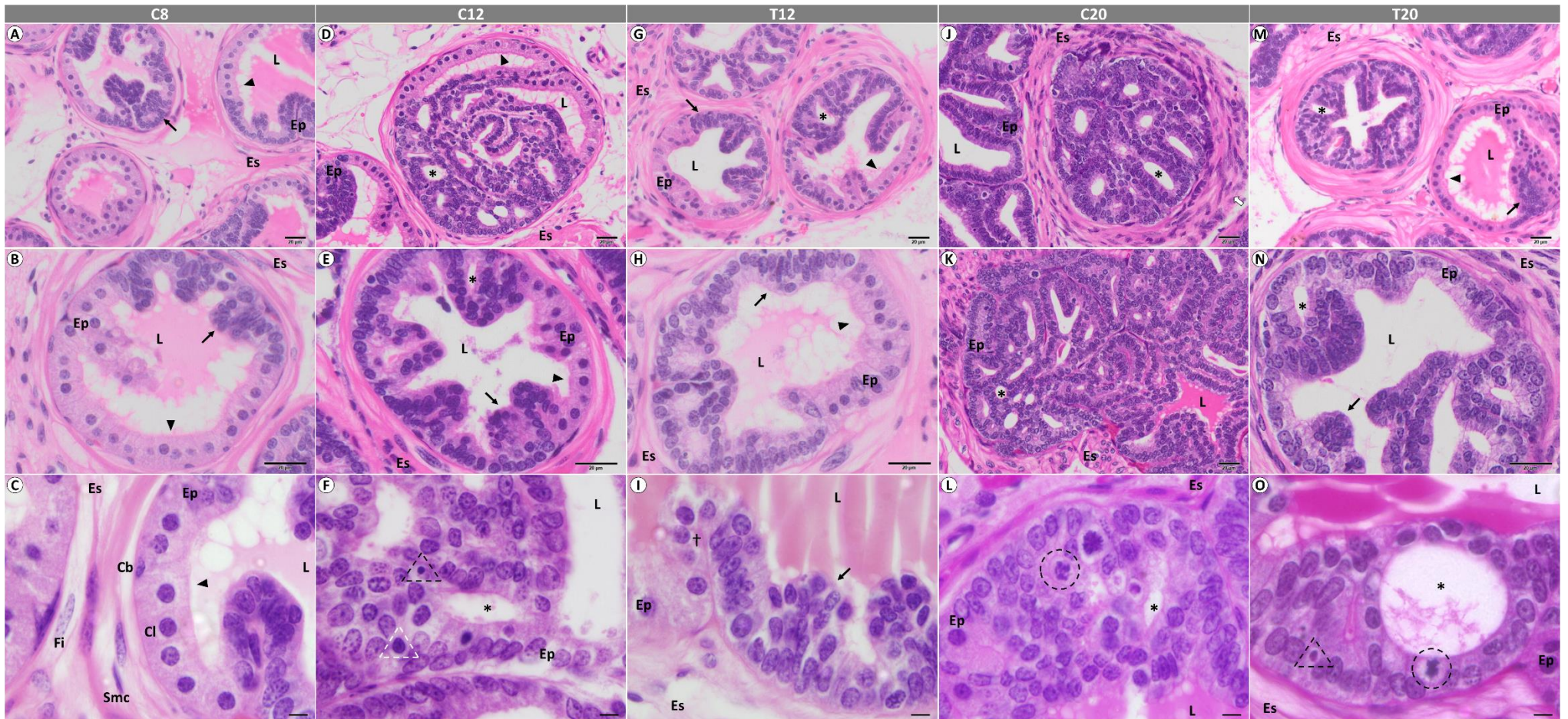
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Fotomicrografias representando o fenótipo geral da próstata dorsolateral de camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A) Grupo C8. (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20. Ac: Ácinos; Es: Estroma. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: 200µm.



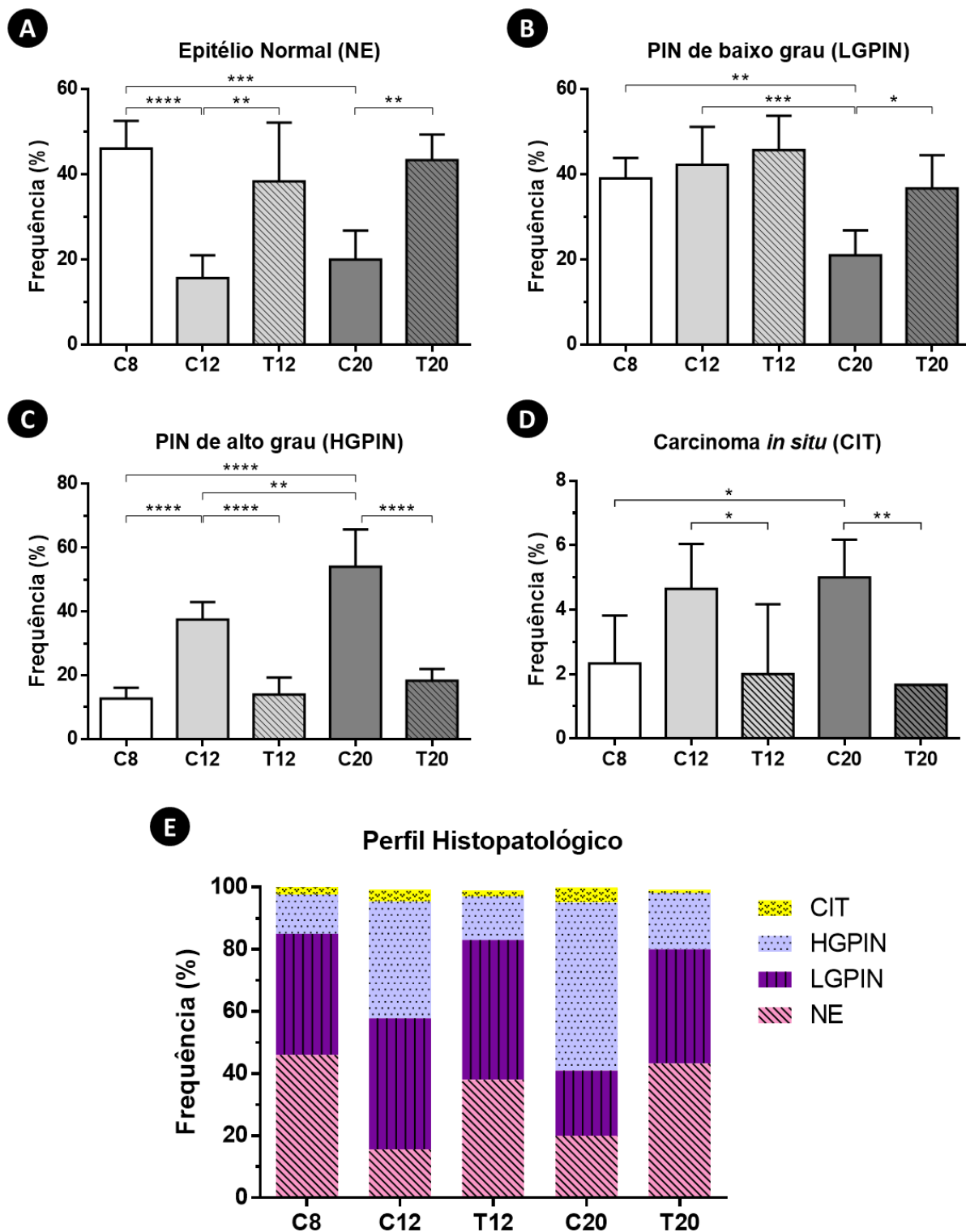
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 - Fotomicrografias do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP nos diferentes grupos experimentais. (A-C) Grupo C8: epitélio e estroma mostrando tecido glandular predominantemente saudável. Epitélio secretor simples com células colunares ou cúbicas (ponta de seta). Algumas LGPINs (seta). Em (C), estroma com células musculares lisas (Smc) e fibroblastos (Fi), estruturas glandulares com células luminais secretoras (Cl) e células basais (Cb) identificadas. (D-F) Grupo C12: Áreas menos frequentes de epitélio secretor simples e presença de LGPIN (seta) e de HGPIN (asterisco). Em (F), HGPIN com destaque (triângulo descontinuado) para células em processo de morte celular em diferentes estágios – estágio mais inicial (triângulo descontinuado branco) e estágio mais tardio (triângulo descontinuado preto). (G-I) Grupo T12: maior frequência de epitélio saudável em relação ao controle e ocorrência de LGPIN e HGPIN. Características estromais semelhantes ao grupo C8, com distribuição regular dos elementos ao redor dos ácinos. Em (I), destaque para uma LGPIN com estratificação do epitélio diferenciada de uma dobra (cruz). (J-L) Grupo C20: ácinos apresentando HGPIN (asterisco) com características cribriformes e obstrução do lúmen. Estroma hipertrofiado e hiperplásico (seta branca), particularmente próximo a regiões de HGPIN (J). Em (L), destaque (círculo descontinuado) para células em processo de proliferação (figuras mitóticas) em uma HGPIN. (M-O) Grupo T20: áreas de epitélio saudável mais frequentes que no grupo controle e regiões apresentando LGPIN e menor frequência de HGPIN. Em (O), HGPIN com células em proliferação e células em processo de morte. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras de escala: 1ª e 2ª linha - 20µm; 3ª linha - 10µm.



