



UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DE BOTUCATU

INFLAMAÇÃO E CÂNCER: AVALIAÇÃO DAS VIAS CCL2 e TGF β 1 NA CARCINOGENESE PROSTÁTICA EM RATOS VELHOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E AO CONSUMO DE AÇÚCAR ATÉ A IDADE ADULTA

Matheus Naia Fioretto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre no Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr Luis Antonio Justulin Junior

Coorientador: Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Colaboradora: Ketlin Thassiani Colombelli

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
- Setor Morfologia

**Botucatu – São Paulo
2021**

UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DE BOTUCATU

**INFLAMAÇÃO E CÂNCER: AVALIAÇÃO DAS VIAS CCL2 e TGFβ1 NA
CARCINOGENESE PROSTÁTICA EM RATOS VELHOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E AO CONSUMO DE AÇÚCAR ATÉ A
IDADE ADULTA**

**Matheus Naia Fioretto
Luis Antonio Justulin Jr**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de mestre no Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr Luis Antonio Justulin Junior

Coorientador: Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Colaboradora: Ketlin Thassiani Colombelli

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
- Setor Morfologia

**Botucatu – São Paulo
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Fioretto, Matheus Naia.

Inflamação e câncer : avaliação das vias CCL2 e TGF β 1 na carcinogênese prostática em ratos velhos submetidos à restrição proteica materna e ao consumo de açúcar até a idade adulta / Matheus Naia Fioretto. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luis Antonio Justulin Jr
Coorientador: Sergio Alexandre Alcantara dos Santos
Capes: 20600003

1. Próstata - Câncer. 2. Inflamação. 3. Restrição calórica.
4. Dietoterapia. 5. Dieta com restrição de proteínas.

Palavras-chave: Açúcar; Inflamação; Próstata ventral; Restrição proteica materna.

AGRADECIMENTOS

Sozinhos não somos nada. Mudanças efetivas dependem, inevitavelmente, de outras mãos. O caminho precisa de companhia, pois quando diversas complexidades se entrelaçam, o resultado final é sempre mais evidente e bonito. Sozinho não sou nada, por isso meu muito obrigado a todos que, de alguma forma, deixaram e deixam pontinhos de amor e aprendizado em cada página do livro da minha vida, em cada passo da trajetória.

Agradeço, dessa forma:

Primeiramente, aos meus pais Paulo Sergio Fioretto e Leda Cristina Naia, que sempre me apoiaram em cada escolha e me fortaleceram a cada dificuldade. Gostaria de agradecer também à toda minha família, excepcionalmente minha vó Therezinha e minha Tia Mônica, por todo o suporte constante em todos os momentos bons e nas dificuldades – vocês são uma parte enfática e determinante de tudo que já me aconteceu de bom na vida. Por toda educação, criação e ensinamentos. Um obrigado carinhoso e amoroso aos meus avós, Romeu, Domarcindo e Sebastiana, minha tia Simone, tia Regina, tio Marcos, tio Valter, meu irmão Vitor Fioretto, minha prima Nathália Fioretto, e meu primo Orlando Weber.

Ao meu orientador, Dr. Luis Antonio Justulin Jr., que me acolheu ao final da graduação e me deu oportunidade de conhecer os bônus e ônus da carreira acadêmica, sempre com muita paciência, apoio e incentivo. Obrigado por me possibilitar um crescimento, e que essa curva se mantenha, sempre num direcionamento exponencial.

Ao Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, meu coorientador, e à Ketlin Thassiani Colombelli, por todas as broncas necessárias e por todo o suporte científico mas, principalmente, amigo, gerando um conforto no ambiente de trabalho e auxiliando em toda a competência do mesmo.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular e ao LaBDECA, por toda a companhia, competência, aprendizagem e trabalho. Aos professores Sérgio, Flávia, Wellerson, Fran, Isa, Hopi, Beatriz, Marcus, Alexandre, Barquilha, Caio, Juliana, Mirian, Isabele, e tantos outros que já passaram por aqui. Um agradecimento também ao pessoal do Prof. Barbisan, ao Mais e ao Guilherme, que me auxiliaram em várias análises.

Às agências de fomento, FAPESP (processo 2019/10410) e CAPES (nº001), por todo suporte e financiamento das etapas essenciais para a realização dessa dissertação.

A todos os docentes, discentes, funcionários do Departamento e a todos àqueles que participaram da minha trajetória, desde os anos iniciais de ensino, ao colégio Tyto Alba, e aos professores e companheiros da UNESP/Botucatu.

À Ariana, por todas as risadas, pelo ambiente descontraído e por todo o suporte

científico, e o Nilton, pela companhia, ensinamentos e pelos “limites” do trabalho. Também quero agradecer à Ana Carolina (Galah), por todo o suporte e seriedade durante esses anos de LABMEC, que me proporcionou um grande crescimento, e ao Luiz Marcos Frediani, meu amigo de Laboratório, República, e da vida, estando ao meu lado em todos os momentos, sejam eles de lazer, sejam eles de trabalho. Em especial também à Luiza e ao Renato, ics extremamente competentes que me ajudam em diversos momentos exacerbados, e que ainda estarão em muitos outros.

À professora Ariane Leite Rozza, por ter me possibilitado estar dentro da sala de aula de maneira constante, exercendo àquilo que mais me traz satisfação na vida: A docência.

Agradeço imensamente à professora Elisabete Cardieri, da qual tive o grande prazer de estar junto no projeto PIBID, juntamente com colegas incríveis: Euler, Maiara, Carol, Carol, Larissa, Suelen.

A todos os meus amigos, em especial àqueles que já dividiram um pouco da morada comigo (Rep Bagaçu de Kana). Com ênfase ao Gustavo Carvalho (João), ao Elian, ao Luiz, Danilo Bérghamo, Fabio Vendramini, Patricia, Alec. Também ao Nicolas, Gustavo, Lucas, Marcos, Luiza Catapani, Giovanni, Give...

Aos meus amigos da Põe, uma rep acolhedora e que sempre teve as portas abertas pra diversos momentos, em especial ao Gabriel, Guilherme e Ivan.

Aos meus amigos de faculdade, de sala de aula, festas e afins – Gabriela Duarte, Ana Casali, Nayara Martinelli, Pedro Paulo, Leo, Vinicius, Gabi, Ana Denadai, Lucas Luan, Pablo, Bruno, Marielly, entre tantos outros.

Um agradecimento imensamente carinhoso aos meus melhores amigos, Carol Fioretto e Romário Oliveira dos Santos, por todos os momentos incríveis que já passamos e ainda passaremos. As amizades vêm e vão, mas alguns vínculos são como marcas eternas em cada um de nós. Quero dizer que muito do que sou hoje e muito da minha felicidade são provenientes da existência e da companhia de vocês. Muito obrigado.

À instituição Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada por toda estrutura oferecida para que este projeto fosse desenvolvido.

Aos meus animais experimentais, os quais foram tratados com muito respeito.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para que esta fase se realizasse.

Agradeço, de uma forma geral e englobada, a todos os meus professores e colegas de conhecimento, prazeres, conversas, distrações, pois tudo é necessário para uma vida feliz. Uma

montanha-russa de sinapses, viver, sentir, é tudo assim mesmo, um emaranhado de essências que precisam, no seu devido tempo, lugar, momento, ser flexível, doce e satisfatório. Viver é assim, é loucura, tristeza, carinho, dança, espanto, brincadeira de criança. Que eu leve sempre isso, a seriedade, mas também o brilho nos olhos de alguém que se espanta, alegremente, com um mundo cheio de possibilidades. E que seja leve, jardim, fruto de toda essa mescla inerente à vida. E que saiba ser sério também, nos momentos devidos. Mas que eu me lembre, sempre que olhar para mim mesmo, que:

“A vida é muito importante para ser levada a sério.”

Oscar Wilde

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP – Câncer de Próstata

CCL – Quimiocina atraente de monócito

CTR- Grupo Controle

CTR+AÇU – Grupo controle + consumo de açúcar

DOHaD – *Development Origins Heath and Disease* (Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença)

HBP – Hiperplasia prostática benigna

IL – Interleucina

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

NF-KB – Fator nuclear *Kappa* B

OMS – Organização Mundial da Saúde PF- Programação Fetal

PV- Próstata ventral PA- Próstata anterior PD- Próstata dorsal

PIN – *Prostatic Intraepithelial* (Neoplasia)

PL – Próstata lateral

RPGL – Restrição proteica gestacional e lactacional

RPGL+AÇU – Restrição proteica gestacional e lactacional + consumo de açúcar

RPM – Restrição proteica materna

SM – Síndrome metabólica

TNF – Fator de necrose tumoral

TGF – Fator de transformação do crescimento

RESUMO

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado maior índice de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na população adulta de indivíduos cujas mães tiveram condições inadequadas durante a gravidez, como a restrição proteica materna (RPM). Recentemente, estudos experimentais demonstraram que o sistema reprodutivo da prole também é afetado pela RPM. Articulado a isso, o aumento do consumo de "açúcar de adição" no mundo tem sido associado ao aumento global de casos de doenças metabólicas. Englobado a esse contexto, a RPM e o consumo de açúcar podem estar associados a processos inflamatórios prostáticos com o envelhecimento. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o papel das vias de inflamação em ratos submetidos à RPM e/ou consumo de açúcar, com foco na próstata ventral (PV). Foram utilizados ratos machos da prole Sprague Dawley submetidos ou não à RPM (CEUA 951). Após o desmame, ratos machos nascidos de mães alimentadas com dieta normoproteica (CTR, 17% de proteína) ou dieta hipoproteica (RPGL, 6% de proteína), durante a gestação e lactação, foram divididos em 4 grupos experimentais (n = 6 / grupo): Controle (CTR): Consumiu dieta normoproteica e água padrão até o dia pós natal (DPN) ; Controle + açúcar (CTR + AÇU): Consumiu dieta normoproteica e solução açucarada (10% diluída em água) até DPN 90; Restrição Proteica Gestacional e Lactacional (RPGL): Recebeu água normal até DPN90; e RPGL + AÇU: Consumiram solução açucarada até DPN 90. No DPN 540 os animais foram anestesiados, pesados e eutanasiados. O sangue foi coletado e utilizado para análises sistêmicas e a PV para análises morfológicas e moleculares. Os resultados demonstram redução do peso corporal no grupo RPGL e RPGL + AÇU, aumento do peso relativo prostático, além de menor quantidade de gordura total. Os parâmetros metabólicos como glicose, triglicerídeos e proteínas totais não apresentaram diferenças significativas, assim como os parâmetros de estresse oxidativo, o que demonstra que as condições adversas não foram suficientes para desencadear processos como obesidade, diabetes e síndrome metabólica. Alterações teciduais na PV foram observadas em todos os grupos experimentais, com ênfase no infiltrado inflamatório e inflamação para os grupos RPGL e RPGL+AÇU. Em relação aos parâmetros inflamatórios, observou-se aumento de mastócitos e macrófagos CD68 na PV de todos os grupos experimentais, quando comparados ao CTR, além da incidência de carcinoma em alguns animais destes grupos. Verificamos alta expressão das moléculas de IL-6 no RPGL e aumento de TGF- β 1 nos animais do grupo RPGL + AÇU, sistêmico e intra-prostático. Associado a isso, a SMAD2/3 fosforilada estava diminuída, o que pode demonstrar que essa via de inflamação é exacerbada no grupo que foi submetido às duas condições adversas. Com esses resultados, é possível observar influência da inflamação nos processos deletérios relacionados ao envelhecimento, tanto em animais submetidos à RPM, quanto ao consumo de açúcar, mas com maior ênfase naqueles que apresentavam ambas as condições adversas. Isso demonstra que a RPM e o consumo de açúcar afetam negativamente e diretamente a homeostase prostática na senilidade, com influência de parâmetros inflamatórios, podendo ter relação na biologia do câncer neste tecido.

