



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Gustavo Matheus Amaro

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA PROGRESSÃO DO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

São José do Rio Preto
2020

Gustavo Matheus Amaro

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA PROGRESSÃO DO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (130964/2018-2)
FAPESP (2018/21891-4)

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

São José do Rio Preto
2020

A485e Amaro, Gustavo Matheus
Efeitos dos ácidos graxos ômega-3 na progressão do câncer de
próstata / Gustavo Matheus Amaro. -- São José do Rio Preto, 2020
70 p. : il., tabs.

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.
Receptores nucleares. 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.

Gustavo Matheus Amaro

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3 NA PROGRESSÃO
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq (130964/2018-2)
FAPESP (2018/21891-4)

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maira Góes
Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de São José do Rio Preto, SP

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Girol
Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA) – Catanduva, SP

Dra. Larissa Akemi Kido de Barros
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Campinas, SP

São José do Rio Preto
5 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente aos meus pais, **Carmen e José Augusto**, por sempre me apoiarem em minhas decisões.*

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Rejane Maira Góes**, por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver esse projeto, e por todas as suas contribuições para o meu crescimento pessoal e profissional.*

*Aos meus colegas do **Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desregulação Endócrina**, **Alana, Guilherme, Tatiane e Vanessa** e aos colegas do **Laboratório de Microscopia e Microanálises**, **Carolina, Ellen, Fernanda, Luís Henrique, Mariele, Nayara e Simone**, por todos esses anos de convívio, apoio e por todo o aprendizado.*

*As minhas amigas, **Ana Carolina, Bruna, Jéssica, Letícia** por estarem comigo desde o início da graduação, por todos esses anos de amizade, todas as risadas e discursos de motivação nos momentos difíceis.*

*À profa. **Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** pela colaboração na realização desse projeto*

*Ao **Luiz Roberto Falleiros Jr** e **Maysa Succi** pelo apoio técnico sempre que necessário.*

*Ao **CNPq**, pela bolsa de Mestrado concedida (130964/2018-2) e à **FAPESP** pelo auxílio financeiro (2018/21891-4).*

*Ao Programa de Pós-Graduação em **Biociências** por proporcionar um curso de qualidade aos seus alunos.*

Agradeço a todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a conclusão dessa etapa.

Resumo

O câncer de próstata (CaP) é um dos tipos mais recorrentes de câncer em homens e o consumo excessivo de lipídeos saturados favorece o seu desenvolvimento. Ao contrário, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) tipo ômega-3 (n-3) tem sido associadas com menor incidência do CaP. O presente trabalho avaliou as repercussões do consumo de ácidos graxos PUFAs n-3 da série marinha, ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), sobre a progressão tumoral na próstata ventral de camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP). Camundongos TRAMP foram alimentados com dieta padrão e eutanasiados com 8 (C8), 12 (C12) e 20 (C20) semanas de vida ou então alimentados com uma dieta rica em óleo de peixe (10% óleo de peixe) a partir da oitava semana de vida e então eutanasiados com 12 (T12) ou 20 semanas (T20). Os resultados adquiridos demonstraram o aumento na proliferação celular bem como na expressão tecidual do receptor de andrógeno (AR) e glicocorticoide (GR) e no número de linfócitos T na próstata dos grupos controles conforme o aumento da idade e da agressividade das lesões. A intervenção dietética com PUFAs n-3 proporcionou a preservação do microambiente glandular levando a uma menor frequência de lesões proliferativas, indicando um atraso na progressão tumoral, onde foi observado níveis de proliferação celular, da expressão tecidual de AR e GR e de linfócitos T inferiores que seus controles de mesma idade. Ainda, o consumo de DHA/EPA promoveu uma melhora no perfil metabólico dos animais que apresentaram uma redução nos níveis de triglicérides e colesterol. Assim, concluímos que a incorporação de DHA/EPA na dieta é capaz de reduzir a severidade da doença, levando ao atraso da progressão tumoral, destacando que a intervenção dietética é um mecanismo eficaz de modular a progressão tumoral, podendo ser utilizada em novas abordagens terapêuticas para o CaP.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Dieta. Ácidos graxos ômega-3. Receptores nucleares.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is one of the most frequent cancers among male individual and saturated lipid intake is linked to its development. However, diets rich in omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acid (PUFA) have been associated to lower PCa development risk. The present study assessed the outcome of the marine n-3 PUFA intake, docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), upon tumor progression at the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP). TRAMP mice were chow-fed and euthanized at 8 (C8), 12 (C12) and 20th (C20) week of age or fed with a fish oil-enriched diet from 8 to 12 (T12) or 20th (T20) week of age and then euthanized. The results indicated an increase in proliferation rate, tissue expression of androgen receptor (AR) and glucocorticoid receptor (GR) and the number of T-cells at the prostate of the control groups according to the increase of age and aggressiveness of the lesions. Dietary intervention with n-3 PUFA led to the maintenance of the glandular microenvironment, highlighted by a reduction of the frequency of proliferative lesions, indicating a delay in PCa progression whereas the levels of cell proliferation, tissue expression of AR and GR and the number of T-cells were lower than the control groups of the same age. Also, DHA/EPA intake promoted a lowering effect of serum triglycerides and cholesterol, improving the metabolic profile of these animals. Thereby incorporation of DHA/EPA on diet is capable of decrease the severity of PCa by delaying the disease progression, highlighting that dietary interventions are effective mechanisms to modulate tumor progression and may be used in new therapeutic approaches in PCa.

Keywords: Prostate cancer. Diet. Omega-3 fatty acids. Nuclear receptors.

Lista de abreviações

11 β -HSDII	11 β -hidroxisteróide desidrogenase II
17-HDHA	17-hidroperóxido docosahexaenoico
AA	ácido araquidônico
ABC	complexo avidina-biotina
ADT	terapia de ablação androgênica
Akt	proteína cinase B
ALA	ácido alfa-linolênico
AR	receptor de andrógeno
Bmp 7	proteína morfogenética óssea sete
CaP	câncer de próstata
CD3	<i>cluster</i> de diferenciação 3
CIT	carcinoma <i>in situ</i>
CK	citoqueratina
COX	ciclo-oxigenase
CRPC	câncer de próstata resistente à castração
CYP	citocromo P-450
CYP-17	17 α -hidroxilase/17,20-liase
DHA	ácido docosahexaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
ER	receptor de estrógeno
ERO	espécie reativa de oxigênio
GF	fator de crescimento
GR	receptor de glicocorticóide
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HBP	hiperplasia prostática benigna
HGPIN	neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau
IUPAC-IUB	união internacional de química pura e aplicada e união internacional de bioquímica
LA	lobo anterior
LD	lobo dorsal
LDL	lobo dorsolateral
LGPIN	neoplasia intra-epitelial prostática de baixo grau

LHRH	hormônio liberador do hormônio luteinizante
LL	lobo lateral
LOX	lipo-oxigenase
LV	lobo ventral
MEC	matriz extracelular
mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos
n-3	ômega-3
n-6	ômega-6
NF-kb	fator nuclear kappa b
NSAA	anti-androgênico não esteroideal
Pgc1 α	co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama
PHH3	histona H3 fosforilada
PIN	neoplasia intra-epitelial prostática
PPAR γ	receptor ativado por proliferador de peroxissomo tipo gama
PSA	antígeno prostático específico
PTEN	proteína homóloga de fosfatase e tensina
PUFA	ácido graxo poli-insaturado
SAA	anti-androgênico esteroideal
SV40	vírus símio 40
Tag	antígeno T
TGF- β	fator de crescimento transformante beta
TRAMP	camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata
Ucp1	proteína desacopladora 1
UDAC	adenocarcinoma indiferenciado
VS	vesícula seminal
ZC	zona central da próstata humana
ZP	zona periférica da próstata humana
ZT	zona de transição da próstata humana
α SMA	alfa actina do músculo liso

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1 Morfologia prostática	9
1.2 Ácidos graxos e suas implicações na saúde.....	11
1.3 Câncer de próstata e Camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP).....	15
2. Problemática do estudo	19
2.1 Implicações dos PUFA n-3 na morfofisiologia prostática.....	19
3. Objetivos gerais.....	22
4. Objetivos específicos	22
5. Resultados.....	22
6. Manuscrito – O consumo de PUFA n-3 atrasa a progressão tumoral na próstata ventral de camundongos TRAMP	23
6.1 Introdução	24
6.2 Material e Métodos	26
6.2.1 <i>Delineamento Experimental</i>	<i>26</i>
6.2.2 <i>Análises biométricas e metabólicas</i>	<i>26</i>
6.2.3 <i>Análise histopatológica</i>	<i>27</i>
6.2.4 <i>Análises Imuno-histoquímicas.....</i>	<i>27</i>
6.2.5 <i>Análises estatísticas.....</i>	<i>28</i>
6.3. Resultados.....	28
6.3.1 <i>O consumo de DHA/EPA modula o perfil metabólico de camundongos TRAMP</i>	<i>28</i>
6.3.2 <i>O consumo de DHA/EPA atrasa a progressão tumoral no camundongo TRAMP</i>	<i>29</i>
6.3.3 <i>A dieta enriquecida com DHA/EPA modula a proliferação celular e a expressão tecidual de receptores nucleares envolvidos na resposta a hormônios esteroides.....</i>	<i>30</i>
6.3.4 <i>O consumo a médio prazo de DHA/EPA reduz o recrutamento de linfócitos T para a próstata de camundongos TRAMP</i>	<i>31</i>
6.4. Discussão.....	31
Referências	38
Conclusões	44
Tabelas	45
Imagens	48
Referências	59

1. Introdução

1.1 Morfologia prostática

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino de mamíferos e que apresenta um papel importante na reprodução (MURASHIMA et al., 2015). Sua secreção é rica em íons e proteínas (KAVANAGH, 1983) que influenciam a motilidade e sobrevivência dos espermatozoides (GERSHBEIN; THIELEN, 1988), os quais são critérios importantes para se avaliar a função reprodutiva (FREITAS et al., 2017).

Em humanos, essa glândula localiza-se no compartimento subperitoneal, entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal, circundando a uretra prostática (LEE et al., 2011). Ainda, em humanos, a próstata é classificada em três zonas distintas: zona periférica (ZP), zona central (ZC) e zona de transição (ZT), que, em condições normais, representam, respectivamente, 75, 25 e 5% do volume total da glândula (LEE et al., 2011; AARON et al., 2016). A próstata é composta por um arranjo complexo de estruturas ducto-acinares, o que resulta em uma glândula de estrutura túbulo-alveolar (CUNHA et al., 1987), na qual é possível diferenciar três compartimentos de grande importância para a biologia prostática: o epitélio glandular, o lúmen glandular e o estroma, os quais apresentam diferentes populações celulares.

O epitélio prostático é composto por diferentes tipos celulares que vão variar em sua morfologia e marcadores específicos. As células luminiais, colunares e secretoras, expressam citoqueratina (CK) 8 e 18. Abaixo da camada de células luminiais encontram-se e células basais não secretoras, positivas para CK5, CK14 e p63, que formam uma camada contínua no epitélio prostático humano que se apoia na membrana basal, o que não é observado em roedores, na qual se apresentam de forma descontínua (TOIVANEN; SHEN, 2017). Ademais, é possível distinguir mais dois tipos celulares, as células intermediárias, as quais co-expressam marcadores de células luminiais e basais e, por fim, em menor frequência dos demais tipos, observam-se células neuroendócrinas, positivas para cromogranina A, serotonina e enolase neurônio específica (HUDSON, 2003; UZGARE et al., 2004).

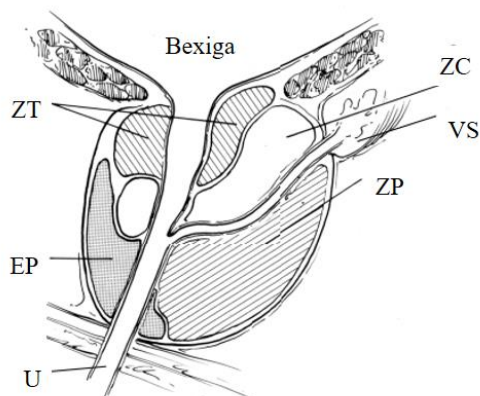
O compartimento estromal também é marcado pela presença de diferentes tipos celulares. Nele pode-se observar a presença de células musculares lisas adjacentes ao

epitélio glandular que exibem função contrátil, auxiliando na expulsão no fluido prostático que irá compor o ejaculado. O estroma ainda vai conter uma grande população de fibroblastos, responsáveis pela secreção de componentes da matriz extra celular (MEC), tais como: elementos fibrilares (e.g. colágeno, elastina), glicoproteínas e proteoglicanos, além de fatores de crescimento (GFs) que regulam a histofisiologia prostática, modulando diversos processos biológicos como a proliferação e morte celular, bem como a própria atividade fisiológica da glândula (TUXHORN et al., 2001, 2002). Adicionalmente, encontram-se no estroma, vasos sanguíneos, células do sistema imune e nervos. A interação recíproca entre esses compartimentos, i.e. interação 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 (CUNHA; WANG, 2002; ELO et al., 2010; LANG; HASHITANI, 2017; COLEMAN, 2018).

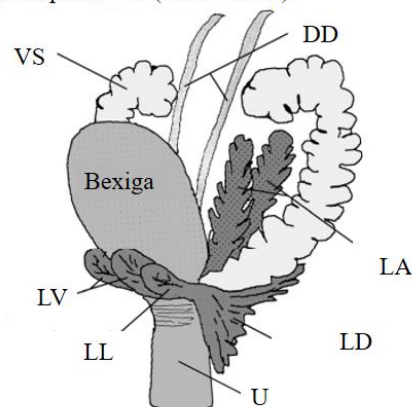
Em roedores, que constituem um modelo amplamente utilizado para o estudo da morfofisiologia prostática, a organização anatômica da próstata difere do que é observado em humanos. Nesse grupo, observa-se que esta glândula não se dispõe em uma estrutura compacta mas sim em uma estrutura multilobulada denominada complexo prostático (CUNHA et al., 1987). Identificam-se quatro pares de lobos denominados de: lobos anteriores ou glândulas coaguladoras (LA), lobos ventrais (LV), lobos laterais (LL) e lobos dorsais (LD). Em muitas espécies, os lobos laterais e dorsais são considerados como um único lobo por compartilharem um sistema único de ductos, recebendo a denominação de dorsolateral (LDL) (CUNHA et al., 2004; AARON et al., 2016) (Fig. 1). Além da origem embrionária, esses lobos apresentam características morfológicas, histológicas e fisiológicas particulares e também diferenças quanto a regulação hormonal e susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças (WU et al., 2004).

Figura 1. Organização anatômica da próstata humana (a) e de roedores (b). Zona de transição (ZT), zonada 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).

A) Próstata humana (corte sagital)



B) Complexo prostático (visão lateral)



Fonte: TOIVANEN; SHEN, 2017, adaptado.

1.2 Ácidos graxos e suas implicações na saúde

Evidências crescentes nos últimos anos destacam que 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, 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 que são caracterizadas por serem compostas por uma cadeia de ácido carboxílico e que podem ser hidrolisadas de fontes naturais como gorduras e óleos (IUPAC-IUB, 1977; RUSTAN; DREVON, 2005). Diferentes nomes podem ser atribuídos para o mesmo ácido graxo, entretanto, recomenda-se a utilização da nomenclatura sistemática proposta pela *União Internacional de Química Pura e Aplicada* e *União Internacional de Bioquímica* (IUPAC-IUB), onde o nome é baseado no número de átomos de carbonos e número e posição de insaturação em relação ao grupo carboxila (COOH). Outras características também são identificadas, como, por exemplo, a configuração das insaturações (i.e. *cis* (Z) ou *trans* (E)), hétero-átomos, entre outras (IUPAC-IUB, 1977).

Ainda que a nomenclatura da IUPAC-IUB seja a preconizada, em termos práticos, nomes simplificados acabam sendo mais aplicados na literatura científica (Tabela 1). Dessa forma, a nomenclatura simplificada tem como característica em comum associar a fórmula C:I e o sistema de nomenclatura ômega ou delta. Nesse contexto, C representa o

número de carbonos e I o número de insaturações ao longo da cadeia de carbono e, por fim, a nomenclatura ômega (n) indica a localização da primeira insaturação em relação ao grupo metil (CH₃), ao passo que a nomenclatura delta (Δ) expressa à posição de todas as insaturações em relação ao grupo carboxila (COOH) (RUSTAN; DREVON, 2005; RATNAYAKE; GALLI, 2009). A nomenclatura simplificada, além de conferir praticidade para a escrita científica é útil pela própria natureza das reações de dessaturação e alongação que ocorrem em mamíferos (MEESAPYODSUK; QIU, 2012).