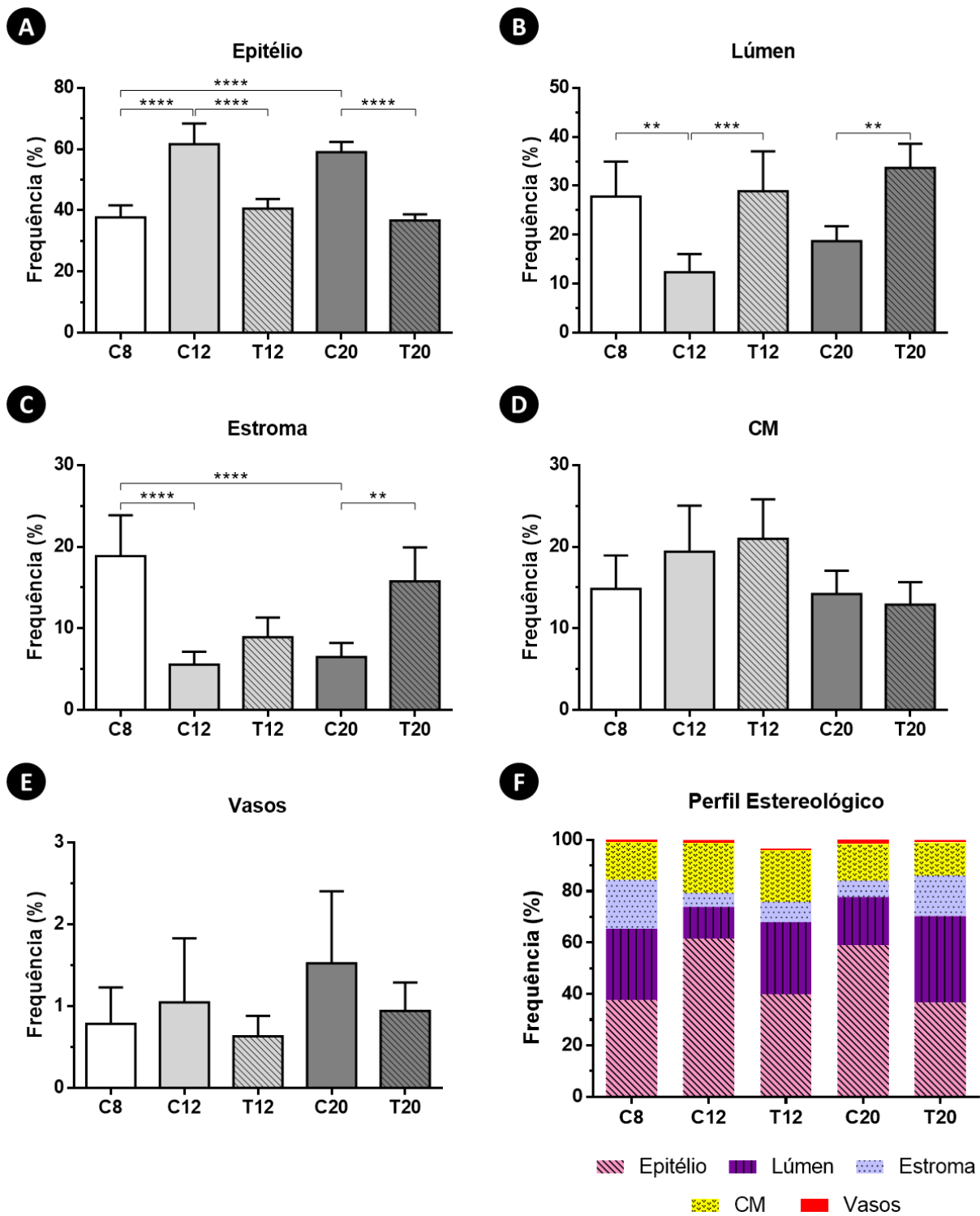
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Análise histopatológica do lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A) Epitélio normal/saudável. (B) Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) e (C) de alto grau (HGPIN). (D) Carcinoma *in situ* (CIT). (E) Perfil histopatológico dos grupos experimentais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).