Palavras-chave: Restrição proteica materna, açúcar, próstata ventral, inflamação.

ABSTRACT

Epidemiological and experimental studies have been demonstrated higher rate of obesity, diabetes and cardiovascular diseases in the adult population of individuals whose mothers had inadequate conditions during pregnancy, such as maternal low protein diet (LPD). Recently, experimental studies have demonstrated that the reproductive system are also affected by maternal LPD in the offspring rats. Linked to this, the increasing consumption of "added sugar" in the world has been associated to the global increase of metabolic diseases cases. Thus, maternal LPD and sugar consumption may be associated with inflammatory processes in the prostate with aging. Therefore, this project aims to investigate the role of inflammation pathways in rats submitted to maternal LPD, which together were exposed to sugar consumption, focusing on the ventral prostate (VP). Male Sprague Dawley offspring rats submitted or not to maternal LPD was used (CEUA951). Rats born from dams fed with control diet (CTR, 17% protein) or low protein diet (GLLP, 6% protein) during gestation and lactation period were divided in 4 experimental groups: Control (CTR) consumed control diet and water until PND 90; Control+sugar (CTR+SUG) consumed control diet and sugar solution (10% diluted in water) until PND 90; Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) received normal water until PND 90; and GLLP+SUG consumed sugar solution until PND 90. On PND 540 they were anesthetized, weighed, and euthanized. The collected blood was used for systemic analysis and the VP for morphological and molecular analysis. The results demonstrate a reduction in body weight in the GLLP and GLLP+SUG, an increase in the prostate relative weight, in addition to a lower amount of total fat. Metabolic parameters such as glucose, triglycerides and total proteins did not show significant differences, as well as oxidative stress parameters, which demonstrates that adverse conditions were not sufficient to trigger processes such as obesity, diabetes, and metabolic syndrome. Tissue changes in VP were observed in all experimental groups, with an emphasis on inflammatory infiltrate and inflammation for the GLLP and GLLP+SUG groups. Regarding inflammatory parameters, there was an increase in mast cells and CD68 macrophages in the VP of all groups when compared to CTR, in addition to the incidence of carcinoma in some animals in these groups. We observed a systemic and intra-prostate high expression of IL-6 molecules in the GLLP and an increase in TGF- β 1 in the animals of the GLLP +SUG group. Associated with this, the phosphorylated SMAD2/3 was reduced, which can demonstrate that this inflammation pathway is exacerbated in the group that was submitted to both adverse conditions. With these results, it is possible to observe an influence of inflammation in the harmful processes related to aging, both in animals submitted to maternal LPD, and in the consumption of sugar, but with greater emphasis on those that presented both adverse conditions. This demonstrates that maternal LPD and sugar consumption negatively and directly affect prostatic homeostasis in senility, with the influence of inflammatory parameters, which may be related to the biology of cancer in this tissue.

Keywords: Maternal protein restriction, sugar, ventral prostate, inflammation.

Sumário

CAPÍTULO I.....	11
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>12</i>
1.1	14
RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: CONTEXTUALIZAÇÃO E IMPACTOS REPRODUTIVOS.....	14
1.2 CONSUMO DE AÇÚCAR, METABOLISMO E INFLAMAÇÃO .	18
1.3 ENVELHECIMENTO, VIAS INFLAMATÓRIAS E CÂNCER DE PRÓSTATA.....	22
<i>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....</i>	<i>34</i>
<i>3. OBJETIVOS.....</i>	<i>34</i>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<i>4. RESULTADOS.....</i>	<i>35</i>
<i>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>35</i>
CAPÍTULO II	48
<i>Maternal low protein diet and sugar consumption in postnatal life alter the prostate morphophysiology and causes inflammation in aging.</i>	<i>49</i>

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Evidências epidemiológicas correlacionam o aumento da incidência de doenças crônicas a processos sofridos ainda durante o desenvolvimento intrauterino. Este período de alta vulnerabilidade é de suma importância tanto para a gestante, como para o embrião/feto, sendo necessária a manutenção de condições adequadas, uma vez que nesta fase ocorre intenso processo de proliferação e diferenciação celular para o desenvolvimento e crescimento dos diferentes órgãos e sistemas (Burton et al., 2016). Nesse âmbito, existem diversos tipos de adversidades, dentre elas a desnutrição, que pode ser proteica, lipídica ou até mesmo de carboidratos, caracterizando um desequilíbrio entre o fornecimento de nutrientes e a demanda corporal responsável por assegurar a homeostasia (Antwi, 2008). Num contexto histórico acerca desses dados, o epidemiologista inglês David Barker foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar que algumas condições ocorridas durante a gestação estão correlacionadas à maior incidência de doenças nos descendentes. Entre os anos de 1935 e 1944, Barker coletou dados de gestantes e recém-nascidos (1298 pacientes) no hospital Sharo e Green, Lancashire, Inglaterra. Deste total, 449 foram localizados quando tinham entre 46 e 54 anos e, analisando dados de peso corpóreo ao nascimento, peso placentário, peso corpóreo e pressão arterial na idade adulta, Barker e seus colaboradores demonstraram que indivíduos com baixo peso ao nascer apresentaram maior risco de desenvolver doença coronariana e diabetes com o envelhecimento, concluindo que o baixo peso ao nascimento é fator de risco para doenças cardíacas e metabólicas na vida adulta (Barker et al., 1989).

Ao avaliar a influência de fatores ambientais sobre o desenvolvimento humano, Ravelli e colaboradores (1976) estudaram filhos de mulheres que, durante a gravidez, foram expostas a um período de escassez alimentar durante o cerco alemão à Holanda, ao final da 2ª Guerra Mundial, episódio conhecido como inverno da fome holandesa (1944-1945). Na vida adulta, esses indivíduos apresentaram padrões diferenciados de composição corporal dependendo da fase da gestação em que haviam sido expostos à desnutrição materna intrauterina. No caso, se a mãe tivesse sofrido desnutrição durante o último trimestre da gestação, tal grupo apresentava baixa incidência de obesidade. Todavia, se tivesse ocorrido no 1º trimestre da gestação, essa incidência de obesidade aumentava significativamente. Assim, demonstrou-se que, além do impacto negativo da restrição proteica materna (RPM) sobre a prole, os efeitos poderiam variar de acordo com o período gestacional em que esse ocorre. Dessa forma, esses estudos fomentaram que condições nutricionais adversas durante o período intrauterino e perinatal predisõem os indivíduos a desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas com o envelhecimento, definição conhecida como **Hipótese de Barker** (Barker, 1989). Sua teoria, apesar de inicialmente controversa, desencadeou o interesse

médico-científico, fomentando a criação de uma sociedade internacional voltada para este campo de pesquisa, denominada **Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença (DOHaD)**, que conta com instituições de pesquisa e de políticas públicas na Europa, América do Norte e regiões do Pacífico, bem como em países em desenvolvimento (Schulz, 2010). Os estudos que envolvem esse conceito são caracterizados por um termo denominado **programação** (ou “reprogramação”) **fetal (PF)** (Lucas et al., 1999). Sendo assim, a placenta é um ambiente de suma importância, pois se não responde ou mostra uma resposta insuficiente aos insultos no útero, o feto pode estar em risco de desenvolver doenças posteriores. Essa conexão íntima entre a placenta e o cérebro resultou, por fim, no conceito eixo placenta-cérebro (Rosenfeld, 2021).

Articulado a esse contexto, impactos de circunstâncias ocorridas durante o desenvolvimento intrauterino e perinatal podem se agravar quando associadas a fatores pós-natais desfavoráveis, tais como hábitos sedentários, consumo de alimentos ultraprocessados, hipercalóricos e pouco nutritivos, como o consumo de bebidas com adição de açúcar (Dearden & Ozanne, 2014; Miles, et al., 2018; West- Eberhard, 2019; Chazelas, et al., 2019). Dessa forma, filhotes nascidos de ratas alimentadas com dieta hipoproteica (menor que 8% de proteína) durante a gestação, que apresentam baixo peso ao nascimento, quando alimentados com dieta rica em gordura ou açúcar, apresentam intenso ganho de peso (*catch up growth*), e se igualam aos animais cujas mães se alimentaram de dieta padrão na gestação. Entretanto, este ganho de peso acelerado normalmente está associado à uma menor longevidade (Embleton et al., 2016), indicando que a nutrição durante períodos críticos de desenvolvimento tem forte impacto sobre a longevidade (Barker et al., 2004; McMillen et al., 2005). Sendo assim, o risco parece maior quando há baixo peso ao nascimento ou restrição de desenvolvimento intraútero, somados à aceleração do crescimento e maior ingestão de nutrientes no período pós-natal imediato, podendo ser relacionados a riscos metabólicos posteriores (Singhal et al., 2003, Singhal et al., 2004).

Nesse sentido, análises de órgãos específicos revelaram que a RPM, durante o período gestacional, acarreta menor número de néfrons nos rins (Habib et al., 2011), afetando a fisiologia de filtração glomerular e formação da urina (Sene et al., 2018); menor quantidade de células beta e ilhotas de *Langerhans* (Dahri et al., 1991), influenciando diretamente na regulação da glicemia e liberação de insulina (Long et al., 2021); proporção alterada entre os tipos celulares do fígado (Burns et al., 1997); menor número de neurônios que controlam o apetite (Plagemann et al., 2001), acarretando problemáticas no eixo hipotalâmico-hipofisário e no centro da saciedade; menor número de alvéolos pulmonares (Zana- Taieb et al., 2013), causando problemáticas na fisiologia respiratória e no processo de hematose; além de efeitos reprodutivos, incluindo atraso da angiogênese prostática

e incidência de carcinoma *in situ* no envelhecimento (Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2019).

Englobado a essas condições, a próstata é uma glândula sexual acessória masculina que frequentemente é afetada pela hiperplasia benigna e pelo câncer (Guess, 2001), e as alterações que ocorrem na vida pré-natal e/ou pós-natal (desenvolvimento) podem ser determinantes para esses processos patológicos, durante a senilidade. Assim, são de grande interesse médico-científico os estudos correlatos a essa glândula, pela alta incidência de patologias (Banerjee et al., 2018) e por ser um problema de saúde pública a níveis globais. Outro ponto relevante é que a inflamação prostática também é um fator de risco para o câncer de próstata (CaP) (De Marzo et al., 2007. Sfanos et al., 2012; Sfanos et al., 2018; Michels et al., 2021).

1.1 RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: CONTEXTUALIZAÇÃO E IMPACTOS REPRODUTIVOS

A programação (ou “reprogramação”) pela dieta materna, correlata à restrição ou exacerbação de micronutrientes ou macronutrientes, já foi demonstrada em diversos estudos com animais experimentais, com consequências fisiológicas e metabólicas amplamente relatadas na prole (Hay et al., 2016; Vithayathil et al., 2018; Palladino et al., 2021; Gete et al., 2021), alterando, por exemplo, o ciclo estral e a histomorfometria ovariana (Côrtes et al., 2021). Esse quadro também afeta o sistema genital em diversos âmbitos, e alguns dos efeitos reprodutivos na prole masculina submetida à PF por RPM foram: Aumento do tempo de instalação da puberdade (Van Weissenbruch et al., 2005; Noriega et al., 2009), menor taxa de fertilidade (Santos et al., 2004; Zambrano et al., 2005), redução da distância ano-genital (Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017), alteração na concentração sérica de testosterona e estradiol (Teixeira et al., 2007; Santos et al., 2019), menor expressão de receptores androgênicos no testículo (Rodríguez-González et al., 2012), aumento de biomarcadores e estresse oxidativo no câncer de CaP (Portela et al., 2021), além de enriquecimento de vias oncológicas no início da vida e no envelhecimento (Santos et al., 2020). Já há evidências crescentes descrevendo forte associação entre exposições ambientais durante o início da vida (pré e pós-natal) e o condicionamento biológico, definindo riscos de doença ao longo da vida dos descendentes. Alguns efeitos da PF estão elucidados na figura 01, demonstrando que fatores epigenéticos, derivados deste processo, acarretam modificações que induzirão a processos adversos durante o desenvolvimento e envelhecimento dos indivíduos (Agarwal et al., 2018).