Tabela 1. Exemplos de nomenclatura de dois ácidos graxos seguindo as recomendações da IUPAC

Nomes		Abreviações*	
Comum	Nomenclatura sistemática	Δ	n
Ácido araquidônico	Ácido todas-cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	20:4, n-6
Ácido α -linolênico	Ácido todas-cis-9,12,15-octadecatrienóico	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	18:3, n-3

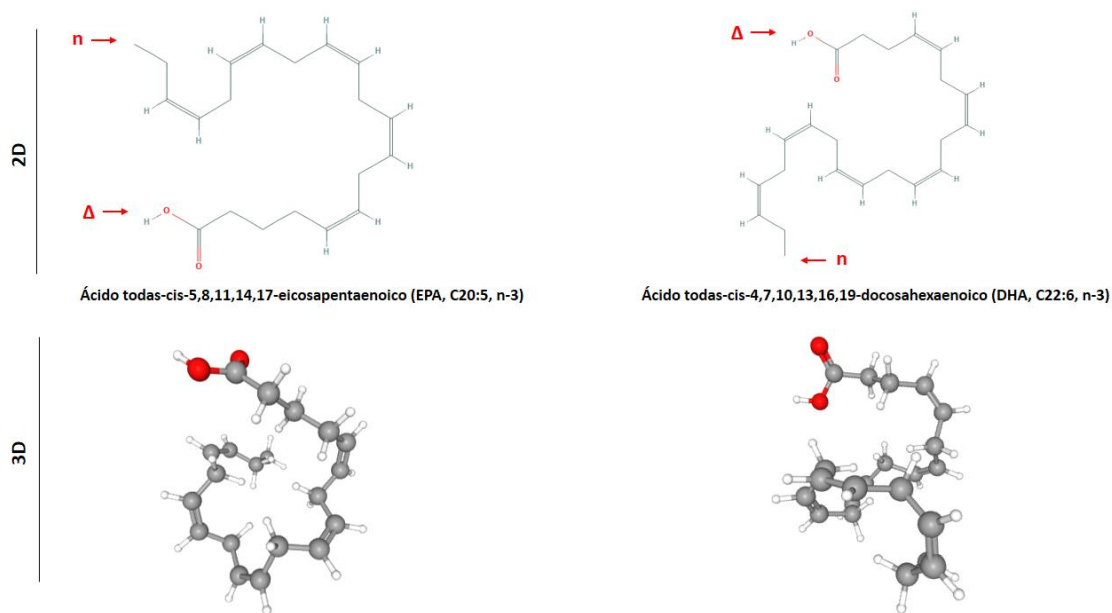
*Referente ao grupo carboxila (COOH - nomenclatura Δ) ou metil (CH₃ - nomenclatura n).

Fonte: Baseado em RATNAYAKE; GALLI, 2009.

No que diz respeito à dieta, com base em recomendações internacionais, sugere-se que o consumo diário de lipídeos não ultrapasse 30% do total de calorias ingeridas (TRUMBO et al., 2002; LICHTENSTEIN et al., 2006). Nesse contexto, ressalta-se ainda que algumas classes de lipídeos são preferíveis ao consumo, como os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ômega-3 (n-3) (PLOURDE; CUNNANE, 2007; ZÁRATE et al., 2017), entre eles, o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6, n-3) (Fig. 2). O consumo desses n-3 tem sido associado a diversos benefícios fisiológicos em quadros de resistência à insulina (FLACHS et al., 2006; LUO et al., 2016), doenças cardiovasculares (NIAZI et al., 2017) e neurodegenerativas (CHE et al., 2018).

A obtenção desses PUFAs ocorre majoritariamente pela dieta, através do consumo de peixes – em especial de água fria – e pela suplementação alimentar com óleo de peixe (SCHUCHARDT; HAHN, 2013; JACOBSEN, 2015), ou então pela bioconversão do PUFA essencial, ácido α -linolênico (ALA), por reações de alongação e dessaturação do esqueleto carbônico (SPRECHER, 2000). Todavia, o processo de bioconversão é

particularmente ineficiente (BURDGE; WOOTTON, 2002; BURDGE; CALDER, 2005; PLOURDE; CUNNANE, 2007). Sabe-se que a eficiência de conversão depende de: (i) fatores hormonais, onde mulheres apresentam maior capacidade de bioconversão que homens, pois o estrógeno é capaz de aumentar a expressão de uma das enzimas envolvidas no processo (GILTAY et al., 2004; KITSON et al., 2013), e (ii) da razão da ingestão das diferentes classes de ácidos graxos, considerando que ocorre competição pelas enzimas envolvidas nesse processo, as quais são compartilhadas com a via biossintética dos ômega-6 (n-6) (NAKAMURA; NARA, 2004; MEESAPYODSUK; QIU, 2012) (Fig. 3). Com isso, altas razões n-6/n-3 inibem a biossíntese de PUFAs n-3 (GERSTER, 1998; SAINI; KEUM, 2018). Assim, considerando que a dieta ocidental é rica em PUFAs n-6, (SIMOPOULOS, 2002; SCHMITZ; ECKER, 2008), a suplementação alimentar com PUFAs n-3 tem sido recomendada por profissionais da saúde (PLOURDE; CUNNANE, 2007), em doses que variam de 200mg à até 4g/dia, dependendo da condição de saúde do indivíduo (KRIS-ETHERTON et al., 2009).

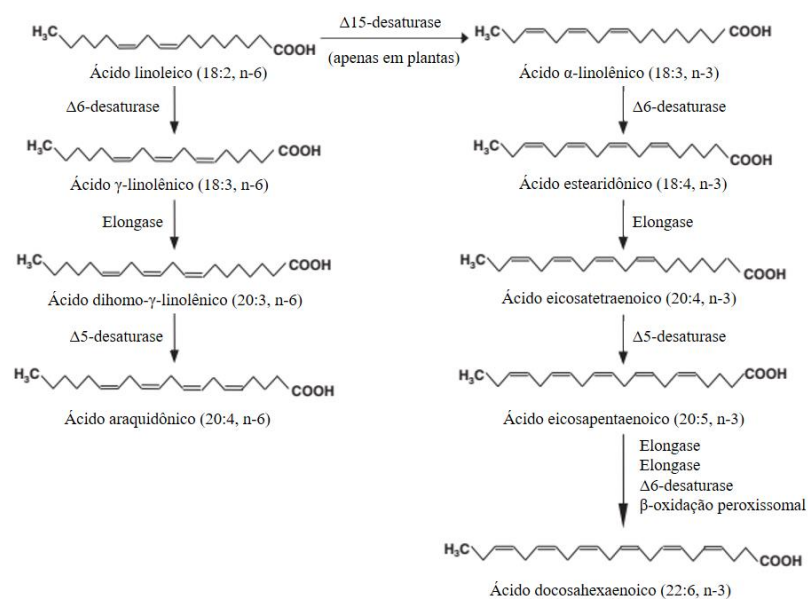


Fonte: Extraído de: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os PUFAs são metabolizados principalmente no fígado, no retículo endoplasmático liso, e então exportados para os demais órgãos, onde podem ser incorporados aos fosfoglicerídeos de membrana (ABBOTT et al., 2012; DAVIDSON, 2013; KUDA et al., 2018). Os PUFAS podem, então, ser recrutados e metabolizados pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX), lipo-oxigenase (LOX) e citocromo P-450 (CYP) (ZELDIN, 2001) levando a formação de lipídeos bioativos que modulam

diferencialmente a fisiologia celular. Interessantemente, observa-se que os efeitos biológicos desses metabólitos dependem do ácido graxo precursor, de modo que na maior parte dos casos, os PUFAs n-6 e n-3 apresentam efeitos antagônicos (KHADGE; SHARP; et al., 2018). Os metabólitos derivados dos PUFAs n-6, particularmente do ácido araquidônico (AA, C:20:4, n-6), apresentam uma natureza pró-inflamatória, além de propiciarem a sobrevivência e proliferação celular (WANG; DUBOIS, 2010). Em contrapartida, o metabolismo do EPA e do DHA gera metabólitos com propriedades anti-inflamatórias e anti-proliferativas (DALLI et al., 2013; KHADGE; THIELE; et al., 2018). Assim, devido a essas características contrastantes, a razão n-6/n-3 da dieta tem sido associada à capacidade de modular o risco do desenvolvimento de diversas doenças como obesidade, dislipidemia, diabetes e câncer (CALDER, 2011; WILLIAMS et al., 2011; NASSAR et al., 2018).

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



Fonte: CALDER, 2011, adaptado.

Em vista das crescentes evidências da importância dos lipídeos na alimentação (ZÁRATE et al., 2017; LI et al., 2019), inúmeros estudos procuraram compreender o impacto do seu consumo e metabolismo na modulação do risco de desenvolvimento de doenças (NIAZI et al., 2017; SHANG et al., 2017; BHANDARKAR et al., 2018). No que diz respeito à saúde prostática, sabe-se que o consumo excessivo de lipídeos está associado ao desenvolvimento de hiperplasia prostática benigna (HBP) (SUZUKI et al., 2002; VIKRAM; RAMARAO, 2011) e maiores incidências de câncer de próstata

(WILLIAMS et al., 2011; SHANKAR et al., 2016; NASSAR et al., 2018). Estudos com roedores reforçam essa associação do alto consumo de lipídeos com patologias prostáticas, onde dietas hiperlipídicas são responsáveis por modular o microambiente prostático, favorecendo o desenvolvimento de HBP (SILVA et al., 2015; CALMASINI et al., 2018) além de alterar a sinalização hormonal e vias de proliferação e sobrevivência celular, promovendo uma maior incidência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, e favorecendo o estabelecimento de focos inflamatórios (RIBEIRO; PINTO; MAEDA; et al., 2012; RIBEIRO; PINTO; RAFACHO; et al., 2012; JESUS, DE et al., 2015).

Todavia, apesar da quantidade de lipídeos da dieta ser um fator relevante a ser considerado, estudos demonstraram que a natureza dos ácidos graxos bem como o período de exposição levam a uma resposta tecidual prostática diferente. O consumo de ácidos graxos insaturados e saturados é responsável por alterar a expressão de receptores nucleares envolvidos na resposta hormonal (receptores de andrógeno – AR - e de estrógeno α e β – ER α ER β) e metabolismo de lipídeos (PPAR γ – receptor ativado por proliferador de peroxissomo) promovendo um estado hiperproliferativo no epitélio glandular (PYTLOWANCIV et al., 2016) e até mesmo acelerar a progressão do câncer de próstata (HAYASHI et al., 2018; LIU et al., 2019). Por outro lado, o consumo de ALA leva à redução da expressão do AR e PPAR γ , efeito associado a menor proliferação celular (ESCOBAR et al., 2009).

1.3 Câncer de próstata e Camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP)

O câncer de próstata (CaP) atualmente figura entre as neoplasias mais frequentes em indivíduos do sexo masculino a nível nacional e mundial (SIEGEL et al., 2020). Sua etiologia é extremamente complexa e ainda não é totalmente compreendida, contudo, sabe-se que a interação entre fatores genéticos e ambientais é fundamental para a gênese da doença, sendo que a dieta é nitidamente reconhecida como um fator ambiental capaz de modular o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, incluindo o CaP (KOLONEL, 2001; WILSON et al., 2002; CHEN et al., 2007; VIKRAM; RAMARAO, 2011). A detecção precoce do CaP é particularmente difícil uma vez que em seus estágios iniciais a doença é assintomática (TABAYOYONG; ABOUASSALY, 2015) e quando presentes, os sintomas se assemelham aos da hiperplasia prostática benigna (HBP), o que dificulta o diagnóstico (MUSIAŁA et al., 2019).

Assim, uma vez detectado, as principais intervenções vão se basear em: (i) vigilância ativa, para os casos de CaP de baixo risco (COOPERBERG, 2016); (ii) prostatectomia radical (PR); (iii) radioterapia (RTP) e (iv) castração química, i.e. terapia de ablação androgênica (ADT), ou cirúrgica, i.e. orquectomia bilateral, individualmente, ou em associação a PR ou RTP (HEIDENREICH et al., 2011; ALEX et al., 2016). Apesar do tratamento do CaP localizado ser bem sucedido com a PR ou a RTP, muitos pacientes apresentam a reincidência da doença e, na maioria dos casos, com perfil metastático (WEINER et al., 2016). Assim, atualmente, o tratamento mais frequente para o CaP, incluindo os casos de reincidência, é a ADT (GILBERT et al., 2011) (Tab. 2), contudo, inevitavelmente, a maior parte dos indivíduos sob ADT desenvolvem um fenótipo resistente, i.e. câncer resistente à castração (CRPC), o que resulta na progressão da doença (CORNFORD et al., 2017).

Tabela 2. Exemplos de fármacos utilizados na ADT.

Mecanismo de ação	Classificação	Exemplo de droga
Redução dos níveis de andrógeno	Agonista de LHRH	Gosserrelina
	Antagonista de LHRH	Degarelix
	Inibidor da enzima CYP-17	Acetato de abiraterona
Inibição da ligação de andrógenos ao AR	Anti-androgênicos não esteroidais (NSAAs)	Flutamida (Primeira geração de NSAAs)
		Enzalutamida (Segunda geração de NSAAs)
Inibição da ligação de andrógenos ao AR e supressão da síntese gonadal	Anti-androgênicos esteroidais (SAAs)	Acetato de ciproterona

LHRH: Hormônio liberador do hormônio luteinizante; CYP-17: 17 α -hidroxilase/17,20-liase – enzima chave na síntese de andrógenos.

Fonte: MUSIAŁA et al., 2019, adaptado.

Dessa maneira, muitos esforços são voltados para compreender melhor os aspectos envolvidos nos processos de iniciação e progressão tumoral, 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 (GREENBERG et al., 1995), constitui um bom modelo para a investigação do CaP uma vez que a progressão da doença ocorre de forma similar ao que se observa em humanos.

A iniciação e progressão do CaP é dependente de uma grande variedade de fatores, contudo, o estímulo androgênico apresenta um protagonismo nesses processos (TINDALL; LONERGAN, 2011; SHAFI et al., 2013). Camundongos TRAMP apresentam o desenvolvimento da doença de forma dependente de andrógenos, (GREENBERG et al., 1994; KIDO et al., 2019), além de apresentarem mutações espontâneas no gene do AR (HAN et al., 2001), o que pode contribuir para a evolução a um fenótipo andrógeno-independente (GINGRICH et al., 1997; BONO et al., 2008).

O modelo foi inicialmente estabelecido e caracterizado a partir do *background* genético de camundongos C57BL/6 (B6) e, posteriormente, constatou-se que o estabelecimento e a progressão do tumor era mais rápido em camundongos F1 do cruzamento de fêmeas TRAMP C57BL/6 (B6) com camundongos da linhagem FVB (GREENBERG et al., 1995; GINGRICH et al., 1999), sendo então, o *background* FVB altamente utilizado atualmente (CONLON et al., 2015; NOGUEIRA-PANGRAZI et al., 2018; SILVA et al., 2019). O desencadeamento da carcinogênese prostática nesses animais é dado pela expressão do antígeno T (Tag) do vírus símio 40 (SV40), sob controle da probasina de rato, um elemento andrógeno-dependente (GREENBERG et al., 1994, 1995).

O Tag do SV40 tem sua expressão restrita ao epitélio prostático (GREENBERG et al., 1994) e age como uma oncoproteína, inativando produtos de genes de supressão tumoral como a proteína p53 e retinoblastoma (LANE; CRAWFORD, 1979; LINZER; LEVINE, 1979; DECAPRIO et al., 1988). Assim, os animais passam a apresentar alterações nucleares compatíveis com neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) a partir da 6ª semana de vida, sendo que a partir da 8ª semana já se pode observar diversos focos de lesões proliferativas na glândula dos animais. Com o decorrer da idade, a doença progride para um fenótipo mais agressivo, onde ocorre uma prevalência de PINs de alto grau (12-18 semanas) e lesões malignas como carcinoma *in situ* e adenocarcinoma indiferenciado (16-22 semanas) (KIDO et al., 2016; KIDO et al., 2019). Ainda, a partir

da 18ª semana passa-se a observar o estabelecimentos de tumores primários (GINGRICH et al., 1999) . Considerando o fato do contexto fisiológico ser preservado, mantendo assim as interações epitélio-estromais (MONTICO et al., 2015; NOGUEIRA-PANGRAZI et al., 2018), estímulos hormonais (SILVA et al., 2017) e processos inflamatórios (KIDO et al., 2016; ALVES et al., 2018), permite a análise de eventos e mecanismos envolvidos na iniciação, progressão tumoral e metástase (GINGRICH et al., 1996).

2. Problemática do estudo

2.1 Implicações dos PUFAs n-3 na morfofisiologia prostática

O câncer de próstata (CaP), atualmente, figura entre as principais causas de morte no cenário mundial, ocupando o primeiro lugar entre os tipos de câncer mais frequentes em homens (SIEGEL et al., 2020). Sua etiologia é extremamente complexa e entre os fatores ambientais a dieta assume um papel preponderante (MOKBEL et al., 2019). Conforme mencionado acima, nos últimos anos, as repercussões do consumo de lipídeos sobre a saúde prostática vem sendo investigadas. Contudo, ainda restam muitas questões a serem esclarecidas, principalmente no que diz respeito aos PUFAs n-3 da série marinha. Devido ao potencial efeito anti-neoplásico dos PUFAs n-3 nota-se um grande interesse na literatura a respeito da suplementação alimentar e suas implicações na saúde prostática. Estudos demonstram que a ingestão e os altos níveis séricos desses PUFAs reduzem o risco do desenvolvimento do CaP (NORRISH et al., 1999; LEITZMANN et al., 2004), embora alguns autores não tenham constatado essa associação (CROWE; KEY; et al., 2008; DINWIDDIE et al., 2016). Recentemente, esse papel protetor dos PUFAs n-3 vem sendo questionado pois alguns trabalhos indicam que a ingestão desses ácidos graxos pode aumentar o risco do desenvolvimento de CaP (WALLSTRÖM et al., 2007; CROWE; ALLEN; et al., 2008; BRASKY et al., 2011; SORONGON-LEGASPI et al., 2013). Ainda, em relação ao DHA, já se observou uma correlação positiva entre o nível tecidual desse lipídeo ao pior prognóstico de pacientes com CaP (ZHAO et al., 2016).