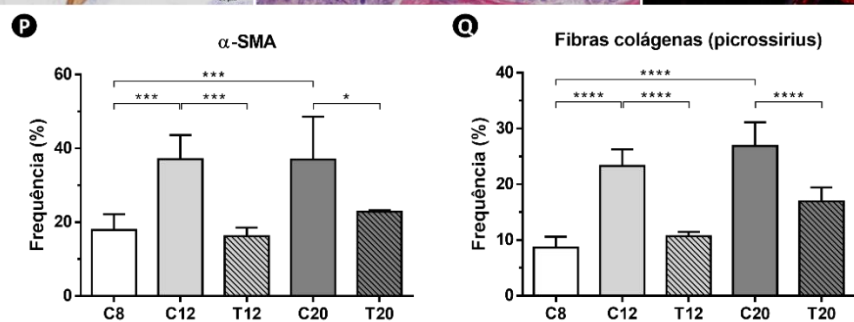
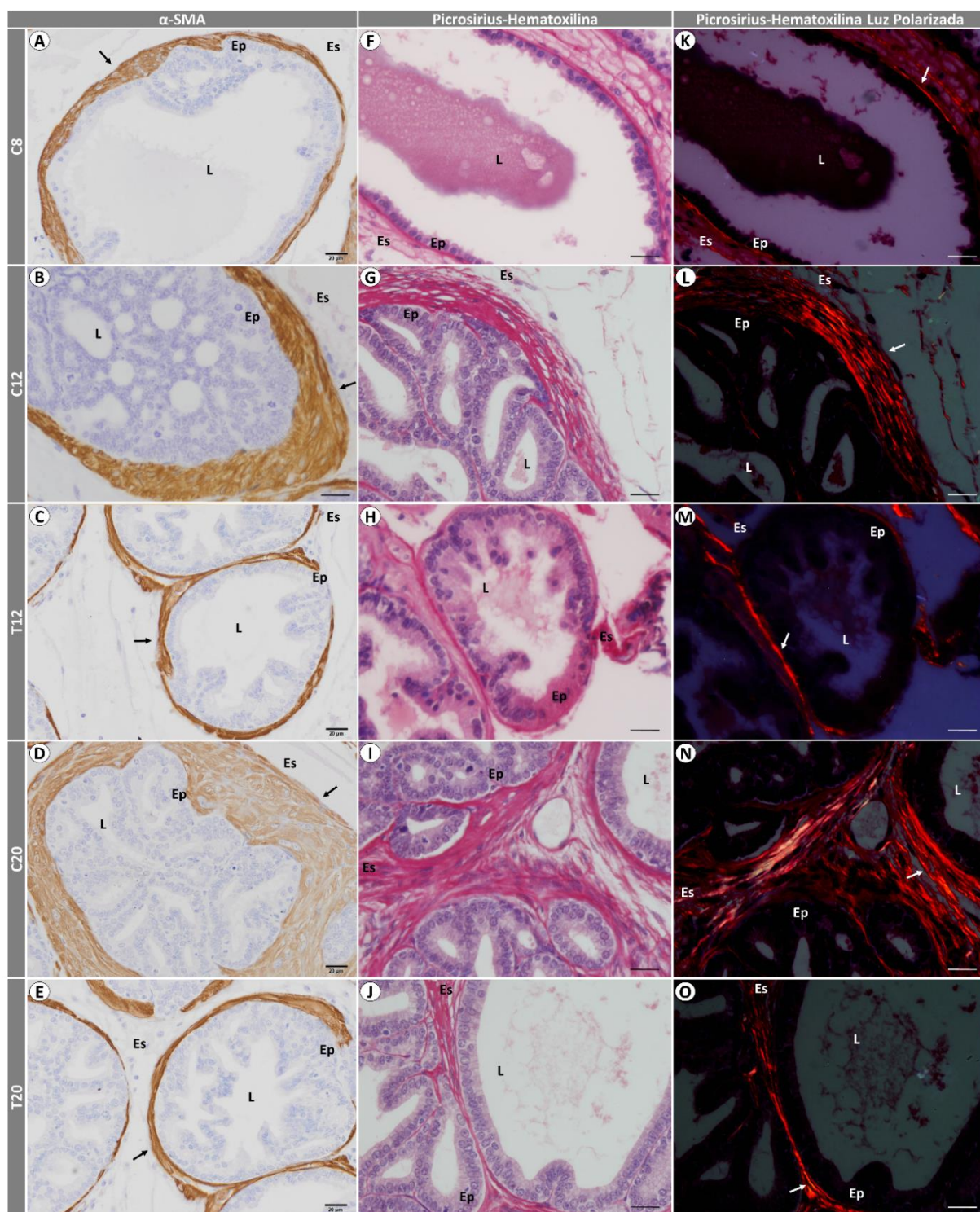
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Comparação da média e desvio padrão dos compartimentos teciduais prostáticos dos camundongos TRAMP entre os diferentes grupos experimentais. (A) Epitélio. (B) Lúmen. (C) Estroma. (D) CM: camada muscular. (E) Vasos. (F) Perfil estereológico. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos (** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).



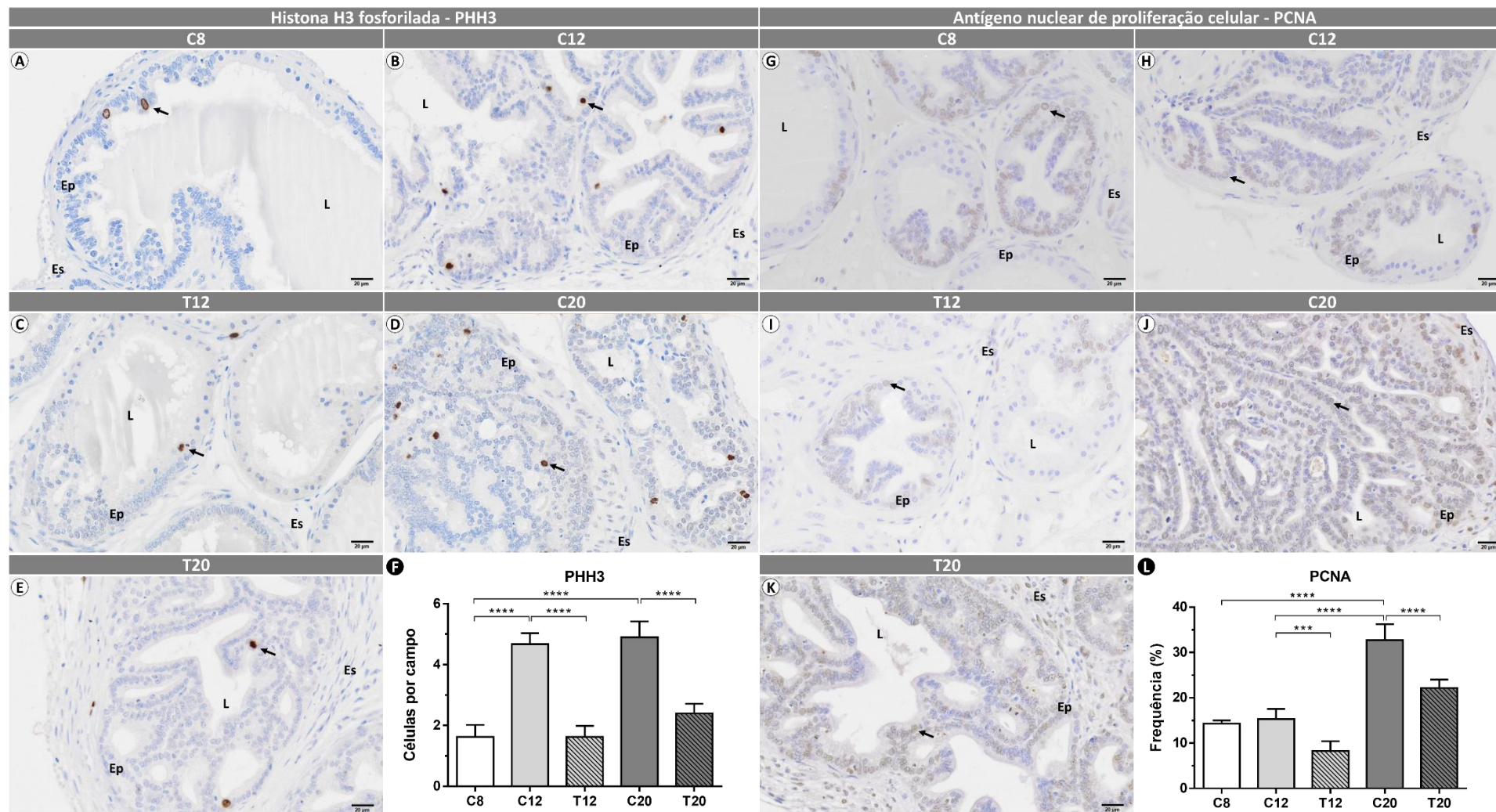
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Análise do ambiente estromal na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP. (A-E) Imuno-histoquímica para expressão tecidual de α -SMA. (F-J) Picrosirius-Hemataxolina. (K-O) Picrosirius-Hematoxilina sob luz polarizada. (P) Quantificação da imunomarcagem para α -SMA. (Q) Quantificação das fibras colágenas. Setas pretas indicam reatividade para α -SMA e setas brancas indicam deposição de colágeno peri-acinar. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: A-E: 20 μ m; F-O: 50 μ m.