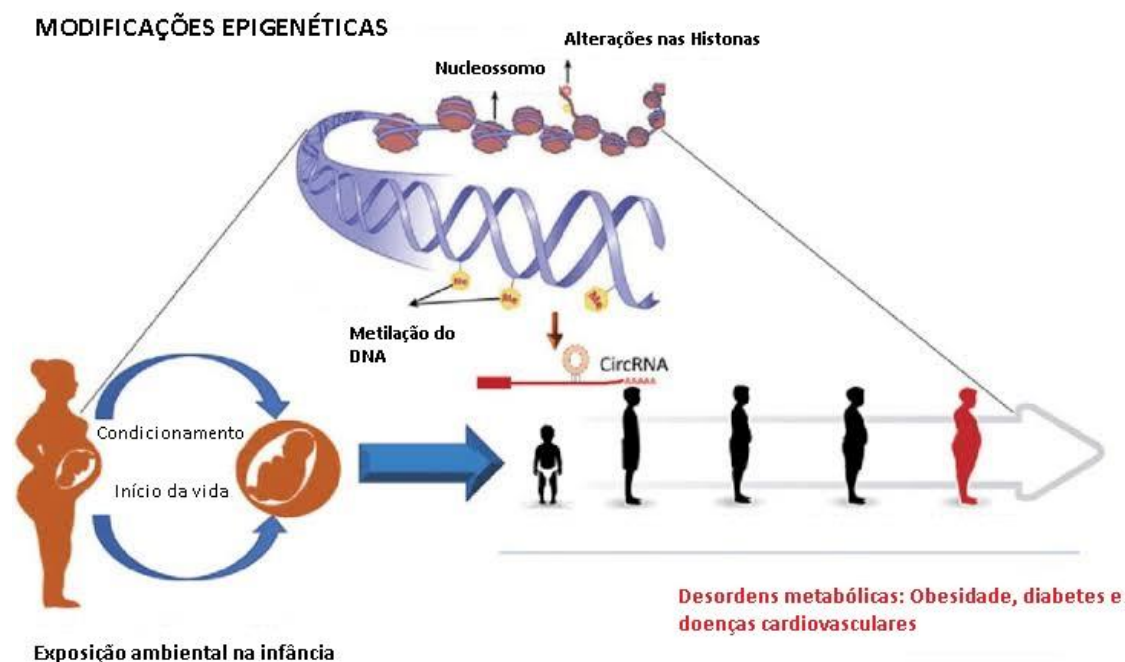


Figura 01. DOHaD e epigenética. As influências do ambiente materno e as condições adversas que acarretam efeitos epigenéticos desencadeados no desenvolvimento e envelhecimento da prole. Durante a gestação ou no início da vida da prole, as exposições ambientais podem levar ao estabelecimento de modificações epigenéticas, como modificações de histonas, metilação do DNA, e regulação mediada por RNA não codificante. A persistência dessas modificações durante o desenvolvimento pós-natal pode condicionar a prole a desenvolver distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Adaptado de Agarwal et al., 2018).

Dados recentes do nosso grupo demonstram que a RPM reduz o processo de angiogênese prostática, o qual pode estar relacionado à menor troca de moléculas entre os vasos e os compartimentos epitelial e estromal, impactando negativamente o desenvolvimento, maturação e função secretora da glândula (Colombelli et al., 2017). Considerando que a principal função do compartimento estromal é garantir um microambiente apropriado para o epitélio, torna-se relevante compreender como ele está a partir de alguma condição que seja antagônica à fisiologia ideal. Assim, o estroma fornece sinais e suporte para auxiliar nas funções da próstata, seja em condições saudáveis ou durante os processos agressivos, e diversas evidências indicam que a região estromal pode ter um papel central nos processos homeostáticos, como também nos inflamatórios da glândula (Nieto et al., 2014). A literatura já explana alguns efeitos de exposição durante gestação e lactação, como a dos ftalatos, que podem exercer um papel citotóxico direto ou indireto, desencadeando processos inflamatórios não bacterianos, influenciando na patogênese, distúrbios adaptativos e pré-neoplásicos na próstata de ratos, e possivelmente ativando vias alternativas do receptor de andrógeno (Scarano et al., 2009). Nesse sentido, é notório que alguns efeitos na RPM afetam negativamente o desenvolvimento e funcionamento do sistema genital masculino da prole, incluindo as glândulas

acessórias e a próstata (Ramos et al., 2010; Pinho et al., 2014) e, no envelhecimento, ocasiona maior incidência de lesões e carcinoma *in situ* (Santos et al., 2019), justificando o interesse pelo modelo de estudo.

Pareado a esse contexto, a importância da próstata é inerente ao sucesso reprodutivo, pois é uma glândula sexual acessória do sistema genital masculino responsável pela secreção do fluido seminal (Verze et al., 2016), produzindo aproximadamente 30% deste, e tem como funções liquefazer o sêmen, ativar a motilidade espermática e proteger os espermatozoides contra os danos imunológicos causados pelo sistema genital feminino (Zenzmaier et al., 2008). Seu desenvolvimento se inicia por volta do 15º dia em ratos, e entre a 9-10ª semana em humanos (Welsh et al., 2008), e sua morfogênese não é determinada pelo sexo genético, mas sim pela exposição a andrógenos que são produzidos pelos testículos fetais (Cunha et al., 1987). Assim, os andrógenos são os responsáveis pela masculinização dos tecidos, sendo atuantes desde o início do desenvolvimento dos órgãos genitais externos e internos, até o indivíduo chegar à puberdade, influenciando diretamente nas características sexuais secundárias e promovendo a manutenção dos órgãos dependentes de andrógenos por toda a vida adulta (Brinkmann, 2011). Macroscopicamente, a próstata humana é unilobulada, contendo três zonas: Zona central, ramificada anteriormente à parte prostática da uretra, circundando o ducto ejaculatório, Zona de transição, local da hiperplasia prostática benigna (HPB) (Timms, 2008), e a Zona periférica, que corresponde a 70% do volume da glândula e representa o local mais comum de malignidade (McNeal, 1988; Toivanen & Shen, 2017; Yacoub & Oto, 2018).

Já em ratos e camundongos, a glândula é composta por pares distintos de lóbulos (Figura 02), denominados: Próstata anterior (PA), próstata ventral (PV), próstata lateral (PL) e próstata dorsal (PD). Estas se dispõem ao redor da bexiga urinária e se diferenciam pelos padrões de ramificação, histologia e expressão das proteínas secretoras (Shirai et al., 2000; Marker et al., 2003). Outro ponto relevante a se considerar é que a próstata é altamente suscetível à transformação oncogênica, a uma frequência significativamente maior que a de outros tecidos sexuais secundários masculinos, como as vesículas seminais (Siegel et al., 2017). Dessa forma, compreender alguns aspectos do desenvolvimento glandular e sua influência no envelhecimento são importantes não só para o sucesso reprodutivo, como também para biologia do câncer. É notório, portanto, que efeitos calamitosos durante o ambiente intrauterino e lactacional podem desencadear problemáticas em todo crescimento e morfogênese, possibilitando uma janela de suscetibilidade a doenças no decorrer da vida.

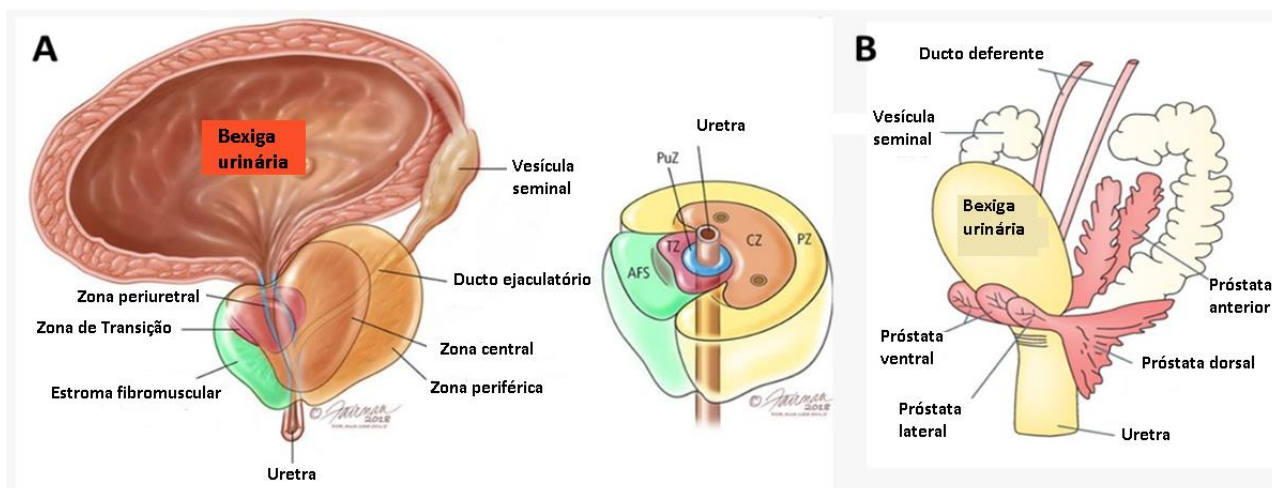


Figura 02. Imagem ilustrativa da diferença entre a próstata de humanos e roedores. (A) Aparência macroscópica e organização microscópica da próstata humana, unilobulada, dividida em Zona central (CZ), Zona periférica (PZ), Zona de transição (TZ) e, por alguns autores, Zona periuretral (PuZ). (B) Vista anterolateral dos lobos prostáticos de roedores, em relação à bexiga urinária, vesículas seminais e uretra, evidenciando os quatro lobos – Próstata ventral, Próstata anterior, Próstata dorsal e lateral. (Adaptado de Marker et al., 2003).

É importante notar que, tanto em jovens, quanto idosos, a influência negativa sobre as células e tecidos pode afetar diretamente a fertilidade masculina e induzir a processos lesivos ao longo da vida, através da alteração do metabolismo, podendo acarretar um estado inflamatório. Nesse sentido, uropatógenos e bactérias atípicas, por exemplo, podem alterar o funcionamento dos espermatozoides, causando danos diretos ou mediados por imunidade (Roberts et. al, 1997; Schuppe et al., 2017). Nessa linha de pensamento, linfócitos T, macrófagos e linfócitos B que estão presentes na próstata adulta, em condições patológicas, podem causar problemáticas às células epiteliais e estromais, com liberação de citocinas e aumento da concentração de alguns fatores de crescimento, causando remodelação tecidual pelo crescimento fibromuscular (Gandaglia, et al, 2013), o qual pode fornecer uma reatividade ao microambiente e retroalimentar possíveis processo pré-neoplásicos.

Com essas características, pode-se compreender que a morfologia prostática, seu metabolismo, vias dependentes de hormônios, vias moleculares e condições que possam estar modificadas são de suma importância para estabelecer alterações agudas, crônicas, patológicas e até agressivas, pois fibroblastos, naturais da matriz extracelular da glândula, quando estão associados ao câncer, podem exercer um papel de progressão dessa condição, sustentando metabolicamente a sobrevivência e o crescimento das células cancerosas, acarretando o recrutamento de células inflamatórias e imunes e promovendo a transição mesenquimal epitelial, o qual favorece parâmetros metastáticos (Chiarugi et al., 2014). Isso sugere que modificações durante o próprio desenvolvimento já podem modular o ambiente tecidual, incluindo o sistema genital e a próstata, o qual pode acarretar problemáticas não só na vida adulta, mas, principalmente, na senilidade.