Majoritariamente, os estudos com DHA e EPA são focados em análises *in vitro* e atribuem a esses PUFAs um efeito anti-proliferativo (ESER et al., 2013; OONO et al., 2017). Interessantemente, o que tem se observado é que existe um mecanismo diferencial de ação desses PUFAs dependendo da dependência androgênica. Assim, o tratamento de células andrógeno-dependentes com EPA e/ou DHA leva a modulação da atividade transcricional do AR (CHUNG et al., 2001) além de reduzir a expressão de fatores anti-apoptóticos (ESER et al., 2013). Por outro lado, em linhagens andrógeno-independentes, o mecanismo de ação se dá principalmente por sua natureza pró-oxidante, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHIN et al., 2013) e modulando a expressão de fatores de sobrevivência (CAVAZOS et al., 2011; SUN et al., 2017). Uma ação diferencial do DHA também tem sido observada em outros tipos de tumores. Em tumores neurais, por exemplo, demonstrou-se o metabolismo diferencial do DHA, onde

células normais metabolizam esse PUFA em compostos com propriedades anti-inflamatórias e de pró-resolução, como as resolvinas, protectinas e maresinas, ao passo que células de neuroblastoma metabolizam o DHA em um composto citotóxico (17-hidroperóxido docosahexaenoico - 17-HDHA) (GLEISSMAN et al., 2010). Contudo, no que diz respeito à próstata, pouco se sabe da ação do DHA/EPA em um microambiente normal. Estudos *in vitro* com células prostáticas benignas PNTA1 demonstram efeitos variável do DHA dependendo da concentração, sendo que um efeito anti-proliferativo foi observado apenas em doses de 100 μ M (TAMARINDO et al., 2019) ao passo que em células tumorais esse efeito já pode ser observado em doses de 35-50 μ M (SHIN et al., 2013).

Quando se trata de estudos *in vivo* a literatura é particularmente escassa e analisa a ação conjunta do DHA+EPA oriundos do óleo de peixe, sendo a ação isolada desses PUFAs desconhecidas (FASANO et al., 2017). Estudos envolvendo camundongos geneticamente modificados mostram que o consumo de óleo de peixe reduz a proliferação celular (AKINSETE et al., 2012; WANG et al., 2012) e ainda é capaz de conter o crescimento tumoral por reduzir a expressão de genes envolvidos na síntese/secreção de insulina e fisiologia mitocondrial (LLOYD et al., 2013). Adicionalmente, efeitos terapêuticos do DHA já foram observados em modelo de HBP quimicamente induzida em ratos, onde o tratamento com óleo de foca foi capaz de reduzir a expressão do AR e ER α resultando em menores taxas proliferativas (WANG et al., 2016). Contudo, embora esses trabalhos corroborem com um efeito positivo dos PUFAs n-3, FURRIEL et al. (2014) avaliaram as repercussões de dietas hiperlipídicas (50% ácidos graxos) ricas em ALA - ácido graxo precursor do EPA e do DHA - sobre a histofisiologia de ratos adultos. Seus resultados demonstram um efeito negativo sobre a glândula, levando a hipertrofia dos componentes teciduais e a maiores níveis de proliferação celular (FURRIEL et al., 2014).

Dessa forma, nota-se que as repercussões do consumo de PUFAs n-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 na próstata e focos inflamatórios na próstata (ESCOBAR et al., 2009; RIBEIRO; PINTO; MAEDA; et al., 2012; RIBEIRO; PINTO; RAFACHO; et al., 2012; JESUS, DE et al., 2015; PYTLOWANCIV et al., 2016), pouco ainda é conhecido sobre a ação do EPA e do

DHA sobre essa glândula. Somada a escassez de estudos *in vivo*, se faz necessário investigar melhor a ação desses lipídeos no que respeita à iniciação e progressão do CaP.

3. Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi avaliar as repercussões do consumo de uma dieta rica em DHA+EPA sobre progressão tumoral na próstata ventral de camundongos TRAMP.

4. Objetivos específicos

Avaliar como a intervenção dietética com DHA/EPA afeta a progressão tumoral em camundongos TRAMP com base em:

- I. Parâmetros metabólicos: glicemia de jejum, triglicerídeos e colesterol total;
- II. Análise histopatológica e quantificação de áreas normais e comprometidas por lesões pré-malignas e malignas;
- III. Proliferação celular;
- IV. Expressão tecidual de receptores nucleares: Receptores de andrógeno e de glicocorticoide;
- V. Quantificação de linfócitos T.

5. Resultados

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito.

O consumo de PUFA n-3 atrasa a progressão tumoral na próstata ventral de camundongos TRAMP

Gustavo Matheus Amaro¹, Alana Della Torre da Silva¹, Guilherme Henrique Tamarindo², Celina de Almeida Lamas², Valéria Helena Alves Cagnon Quitete², Rejane Maira Góes¹

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José do Rio Preto, SP.

² Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campina – UNICAMP – Campinas, SP.

Palavras-chave: Câncer de próstata, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, camundongos TRAMP, receptores nucleares, proliferação celular

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo: 130964/2018-2) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 2018/21891-4)

6.1 Introdução

O câncer de próstata (CaP), atualmente, figura entre as principais causas de morte no cenário mundial, ocupando o primeiro lugar entre os tipos de câncer mais frequentes em homens (SIEGEL et al., 2020). Sua etiologia é extremamente complexa e entre os fatores ambientais a dieta assume um papel preponderante (MOKBEL et al., 2019). Nesse contexto, o consumo excessivo de lipídeos vem sendo implicado na gênese da hiperplasia prostática benigna (HBP) (VIKRAM; RAMARAO, 2011) e como fator que acelera a progressão do CaP (CHO et al., 2015). Os dados clínicos são reforçados por vários estudos com roedores mostrando que dietas ricas em lipídeos interferem na histofisiologia e na incidência de lesões patológicas na próstata (RIBEIRO et al., 2012; DE JESUS et al., 2015; KWON et al., 2016).

Assim, considerando que o grande impacto que a dieta tem sobre a saúde, incluindo o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, a intervenção nutricional em pacientes com câncer tem assumido um papel preponderante tanto por aumentar a eficácia da terapia, mas também por amenizar o comprometimento do estado nutricional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (RAVASCO, 2019). Nesse sentido, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ômega-3 (n-3) são considerados nutrientes importantes, pois atuam em múltiplas vias e tem sido amplamente usado com um adjuvante por pacientes com câncer (FREITAS; CAMPOS, 2019).

O óleo de peixe é uma das fontes mais ricas em PUFAs n-3 da série marinha, em especial o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6, n-3). O consumo desses PUFAs já foi associado a inúmeros benefícios fisiológicos, principalmente no que diz respeito à doenças coronárias e neurodegenerativas (NIAZI et al., 2017; CHE et al., 2018). Em relação à saúde prostática, o consumo desses PUFAs tem sido associado a menor risco de desenvolvimento de CaP (LEITZMANN et al., 2004; LOVEGROVE et al., 2015). Esses dados são reforçados por estudos com cultura de células prostáticas que demonstram que ambos os n-3 exercem um efeito anti-proliferativo tanto nas linhagens tumorigênicas LNCaP, PC3 e DU-145, como na linhagem benigna PNT1A (HU et al., 2010; LIU et al., 2015; SUN et al., 2017; TAMARINDO et al., 2019).

Estudos envolvendo camundongos C3(1) Tag e *knockout* para PTEN mostram que o consumo de óleo de peixe reduz a proliferação celular (AKINSETE et al., 2012; WANG et al., 2012) e ainda é capaz de conter o crescimento tumoral por reduzir a expressão de genes envolvidos na síntese/secreção de insulina e na fisiologia mitocondrial em modelo xenográfico de CaP (LLOYD et al., 2013). Adicionalmente, efeitos terapêuticos do DHA já foram observados em modelo de hiperplasia prostática benigna (HBP) quimicamente induzida em ratos, onde o tratamento com óleo de foca foi capaz de reduzir a expressão do receptor de andrógeno (AR) e de estrógeno α (ER α) resultando em menores taxas proliferativas (WANG et al., 2016). Portanto, várias evidências sugerem uma possível aplicabilidade do consumo desses n-3 em abordagens quimioprotetivas.

Considerando a alta incidência e mortalidade do CaP no cenário mundial, grandes esforços são voltados para compreender melhor os aspectos envolvidos nos processos de iniciação e progressão tumoral e estabelecer modelos que melhor se assemelhem ao observado em humanos. Dentre os modelos disponíveis, o camundongo transgênico para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) é amplamente adotado para o estudo do CaP (CHO et al., 2015; SILVA et al., 2017; KIDO et al., 2019). Neste modelo, o desencadeamento da carcinogênese prostática é dado pela expressão do antígeno T (Tag) do vírus símio 40 (SV40), sob controle da probasina de rato, um elemento andrógeno-dependente (GREENBERG et al., 1995), evento que leva à inativação de produtos de genes de supressão tumoral, em especial as proteínas p53 e retinoblastoma (LANE; CRAWFORD, 1979; LINZER; LEVINE, 1979; DECAPRIO et al., 1988). Os animais desenvolvem neoplasias intra-epiteliais prostáticas (PIN) a partir da 6ª semana de vida e tumores primários a partir da 18ª semana de vida (GINGRICH et al., 1999; KAPLAN-LEFKO et al., 2003; BERMAN-BOOTY et al., 2012).

A iniciação e progressão do CaP é dependente de uma grande variedade de fatores, contudo, o estímulo androgênico apresenta um protagonismo nesses processos (TINDALL; LONERGAN, 2011; SHAFI et al., 2013). Camundongos TRAMP apresentam o desenvolvimento da doença de forma dependente de andrógenos, mantendo as interações epitélio-estromais e estímulos inflamatórios (GREENBERG et al., 1994; KIDO et al., 2016), além de apresentarem mutações espontâneas no gene do AR (HAN et al., 2001), o que pode contribuir para a evolução a um fenótipo andrógeno-independente (GINGRICH et al., 1997; BONO et al., 2008). Assim, essa linhagem constitui um dos principais modelos *in vivo* do estudo do CaP para compreender eventos

envolvidos nos processos de iniciação/progressão tumoral, metástase e avaliação de novas abordagens terapêuticas (GINGRICH et al., 1996b; PFLUG et al., 2003; YU et al., 2010; KIDO et al., 2019).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do consumo dos PUFAs n-3, DHA e EPA, sobre o processo de progressão tumoral na próstata ventral de camundongos TRAMP. Para tanto, foi realizada a análise histopatológica para estimar a frequência de lesões pré-malignas ou malignas e do tecido normal. Os dados histopatológicos foram relacionados com os efeitos sobre a atividade de proliferação celular, com a expressão tecidual do receptor de andrógeno e glicocorticoide, e com o perfil metabólico dos animais.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Delineamento Experimental

Camundongos machos transgênicos para adenocarcinoma de próstata da linhagem TRAMP (C57BL/6-Tg(TRAMP) 8,247Ng/J X FVB/Unib), adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológicas (CEMIB/UNICAMP), foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=10/grupo): camundongos alimentados com dieta padrão e eutanasiados com 8, 12 e 20 semanas de vida (**C8**, **C12** e **C20**) e camundongos alimentados com dieta enriquecida com óleo de peixe (DHA 500^{TG}, Naturalis[®], São Paulo, Brasil, Tabs. 1 e 2) da 8^a à 12^a (**T12**) ou 20^a (**T20**) semana de vida e então eutanasiados (CEUA: 198/2018). Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico (Cloridrato de Xilazina, 5mg/kg, e Cloridrato de Cetamina, 60mg/kg, intramuscular) e então a próstata ventral coletada e processada para a análise histológica.

6.2.2 Análises biométricas e metabólicas

O consumo da dieta foi aferido a cada dois dias, no mesmo horário, e calculado a média de consumo semanal e a ingestão energética foi obtida multiplicando a média de consumo de ração semanal pelo valor energético de cada dieta. O ganho relativo de peso (RW) foi calculado pela seguinte fórmula: $RW = (FG - IG * 100) / IG$, onde FG representa o peso final do animal e IG o peso do animal ao início do experimento.

Durante a eutanásia, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca do ventrículo esquerdo e subsequentemente centrifugadas à 1620 g por 20 min. A glicemia de jejum foi aferida com o uso de aparelho Accu-chek (Roche) de fitas *one touch*. Amostras de soro foram posteriormente submetidas a testes enzimáticos (In vitro Diagnóstica Ltda, Itabira, MG, Brasil) para a determinação dos níveis de colesterol (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 e analisados em leitor SpectraMax-Plus 384 Reader (Molecular Devices).

6.2.3 Análise histopatológica

A próstata ventral foi coletada, fixada em Bouin, por 24h, e então processada para inclusão em polímero plástico (Paraplast, Merck, Darmstadt, Alemanha). Cortes histológicos (4µm de espessura) foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrossírius-Hematoxilina para a análise histopatológica. Essas análises foram realizadas segundo Kido e colaboradores (2016). Por animal (n=5/grupo), foram digitalizadas 15 imagens aleatórias, no aumento de 400x, totalizando 75 imagens por grupo. Cada imagem foi dividida em quatro quadrantes e, em cada um deles, considerou-se a classe morfológica predominante de acordo com as categorias representadas na Figura 1 e classificadas segundo Greenberg e colaboradores (1995) e Berman-Booty e colaboradores (2012). Foram identificadas as seguintes categorias: (1) Epitélio normal (i.e. livre de lesão); (2) neoplasia intra-epitelial prostática de baixo grau (LGPIN), representada pela estratificação das células epiteliais; (3) neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HGPN), caracterizada por apresentar focos de proliferação celular com crescimento papilar e cribiforme, levando à oclusão do lúmen glandular; (4) carcinoma *in situ* (CIT), caracterizado pela invasão das células epiteliais no estroma glandular e (5) adenocarcinoma indiferenciado, representado pela perda da arquitetura glandular.

6.2.4 Análises Imuno-histoquímicas

Cortes histológicos foram submetidos a reações de imuno-histoquímicas para a detecção da histona H3 fosforilada (PHH3), do receptor de andrógeno (AR), receptor de glicocorticoide (GR), *cluster* de diferenciação 3 (CD3) e alfa-actina do músculo liso (α -SMA) (Tab. 3). A recuperação de antígeno foi realizada utilizando tampão Tris-EDTA

(10mM Trizma Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) ou em tampão citrato (10mM, pH 5.8) por 45-60 min à 98°C. Em seguida, as lâminas foram submergidas em H₂O₂ 3% por 15-30min para bloqueio da peroxidase endógena e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado incubando as lâminas em BSA 3% por 1h em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário *overnight* à 4°C O complexo antígeno-anticorpo foi detectado utilizando o sistema de polímero para o AR (Novolink™ Max Polymer Detection System, RE7280-K, Leica Biosystems) ou pelo complexo avidina-biotina (ABC) para a PHH3, α -SMA, CD3 e GR (ImmunoCruz® rabbit ABC Staining System, sc-2018, Santa Cruz Biotechnology). A atividade de peroxidase foi detectada utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Leica Biosystems) e a Hematoxilina de Harrys foi utilizada para contra-coloração. Os controles negativos foram obtidos omitindo o anticorpo primário.

A estimativa da frequência de células AR- GR- ou α SMA-positivas foi realizada por meio do sistema de multiponto de Weibel (WEIBEL, 1963) com 160 intersectos e a utilização do software Image Pro Plus (Media Cybernetics v 4.5). Para tanto, dez campos microscópicos da próstata foram capturados aleatoriamente por animal, no aumento de 400x, totalizando 50 campos por grupo (SILVA et al., 2017). A imunoreatividade foi determinada pela razão dos intersectos positivos 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 no aumento de 40x por animal, em cinco animais por grupo (MATEUS et al., 2018).

6.2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0.1 (GraphPad Software). Os grupos experimentais foram comparados por *one-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0.05$.

6.3. Resultados

6.3.1 O consumo de DHA/EPA modula o perfil metabólico de camundongos TRAMP

Ao longo do experimento, não houve diferença no consumo semanal de ração entre os grupos, com exceção do grupo T20, cujo consumo reduziu em relação a C20 (Fig 2A). Para o grupo T12 houve maior ingestão calórica que para o C12, sendo que para os demais grupos esse parâmetro não variou (Fig 2B). Adicionalmente, não foi observado ganho de peso entre os animais tratados com a dieta rica em PUFA n-3 quando comparados aos seus controles de mesma idade (Fig 2C).

Não foi observado variações na glicemia de jejum entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 2D). O consumo da ração enriquecida com PUFA n-3 reduziu os níveis de colesterol sérico (**C8**: $33,5 \pm 5,5$; **C12**: $34,8 \pm 4,7$; **T12**: $23,5 \pm 2,31$; **C20**: $43,3 \pm 7,2$; **T20**: $29,64 \pm 4,38$, $p \leq 0,05$ mg/dL), e de triglicerídeos (**C8**: $156 \pm 87,1$; **C12**: $126 \pm 58,9$; **T12**: 38 ± 35 ; **C20**: $126 \pm 40,9$ **T20**: $49 \pm 21,57$ mg/dL) em relação aos grupos de mesma idade (Figs 2D e E). No que diz respeito aos grupos controles, apenas os animais de 20 semanas (**C20**) apresentaram aumento nos níveis de colesterol sérico (Fig 2E).