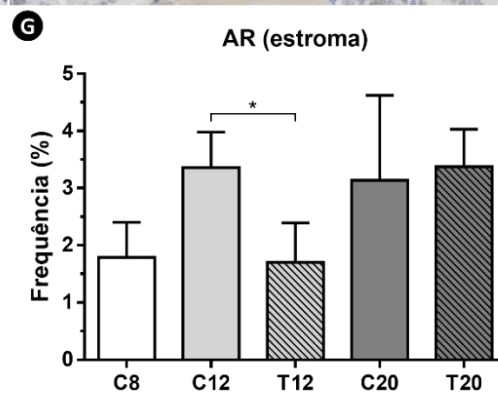
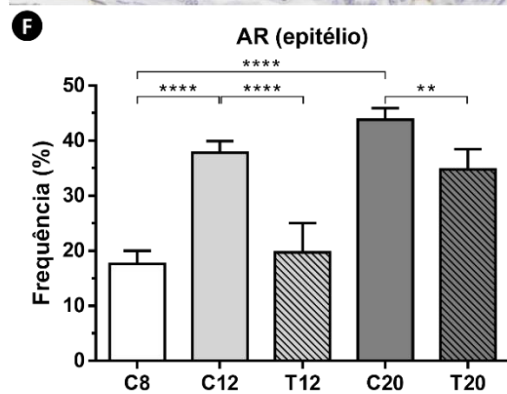
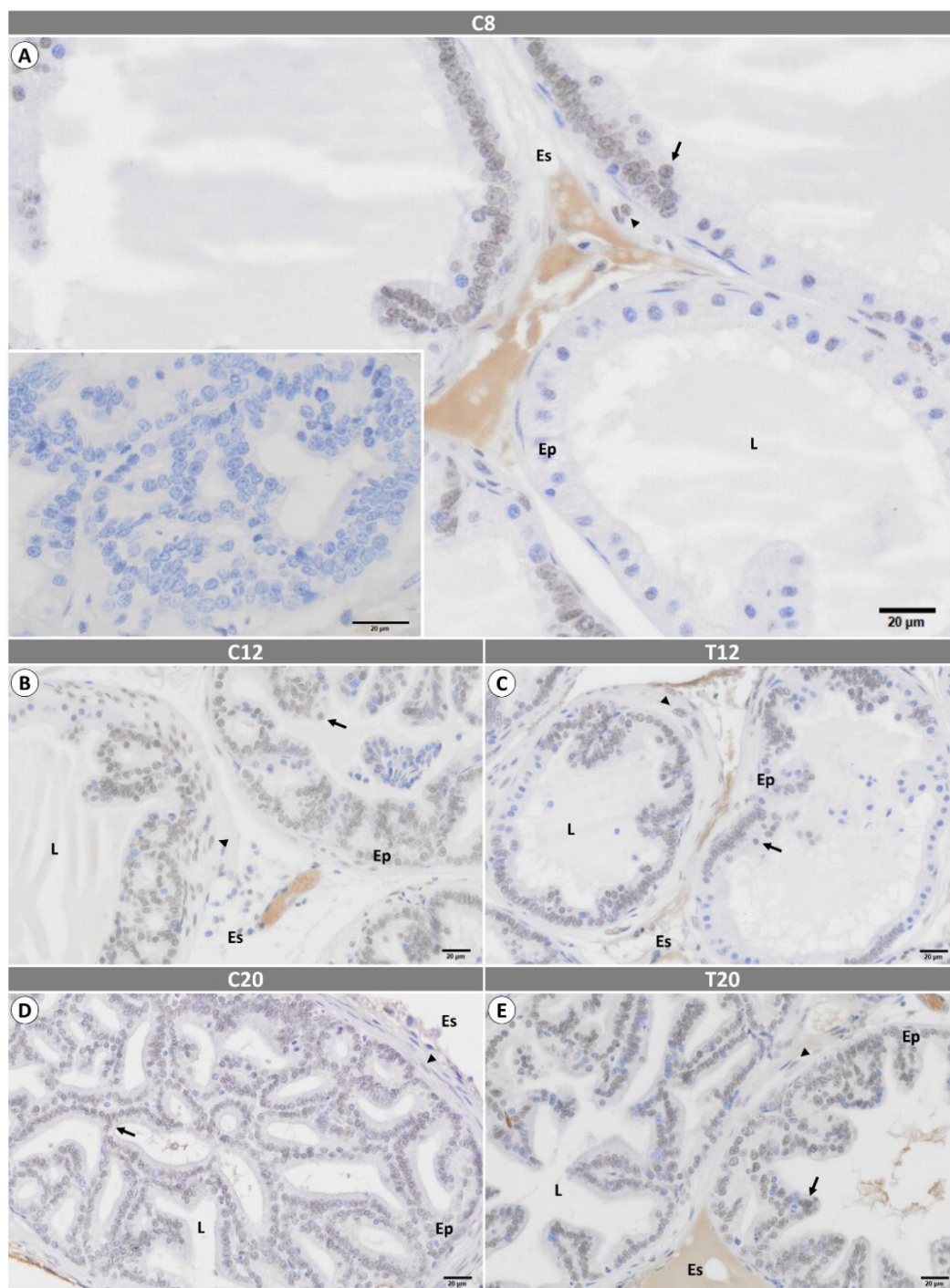
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 – Análise da proliferação celular no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. Imuno-histoquímica para a expressão tecidual de PHH3 (A-E) e de PCNA (G-K), nos diferentes grupos experimentais. Quantificação do número de células de PHH3-positivas (F) e da expressão tecidual de PCNA (L). Setas pretas indicam células positivas para a reação. Regiões de PIN apresentam mais células positivas. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (*** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m.