1.2 CONSUMO DE AÇÚCAR, METABOLISMO E INFLAMAÇÃO

Além da RPM, uma condição pré-natal, exposições pós-natais podem influenciar o organismo a respostas crônicas e/ou exacerbadas, que possam comprometer o funcionamento normal dos diversos órgãos. Sabe-se, por exemplo, que a exposição contínua a disruptores endócrinos pode comprometer a fertilidade masculina na puberdade e, a longo prazo, tornam o tecido prostático mais suscetível a patologias (Aquino et al., 2019). Não só disruptores endócrinos, como também outros componentes ambientais, podem afetar diversos sistemas, como os fatores dietéticos, do qual se enquadra o consumo de açúcar. Nesse sentido, organizações mundiais de governo e saúde têm se dedicado a avaliar a relação entre o aumento do consumo de açúcares na dieta e a incidência de obesidade e doenças correlatas, como diabetes e doenças cardiovasculares (Newens & Walton, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de “açúcares de adição”, ou seja, carboidratos simples que são adicionados artificialmente durante o processamento industrial dos alimentos, devem ser reduzidos num percentual de menos de 10% do total de calorias diárias, uma vez que o consumo superior a essa porcentagem pode levar ao aumento de obesidade e doenças não transmissíveis, tais como diabetes e hipertensão. Outra recomendação é feita para limitar este total a não mais de 5% (WHO, 2015). Neste contexto, o consumo de bebidas com adição de açúcares aumentou de forma drástica e, nos EUA, entre 1977 e 2003, o conteúdo energético dos açúcares adicionados nas bebidas teve um aumento de 377 kJ/d (90 kcal/d), e açúcares em alimentos por volta de 96 kJ/d (23 kcal/d) (Powell et. al, 2016). Isso demonstra a problemática do consumo indireto de açúcar pelo excesso de alimentos e bebidas industrializados e processados, uma questão articulada ao processo de industrialização e a modulação dos hábitos dietéticos atuais, que abrange não só os EUA, como o mundo todo.

Sabendo-se da problemática que envolve o açúcar e doenças crônicas, é possível contextualizar seus efeitos, do qual estudos já demonstraram que disfunções sexuais e reprodutivas, incluindo impotência, redução da libido, prejuízo da espermatogênese e infertilidade, diminuição da qualidade espermática, decorrente de alterações nos testículos e glândulas sexuais acessórias, são frequentemente associados com o diabetes (Kolodny et al., 1974; Bartak et al., 1975; Handelsman et al., 1985; Niven et al., 1995; Baccetti et al., 2002; Ryu et al., 2003; Ding et al., 2015; Leisegang et al., 2021). Em outro experimento, realizado por Camargo e colaboradores (2017), relatou-se aumento da expressão de enzimas antioxidantes na PV da prole de mães diabéticas, e associou-se o aumento do estresse oxidativo às alterações morfofuncionais prostáticas, similares às observadas por Santos e colaboradores (2014).

Ainda no contexto nutricional, na última década a síndrome metabólica (SM) e os marcadores do metabolismo foram identificados como fatores de risco potenciais para HPB e a maioria dos sintomas do trato urinário inferior (Giri et al., 2015). Dessa forma, a SM engloba um grupo de doenças crônicas, incluindo obesidade, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina (Martins et al., 2019), e este é um problema à nível mundial, que vem trazendo diversas discussões e pesquisas no meio acadêmico, pois, nos últimos anos, tem-se observado o aumento das SMs em idades mais precoces na população, afetando pelo menos 10% dos adolescentes e 25% dos adultos (O'Neill & O'Driscoll, 2015; Nolan et al., 2017; Pucci et al., 2017; Gurka et al., 2018; Reisinger et al., 2021). Sabendo desta convergência entre excesso de consumo de alguns micronutrientes e macronutrientes e a SM e seus efeitos sistêmicos, inclusive na próstata (Figura 03), é nítida a relevância de se avaliar qual o papel ou mecanismos moleculares que podem desencadear essas correlações derivadas do açúcar.

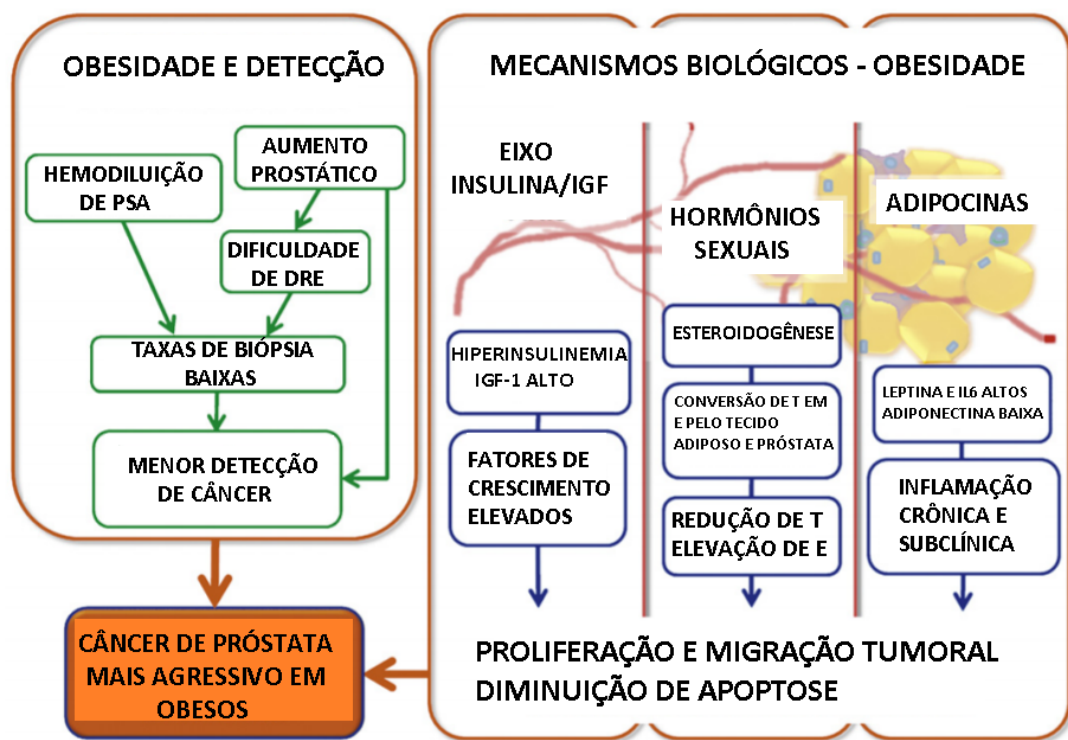


Figura 03. Obesidade e mecanismos biológicos que contribuem para a associação epidemiológica entre obesidade e agressividade do CaP. Importante delimitar que a obesidade é um dos fatores que estão inclusos na síndrome metabólica, processo que pode ter relação com excessivos consumos de alguns micronutrientes e macronutrientes, como o açúcar. DRE = Exame retal digital; E = Estrogênio; IGF = Fator de crescimento semelhante à insulina; IL = Interleucina; PSA = Antígeno específico da próstata; T = Testosterona. Adaptada de Allott et al., 2013.

É importante, portanto, a compreensão acerca da ingestão dietética e seu papel na regulação da saúde, inclusive no âmbito que condiz com os processos inflamatórios. Nessa perspectiva, durante o consumo de alimentos contendo açúcar, glicose e frutose, tais monossacarídeos são absorvidos e

metabolizados de forma diferente. A frutose, em particular, não tem sua regulação pela insulina e seu metabolismo leva à significativa inflamação e adiposidade visceral, enquanto o excesso de glicose leva ao aumento de gordura subcutânea (Stanhope et al., 2009; Tchernof & Després, 2013). A frutose induz à inflamação, ocasionando aumento na 11B-hidroxiesteróide desidrogenase-1, e gera elevação nos níveis de cortisol intracelular em adipócitos subcutâneos, alterando ainda mais os processos metabólicos, de forma a prejudicar a função dos órgãos (London & Castonguay, 2011; Snel et al., 2012; Vasiljevic et al., 2014). Os mecanismos que envolvem o consumo dos açúcares “de adição” estão correlacionados, portanto, à inflamação metabólica, caracterizada por infiltrado de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa - $TNF-\alpha$ - (Hotamisligilet al., 1993), podendo causar resistência à leptina e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), derivando num recrutamento de monócitos e perpetuação do processo inflamatório (Fantuzzi et al., 2000; Shapiro et al., 2011). Sendo assim, é importante delinear os processos inflamatórios que derivam do alto consumo calórico de carboidratos durante a juventude, num âmbito de caracterizar os mecanismos sistêmicos e teciduais que envolvem os distúrbios no envelhecimento.

De forma minuciosa no que circunda as questões sobre próstata, inflamação e dietética, sabe-se que o consumo de açúcares concentrados pode estar relacionado ao risco de CaP, por meio da ativação de citocinas inflamatórias, como interleucinas, proteína C reativa e TNF (Lyngdoh et al., 2011), além de outros elementos, podendo ter uma correlação enfática com o nível de ácido úrico elevado no soro (Newens & Walton, 2016), o qual pode levar ao aumento da produção de IL- 1β e inflamação crônica (Shi, 2010). Alternativamente, o colesterol elevado pode ser relacionado ao risco de CaP também (Allott et al., 2014), induzindo a ativação da sinalização por NF-KB (Welty, 2013). Nessa lógica, uma condição que pode levar à perda de homeostasia não afetará apenas um órgão, mas sim um conjunto de tecidos e sistemas de maneiras distintas, caracterizando efeitos em um contexto integrado (Figura 04), sejam elas por vias desreguladas, exacerbação de alguns componentes biológicos ou até mesmo a falta de produção de componentes essenciais (Martins et al., 2019).

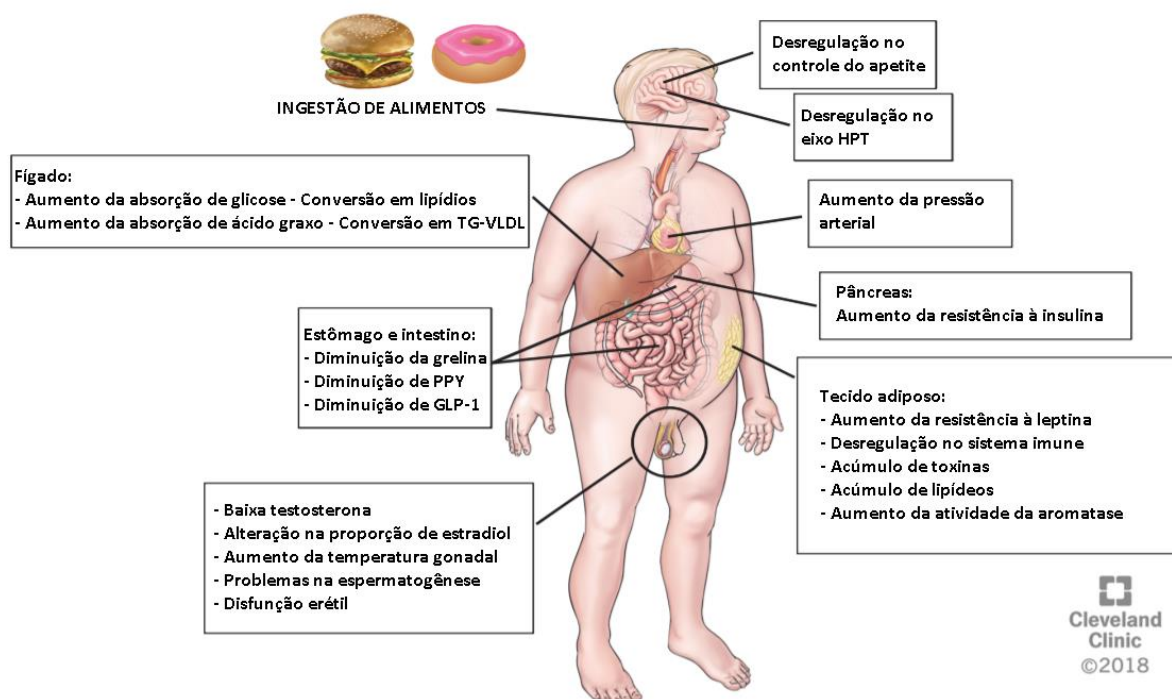


Figura 04. Fisiopatologia da síndrome metabólica, efeitos e consequências de cada componente (obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e pressão arterial elevada) no corpo humano. Uma visão sistêmica e fisiológica de como as patologias podem influenciar vários tecidos e sistemas concomitantemente, mas de maneiras distintas. Assim, o consumo do açúcar, que pode levar à síndrome metabólica ou a processos patológicos anteriores, é uma questão que não vai afetar somente o sistema genital masculino e a próstata, mas também outros sistemas. HPT: hipotálamo- hipófise-tireóide, TG: triglicerídeos, VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa, PYY: peptídeo YY, GLP-1: glucagon like peptide-1, CCK: colecistocinina. Adaptado de Martins et al., 2019.