6.3.2 O consumo de DHA/EPA atrasa a progressão tumoral no camundongo TRAMP

A análise histológica geral indicou que a glândula do grupo C8 já exibe vários focos de lesões pré-malignas (Figs. 3, 5 e 6). A estimativa da frequência dos focos de lesões demonstrou que a maior parte corresponde a LGPIN (50%), cerca de 14% de HGPIN e baixa frequência de carcinoma *in situ* (3%) (Fig. 6). No grupo C12, notou-se a diminuição nas áreas de epitélio normal que corresponderam a cerca de 10% da próstata ($p \leq 0,05$) e aumento nos focos de HGPIN (26%) em comparação a C8, enquanto os focos de LGPIN permaneceram semelhantes (56%, $p > 0,05$). A frequência de carcinoma *in situ* (CIT) em C12 correspondeu a 6% (Figs. 3 e 6). A análise do microambiente estromal demonstrou que o grupo C8 exibiu um fenótipo aparentemente normal, caracterizado pela disposição preferencial de colágeno entre as células musculares lisas e fibroblastos periacinares. O estroma glandular do grupo C12 mostrou-se semelhante do grupo C8, com baixa imunoreatividade para α SMA e com pouca densidade de elementos fibrilares, contudo, pode-se observar nesse grupo áreas de espessamento de colágeno, particularmente, em locais de distúrbios proliferativos (Fig 7).

O consumo de óleo de peixe manteve a histologia da próstata no grupo T12 mais semelhante à C8 (Fig 5). A análise histopatológica indicou que esse consumo preservou a frequência de áreas com epitélio normal (38%, $p \leq 0,05$ vs C12) e com HGPIN (7%, $p \leq 0,05$ vs C12) semelhantes às do grupo C8 (Figs. 3 e 6). Também se observou uma

tendência na manutenção das áreas de CIT ($p = 0,0607$ vs C12), com uma frequência semelhantes ao grupo C8 (Fig 6). O estroma no grupo T12 foi semelhante aos animais de 8 semanas de idade, apresentando menor densidade estromal, com poucos elementos fibrilares e baixa imunoreatividade para α SMA ($p = 0,0558$ vs C12) (Fig 7)

Por fim, a análise histopatológica demonstrou que, no grupo C20, cerca de 87% da glândula estava comprometida por lesões proliferativas, em especial LGPIN (55%) e HGPIN (32%). As LGPIN e HGPIN foram as lesões com maior frequência nesse grupo, de modo que as lesões de alto grau apresentaram um padrão de crescimento com projeções papilares e cribiformes que em muitos casos levava à oclusão do lúmen glandular (Figs 4 e 6). Ainda, uma porcentagem de 6% de CIT foi observada no grupo C20, caracterizado pela invasão das células epiteliais tumorais no estroma glandular. Nesse grupo, o estroma mostrou-se hipertrofiado, caracterizado por aumento expressivo na deposição de colágeno peri-acinar, bem como aumento significativo na imunoreatividade para α SMA em comparação com os demais grupos controles (**C8:** 6%; **C12:** 8%; **C20:** 13%, $p \leq 0,05$) (Fig 7).

O consumo de óleo de peixe por três meses também resultou em um atraso na progressão do CaP, visto que as principais lesões proliferativas encontradas em T20 foram as LGPIN (42%), com manutenção da frequência de HGPIN (9%, $p \leq 0,05$ vs C20) e de epitélio livre de lesões (44%, $p \leq 0,05$ vs C20), semelhantes a C8. Também se observou para T20 tendência na manutenção da frequência de CIT (3%, $p = 0,0508$ vs C20) (Figs 4 e 6). Ainda, nesse grupo, foi observado a preservação do ambiente estromal, marcada pela manutenção dos componentes fibrilares e da baixa imunoreatividade para α SMA (7%, $p \leq 0,05$ vs C20) (Fig 7).

6.3.3 A dieta enriquecida com DHA/EPA modula a proliferação celular e a expressão tecidual de receptores nucleares envolvidos na resposta a hormônios esteroides

Como esperado para o modelo, houve um aumento no número de células em proliferação (PHH3-positivas) nos grupos C12 ($3,78 \pm 0,95$, $p \leq 0,05$) e C20 ($2,90 \pm 0,73$, $p \leq 0,05$) em relação ao grupo C8 ($1,66 \pm 0,11$ células). O consumo de DHA/EPA manteve a taxa de proliferação celular nos grupos T12 e T20 semelhantes ao C8 e inferiores aos seus respectivos grupos controles (Fig 8)

A análise da expressão tecidual do AR (Fig. 9) demonstrou aumento da imunoreatividade para esse receptor no compartimento epitelial da próstata do grupo

C12 ($31 \pm 3,0$, $p \leq 0,05$) e C20 ($31 \pm 4,9$, $p \leq 0,05$) em relação ao grupo C8 ($23 \pm 2,4$), sendo que apenas no grupo C20 foi observado um aumento na localização estromal do AR ($1,9 \pm 1$, $p \leq 0,05$) em relação aos grupos controles. O consumo da ração enriquecida com PUFA n-3 manteve a imunorreatividade para o AR no epitélio no grupo T12 ($22 \pm 2,5$, $p \leq 0,05$) semelhantes aos níveis do grupo C8, sendo que uma redução mais expressiva foi observada no grupo T20 ($18 \pm 4,7$, $p \leq 0,05$). No que diz respeito à expressão estromal do AR, apenas no grupo T20, alimentado por três meses com dieta rica em DHA/ EPA, foi observado menor imunorreatividade em relação ao seu controle de mesma idade (T20: $0,85 \pm 0,22$, C20: $1,95 \pm 1$, $p \leq 0,05$) (Fig 9).

A expressão epitelial do GR não variou ao decorrer da progressão tumoral (grupos C8, C12 e C20) enquanto a estromal aumentou nos grupos C12 e C20 (**C12**: $3 \pm 0,7$ e **C20**: $3 \pm 0,8$, $p \leq 0,05$), em relação a C8 ($1,5 \pm 0,7$). A intervenção dietética com óleo de peixe manteve a expressão estromal de GR semelhante a C8 e inferior aos respectivos controle (**T12**: $1,5 \pm 0,3$ e **T20**: $2,2 \pm 0,2$, $p \leq 0,05$). A expressão epitelial do GR dos grupos alimentados com óleo de peixe também foi inferior aos respectivos controles (**C12**: 28 ± 9 ; **T12**: $15 \pm 3,7$; **C20**: 29 ± 10 e **T20**: $15 \pm 4,8$, $p \leq 0,05$) (Fig 10).

6.3.4 O consumo a médio prazo de DHA/EPA reduz o recrutamento de linfócitos T para a próstata de camundongos TRAMP

A próstata ventral dos grupos controles foi caracterizada por uma frequente presença de linfócitos T intra-epiteliais e, em menor frequência, no estroma glandular, sendo que o número de linfócitos T foi proporcional à idade dos animais e severidade da doença, havendo um aumento na população de linfócitos nos grupos C12 ($2,90 \pm 0,70$, $p \leq 0,05$) e C20 ($3,24 \pm 0,44$, $p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo C8 ($1,88 \pm 0,36$ linfócitos). Nos grupos sob dieta com DHA/EPA a população de linfócitos também se mostrou majoritariamente intra-epitelial, de forma que o consumo de PUFA n-3 levou à redução numérica na população de linfócitos T nos grupos T12 ($2,10 \pm 0,43$, $p = 0,0627$ vs C12), contudo, uma redução estatisticamente significativa só foi observada no grupo T20 ($1,96 \pm 0,17$, $p \leq 0,05$ vs C20), igualando ao observado em C8 (Fig 11).

6.4. Discussão

Ao avaliarmos os efeitos do consumo dos PUFA do óleo de peixe DHA/EPA sobre o modelo de câncer de próstata de camundongos TRAMP verificamos a redução da

severidade das PINs e aumento das áreas de epitélio normal na glândula. Além disso, o consumo desses PUFAs manteve os níveis de proliferação celular, a expressão tecidual de AR e GR, bem como a população de linfócitos T na glândula similares ao estágio inicial da doença correspondente à idade de 8 semanas. Em conjunto, esses achados indicam que uma dieta enriquecida com 10% de óleo de peixe (10g/100g ração) reduz a severidade da doença, retardando a progressão do CaP nesse modelo transgênico.

As principais alterações metabólicas resultantes do consumo de PUFAs aqui detectadas foram as reduções dos níveis séricos de colesterol e de triglicerídeos. De fato, o consumo de DHA/EPA tem sido utilizado para redução dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol em quadros de doenças cardiovasculares (ZULIANI et al. 2009; DINICOLANTONIO, O'KEEFE; 2018). Apesar do excesso de lipídeos na dieta ser um indutor de obesidade (PYTLOWANCIV et al., 2016; CALMASINI et al., 2018), isso não ocorreu no caso do óleo de peixe, visto que o peso corporal não foi alterado. Nesse sentido, observa-se além do tempo de administração, a natureza do lipídeo também deve ser levada em consideração. De fato, nossos achados corroboram com estudos anteriores que demonstram efeitos anti-obesogênicos de dietas ricas em DHA/EPA (MINAMI et al., 2002; HIROUCHI et al., 2007; BALAKRISHNAN et al., 2019). Em parte, esse efeito tem sido associado às propriedades anti-adipogênicas desses PUFAs, devido ao aumento na expressão dos genes *Ucp1* (Proteína desacopladora 1), *Ppar γ* (Receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ), *Pgc1 α* (Coativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ) e *Bmp7* (Proteína óssea morfogenética 7), promovendo a diferenciação do tecido adiposo branco em marrom (ZHUANG et al., 2019).

O consumo excessivo de lipídeos está associado ao estabelecimento de quadros de dislipidemia (BASEGGIO et al., 2018; LAMAS et al., 2018). Por sua vez, níveis elevados de triglicérides e/ou colesterol tem sido associados ao aumento no risco de desenvolvimento e/ou recorrência do CaP (ALLOTT et al., 2014; GABITOVA et al., 2014; JAMNAGERWALLA et al., 2018). De fato, 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). Recentemente, foi reportado que o aumento do colesterol sérico está correlacionado positivamente com a proliferação epitelial em camundongos *knockout* para PTEN e com os níveis intra-prostáticos de andrógenos, entre eles, a desidroepiandrosterona, androstenediona e testosterona

(ALLOTT et al., 2018). Aqui detectamos um aumento do colesterol sérico nos animais na 20ª semana de vida, sugerindo haver uma alteração do metabolismo do colesterol no modelo TRAMP ao longo do decorrer da progressão tumoral. O consumo de óleo de peixe foi capaz de reduzir os níveis desse lipídeo e melhorar o perfil histopatológico da próstata ventral dos animais, sugerindo que a modulação do metabolismo lipídico pode ser uma via importante de atraso na progressão tumoral.

A linhagem TRAMP apresenta formas progressivas do CaP durante o envelhecimento, onde se observa um predomínio de tecido normal e LGPIN durante a 8ª semana de vida e um aumento da presença HGPIN entre a 12-16ª semana de vida (KIDO et al., 2016; SILVA et al., 2017; NOGUEIRA-PANGRAZI et al., 2018), sendo que lesões malignas, incluindo o CIT e UAC, são observadas em maior frequência a partir da 18ª semana de idade (BERMAN-BOOTY et al., 2012; KIDO et al., 2016; MATEUS et al., 2019). Assim, o modelo TRAMP vem sendo amplamente empregada na avaliação de novos tratamento para o CaP (MOORE et al., 2016; ALVES et al., 2018; KIDO et al., 2019). Nos últimos anos, interesse crescente tem sido direcionado para as intervenções dietéticas na terapia do câncer (LÉVESQUE et al., 2019), incluindo o CaP (KIM et al., 2014; CONLON et al., 2015), contudo, os efeitos do DHA/EPA ainda são pouco entendidos nesse modelo transgênico (SAW et al., 2011). Foi verificado que o consumo de proporção de PUFAs igual à usada aqui (100g/kg de ração), da 8ª à 22ª semana de vida exerceu efeito protetor contra o CaP em camundongos TRAMP alimentados com dieta hiperlipídicas rica em ácidos graxos saturados e PUFAS n-6, onde os animais apresentaram menores incidências de tumores palpáveis e de metástases (SAW et al., 2011). Esse estudo, contudo, restringiu-se majoritariamente a análises do peso tumoral e da presença de metástases (SAW et al., 2011). Portanto, do melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro relato mais pormenorizado sobre a ação desses PUFAs na progressão do CaP em camundongos TRAMP.

Nossos dados indicam que o atraso na progressão tumoral está associado à redução da proliferação celular e também à alteração da expressão de receptores nucleares, entre eles o AR e o GR. Análises com cultura de células ou tumores xenográficos demonstram que o DHA é capaz de alterar a ativação de vias de proliferação e sobrevivência celular. O consumo de DHA está associado à alteração da localização celular da Akt, bem como a redução da sua ativação (GU et al., 2013). O tratamento de células prostáticas com DHA também leva à redução da fosforilação da Akt/mTOR, reduzindo a proliferação celular

(SHIN et al., 2013; TAMARINDO et al., 2019). Ainda, Oono e colaboradores (2017), demonstraram que o tratamento de células PC3, andrógeno-independentes, com DHA ou EPA além de reduzir proliferação celular é capaz de inibir a migração e invasão celular. Assim, um dos principais mecanismos pelos quais os PUFAs n-3 parecem atrasar a carcinogênese prostática é pela modulação de vias de sobrevivência e proliferação celular.

A hipertrofia do estroma, caracterizada pelo aumento da expressão α SMA e de colágeno, aqui observado, 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 e na modulação da atividade proliferativa (YU et al., 2011; MONTICO et al., 2015). Assim, propõe-se que a remodelação tecidual pode representar uma resposta adaptativa frente ao estabelecimentos de lesões na glândula (TUXHORN et al., 2002). Estudos demonstram que o DHA é capaz de reduzir a expressão de α SMA em modelo de hiperplasia prostática benigna (HBP) (WANG et al., 2016) e de reduzir a ativação de fibroblastos estimulados pelo fator de crescimento transformante β (TGF- β) (BIANCHINI et al., 2012; ZENG et al., 2017), Assim, nossos dados em conjunto com a literatura sugerem que o consumo de PUFAs da série marinha é capaz de levar à preservação do ambiente estromal, processo que contribui para o atraso da progressão tumoral.

Em condições normais a expressão do AR é importante para manutenção da morfofisiologia prostática (PRINS et al., 2008), contudo sabe-se que a hiperexpressão desse receptor é evento crítico para a patogênese do CaP (ZHOU et al., 2015). Durante a progressão do CaP em humanos e no modelo TRAMP, observa-se o aumento gradativo na expressão do AR, que correlaciona-se com a severidade da doença (HUSAIN et al., 2016; FRENEDOSO et al., 2017), corroborando com os nossos achados. A manutenção da expressão do AR (YUAN et al., 2014), nos casos de câncer de próstata resistente à castração (CRPC), já se mostrou importante para sensibilizar esse receptor a baixas doses de andrógenos sintetizados pela própria glândula (LOCKE et al., 2008). Ainda, Niu e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos TRAMP *knockout* para AR, nas células epiteliais e estromais, apresentam um menor crescimento tumoral, efeito que foi associado a menor proliferação celular e menor capacidade invasiva, fato que destaca o protagonismo desse receptor na iniciação e progressão do CaP. Aqui, observamos que o

atraso na progressão causado pelo consumo de PUFA's n-3 foi associado com a redução da expressão epitelial e estromal do AR. O consumo de DHA/EPA tem sido relacionado com redução da expressão do AR em modelo de camundongo C3(1) Tag (AKINSETE et al., 2012) e em camundongos *knockout* para PTEN (WANG et al., 2012). Neste último caso, constatou-se a redução da expressão proteica de AR por promover sua degradação proteossomal (WANG et al., 2012). Portanto, a modulação da sinalização androgênica decorrente do consumo desses lipídeos é um mecanismo efetivo que leva ao atraso da progressão do CaP (CHUNG et al., 2001; AKINSETE et al., 2012; WANG et al., 2012; HU et al., 2015).

Apesar do AR apresentar um protagonismo na iniciação e progressão do CaP, sabe-se que indivíduos sob terapias de ablação androgênica (ADT) muitas vezes apresentam a evolução do quadro para um fenótipo resistente (i.e., CRPC) (MUSIAŁA et al., 2019), onde se observa a desregulação na expressão de inúmeros receptores nucleares, entre eles o GR (LEACH et al., 2006). O GR é um membro da família de receptores nucleares envolvidos na sinalização de hormônios esteroides e apresenta alta semelhança com o AR, de modo que ambos reconhecem motivos de ligação ao DNA semelhantes (SHAFFER et al., 2004), o que sugere um possível papel do GR na carcinogênese prostática. A indução de resistência à ADT em células prostáticas com o uso de anti-androgênicos demonstrou que o GR é hiperexpresso após a inibição do AR, evento importante para a sobrevivência celular (PUHR et al., 2018). A hiperexpressão e ativação do GR no contexto do CRPC é responsável por levar a reexpressão de aproximadamente 50% de genes regulados por andrógenos (ARORA et al., 2013), dentre eles, o antígeno prostático específico (PSA) (ISIKBAY et al., 2014). Ainda, células resistentes à castração apresentam a perda da expressão da enzima 11 β -hidroxisteróide desidrogenase II (11 β -HSDII), responsável pela conversão do cortisol, em humanos, e da corticosterona, em roedores, em suas formas inativas, mantendo a progressão tumoral pela manutenção da ativação do GR (LI et al., 2017). Até o momento, não há nenhum relato da expressão do GR em camundongos TRAMP, dessa forma, nossos dados demonstraram não haver alteração na expressão epitelial desse receptor, contudo, um aumento na expressão estromal é observado entre a 12-22ª semana de vida, de forma que a dieta rica em PUFA's n-3 foi capaz de prevenir o aumento na expressão desse receptor tanto no compartimento epitelial quanto estromal. De fato, Zhao e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos *knockout* para o GR no

compartimento estromal apresentam redução na proliferação epitelial, sugerindo um papel importante desse receptor na sinalização parácrina no microambiente prostático (SIMANAINEN et al., 2011; ZHAO et al., 2014). Assim, o aumento da expressão estromal do GR durante a progressão do CaP pode representar um evento importante para a aquisição de um fenótipo andrógeno-independente e para evolução da doença à quadros mais agressivos. Portanto, composto que tenham a capacidade de intervir na expressão e/ou ativação do GR podem vir a exercer um papel terapêutico no CaP (KACH et al., 2017).