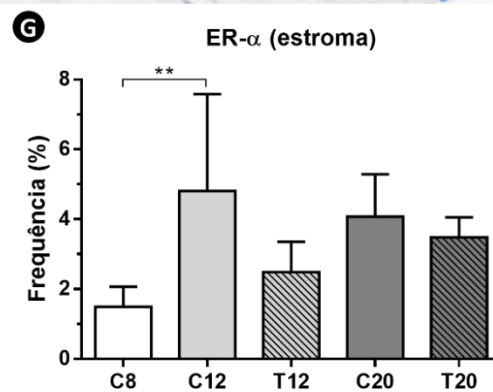
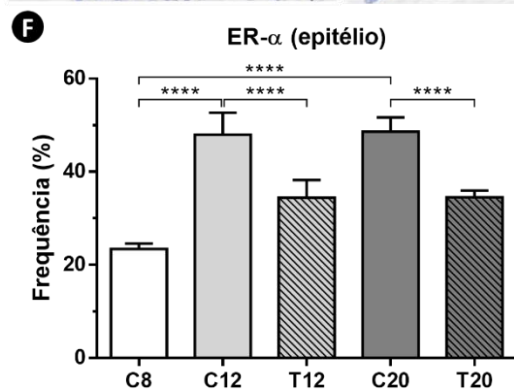
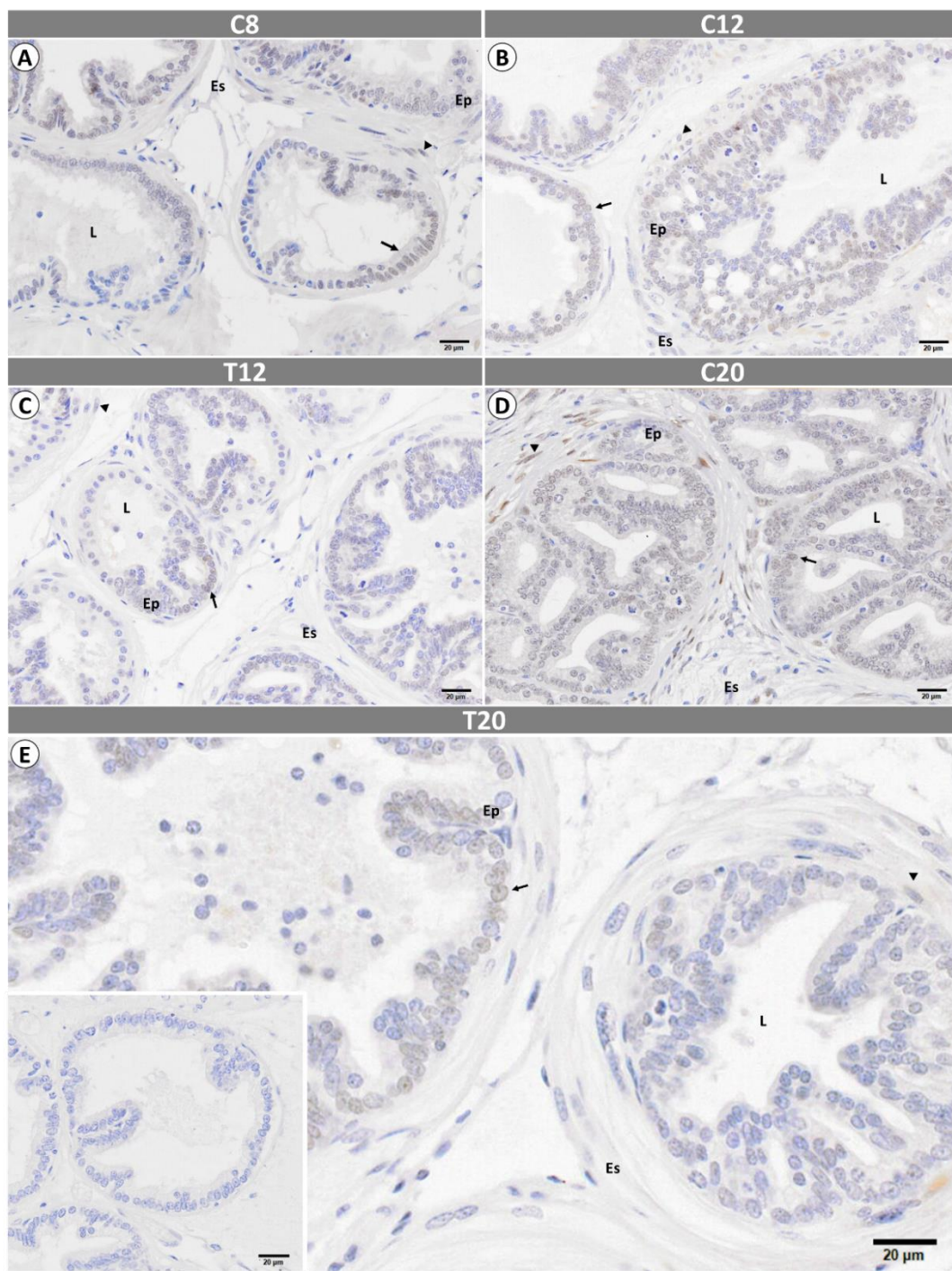
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Análise da expressão tecidual de AR no lobo prostático dorsolateral. (A-E) Fotomicrografias da imuno-histoquímica para AR. (A) Grupo C8 e controle negativo (*inset*). (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20. Setas e cabeças de setas pretas indicam as células positivas (núcleo marrom) no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação (frequência) da expressão epitelial (F) e estromal (G) do AR. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m.



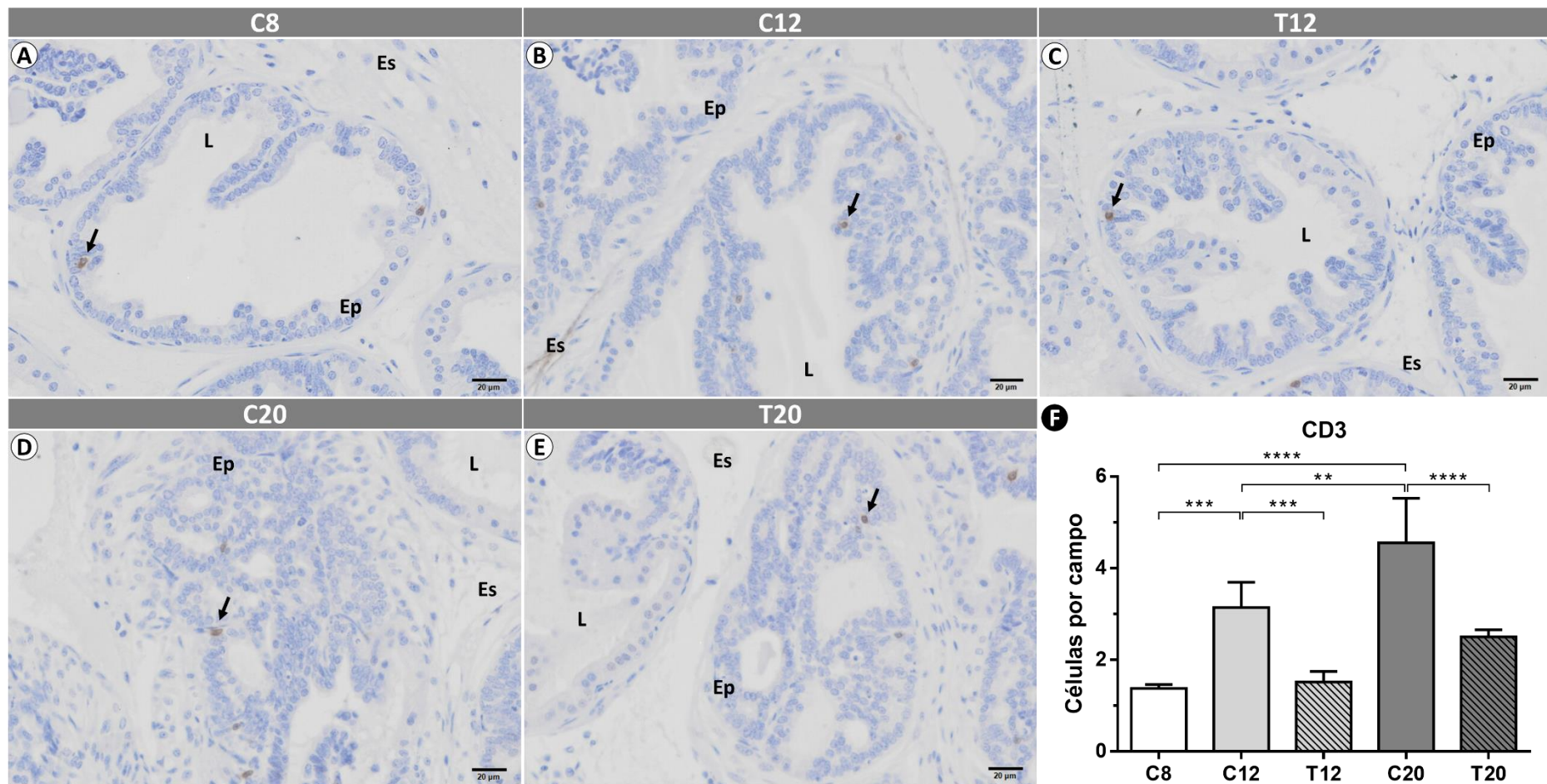
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 – Análise da expressão tecidual de ER- α . (A-E) Fotomicrografias da imunohistoquímica para ER- α no lobo prostático dorsolateral. (A) Grupo C8. (B) Grupo C12. (C) Grupo T12. (D) Grupo C20. (E) Grupo T20 e controle negativo (*inset*). Setas e cabeças de setas pretas indicam as células positivas (núcleo marrom) no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação (frequência) da expressão epitelial (F) e estromal (G) do ER- α . Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (** p < 0,01; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m.