Com isso, a ingestão de bebidas ricas em frutose ou açúcares adicionados, por exemplo, tem sido associada à SM, caracterizada por hipertensão, colesterol LDL alto, ácido úrico elevado e também inflamação (Johnson et al., 2009; Johnson et al., 2010; Jalal et al., 2010). A literatura já mostrou, também, que a ingestão de carboidratos ou adição de açúcar pode ter uma correlação inerente com o risco de CaP (Miles et al., 2018). Em um estudo prospectivo de coorte sueco, observou-se que alguns carboidratos refinados, como bolos e biscoitos, cereais com baixo teor de fibras, arroz e massas, foram associados ao CaP de baixo grau (Drake et al., 2012). Dessa forma, é possível delimitar diversos mecanismos que podem influenciar na relação entre as doenças crônicas e o consumo de açúcar, além de articular alguns desses pontos com problemáticas no sistema genital masculino, no que tange à senilidade e carcinogênese.

1.3 ENVELHECIMENTO, VIAS INFLAMATÓRIAS E CÂNCER DE PRÓSTATA

Englobando o tripé deste trabalho, RPM, consumo de açúcar e próstata, se tangencia um último fator importante que pode ter relação com os três: a inflamação. Assim, de forma geral, um número cada vez maior de evidências epidemiológicas indica que o risco de doenças não transmissíveis na vida adulta é, em parte, determinado pelo ambiente delimitado no início da vida (Calder et al., 2018), mas também o ambiente que envolve todo o desenvolvimento pode ser determinante para as mesmas. Nesse intuito, é necessário compreender por quais mecanismos específicos algumas doenças são desencadeadas, como o câncer, que pode ser desencadeado por fatores genéticos, inflamatórios, nutricionais (ambientais) ou até mesmo por patógenos, como no caso da alteração do microbioma tecidual, como na próstata (Porter et al., 2018) (Figura 05).

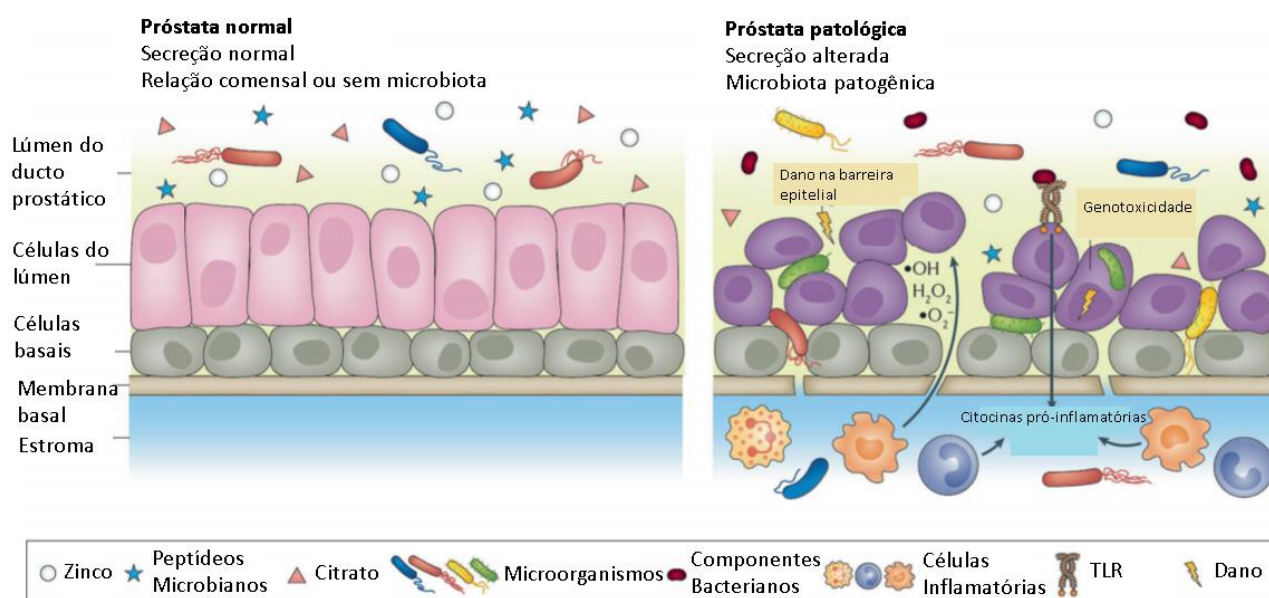


Figura 05. Interação do epitélio prostático com o microbioma urinário na homeostasia e patologia. O fluido prostático, na próstata saudável, contém altos níveis de componentes antimicrobianos, como zinco, peptídeos antimicrobianos (lactoferrina, defensinas e outros) e citrato. Portanto, a próstata saudável não contém ou contém apenas alguns organismos, que não são pró-inflamatórios quando a barreira epitelial luminal está intacta e secreções antimicrobianas normais estão presentes. Condições patológicas da próstata, como atrofia da próstata, podem levar a alterações no componente antimicrobiano do fluido prostático, levando ao crescimento de organismos comensais ou patogênicos do microbioma urinário no compartimento luminal dos ductos da próstata. (Roberts et al. 2004; Porter et al., 2018). Dessa forma, o intuito essencial dessa figura é demonstrar que existem componentes naturais da próstata em homeostasia e outros que podem desencadear patologias, por isso é importante delimitar o microambiente glandular em todos os seus compartimentos, seja em condições saudáveis, com alterações, ou nas patologias iniciais e agressivas. Figura e legenda adaptada de Porter et al., 2018.

Assim, a glândula prostática é de grande interesse médico-científico pela alta incidência de patologias (Banerjee et al., 2018). Segundo dados publicados pela “*Global Cancer Statistics*” (Globocan, 2018), o CaP é o 2º câncer que mais acomete homens no mundo, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma, e é a quinta principal causa de mortes, sendo diagnosticados no mundo 1.276.106 novos casos apenas em 2018, com maior diagnóstico em países desenvolvidos, atingindo homens com idades acima de 65 anos, além de ser mais comum em homens afro-americanos, que homens brancos (Bray et al., 2018). Além disso, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que a realidade do CaP não é diferente no Brasil, e a estimativa para o ano de 2020 foi de 65.840 novos casos, sendo a estimativa, para o triênio 2020 a 2022, de 11.180 novos casos ao ano (INCA, 2020).

O CaP é, portanto, uma questão a níveis globais, o qual acarreta demandas de saúde pública, justificando seu amplo estudo no meio científico. A inflamação, correlacionada a esse fator, afeta a carcinogênese à nível molecular, regulando o microambiente tumoral através da alteração do equilíbrio de citocinas, quimiocinas, fatores transcricionais e EROS (Nguyen et al., 2014). Portanto, câncer e inflamação têm uma relação convergente, reconhecida desde a década de 1860, quando Virchow observou, em tecidos neoplásicos, presença de leucócitos (Balkwill et al., 2001). Além disso, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas por células cancerígenas, células normais do microambiente tumoral e células inflamatórias invasoras têm demonstrado auxiliar no crescimento tumoral, migração e na metástase por meio da produção de alguns fatores denominados quimiotáticos, convergindo na produção de fatores angiogênicos e auxiliando na manutenção de uma inflamação através de um *feedback* contínuo (Balkwill et al., 2001; Coussens et al., 2002; Lu et al., 2006.). A inflamação prostática, pois, ocorre em uma série de padrões, caracterizada pelo tipo de célula (inflamação aguda caracterizada por neutrófilos e inflamação crônica caracterizada por células mononucleares, que são predominantemente linfócitos e macrófagos), bem como pela localização (estroma, intraepitelial ou luminal) (Nickel et al., 1999). Dessa forma, a estreita relação entre o desenvolvimento da imunidade tumoral e a indução da reatividade autoimune foi totalmente comprovada em modelos pré-clínicos e clínicos (Liu et al., 2020). Englobando essa linha de pensamento, recentemente, além de estratégias para direcionar células tumorais, estratégias para direcionar microambientes tumorais também foram exploradas (Dai et al., 2017).

Para compreender o papel da inflamação é necessário investigar algumas das interleucinas típicas desse processo. Citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 1, IL-6 e o TNF α estão envolvidos em diversos processos inflamatórios que podem estar relacionados aos tumores, além das citocinas anti-inflamatórias (EGF e TGF- β), desempenhando um papel importante na ativação de

diferentes vias de transdução relacionadas com carcinogênese (Bouraoui et al., 2008). Uma das funções destes processos é a promoção angiogênica, induzindo a liberação de componentes pró-inflamatórios, como prostaglandinas, acarretando proliferação celular, crescimento tumoral e metástase (Ricote et al., 2004; Elaraj et al., 2006; Khandia & Munjal, 2020). Assim, RPM e consumo de açúcar podem estar relacionados como indutores de componentes inflamatórios, sistemicamente ou tecidual, tendo relação com a formação neoplásica. Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que, em animais senis provenientes de mães submetidas à RPM, há um ambiente alterado, com vias específicas desreguladas para algumas proteínas, como ambiente estrogeinizado, que caracteriza a fase inicial da vida dos animais e a velhice, além dos níveis de testosterona desbalanceados, o qual leva, especificamente, à maior incidência de carcinoma *in situ* na PV (Santos et al. 2019; Santos et al., 2020). Outros estudos já caracterizaram também que roedores têm a próstata sensível à exposição estrogênica durante o desenvolvimento na vida fetal e neonatal, e esta condição de exposição transitória ao estrogênio, antes da puberdade, resulta em inflamação no passar da vida, bem após a exposição (Bianco et al., 2006; Prins et al., 2006). Além da relação entre processos inflamatórios e formação de câncer, é de suma importância contextualizar que as células sofrem ação direta de muitas EROS, e estas são produzidas como subprodutos do metabolismo celular normal, gerado por substâncias endógenas ou exógenas, podendo ser positivas ou negativas para os sistemas biológicos (Fridovich, 1978; McCord, 1993; Valko et al., 2006; Sies & Jones, 2020). Logo, existem as enzimas antioxidantes que são responsáveis por modular os radicais livres, sendo de suma importância para manutenção homeostática (Yang & Lee et al., 2015; Sies et al., 2017).