Estudos recentes têm focado em buscar tratamentos para o CaP com base em compostos anti-inflamatórios (KIDO et al., 2016) e anti-angiogênicos (SILVA et al., 2017, 2019) os quais foram capazes de atrasar a progressão tumoral em camundongos TRAMP. Os PUFAs n-3 são conhecidos por sua potente ação anti-inflamatória (ZÁRATE et al., 2017), de forma que o consumo de DHA/EPA é responsável por reduzir a expressão do fator nuclear de transcrição NF- κ B e de seus genes alvos, levando ao atraso da progressão tumoral (CAVAZOS et al., 2011). As variações nas populações de linfócitos no microambiente tumoral também vem sendo amplamente investigadas e estudos com câncer de mama mostram que esse parâmetro imunológico tem alta relevância clínica no que diz respeito ao prognóstico (DAVIDSSON et al., 2013; SIEGAL; WEI, 2017). 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). Sabe-se que a ativação de linfócitos T CD4+ é altamente dependente do estabelecimento de domínios de membrana (SCHIEFFER et al., 2014). O consumo de EPA e DHA é responsável por induzir alterações na formação desses domínios em humanos e camundongos (HOU et al., 2016; FAN et al., 2018), modulando a dinâmica do citoesqueleto por diminuir as atividades das GTPases Rho, Rhoa e Rac1 e, assim, reduzindo a mobilidade celular (CUCCHI et al., 2019). Assim, nossos dados estão de acordo com a literatura, visto que observamos redução no recrutamento de linfócitos T na próstata de camundongos alimentados com a dieta enriquecida com PUFAs n-3. Esses achados também levantam uma nova via modulatória para a ação anti-inflamatória do DHA/EPA no CaP, cujos mecanismos merecem ser melhor investigados.

Nossos resultados demonstraram que a intervenção dietética com óleo de peixe, uma fonte rica em DHA e EPA, em camundongos TRAMP é capaz de atrasar a progressão tumoral em curto e médio prazo. Baseado em nossos achados, concluímos que o atraso

na progressão é resultante da diminuição da proliferação celular, modulação da expressão tecidual dos receptores nucleares AR e GR, redução no recrutamento de linfócitos T e melhora no perfil metabólico dos animais. Assim, os dados obtidos são relevantes para destacar que intervenções dietéticas são importantes para modular a progressão tumoral e podem vir a ser usadas com adjuvante terapêutico ou em novas abordagens terapêuticas para o câncer, contudo, mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos pelos quais o consumo de EPA e DHA afeta a progressão tumoral e seu possível papel quimioprotetor no CaP.

Referências

- AKINSETE, J. A.; ION, G.; WITTE, T. R.; HARDMAN, W. E. Consumption of high w-3 fatty acid diet suppressed prostate tumorigenesis in C3(1) Tag mice. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 140–148, 2012.
- ALLOTT, E. H.; HOWARD, L. E.; COOPERBERG, M. R.; 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.; MASKO, E. M.; FREEDLAND, A. R.; et al. Serum cholesterol levels and tumor growth in a PTEN-null transgenic mouse model of prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, 2018.
- ALVES, L. F.; SILVA, R. F. DA; CAGNON, V. H. A. Nintedanib effects on delaying cancer progression and decreasing COX-2 and IL-17 in the prostate anterior lobe in TRAMP mice. **Tissue and Cell**, v. 50, n. December 2017, p. 96–103, 2018.
- ARCIDIACONO, B.; IIRITANO, S.; NOCERA, A.; et al. Insulin Resistance and Cancer Risk : An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.
- ARORA, V. K.; SCHENKEIN, E.; MURALI, R.; et al. Glucocorticoid Receptor Confers Resistance to Antiandrogens by Bypassing Androgen Receptor Blockade. **Cell**, v. 155, n. 6, p. 1309–1322, 2013.
- BALAKRISHNAN, J.; DHAVAMANI, S.; SADASIVAM, S. G.; et al. Omega-3-rich Isochrysis sp. biomass enhances brain docosahexaenoic acid levels and improves serum lipid profile and antioxidant status in Wistar rats. **J Sci Food Agric.**, v. 13, 2019.
- BASEGGIO, A. M.; NUÑEZ, C. E. C.; DRAGANO, N. R. V.; et al. Jaboticaba peel extract suppress autophagy in white adipose tissue and prevents metabolic disorders in mice fed with a high-fat diet. **Biochemical Pharmacology**, 2018.
- BERMAN-BOOTY, L. D.; SARGEANT, A. M.; ROSOL, T. J.; et al. A Review of the Existing Grading Schemes and a Proposal for a Modified Grading Scheme for Prostatic Lesions in TRAMP Mice. **Toxicology Pathology**, v. 40, p. 5–17, 2012.
- BIANCHINI, F.; GIANNONI, E.; SERNI, S.; CHIARUGI, P.; CALORINI, L. 22:6n-3 DHA inhibits differentiation of prostate fibroblasts into myofibroblasts and tumorigenesis. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2129–2137, 2012.
- BJORNSTAD, P.; ECKEL, R. H. Pathogenesis of Lipid Disorders in Insulin Resistance: A Brief Review. **Curr Diab Rep.**, v. 18, n. 12, 2019.
- CALMASINI, F. B.; OLIVEIRA, M. G. DE; ALEXANDRE, E. C.; et al. Obesity-induced mouse benign prostatic hyperplasia (BPH) is improved by treatment with resveratrol: implication of oxidative stress, insulin sensitivity and neuronal growth factor. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 55, p. 53–58, 2018.
- CAVAZOS, D. A.; PRICE, R. S.; APTE, S. S.; LINDA, A. 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.
- CONLON, L. E.; WALLIG, M. A.; ERDMAN, J. W. Low-lycopene containing tomato

powder diet does not protect against prostate cancer in TRAMP mice. **Nutrition Research**, v. 35, n. 10, p. 882–890, 2015.

CUCCHI, D.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; CERTO, M.; 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**, p. 1–15, 2019.

DAVIDSSON, S.; OHLSON, A.; ANDERSSON, S.; et al. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3⁺ regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. **Modern Pathology**, p. 448–455, 2013.

FAN, Y.; FUENTES, N. R.; HOU, T. Y.; et al. Remodelling of primary human CD4⁺ T cell plasma membrane order by n-3 PUFA. **British Journal of Nutrition**, p. 163–175, 2018.

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

GU, Z.; WU, J.; WANG, S.; 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.

HIROUCHI, B. U. S.; AGAO, K. O. J. I. N.; NOUE, N. A. O. I.; et al. Effect of Dietary Omega 3 Phosphatidylcholine on Obesity-Related Disorders in Obese Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7170–7176, 2007.

HOU, T. Y.; BARHOUMI, R.; FAN, Y.; et al. n-3 polyunsaturated fatty acids suppress CD4⁺ T cell proliferation by altering phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate [PI(4,5)P₂] organization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 1, p. 85–96, 2016.

HU, Z.; QI, H.; ZHANG, R.; 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.

ISIKBAY, M.; OTTO, K.; KREGEL, S.; CONZEN, S. D.; SZMULEWITZ, R. Z. Glucocorticoid Receptor Activity Contributes to Resistance to Androgen-Targeted Therapy in Prostate Cancer. **HORM CANC**, p. 72–89, 2014.

JAMNAGERWALLA, J.; HOWARD, L. E.; ALLOTT, E. H.; et al. Serum cholesterol and risk of high-grade prostate cancer: results from the REDUCE study. **Prostate Cancer Prostatic Dis.**, v. 21, n. 2, p. 252–259, 2018.

KACH, J.; LONG, T. M.; SELMAN, P.; et al. Selective Glucocorticoid Receptor Modulators (SGRMs) Delay Castrate-Resistant Prostate Cancer Growth. **AACR**, v. 16, n. August, p. 1680–1693, 2017.

KIDO, L. A.; ALMEIDA, C. DE; ROBERTO, M.; et al. Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) model: A good alternative to study PCa progression and chemoprevention approaches. **Life Sciences**, v. 217, n. November 2018, p. 141–147, 2019.

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

KIM, H.; YOKOYAMA, W.; DAVIS, P. A. TRAMP Prostate Tumor Growth Is Slowed

by Walnut Diets Through Altered IGF-1 Levels, Energy Pathways, and Cholesterol Metabolism 1. **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**, v. 17, n. 12, p. 1281–1286, 2014.

KLAFKE, J. Z.; PORTO, F. G.; BATISTA, R.; 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.

LAMAS, C. A.; LENQUISTE, S. A.; BASEGGIO, A. M.; et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. June, p. 434–446, 2018.

LEACH, D. A.; POWELL, S. M.; BEVAN, C. L. New roles for nuclear receptors in prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, 2006.

LÉVESQUE, S.; POL, J. G.; FERRERE, G.; GALLUZZI, L.; ZITVOGEL, L. Trial watch: dietary interventions for cancer therapy. **OncoImmunology**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2019.

LI, J.; ALYAMANI, M.; ZHANG, A.; et al. Aberrant corticosteroid metabolism in tumor cells enables GR takeover in enzalutamide resistant prostate cancer. **eLIFE**, p. 1–17, 2017.

LLOYD, J. C.; MASKO, E. M.; WU, C.; et al. Fish oil slows prostate cancer xenograft growth relative to other dietary fats and is associated with decreased mitochondrial and insulin pathway gene expression. **Prostate Cancer and Prostatic Disease**, v. 16, n. 4, p. 285–291, 2013.

LOCKE, J. A.; GUNS, E. S.; LUBIK, A. A.; et al. Androgen Levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 15, p. 6407–6415, 2008.

MATEUS, P. A. M.; KIDO, L. A.; SILVA, R. S.; CAGNON, V. H. A.; MONTICO, F. 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.

MERCADER, M.; BODNER, B. K.; MOSER, M. T.; 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.

MINAMI, A.; ISHIMURA, N.; SAKAMOTO, S.; et al. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v . oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 157–162, 2002.

MONTICO, F.; KIDO, L. A.; MARTIN, R. S.; ROWLEY, D. R.; CAGNON, H. A. Reactive Stroma in the Prostate During Late Life : The Role of Microvasculature and Antiangiogenic Therapy Influences. **Prostate**, v. 1661, p. 1643–1661, 2015.

MOORE, R. W.; FRITZ, W. A.; SCHNEIDER, A. J.; et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin has both pro-carcinogenic and anti-carcinogenic effects on neuroendocrine prostate carcinoma formation in TRAMP mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 305, p. 242–249, 2016.

MUSIAŁA, N.; OSOWSKA, I.; SZOSTAK, M. Previous , Current , and Future

Pharmacotherapy and Diagnosis of Prostate Cancer — A Comprehensive Review. **Diagnostics**, 2019.

NIU, Y.; ALTUWAIJRI, S.; YEH, S.; et al. Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. **PNAS**, 2008.

NOGUEIRA-PANGRAZI, E.; SILVA, R. F.; KIDO, L. A.; MONTICO, F.; CAGNON, H. A. Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial- stromal interaction balance. **Cell Biology International**, v. 42, p. 153–168, 2018.

OONO, K.; TAKAHASHI, K.; SUKEHARA, S.; et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Molecular and Clinical Oncology**, p. 217–220, 2017.

PRINS, G. S.; PUTZ, O.; BMP, Á. B. Á.; WNT, Á. T. Á. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, p. 641–659, 2008.

PUHR, M.; HOEFER, J.; EIGENTLER, A.; et al. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. **AACR**, , n. 18, p. 927–939, 2018.

PYTLOWANCIV, E. Z.; PINTO-FOCHI, M. E.; REAME, V.; 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.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; JR, G. C. F. AIN-93 Purified Diet for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**, 1993.

SAW, C. L. L.; WU, T. Y.; PAREDES-GONZALEZ, X.; et al. Pharmacodynamics of fish oil: Protective effects against prostate cancer in TRAMP mice fed with a high fat western diet. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 12, p. 3331–3334, 2011.

SCHIEFFER, D.; NAWARE, S.; BAKUN, W.; BAMEZAI, A. K. Lipid raft-based membrane order is important for antigen-specific clonal expansion of CD4 + T lymphocytes. **bmc Immunology**, p. 1–13, 2014.

SHAFFER, P. L.; JIVAN, A.; DOLLINS, D. E.; CLAESSENS, F.; GEWIRTH, D. T. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. **PNAS**, p. 1–6, 2004.

SHIN, S.; JING, K.; JEONG, 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.

SIEGAL, G. P.; WEI, S. The CD4 / CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in. **Human Pathology**, v. 69, p. 110–117, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2020. **CA Cancer J Clin** 2020;70:7–30, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SILVA, R. F. DA; BANZATO, T. P.; ALVES, L. F.; et al. Antiangiogenic therapy with Nintedanib affects hypoxia , angiogenesis and apoptosis in the ventral prostate of TRAMP animals. **Cell and Tissue Research**, 2019. Cell and Tissue Research.

SILVA, R. F. DA; NOGUEIRA-PANGRAZI, E.; KIDO, L. A.; et al. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). **Journal of Biomedical Science**, p. 1–19, 2017. Journal of Biomedical Science.

SIMANAINEN, U.; LAMPINEN, A.; HENNEICKE, H.; et al. Long-T erm CorticosteroneT reatment Induced Lobe-Specific Pathology in Mouse Prostate. **The Prostate**, v. 297, 2011.

TAMARINDO, G. H.; RIBEIRO, D. L.; GOBBO, M. G.; 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**, 2019.

TUXHORN, J. A; AYALA, G. E.; SMITH, M. J.; et al. Reactive Stroma in Human Prostate Cancer: Induction of Myofibroblast Phenotype and Extracellular Matrix Remodeling Reactive Stroma in Human Prostate Cancer: Induction of Myofibroblast Phenotype and Extracellular. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. September, p. 2912–2923, 2002.

VENDRAMINI-COSTA, B.; SILVA, R. S.; KIDO, L. A.; 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.

WANG, C.; LUO, F.; ZHOU, Y.; 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, S.; WU, J.; SUBURU, J.; et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on castration-resistant Pten-null prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 404–412, 2012.

YU, S.; ZHANG, C.; LIN, C. C.; 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, X.; CAI, C.; CHEN, S.; et al. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. **Oncogene**, v. 33, n. 22, p. 2815–2825, 2014.

ZÁRATE, R.; JABER-VAZDEKIS, N. EL; TEJERA, N.; PÉREZ, J. A.; RODRÍGUEZ, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 25, 2017.

ZENG, Z.; YANG, H.; WANG, Y.; et al. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Attenuate Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis Involving MTORC2 Signaling Suppression. **Scientific Reports**, , n. April, 2017.

ZHAO, B.; CHOI, J. P.; JAEHNE, M.; et al. Glucocorticoid Receptor in Prostate Epithelia is not Required for Corticosteroid-Induced Epithelial Hyperproliferation in the Mouse

Prostate. **The Prostate**, v. 1078, n. February, p. 1068–1078, 2014.

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.

ZHUANG, P.; LU, Y.; SHOU, Q.; et al. Differential Anti-Adipogenic Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Obesity. **Molecular Nutrition**, v. 1801135, p. 1–11, 2019.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir:

(I) O consumo de DHA/EPA é capaz de reduzir a severidade do câncer de próstata, atrasando a progressão tumoral na próstata ventral de camundongos TRAMP.

(II) O atraso da progressão tumoral está envolvido com modulação da atividade proliferativa na glândula, mantendo a densidade de células em proliferação semelhante a observada nos animais de oito semanas, estágio que corresponde aos estágios iniciais da carcinogênese.

(III) A intervenção dietética com DHA/EPA mantém a expressão tecidual de AR e GR no compartimento epitelial e estromal, levando a um perfil de expressão semelhantes aos animais de oito semanas, evitando assim o aumento que ocorre com a progressão tumoral.

(IV) O óleo de peixe, quando consumido a médio prazo (três meses), é capaz de reduzir o recrutamento de linfócitos na próstata ventral de camundongos TRAMP.

(V) O DHA/EPA modula o perfil metabólico dos animais, reduzindo os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, assemelhando-se aos animais de oito semanas nos estágios iniciais da carcinogênese.

Tabelas

Tabela 1. Composição nutricional* do óleo de peixe utilizado na formulação da ração enriquecida com DHA/EPA.

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

*Referente a três cápsulas (3g)

Fonte: Naturalis®.

Tabela 2. Informações nutricionais das dietas utilizadas.

	Dieta padrão		Dieta ômega-3	
	g/100g	Kcal/100g	g/100	Kcal/100g
Caseína	20	80	20	80
Amido de milho	52,474	52,474	42,474	42,474
Sacarose	10	40	10	40
Óleo de soja	7	63	7	63
Óleo de peixe	-	-	10	90
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	-
BHT	0,476	-	0,476	-
Total	100	235,474	100	315,474

Fonte: REEVES et al, 1993.