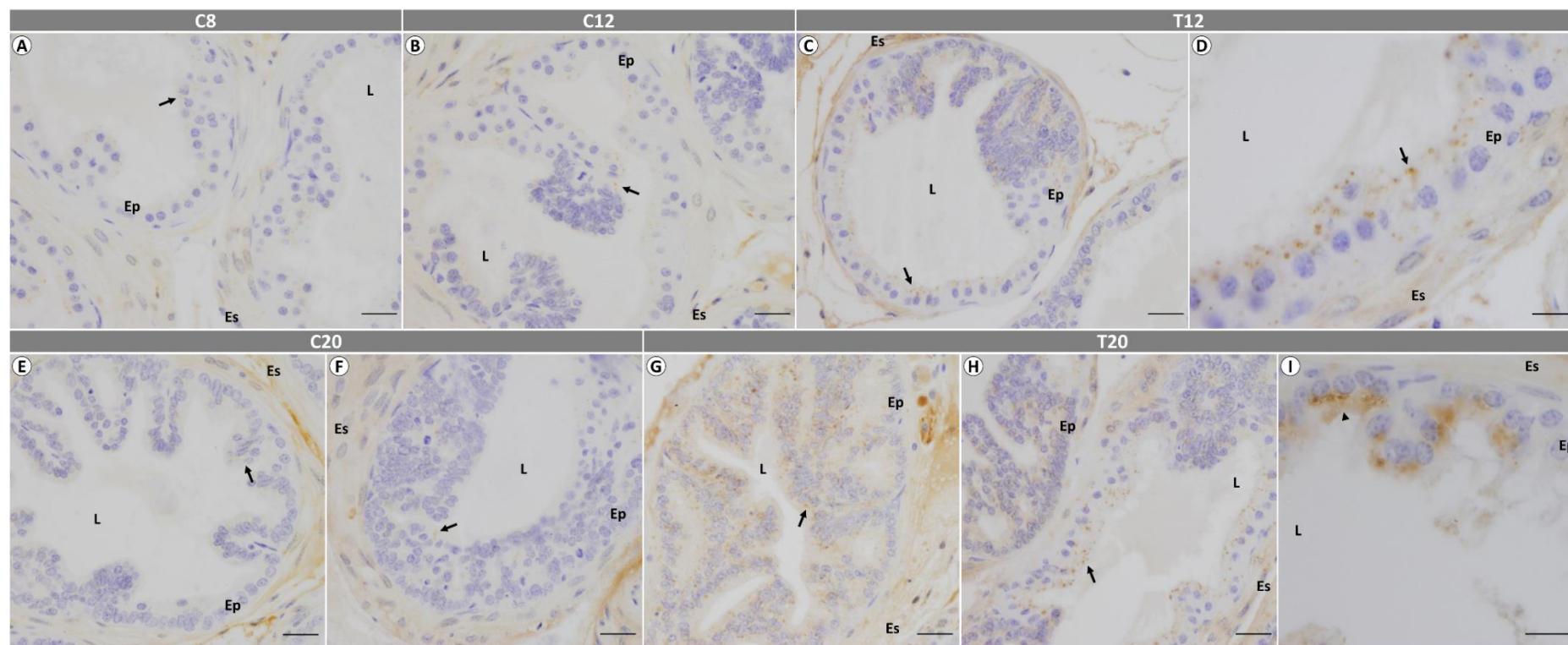
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 – Análise da infiltração de linfócitos T no lobo dorsolateral da próstata de camundongos TRAMP. (A-E) Fotomicrografias da reação de imuno-histoquímica para CD3. (F) Quantificação das células CD3-positivas (setas pretas). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: 20 μ m.



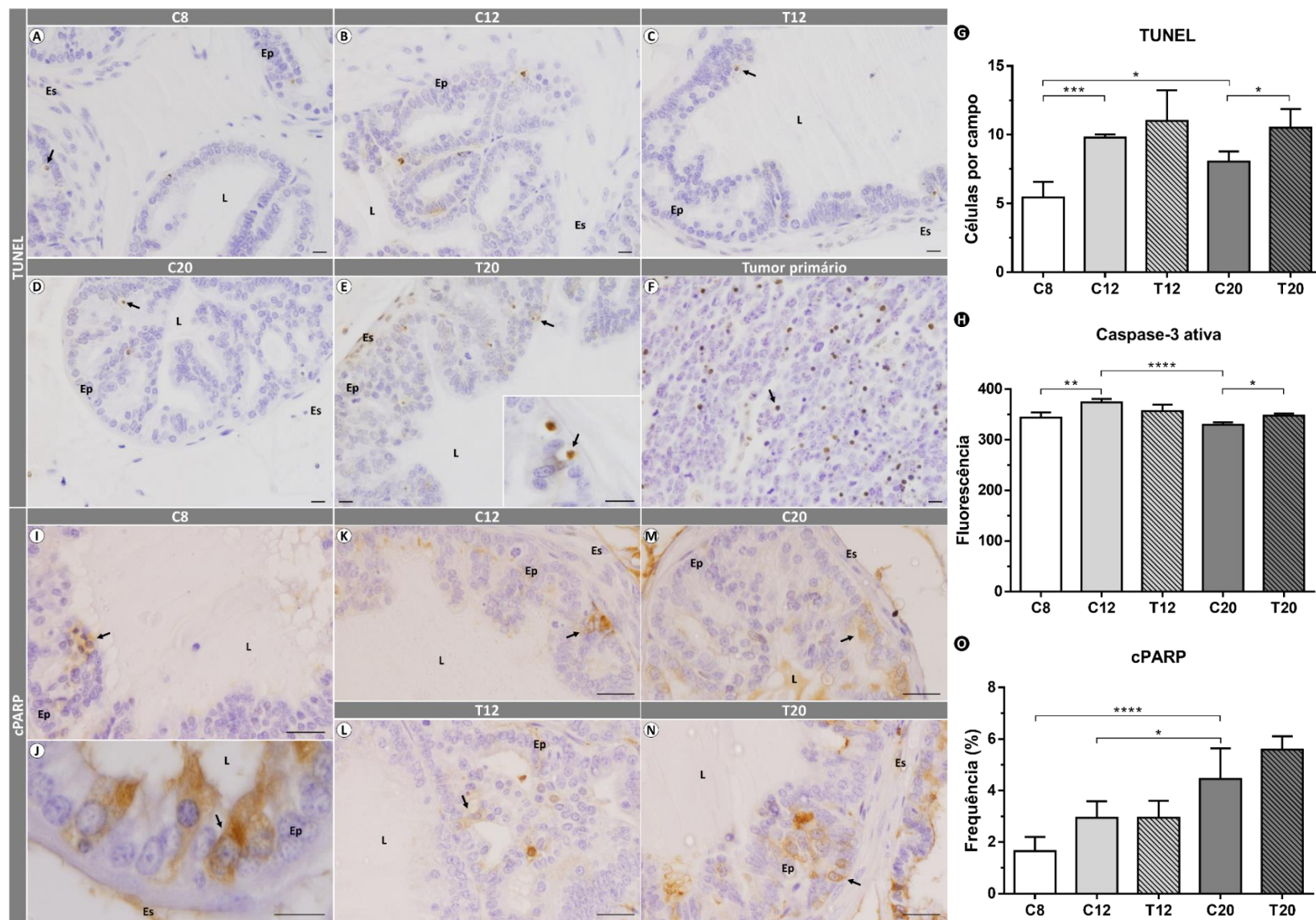
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 – Identificação de autofagia na próstata dorsolateral de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão (grupos C8, C12, C20) e com D ω 3 (grupos T12 e T20), por meio de reação imuno-histoquímica para LC3B. Os autofagossomos aparecem como pontos com coloração acastanhada (setas pretas), localizados na região supra-nuclear do citoplasma apical das células acinares. Nota-se o aumento evidente da frequência de autofagossomos nos grupos alimentados com D ω 3 (D), os quais são mais volumosos no grupo T20 (H, I). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Barras de escala: A-C, E-H: 20 μ m; D, I: 10 μ m;