Articulado ao estresse oxidativo e ao fato da inflamação prostática ser um fator de risco para o CaP (De Marzo et al., 2007; Sfanos et al., 2012; Sfanos et al., 2018), é comum a inflamação do tipo crônica estar presente na próstata de adultos, como evidenciado por análises histológicas dos tecidos tomados por condições malignas ou benignas (Sfanos et al., 2018). Nesse âmbito, a prostatite não bacteriana, ou prostatite categoria III, por exemplo, é comumente observada em pacientes do sexo masculino, afetando a micção e causando disfunção (Alexander et al., 1996). É uma condição mal compreendida ainda, mas que se caracteriza por um ambiente inflamado, e é o mais comum problema geniturinário em homens adultos com idade menor a 50 anos, ocasionando problemáticas de saúde e na qualidade de vida (Wenninger et al., 1996; Collins et al., 1998; Khan et al., 2017). Portanto, a inflamação da próstata tem sido associada a todas as principais doenças prostáticas humanas, incluindo HPB, síndromes de prostatite e CaP (Sfanos et al., 2018). Além disso, 20% de todos os casos de câncer no mundo estão associados à inflamação crônica, infecção crônica ou ambos (Hanahan et al, 2011), demonstrando que a inflamação possui uma relação muito significativa em

patologias, podendo atuar como papel-chave nas alterações biológicas. Mais especificamente, algumas moléculas inflamatórias são nitidamente relevantes para se compreender os processos cancerígenos na próstata, sendo elas a IL-6, TNF α , IL-10, IL-1, IL-4, IL8, entre outras, de forma sistêmica e no próprio órgão, para se avaliar como está a relação entre o balanço pró-inflamatório e anti-inflamatório, pois quando elevadas em diagnóstico do balanço de inflamação, podem ser associadas ao CaP e sua gravidade potencializada (Stark et al., 2009; Arthur et al., 2018). Em suma, a próstata é um órgão imunocompetente e normalmente é povoada por um pequeno número de células inflamatórias como linfócitos T e B, macrófagos e mastócitos (Steiner et al., 1994) e, portanto, um número exacerbado desses tipos celulares pode indicar alguma problemática. Um conjunto de células distintas constitui a maioria dos tumores sólidos, que podem permitir o crescimento e a progressão do tumor, além do caráter geral de heterogeneidade e, notavelmente, as células inflamatórias presentes em tumores podem permitir promoção ou eliminação tumoral (Hanahan et al, 2011 – Figura 06).

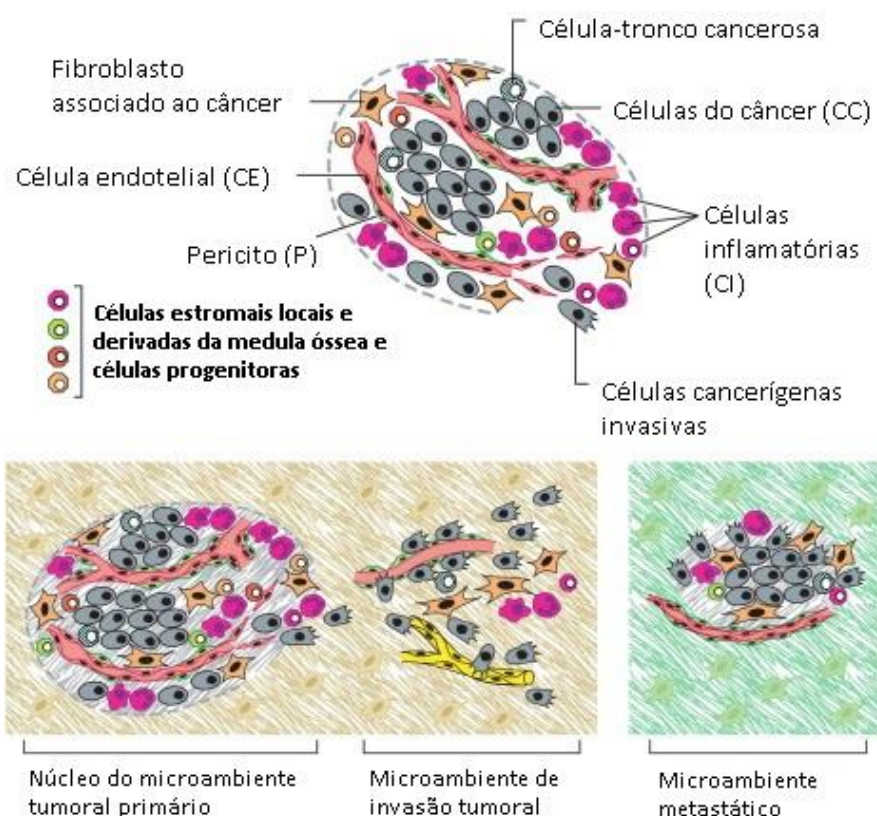


Figura 06. Células do microambiente tumoral. Tipos distintos de células constituem a maioria dos tumores sólidos, com ênfase no parênquima e estroma. As células inflamatórias presentes em tumores podem incluir subclasses de promoção ou eliminação do tumor. Os vários tipos de células estromais criam uma sucessão de microambientes. A abundância, organização histológica e características fenotípicas dos tipos de células do estroma, bem como da matriz extracelular, evoluem durante a progressão, permitindo assim o crescimento primário, invasivo e depois metastático. Adaptado de Hanahan et al, 2011.

As moléculas inflamatórias são, pois, diversas, e exercem diferentes respostas frente a algum estímulo. Sabe-se que a IL-6, por exemplo, é uma das principais citocinas, que fica desregulada no microambiente do câncer. Sua superexpressão foi relatada entre a maioria dos tumores, junto com todas as funções essenciais necessárias para o crescimento tumoral, incluindo a regulação de várias vias de sinalização (Khandia & Munjal, 2020). Além de seu envolvimento durante respostas imunes normais, a IL-6 pode influenciar processos como apoptose e angiogênese (Culig et al., 2005). Já a IL-1, citocina pró-inflamatória, tem demonstrado promover o crescimento e a progressão de vários tumores (Voronov et al., 2003), enquanto níveis séricos elevados de TNF- α e IL-6 estão correlacionados com a doença em estágio avançado e, conseqüentemente, diminuição da sobrevida em pacientes com CaP (Michalaki et al., 2004). Enquanto isso, a expressão de receptores da IL-8 em células do câncer, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos associados a tumores indicam que sua secreção estimula um efeito significativo sobre o microambiente tumoral. Assim, a ativação de receptores de IL-8 em células endoteliais faz com que haja promoção de uma resposta angiogênica, induzindo a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais vasculares (Li et al., 2003; Brat et al., 2005). Já a IL10 é uma importante citocina produzida por células imunes, como macrófagos, linfócitos T, mastócitos, entre outras, podendo ter papel tumorigênico ou de atividade antitumoral pela regulação negativa do VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MMP-9, além de inibir a translocação de NF-KB (Sheikhpour et al., 2018; Khandia & Munjal, 2020). Portanto, o número de células inflamatórias pode ser relevante para caracterização dos processos ali estabelecidos, como mastócitos, que quando elevados no CaP, em comparação com tecidos benignos, podem estar associados com prognóstico de câncer avançado (Sfanos et al., 2014).

Acerca do TNF- α , há uma relação de supressão no gene SRD5A2 e a expressão da proteína e, simultaneamente, promoção da expressão da aromatase, enzima responsável pela conversão da testosterona em estradiol. Wang e colaboradores (2017) sugeriram que, na ausência de SRD5A2 prostático, há uma mudança androgênica para estrogênica, demonstrando que essa alta estrogênica desde o início da vida, até o envelhecimento, pode ser uma das causas do CaP. Isso elucida que pode haver um papel importante de alguns componentes inflamatórios em vias específicas desses animais. Já em relação ao consumo de açúcar, há alguns estudos que demonstram correlação da inflamação com os tecidos, em especial o adiposo e, assim, pode-se esperar que haja alguns mecanismos inflamatórios desregulados em animais que tiveram essa condição durante parte de sua vida, que se correlaciona com a inflamação metabólica, caracterizada pela infiltração de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como alterações no sistema recompensa e no hipotálamo. (Hotamisligil et al., 1993; Freeman et al., 2018).

Além de compreender o balanço entre citocinas e quimiocinas inflamatórias, torna-se palpável a avaliação de algumas vias de sinalização específicas. No caso, já foi relatado que o fator transformador de crescimento- β (TGF- β), produzido por fibroblastos associados a tumor, promove o acúmulo de tecido desmoplásico fibrótico e influência na taxa de progressão do câncer (Bhowmick et al., 2004; Kalluri et al., 2006; Marsh et al., 2013), sendo sua superexpressão articulada com um prognóstico pior para CaP (Wu et al., 2015). Logo, uma das vias selecionadas foi da TGF- β 1, dos quais os membros desta família são reguladores importantes de diferenciação e apoptose das células epiteliais normais, podendo, porém, promover a tumorigênese (Massagué, 2008; Heldin et al., 2009). O TGF- β liga-se aos receptores de serina e treonina quinase do tipo II e tipo I (T β RII e T β RI, respectivamente), induzindo um complexo de dois T β RI (TGF β RI) e dois T β RIIs (TGF β RII) a serem formados. Neste, o T β RII constitutivamente ativo fosforila o T β RI, resultando na ativação da T β RI quinase, levando à fosforilação e translocação nuclear de SMADs associadas a receptor (R-SMADs), no qual, em conjunto com SMAD4, regulam a expressão de alguns genes alvos (Heldin et al., 1997; Mu et al., 2012) – Figura 07. Esses receptores são também sinalizados por vias não-SMAD, como a da fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K) e proteína quinase B (AKT) (Zhang, 2009).

Numa visão minuciosa, a via de sinalização TGF- β /SMAD está envolvida na regulação do crescimento celular, adesão, migração, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e apoptose (Blobe et al., 2000). Já foram descritos, em estudos com cultura celular, a relação entre fibroblastos associados a câncer e sua regulação na proliferação de células PC-3, através da via de sinalização do TGF- β 1, o qual pode explicar as vias de TGF- β como potenciais alvos terapêuticos (Sun et al., 2019). Contextualizados alguns parâmetros sobre esse fator de crescimento, pode-se delimitar que suas vias são muito ativas em diversos parâmetros homeostáticos, mas que podem estar exacerbados em condições patológicas, como durante o crescimento tumoral, pois o TGF- β 1 tem como uma de suas funções o início e desenvolvimento de respostas inflamatórias, recrutando e ativando diversos tipos de células do sistema imunitário, incluindo os mastócitos (Halova et al., 2012). Ainda sobre seu papel, há evidências da importância específica de uma das SMADs, a SMAD2, pois a mesma atua como mediadora crítica de TGF em relação à apoptose (Yang et al., 2009). Portanto, atualmente existem inibidores de pequenas moléculas direcionadas ao receptor TGF- β tipo 1 (TGFR1) quinase, que podem ser usados para tratar CaP no estágio de ensaio clínico (Batlle et al., 2019), enfatizando a importância biológica e médico-científica de estudos acerca do TGF e seus intermediários.