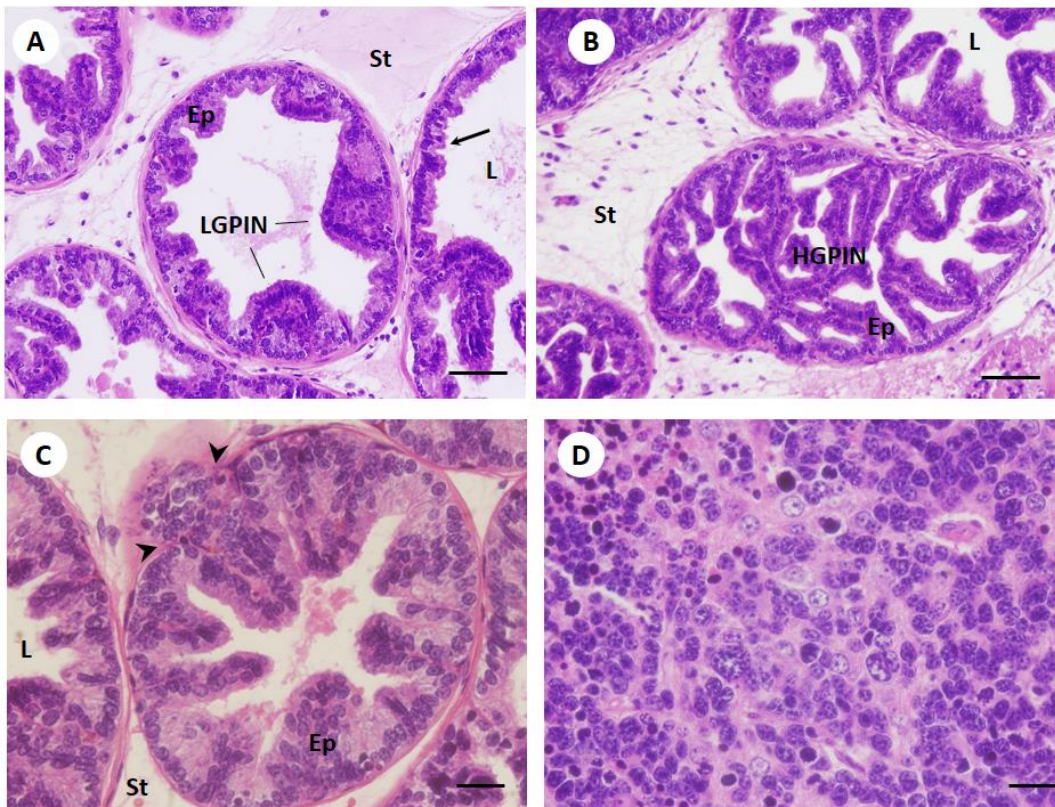
Tabela 3. Características gerais dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

	Espécie hospedeira	Especificidade ao epítipo	Fornecedor	Código	Diluição
AR	Coelho	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-816	1:75 em BSA 1%
GR	Coelho	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-1004	1:75 em BSA 1%
CD3	Coelho	Monoclonal	Abcam	ab16669	1:100 em BSA 1%
PHH3	Coelho	Policlonal	Cell Signaling Technology	#97015	1:75 em BSA 1%
αSMA	Camundongo	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-32251	1:100 em BSA 1%

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

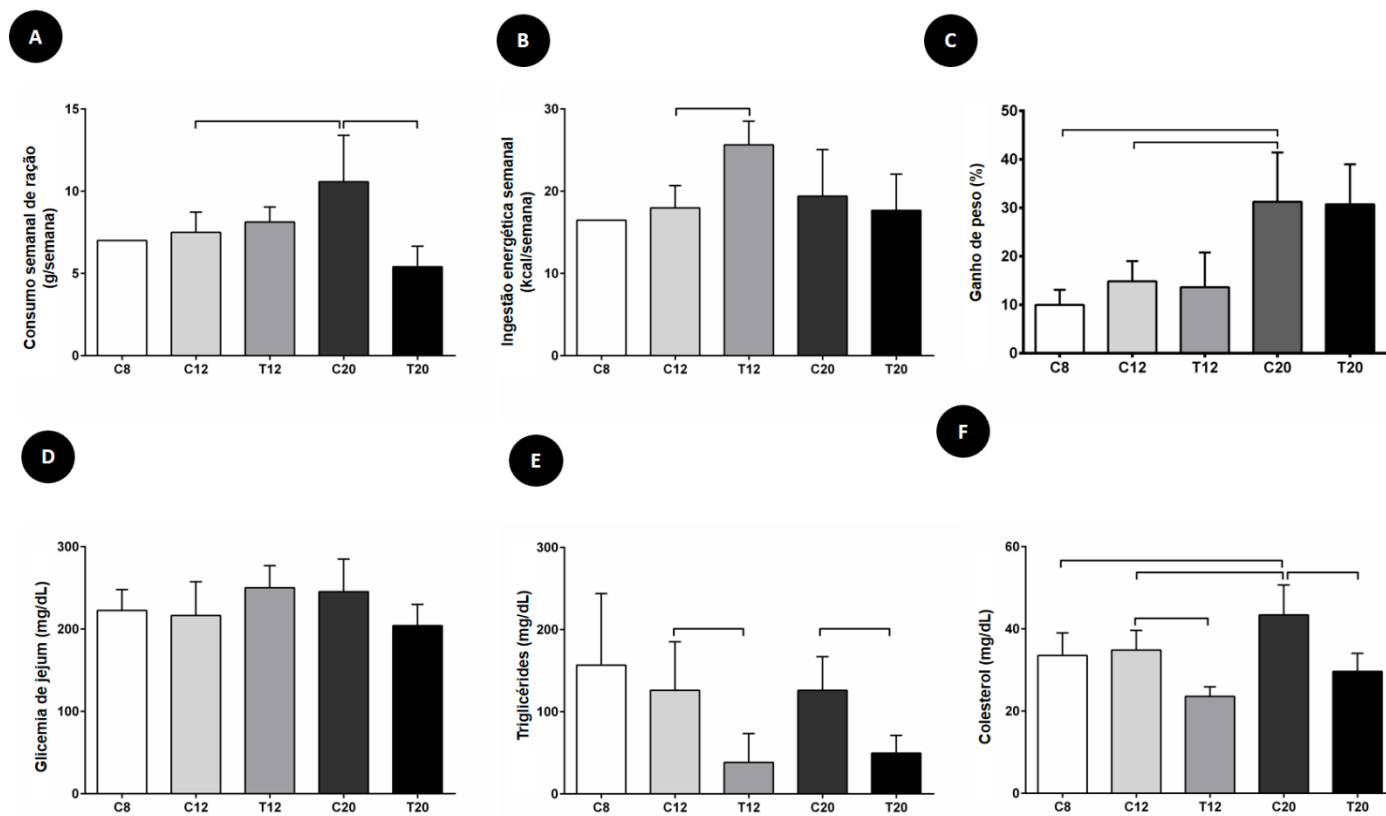
Imagens

Figura 1. Fotomicrografias representando os diferentes tipos de lesões encontradas na próstata ventral de camundongos TRAMP. (A) Região de tecido normal caracterizada por epitélio simples colunar (seta) e neoplasia intra-epitelial prostática de baixo grau (LGPIN). (B) Neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HGPIN). (C) Carcinoma *in situ*, cabeças de seta indicam região de ruptura da membrana basal (CIT). (D) Adenocarcinoma indiferenciado. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: A, C-D: 25µm e B: 50µm.



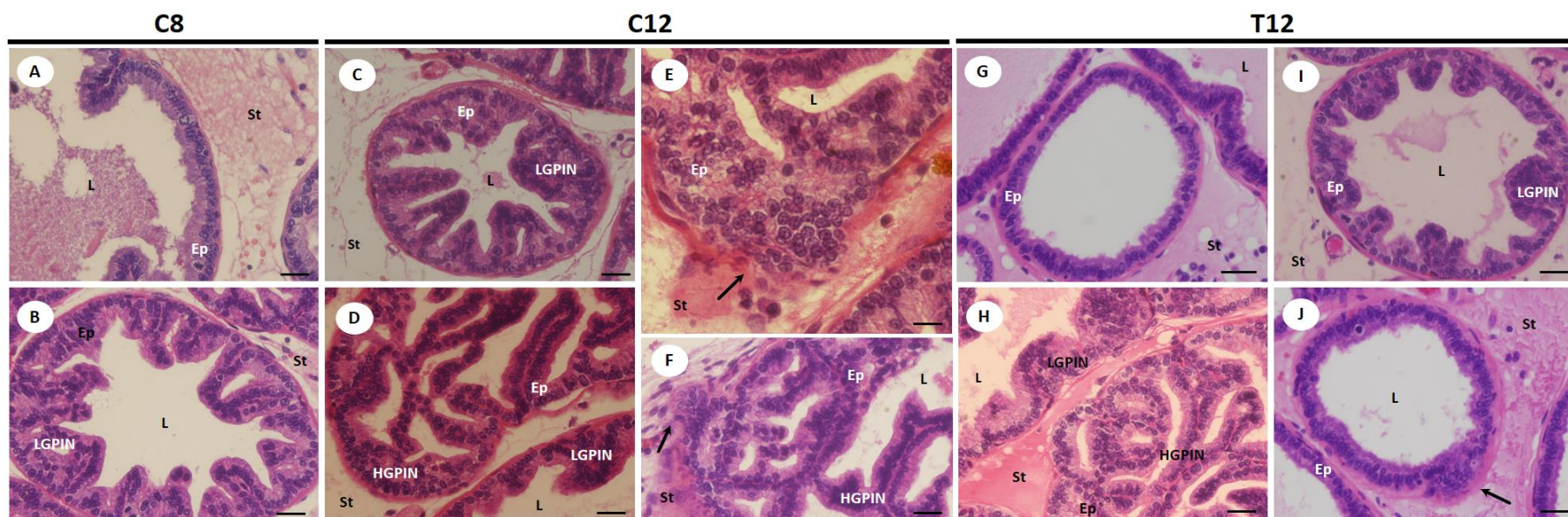
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2. Parâmetro biométricos e fisiológicos de camundongos TRAMP. (A) Consumo semanal de ração. (B) Ingestão calórica semanal (C) Ganho de peso. (D) Glicemia de jejum. (E) Triglicérides sérico. (F) Colesterol sérico. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 7. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$



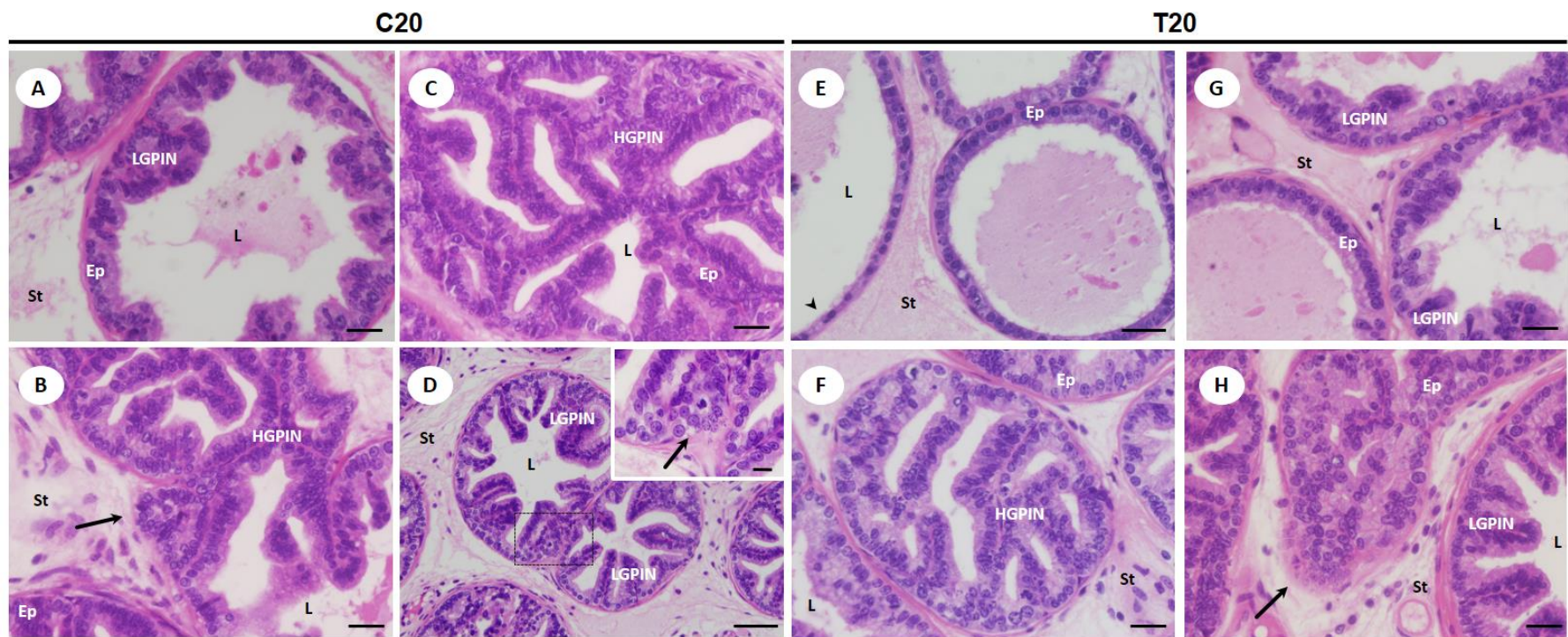
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3. Fotomicrografias da próstata ventral de camundongos TRAMP. **C8 (A-B):** Ácinos apresentando epitélio glandular composto por células colunares, dobras epiteliais e LGPIN. **C12 (C-G):** Presença de LGPIN, HGPIN e invasão das células epiteliais no estroma adjacente (CIT, seta). **T12 (H-K):** Aumento da proporção de tecido normal, ocorrência de lesões proliferativas como LGPIN e HGPIN e presença de CIT (seta). Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Escalas: A-G, I-K: 25µm, H: 50µm.



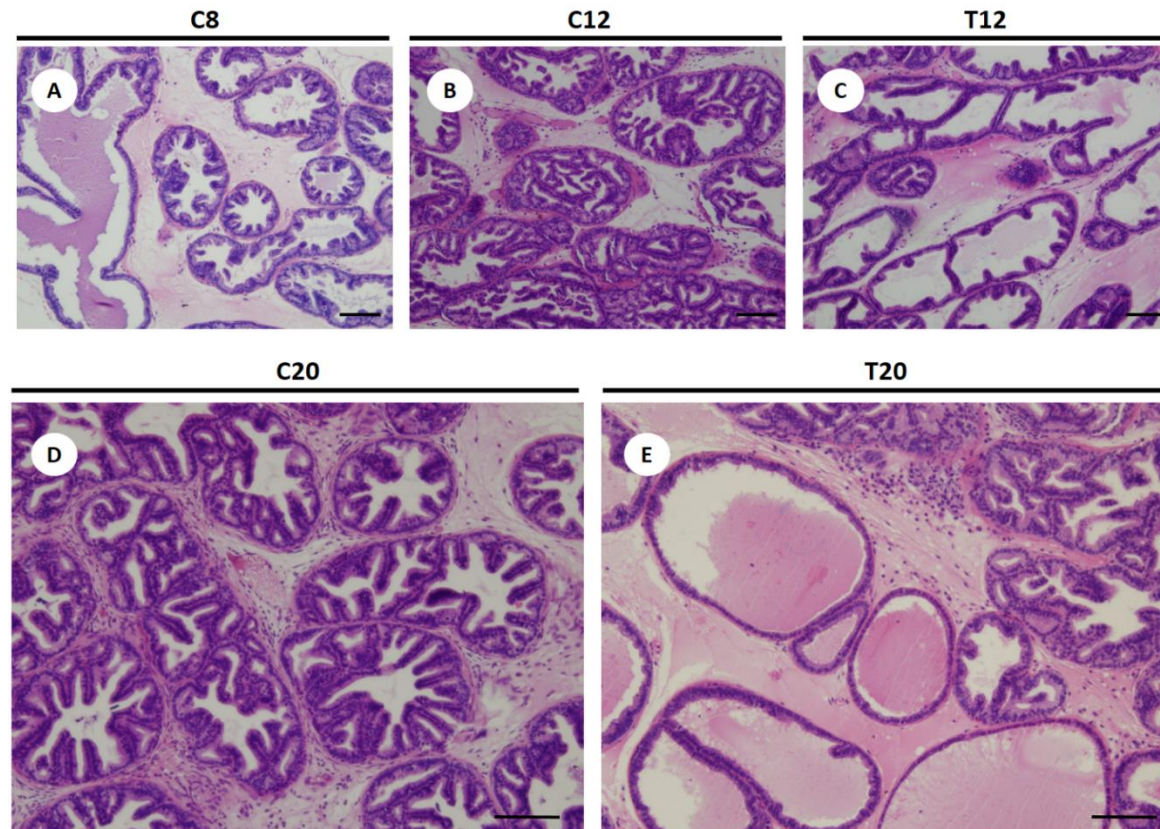
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4. Fotomicrografias da próstata ventral de camundongos TRAMP. **C20 (A-D):** Ácinos apresentando diferentes graus de lesões proliferativas, como LGPIN, HGPIN e CIT. **T20 (E-H):** Aumento da proporção de epitélio normal (E) e menor ocorrência de lesões proliferativas (F-H). As setas indicam a ocorrência de CIT e a cabeça de seta área de atrófica epitelial. Ep: epitélio; St: estroma; L: lúmen. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Escalas: A-D, F-H 25µm, E: 50µm, inset: 10µm.