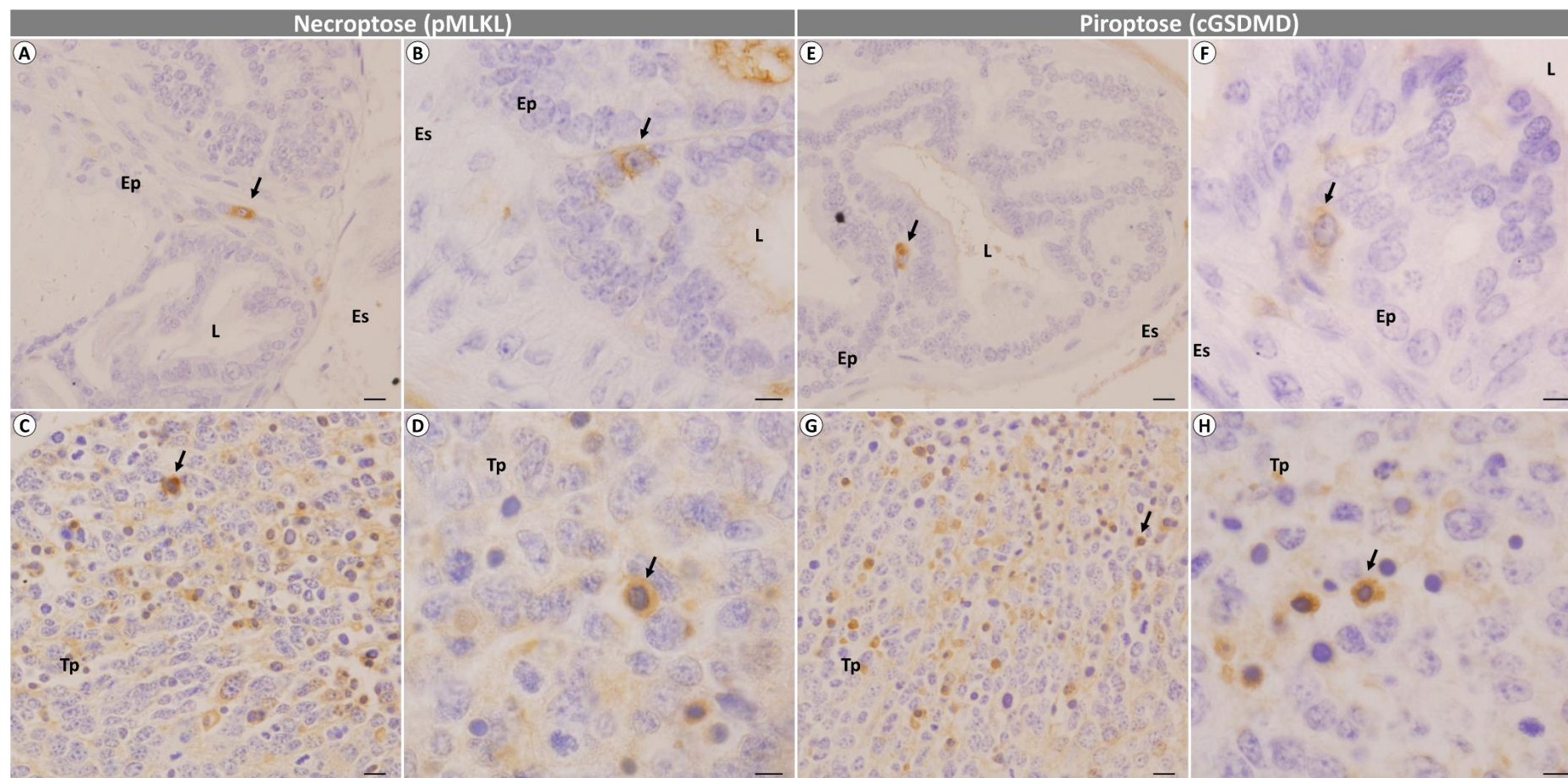
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 – Análise da atividade apoptótica no lobo dorsolateral de camundongos TRAMP alimentados com ração padrão (grupos C8, C12, C20) e com D ω 3 (grupos T12 e T20). (A-F) Reação TUNEL (marcação nuclear). (G) Quantificação do TUNEL. (H) Quantificação da caspase-3 em extratos totais do lobo dorsolateral por ensaio fluorimétrico. (I-N) Imuno-histoquímica para PARP clivada (fragmento de 89 kDa, produzido por clivagem de caspase – marcação citoplasmática). As setas pretas indicam células em apoptose (coloração marrom). Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 5 (ensaio de caspase-3 ativa, n=4). Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001). Barras de escala: A-F, I, K-N: 20 μ m; *inset* e J: 10 μ m.



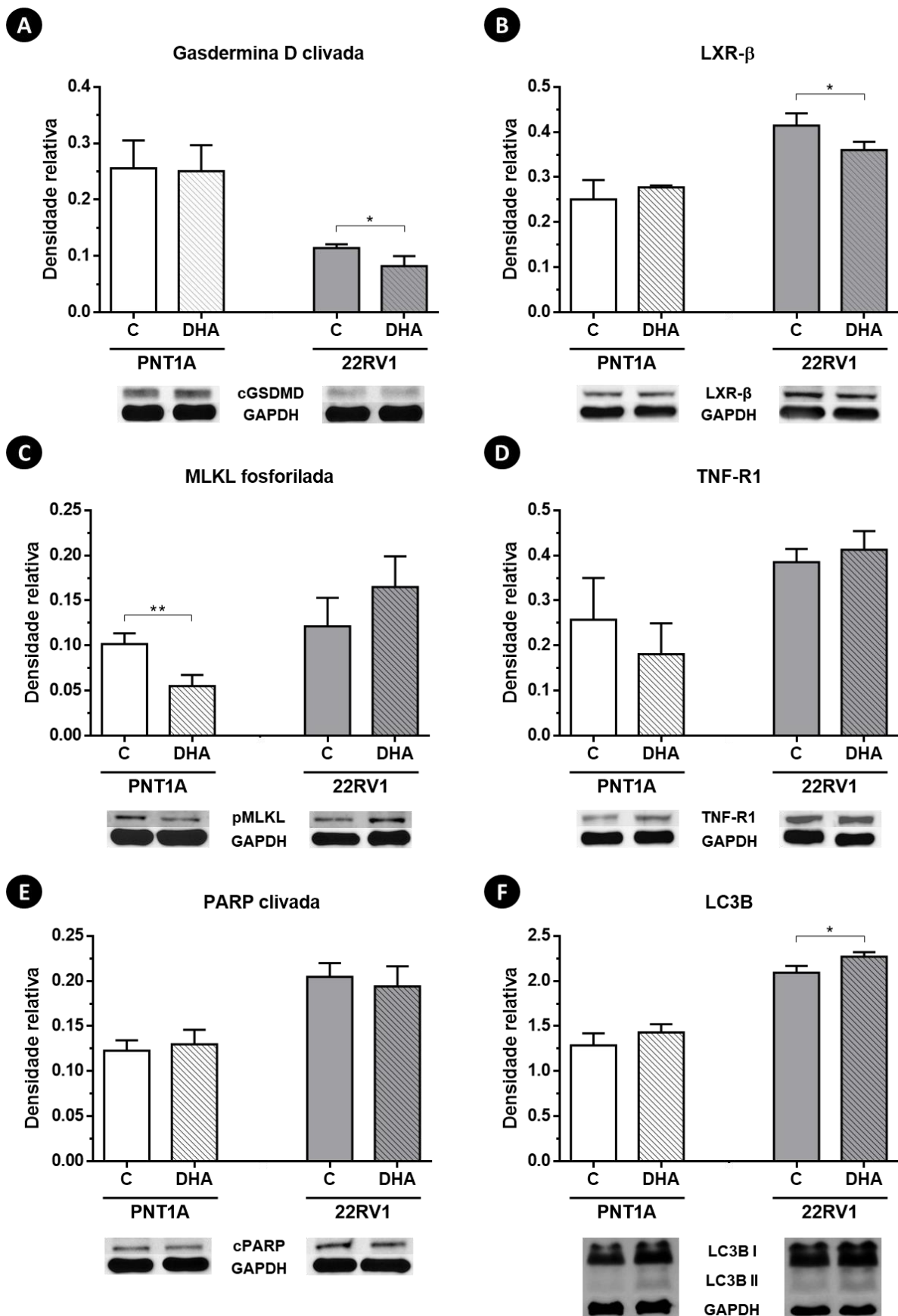
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Imuno-histoquímica para detecção de diferentes padrões de morte celular regulada. (A-D) Necroptose (células pMLKL+), em lobo prostático dorsolateral com estrutura íntegra (A-B) e em tumor primário (C-D). (E-H) Piroptose (células cGSDMD+), em lobo prostático dorsolateral com estrutura íntegra (E-F) e em tumor primário (G-H). Células em necroptose e piroptose foram pouco frequentes nos diferentes grupos experimentais, mas abundantes no tumor primário. Setas pretas indicam células positivas para a reação. Ep: Epitélio; Es: Estroma; L: Lúmen; Tp: Tumor primário. Barras de escala: A, C, E, G: 20µm; B, D, F, H: 10µm.