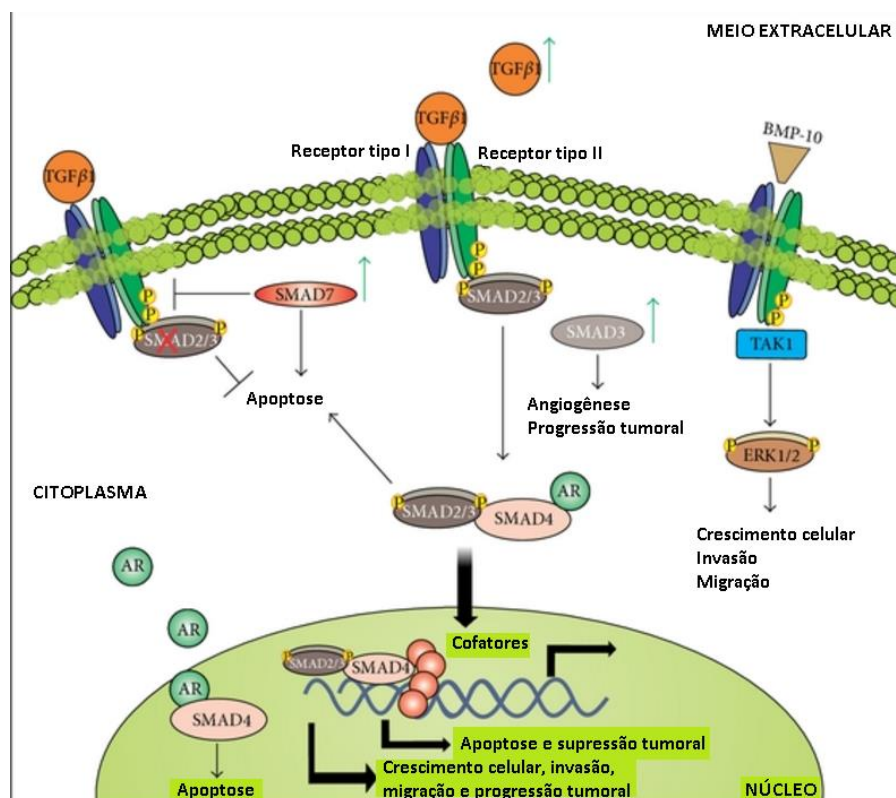


Figura 07. Via da TGF- β 1 com os intermediários de SMAD2, SMAD2p, SMAD2/3, SMAD3, SMAD4 e SMAD7. Tal sequência de reações depende da fosforilação do receptor T β RII para ativação da T β RI, ocasionando a fosforilação e translocação dessa cadeia de SMADs, com expressão de alguns genes alvo, estando associadas à apoptose celular, como também a processos de progressão tumoral. Receptores não-SMAD também estão demonstrados nesta figura, dos quais derivam, por exemplo, PI3K e AKT. Adaptado de Da Silva et. al, 2013.

Outra proteína relevante para se avaliar é a quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2), membro da superfamília de citocinas/quimiocinas, conhecida por promover a migração de monócitos e macrófagos para locais de inflamação. Estudos elucidaram que o CCL2 tem se mostrado um mediador ativo da tumorigênese e metástase de vários tipos de câncer, tendo seu papel na regulação da migração e proliferação de câncer de mama e, também, CaP (Valkovic et al., 1998; Vanderkerken et al., 2002; Ohta et al., 2002; Lebrecht et al., 2004; Loberg et al., 2006). Correlato ao CCL2, a proteína WNT5A apresenta características oncológicas, que remetem ao estímulo de produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias em células endoteliais, monócitos, células estromais ósseas e células cancerígenas (Rauner et al, 2012; Jung et al, 2013; Li et al, 2014), através das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPKs), Akt e NF-KB, um tipo de fator nuclear que pode promover a ativação direta ou indireta de fatores inflamatórios, quimiocinas, expressão inflamatória e do gene TGF- β (Chen et al., 2012). Além disso, estudos anteriores mostraram que a produção de um grande número de EROs pode ativar vias de sinalização inflamatória, como PI3K/Akt/NF-KB, e promover a expressão de fibras de colágeno tipo I e TGF- β 1,

promovendo, por fim, a ocorrência de fibrose (Cohen- Naftaly & Friedman, 2011; Grochot-Przeczek et al., 2012).

Há também uma relação de sinergia entre o palmitato e TNF- α para expressão de CCL2, num contexto de acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios em tecido adiposo, como característica de suma importância na obesidade, havendo correlação com expressão local de marcadores inflamatórios - TNF- α , IL-6, IL-1 β e MCP-1 -, codificados pelo gene CCL2 (Weisberg et al., 2003; Gustafson et al., 2007) – Figura 08a. Ainda nessa conjuntura, o acúmulo de ligante de quimiocina CC 2 (CCL2), CC 3 (CCL3), CC 4 (CCL4), CC 5 (CCL5) e CC 8 (CCL8), no microambiente tumoral, já foi associado a altos níveis de infiltração de macrófagos em vários tipos de malignidades, incluindo CaP (Negus et al, 1997; Azenshtein et al, 2002; Loberg et al, 2007; Szebeni et al, 2017). O CCL2 já foi denotado também em microambientes tumorais, no qual o CCR2 (receptor) é regulado em células cancerígenas, inclusive nas prostáticas (Lu et.al, 2007). Já foi relatado também que o tumor associado a macrófagos promove metástase no CaP, através da estimulação do eixo CCL2 – CCR2 (Izumi et. al, 2013; Lin et. al, 2013), ilustrado na Figura 08b.

Dessa forma, na análise de transcriptoma realizada em um projeto maior do nosso grupo, para animais submetidos à RPM, o gene CCL2 e a via da TGF- β apareceram desregulados, o que levou à proposta de avaliar suas vias em específico, visando o microambiente prostático e sistêmico de animais submetidos à RPM e comparando com os grupos que consumiram açúcar e os que tiveram os dois tipos de condições adversas, pois a linha de pensamento era de que as regiões de lesão e oncológicas teriam caráter molecular e inflamatório distintos.

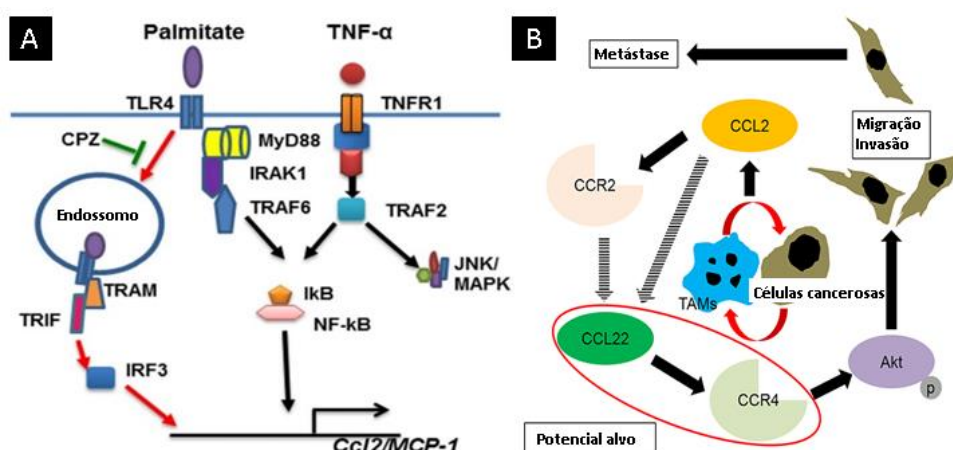


Figura 08. Ilustração das vias de sinalização correlacionadas à sinergia entre palmitato e TNF- α , convergindo na produção de CCL2. **A.** O mecanismo predominante dessa resposta sinérgica induzida pelo palmitato está indicado nas setas vermelhas. O CPZ pode inibir a internalização do TLR4 e suprimir a sinergia e a produção de CCL2. Adaptada de Ahmad et al.; 2018. **B.** Esquema dos eixos CCL2 – CCR2 e CCL22 – CCR4, elucidando interações entre macrófagos associados a tumores e células correlatas ao CaP. Macrófagos infiltram-se através da estimulação com células de CaP, havendo produção de CCL2 na próstata. O CCL2 aumenta o seu receptor e estimula o sinal. Posteriormente, o eixo CCL22 – CCR4 ativa Akt, o qual resulta em migração e invasão do câncer de próstata. Adaptado de Maolake et al., 2016.

Os alvos propostos para análise nesse trabalho foram previamente confrontados com os resultados disponíveis na ferramenta **SurvExpress** (Aguirre et al., 2013), da qual utiliza como base para seus estudos os dados de 497 pacientes, depositados no **The Cancer Genome Atlas Program** (TCGA). Ao analisar a curva de sobrevida, pode-se notar que os pacientes com CaP, que detêm alterações nesses alvos, possuem um pior prognóstico (p valor = 0,007532), levando a um risco de 9,61 vezes maior que àqueles que não apresentam alteração nesses genes, ocasionando menor sobrevida em torno de 1500 dias, como ilustra a Figura 09.

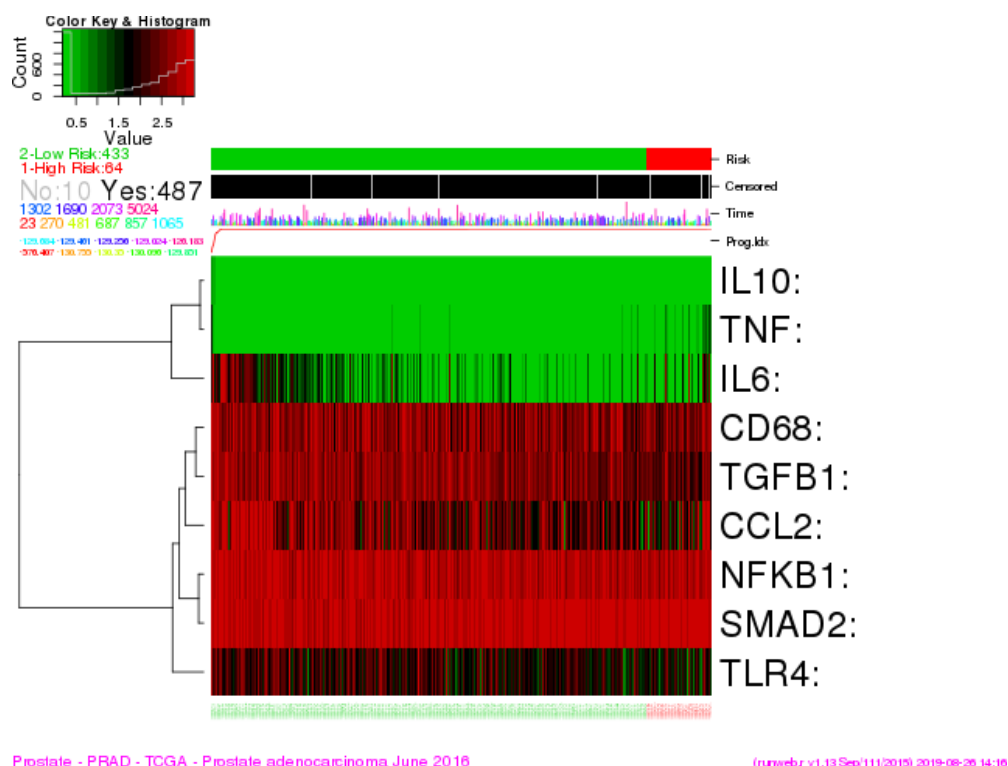


Figura 09. Curva de sobrevida gerada pelo *SurvExpress*, com as moléculas inflamatórias propostas nesse trabalho. Dentre os alvos selecionados, foram colocados a interleucina 10 (IL10), fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL6), macrófagos CD68 (CD68), Fator de transformação de crescimento β 1 (TGF β 1), quimiocina atraente de monócitos (CCL2), fator nuclear kappa B (NFKB1), SMAD2 e Recetor “Tool like” 4 (TLR4). Foram utilizados os dados de câncer de próstata do TCGA, que conta com dados de 497 pacientes. $p = 0,0007532$ e $hazard\ ratio = 9,61$.

É de suma importância deixar enfático que nosso grupo de pesquisa já descreveu o desenvolvimento de carcinoma *in situ* em animais submetidos à RPM no DPN 540 (Santos et al., 2019). Além disso, dados ainda não publicados do grupo apontam que o consumo de açúcar também leva ao desenvolvimento de carcinoma *in situ* na PV de animais senis. A Figura 10 remete a um carcinoma *in situ* em um animal que consumiu açúcar e outro submetido à RPM (Figura 10A e 10B, respectivamente).