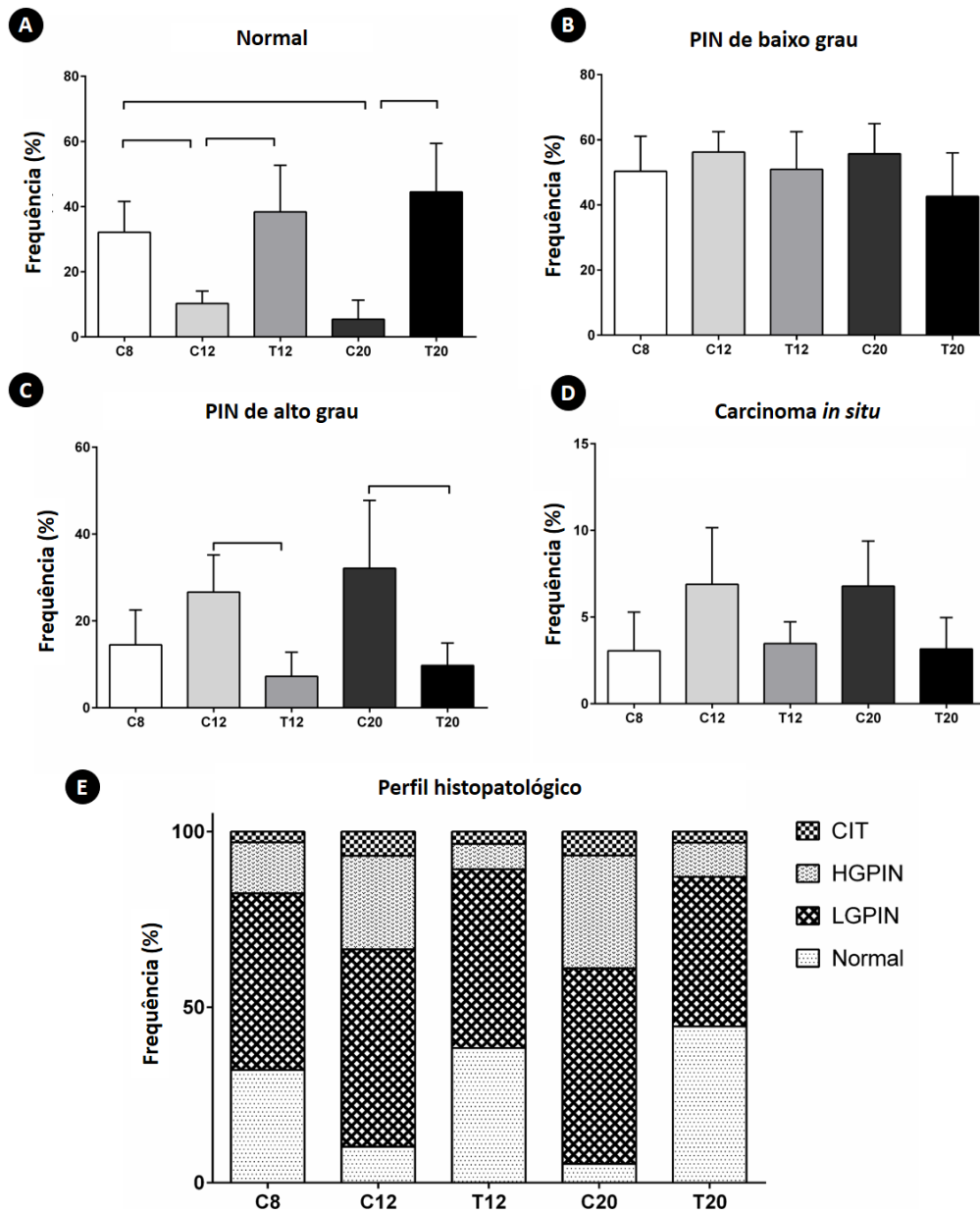
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5. Fotomicrografias representando o fenótipo geral da próstata ventral de camundongos TRAMP. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 50µm.



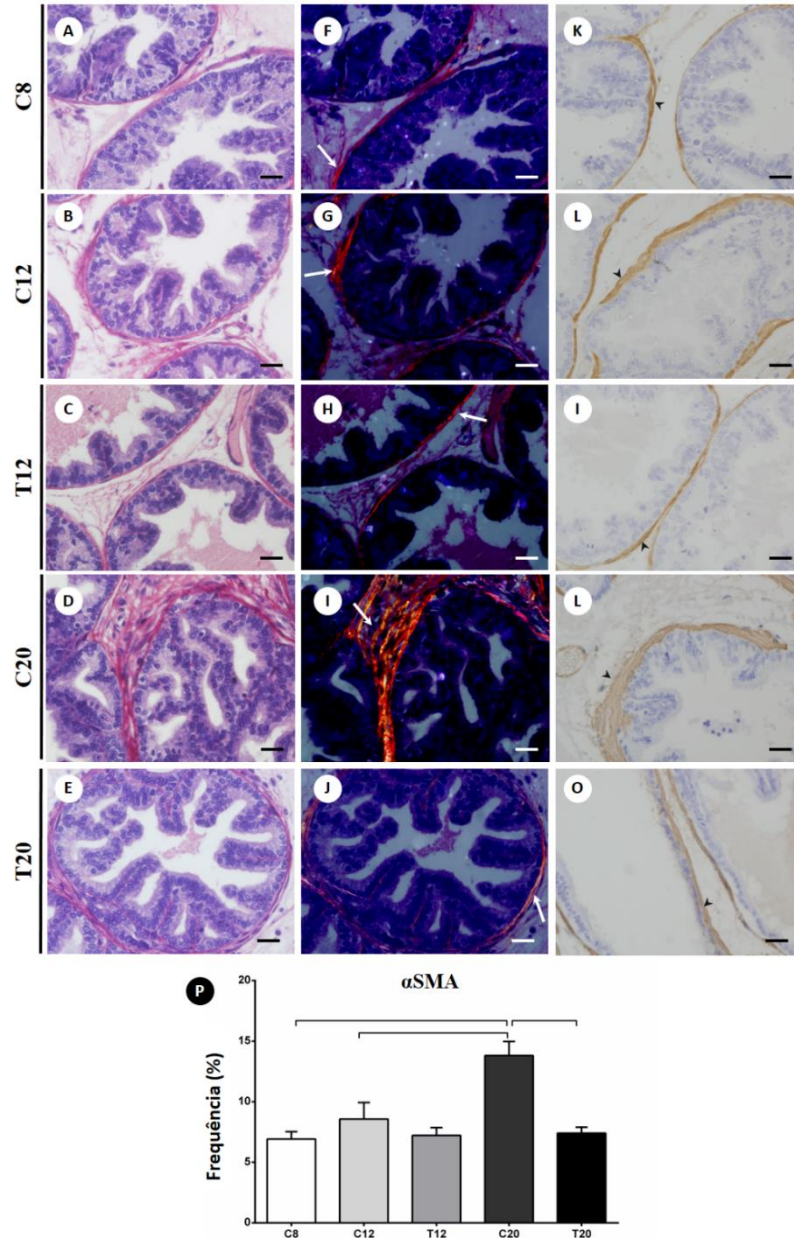
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6. Análise histopatológica da próstata ventral de camundongos TRAMP. (A) Epitélio normal, (B) LGPIN, (C) HGPIN, (D) CIT e (E) perfil histopatológico encontrado nos grupos experimentais. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$.



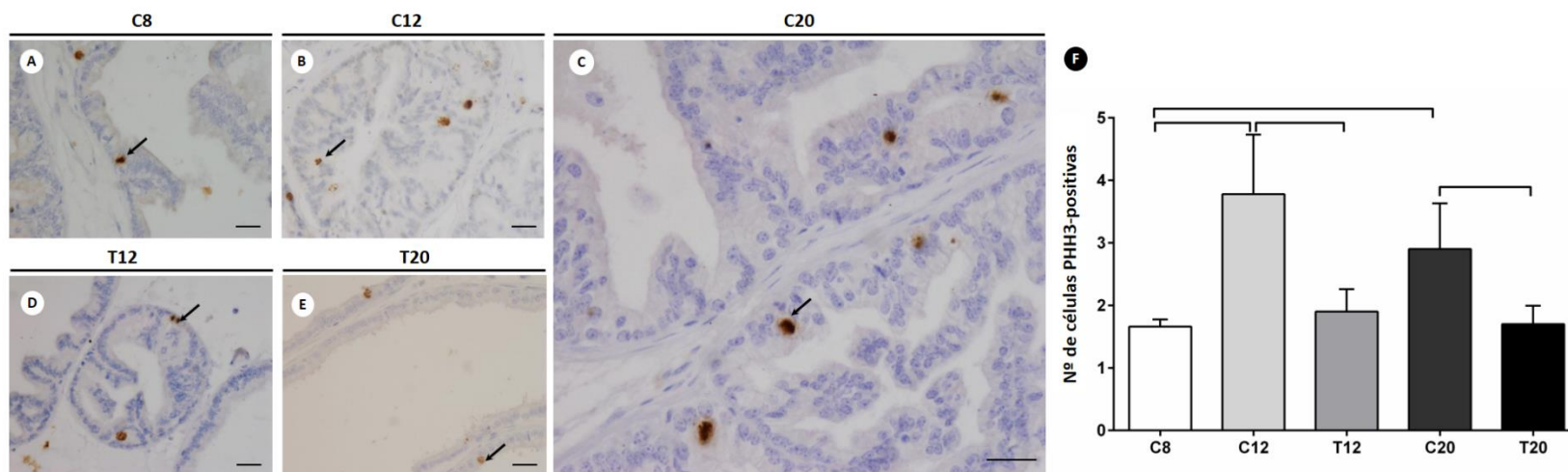
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7. Análise do ambiente estromal. (A-E) Picrossírius-Hemataxolina. (F-J) Picrossírius-Hematoxilina sob luz polarizada. (K-O) Imuno-histoquímica para a expressão tecidual de α SMA e (P) quantificação da imunorreatividade para α SMA. Setas brancas indicam a deposição de colágeno peri-acinar e cabeças de seta indicam reatividade para α SMA. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$. Escala: 25 μ m.



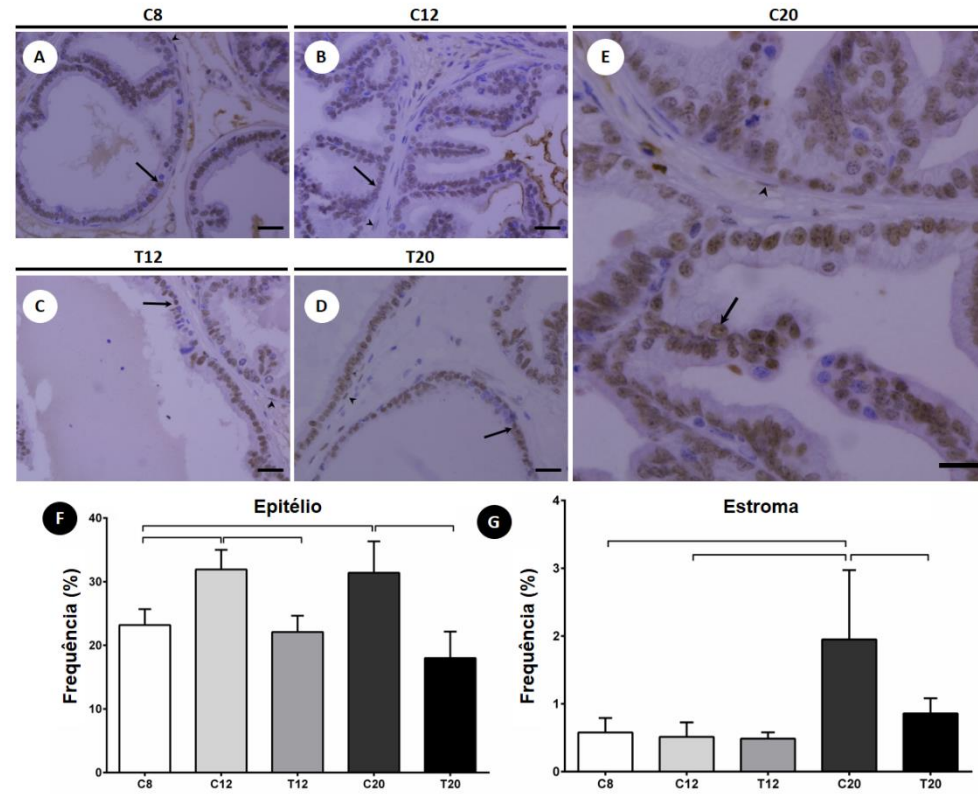
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8. Análise da proliferação celular na próstata ventral de camundongos TRAMP. Imuno-histoquímica para a expressão tecidual de PHH3, setas indicam células positivas (A-E), e quantificação do número de células de PHH3-positivas (F). Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$. Escala: 25 μ m.



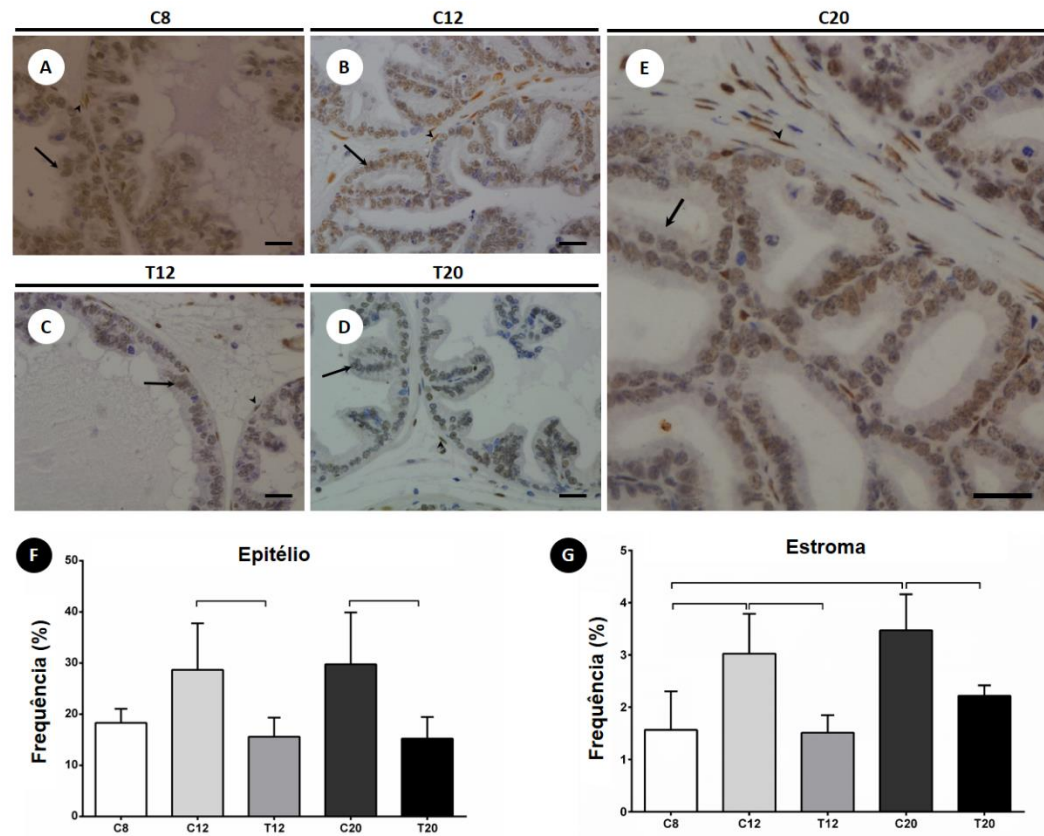
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9. Análise da Expressão tecidual do AR. Na imuno-histoquímica para o AR (A-E) as células que expressam esse receptor aparecem em castanho. Setas e cabeças de seta pretas indicam respectivamente as células positivas no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação da expressão epitelial (F) e estromal (G) do AR. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$. Escala: 25 μ m.



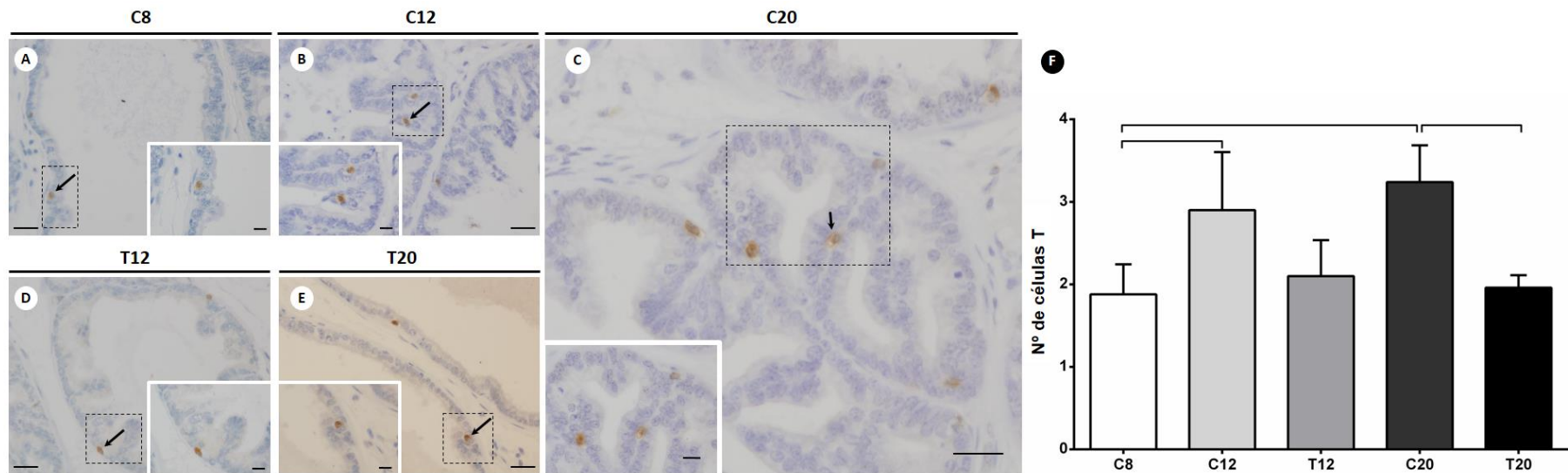
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10. Análise da Expressão tecidual do GR. Na imuno-histoquímica para o GR (A-E) as células que expressam esse receptor aparecem em castanho. Setas e cabeças de seta pretas indicam respectivamente as células positivas no compartimento epitelial e estromal, respectivamente. Quantificação da expressão epitelial (F) e estromal (G) do GR. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$. Escala: 25 μ m.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11. Efeitos do consumo de PUFA n-3 no número de linfócitos T na próstata ventral de camundongos TRAMP (A-E) e quantificação (F) das células CD3-positivas, indicadas pelas setas. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n = 5. Barras indicam diferença estatística entre os grupos experimentais, $p \leq 0,05$. Escala: 25 μ m, inset: 10 μ m.