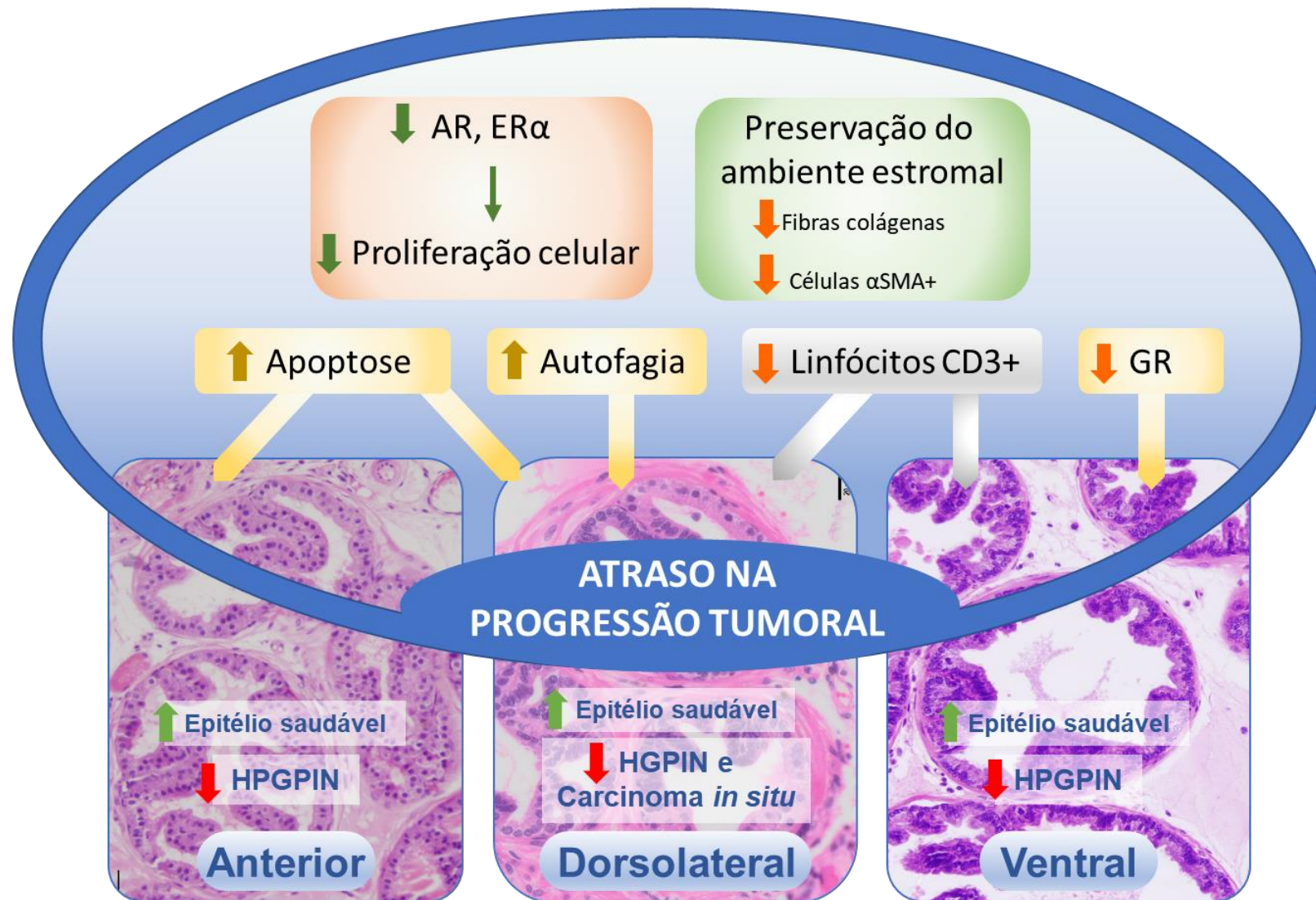
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 – Western Blotting para marcadores de piroptose, necroptose e apoptose, receptores relacionados (TNF-R1 e LXR- β) e autofagia, em linhagens de células epiteliais prostáticas benignas (PNT1A) e tumorais responsivas a andrógenos (22rv1). (A) Quantificação de Gasdermina D clivada (31 kDa, piroptose). (B) Quantificação de LXR- β (63 kDa). (C) Quantificação de MLKL fosforilada (54 kDa, necroptose). (D) Quantificação de TNF-R1 (55 kDa). (E) Quantificação de PARP clivada (89 kDa, apoptose). (F) Quantificação de LC3B (14, 16 kDa, autofagia). Valores de densidade relativa normalizados pela GAPDH (37 kDa). Amostras de passagens consecutivas foram consideradas (n = 3). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (* p < 0,05; ** p < 0,01). C - Controle; DHA - 100 μ M por 48h.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 29 – Síntese gráfica dos efeitos da D ω 3 nos diferentes lobos da próstata de camundongos TRAMP. Tanto no lobo dorsolateral e anterior, quanto no lobo ventral (analisado no mesmo laboratório por AMARO (2020)) a D ω 3 levou a um atraso na progressão tumoral, evidenciado por manutenção das frequências elevadas de áreas epiteliais saudáveis e redução de lesões pré-malignas e de carcinoma *in situ* (apenas no lobo dorsolateral). A D ω 3 reduziu a proliferação celular e a expressão tecidual epitelial de AR e ER- α em todos os lobos analisados. Também manteve as características estromais, evitando o aumento de fibras colágenas, de células α -SMA⁺ e de linfócitos T-CD3⁺ (com exceção do lobo anterior, onde a infiltração de linfócitos não foi alterada). A D ω 3 aumentou a autofagia no lobo dorsolateral e a apoptose no lobos dorsolateral e anterior (não analisadas no lobo ventral). Houve redução da expressão tecidual epitelial e estromal de GR no lobo ventral dos animais alimentados com a D ω 3 (único lobo em que GR foi analisado).



Fonte: Elaborada pela autora.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 22/09/2020

Alana Della Jorja da Silva

Assinatura do autor