Fonte: Elaborado pelo autor.

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 of North America**, v. 43, n. 3, p. 279–288, 2016.

ABBOTT, S. K.; ELSE, P. L.; ATKINS, T. A.; HULBERT, A. J. Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, n. 5, p. 1309–1317, 2012.

AKINSETE, J. A.; ION, G.; WITTE, T. R.; HARDMAN, W. E. Consumption of high ω -3 fatty acid diet suppressed prostate tumorigenesis in C3(1) Tag mice. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 140–148, 2012.

ALEX, A. B.; PAL, S. K.; AGARWAL, N. CYP17 inhibitors in prostate cancer : latest evidence and clinical potential. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, p. 267–275, 2016.

ALVES, L. F.; SILVA, R. F. DA; CAGNON, V. H. A. Nintedanib effects on delaying cancer progression and decreasing COX-2 and IL-17 in the prostate anterior lobe in TRAMP mice. **Tissue and Cell**, v. 50, n. December 2017, p. 96–103, 2018.

BHANDARKAR, N. S.; KUMAR, S. A.; MARTIN, J.; BROWN, L.; PANCHAL, S. K. Attenuation of Metabolic Syndrome by EPA/DHA Ethyl Esters in Testosterone-Deficient Obese Rats. **Marine drugs**, v. 182, n. 16, p. 1–22, 2018.

BRASKY, T. M.; TILL, C.; WHITE, E.; 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.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; et al. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CANCER J CLIN**, v. 68, p. 394–424, 2018.

BURDGE, G. C.; WOOTTON, S. A. Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 04, p. 411, 2002..

BURDGE, G.; CALDER, P. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, p. 581–597,

2005.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. SUPPL. 1, p. S50–S58, 2011.

CALMASINI, F. B.; OLIVEIRA, M. G. DE; ALEXANDRE, E. C.; et al. Obesity-induced mouse benign prostatic hyperplasia (BPH) is improved by treatment with resveratrol: implication of oxidative stress, insulin sensitivity and neuronal growth factor. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 55, p. 53–58, 2018.

CAVAZOS, D. A.; PRICE, R. S.; APTE, S. S.; LINDA, A. 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.

CHE, H.; ZHOU, M.; ZHANG, T.; 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.

CHEN, Y. Q.; EDWARDS, I. J.; KRIDEL, S. J.; THORNBURG, T.; BERQUIN, I. M. Dietary fat-gene interactions in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3–4, p. 535–551, 2007.

CHUNG, B. H.; MITCHELL, S. H.; ZHANG, J.; YOUNG, C. Y. F. Effects of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on androgen-mediated cell growth and gene expression in LNCaP prostate cancer cells influence of ω -3 fatty acids against prostate cancer . We. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1201–1206, 2001.

COLEMAN, W. B. **Molecular Pathogenesis of Prostate Cancer**. Second Edi ed. Elsevier Inc., 2018.

CONLON, L. E.; WALLIG, M. A.; ERDMAN, J. W. Low-lycopene containing tomato powder diet does not protect against prostate cancer in TRAMP mice. **Nutrition Research**, v. 35, n. 10, p. 882–890, 2015.

CORNFORD, P.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; 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.

CROWE, F. L.; ALLEN, N. E.; APPLEBY, P. N.; 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.; KEY, T. J.; APPLEBY, P. N.; 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.

CUNHA, G. R.; WANG, S. W. H. Y. Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, p. 473–485, 2002.

CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A.; COOKE, P. S.; et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.

CUNHA, G. R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, 2004.

DALLI, J.; ZHU, M.; VLASENKO, N. A.; et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresinis converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. **FASEB Journal**, v. 27, n. 7, p. 2573–2583, 2013.

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.

DECAPRIO, J. A.; LUDLOW, J. W.; FIGGE, J.; et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. **Cell**, v. 54, n. 2, p. 275–283, 1988.

DINWIDDIE, M. T.; TERRY, P. D.; WHELAN, J.; PATZER, R. E. 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.

ELO, T. D.; VALVE, E. M.; SEPPÄNEN, J. A.; et al. Stromal Activation Associated with Development of Prostate Cancer in Prostate-Targeted Fibroblast Growth Factor 8b Transgenic Mice. **Neoplasia**, v. 12, n. 11, p. 915–IN19, 2010.

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

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

FASANO, E.; SERINI, S.; CITTADINI, A.; CALVIELLO, G. 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, 2017.

FLACHS, P.; MOHAMED-ALI, V.; HORAKOVA, O.; et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 49, n. 2, p. 394–397, 2006.

FREITAS, M. J.; VIJAYARAGHAVAN, S.; FARDILHA, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. **Biology of Reproduction**, v. 96, p. 2–12, 2017.

FURRIEL, A.; CAMPOS-SILVA, P.; SILVA, P. C. G. P.; et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

GERSHBEIN, L. L.; THIELEN, D. R. Enzymatic and Electrolytic Profiles of Human Semen. **Prostate**, v. 269, p. 263–269, 1988.

GERSTER, H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18 : 3n-3) to eicosapentaenoic acid (20 : 5n-3) and docosahexaenoic acid (22 : 6n-3)? **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, , n. June 2016, 1998.

GILBERT, S. M.; D, M.; KUO, Y.; et al. Prevalent and incident use of androgen deprivation therapy among men with prostate cancer in the United States. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 6, p. 647–653, 2011.

GILTAY, E. J.; GOOREN, L. J. G.; TOORIANS, A. W. F. T.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 10, p. 1167–1174, 2004.

GINGRICH, J.; BARRIOS, R.; FOSTER, B.; GREENBERG, N. Pathologic progression

of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 2, n. 2, p. 70–75, 1999.

GINGRICH, J. R.; BARRIOS, R. J.; MORTON, R. A.; et al. Metastatic Prostate Cancer in a Transgenic Mouse. **Cancer Research**, p. 4096–4103, 1996.

GLEISSMAN, H.; YANG, R.; MARTINOD, K.; et al. Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 906–915, 2010.

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

GREENBERG, N. M.; DEMAYO, F. J.; SHEPPARD, P. C.; et al. The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 230–239, 1994.

HAO, Y.; BJERKE, G. A.; PIETRZAK, K.; et al. TGF β signaling limits lineage plasticity in prostate cancer. **PLoS Genetics**, 2018.

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

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer . Part 1 : Screening , Diagnosis , and Treatment of Clinically Localised Disease. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

HUDSON, D. L. Prostate epithelial stem cell culture. **Cytotechnology**, v. 42, p. 189–196, 2003.

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. 2016.

IUPAC-IUB. The Nomenclature of Lipids. **MOLECULAR & CELLULAR BIOCHEMISTRY**, v. 17, n. 3, p. 157–171, 1977.

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

JESUS, M. M. DE; NEGRIN, A. C.; TABOGA, S. R.; PINTO-FOCHI, M. E.; GÓES, R. M. 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.

KAVANAGH, J. P. Chloride content of human prostatic and seminal fluid. **J. Reprod. Fert**, v. 75, 1983.

KHADGE, S.; SHARP, J. G.; MCGUIRE, T. R.; et al. Immune regulation and anti-cancer activity by lipid inflammatory mediators. **International Immunopharmacology**, v. 65, n. November, p. 580–592, 2018.

KHADGE, S.; THIELE, G. M.; SHARP, J. G.; et al. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease mammary tumor growth, multiorgan metastasis and enhance survival. **Clinical & Experimental Metastasis**, 2018.

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

KITSON, A. P.; MARKS, K. A.; SHAW, B.; MUTCH, D. M.; STARK, K. D. Treatment of ovariectomized rats with 17 β -estradiol increases hepatic delta-6 desaturase enzyme expression and docosahexaenoic acid levels in hepatic and plasma phospholipids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 2–3, p. 81–88, 2013.

KOLONEL, L. N. Fat , Meat , and Prostate Cancer. **Epidemiologic Reviews**, v. 23, n. 1, p. 32–34, 2001.

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

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v. 278, p. 261–263, 1979.

LANG, R. J.; HASHITANI, H. Role of prostatic interstitial cells in prostate motility. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 53, n. 0, p. 57–72, 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.; STAMPFER, M. J.; MICHAUD, D. S.; et al. Dietary intake of n

n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate. **Am J Clin Nutr**, , n. 2, p. 204–216, 2004.

LI, N.; YUE, H.; JIA, M.; et al. Effect of low-ratio n-6/n-3 PUFA on blood glucose: a meta-analysis. **Food & Function**, 2019. Royal Society of Chemistry.

LICHTENSTEIN, A. H.; APPEL, L. J.; BRANDS, M.; et al. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006 A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, p. 82–96, 2006.

LINZER, D. I. H.; LEVINE, A. J. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell**, v. 17, n. 1, p. 43–52, 1979.

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.

LLOYD, J. C.; MASKO, E. M.; WU, C.; et al. Fish oil slows prostate cancer xenograft growth relative to other dietary fats and is associated with decreased mitochondrial and insulin pathway gene expression. **Prostate Cancer and Prostatic Disease**, v. 16, n. 4, p. 285–291, 2013.

LUO, XIAOQIN; JIA, R.; YAO, Q.; 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.

MEESAPYODSUK, D.; QIU, X. The front-end desaturase: Structure, function, evolution and biotechnological use. **Lipids**, v. 47, n. 3, p. 227–237, 2012.

MONTICO, F.; KIDO, L. A.; MARTIN, R. S.; ROWLEY, D. R.; CAGNON, H. A. Reactive Stroma in the Prostate During Late Life : The Role of Microvasculature and Antiangiogenic Therapy Influences. **Prostate**, v. 1661, p. 1643–1661, 2015.

MURASHIMA, A.; KISHIGAMI, S.; THOMSON, A.; YAMADA, G. Androgens and mammalian male reproductive tract development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 2, p. 163–170, 2015.

MUSIAŁA, N.; OSOWSKA, I.; SZOSTAK, M. Previous , Current , and Future Pharmacotherapy and Diagnosis of Prostate Cancer — A Comprehensive Review.

Diagnostics, 2019.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, Function, and Dietary Regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ Desaturases. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 345–376, 2004..

NASSAR, Z. D.; AREF, A. T.; MILADINOVIC, D.; et al. Peri-prostatic adipose tissue : the metabolic microenvironment of prostate cancer. **BJU International**, p. 9–21, 2018.

NIAZI, Z. R.; SILVA, G. C.; RIBEIRO, T. P.; et al. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. **Hypertension Research**, v. 40, n. October 2016, p. 966, 2017.

NOGUEIRA-PANGRAZI, E.; SILVA, R. F.; KIDO, L. A.; MONTICO, F.; CAGNON, H. A. Nintedanib treatment delays prostate dorsolateral lobe cancer progression in the TRAMP model: contribution to the epithelial- stromal interaction balance. **Cell Biology International**, v. 42, p. 153–168, 2018.

NORRISH, A. E.; SKEAFF, C. M.; ARRIBAS, G. L. B.; SHARPE, S. J.; JACKSON, R. T. Prostate cancer risk and consumption of fish oils : a dietary biomarker-based case-control study. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. February, p. 1238–1242, 1999.

OONO, K.; TAKAHASHI, K.; SUKEHARA, S.; et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Molecular and Clinical Oncology**, p. 217–220, 2017.

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.

PYTLOWANCIV, E. Z.; PINTO-FOCHI, M. E.; REAME, V.; 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.

RATNAYAKE, W. M. N.; GALLI, C. Fat and Fatty Acid Terminology , Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism : A Background Review Paper. **Ann Nutr Metab**, v. 55, p. 8–43, 2009.

RIBEIRO, D. L.; PINTO, M. E.; MAEDA, S. Y.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. 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.; PINTO, M. E.; RAFACHO, A.; 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.

RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, p. 1–7, 2005.

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

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.

SHANG, T.; LIU, L.; ZHOU, J.; 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. 65, p. 1–13, 2017.

SHANKAR, E.; BHASKARAN, N.; MACLENNAN, G. T.; et al. Inflammatory Signaling Involved in High-Fat Diet Induced Prostate Diseases. **J Urol Res.**, v. 2, n. 1, p. 1–18, 2016.

SHIN, S.; JING, K.; JEONG, 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.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2020. **CA Cancer J Clin** 2020;70:7–30, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SILVA, R. F. DA; BANZATO, T. P.; ALVES, L. F.; et al. Antiangiogenic therapy with Nintedanib affects hypoxia, angiogenesis and apoptosis in the ventral prostate of

TRAMP animals. **Cell and Tissue Research**, 2019.

SILVA, R. F. DA; NOGUEIRA-PANGRAZI, E.; KIDO, L. A.; et al. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). **Journal of Biomedical Science**, p. 1–19, 2017. Journal of Biomedical Science.

SILVA, S. A.; GOBBO, M. G.; PINTO-FOCHI, M. E.; 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. The importance of the ratio of omega-6 / omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365–379, 2002.

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.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 2–3, p. 219–231, 2000.

SUN, Y.; JIA, X.; HOU, L.; LIU, X.; GAO, Q. Involvement of apoptotic pathways in docosahexaenoic acid-induced benefit in prostate cancer: Pathway-focused gene expression analysis using RT2 Profile PCR Array System. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 59, 2017.

SUZUKI, S.; PLATZ, E. A.; KAWACHI, I.; WILLETT, W. C.; GIOVANNUCCI, E. Intakes of energy and macronutrients and the risk of benign prostatic hyperplasia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 4, p. 689–697, 2002.

TABAYOYONG, W.; ABOUASSALY, R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. **Surg Clin North Am**, v. 95, p. 1023–1039, 2015.

TAITT, H. E. Global Trends and Prostate Cancer : A Review of Incidence , Detection , and Mortality as Influenced by Race , Ethnicity , and Geographic Location. **American Journal of Men's Health**, v. 12, n. 6, 2018.

TAMARINDO, G. H.; RIBEIRO, D. L.; GOBBO, M. G.; 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**, 2019.

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

TRUMBO, P.; SCHILICKER, S.; YATES, A. A.; POOS, M. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 102, n. 11, 2002.

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

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; SMITH, M. J.; et al. Reactive Stroma in Human Prostate Cancer: Induction of Myofibroblast Phenotype and Extracellular Matrix Remodeling Reactive Stroma in Human Prostate Cancer: Induction of Myofibroblast Phenotype and Extracellular. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. September, p. 2912–2923, 2002.

UZGARE, A. R.; XU, Y.; ISAACS, J. T. In Vitro Culturing and Characteristics of Transit Amplifying Epithelial Cells From Human Prostate Tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 205, p. 196–205, 2004.

VIKRAM, A.; RAMARAO, P. Lipids in the Pathogenesis of Benign Prostatic Hyperplasia: Emerging Connections. **Dyslipidemia - From Prevention to Treatment**, 2011.

WALLSTRÖM, P.; BJARTELL, A.; GULLBERG, B.; OLSSON, H.; WIRFÄLT, E. 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.; LUO, F.; ZHOU, Y.; 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, S.; WU, J.; SUBURU, J.; et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on castration-resistant Pten-null prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 404–412,

2012.

WATT, M. J.; CLARK, A. K.; SELTH, L. A.; et al. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. **SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE**, v. 5758, n. February, 2019.

WEINER, A. B.; MATULEWICZ, R. S.; EGGENER, S. E.; SCHAEFFER, E. M. Increasing incidence of metastatic prostate cancer in the United States (2004 – 2013). **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, , n. June, p. 395–397, 2016. Nature Publishing Group.

WILLIAMS, C. D.; WHITLEY, B. M.; HOYO, C.; et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. **Nutrition Research**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2011.

WILSON, S.; JONES, L.; COUSEENS, C.; HANNA, K. **Cancer and the Environment: Gene-Environment Interactions**.

WU, H.; POWELL, W. C.; HAGENKORD, J.; COHEN, M. B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, p. 225–254, 2004.

ZÁRATE, R.; JABER-VAZDEKIS, N. EL; TEJERA, N.; PÉREZ, J. A.; RODRÍGUEZ, C. 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.

ZHAO, Z.; REINSTATLER, L.; KLAASSEN, Z.; et al. The Association of Fatty Acid Levels and Gleason Grade among Men Undergoing Radical Prostatectomy. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. e0166594, 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica da presente Dissertação, em partes, para fins de
pesquisa.

São José do Rio Preto, 12/05/2020

Assinatura do autor