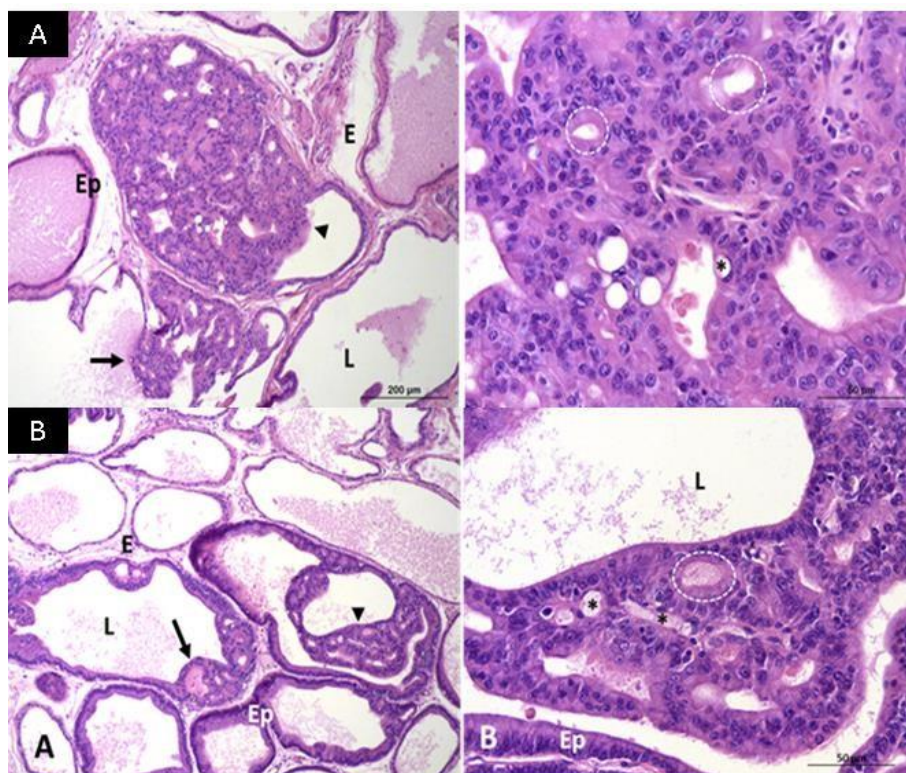


Figura 10. Carcinoma *in situ* na próstata ventral de animais submetidos ao consumo de açúcar (A) e à RPM (B). Coloração por Hematoxilina-eosina (HE). E. Estroma Ep. Epitélio L. Lúmen. A. Microácinos e alteração glandular. As regiões com círculos brancos representam alterações glandulares que indicam a inserção do carcinoma. Os asteriscos demonstram vasos sanguíneos. As setas indicam região de proliferação anormal e sobreposição das células epiteliais, indicando o processo neoplásico. Aumentos de 10x e 40x.

Além da análise dos alvos desregulados através do transcriptoma, também foram verificadas as vias enriquecidas, correlatas a processos inflamatórios, através da proteômica dos animais submetidos à RPM e ao consumo de açúcar no DPN 540, além de várias proteínas diferencialmente expressas (DE) e que cruzam entre si, direcionando a determinadas sinalizações *upreguladas* ou *downreguladas*. Essas vias foram enriquecidas através da plataforma **Enrichr** (Chen et al., 2013; Kuleshov et al., 2016; <https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), correlatas ao **KEGG** e **tipo celular**. Dos resultados, observou-se vias de spliceossoma, apoptose e células inflamatórias (linfócitos T CD4, CD8) *upreguladas* (Figura 11 A e B), quando cruzados os alvos DE entre o grupo CTR e o RPGL, enquanto vias de sinapse gabaérgica e hormônios de regulação hipotalâmica-hipofisária estavam *downregulados* (Figura 11 C e D). Em relação ao grupo CTR e CTR+AÇU, foram verificadas vias de sinalização de AMPK, autofagia, células do músculo esquelético e linfócitos CD4 *upregulados* (12 A e B), enquanto o metabolismo de colesterol, resistência à insulina, sinalização de PPAR e células hepáticas estavam *downreguladas* (Figura 12 C e D). No cruzamento entre CTR e RPGL+AÇU, as vias *upreguladas* foram de ribossomo, retículo endoplasmático, hormônios,

linfoblastos, CD34, e outras células de inflamação (Figura 13 A e B), enquanto o metabolismo de xenobióticos do citocromo p450, ciclo de Krebs, carcinogênese química e monócitos estavam *downreguladas* (Figura 13 C e D). Essas análises iniciais demonstraram uma convergência de dados interessante, pois caracteriza, em todas as vias enriquecidas, alguma correlação entre a RPM, consumo de açúcar e processos metabólicos articulados à inflamação, levando ao interesse da compreensão mais específica de cada parâmetro, em cada grupo experimental.

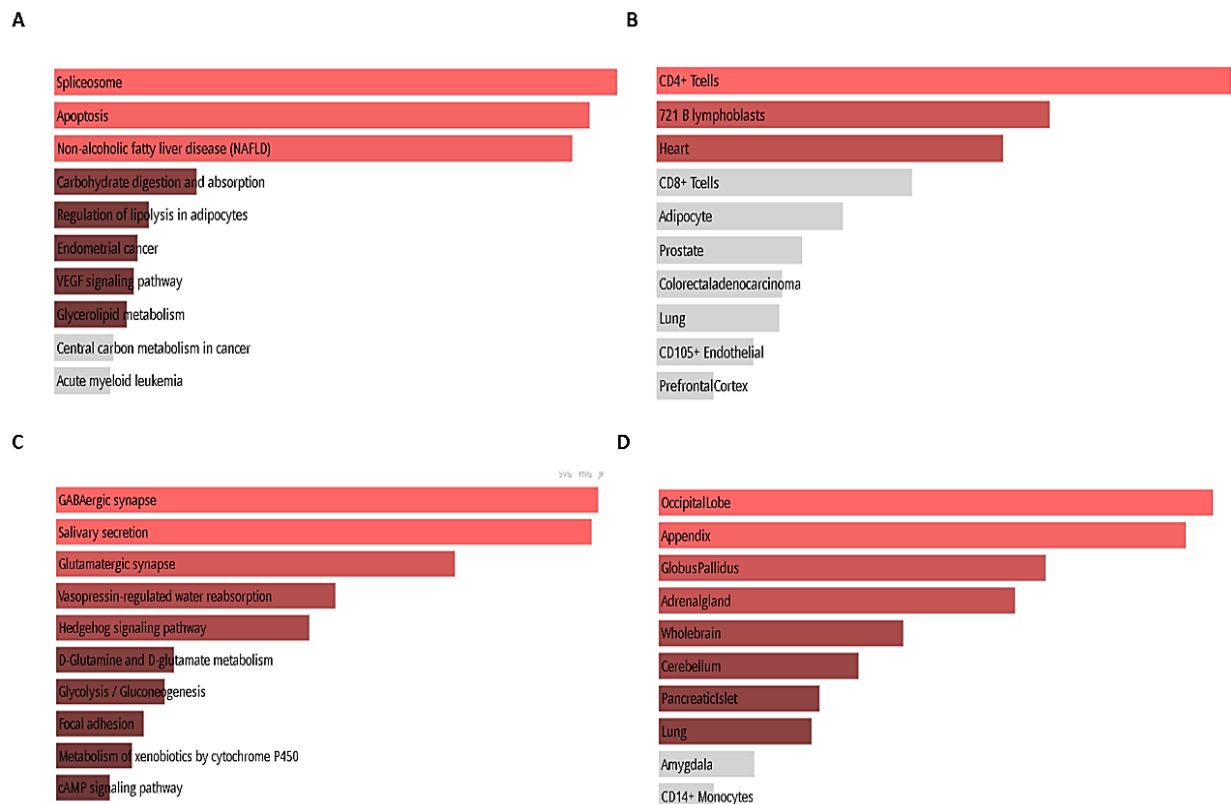


Figura 11. Vias enriquecidas através da plataforma *Enrichr*, por genes diferencialmente expressos através da análise de proteômica. Comparação entre os grupos CTRxRPGL. A. Enriquecimento através dos alvos *upregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias do spliceossoma e apoptose. B. Enriquecimento dos alvos *upregulados* pela plataforma de tipo celular, enfatizando linfócitos CD4 e CD8. C. Enriquecimento através dos alvos *downregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias gabaérgicas e hormonais. D. Enriquecimento dos alvos *downregulados* pela plataforma de tipo celular, elucidando alguns tecidos e monócitos.

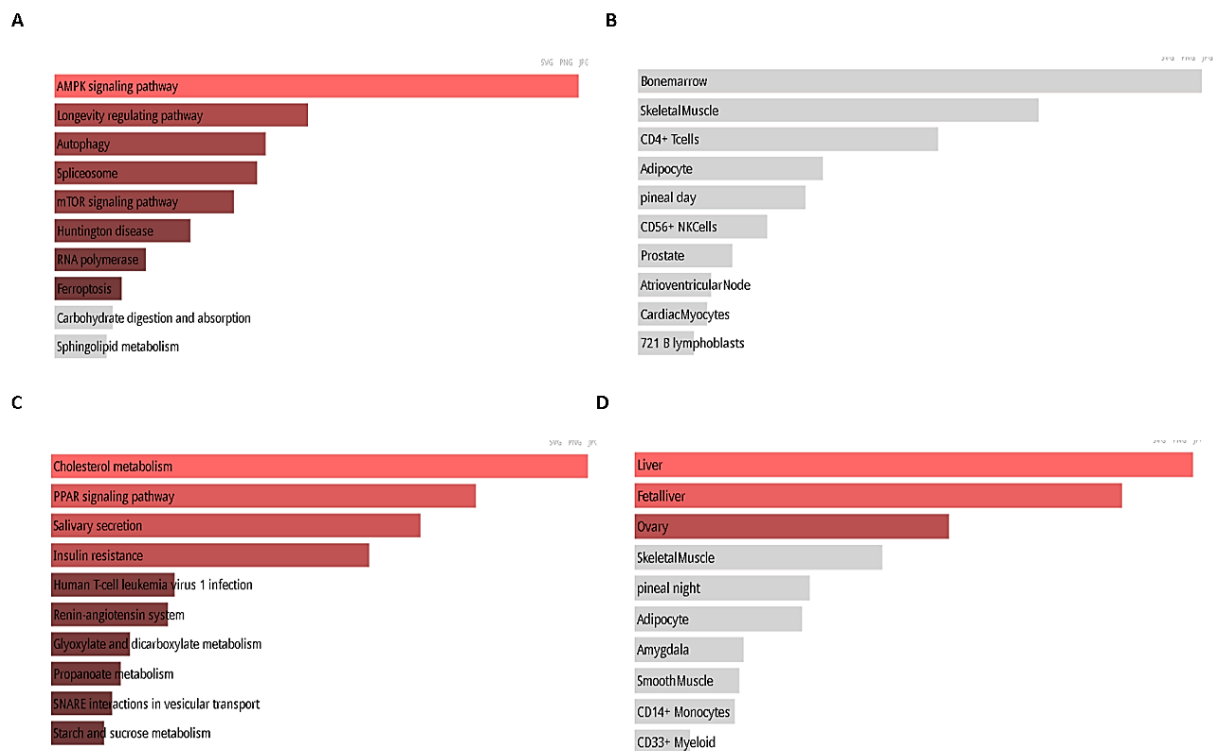


Figura 12. Vias enriquecidas através da plataforma *Enrichr*, por genes diferencialmente expressos através da análise de proteômica. Comparação entre os grupos CTRxCTR+AÇU. A. Enriquecimento através dos alvos *upregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias AMPK e autofagia. B. Enriquecimento dos alvos *upregulados* pela plataforma de tipo celular, enfatizando linfócitos CD4 e células prostáticas. C. Enriquecimento através dos alvos *downregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias do metabolismo de colesterol, resistência à insulina e PPAR. D. Enriquecimento dos alvos *downregulados* pela plataforma de tipo celular, elucidando tecido hepático e monócitos.

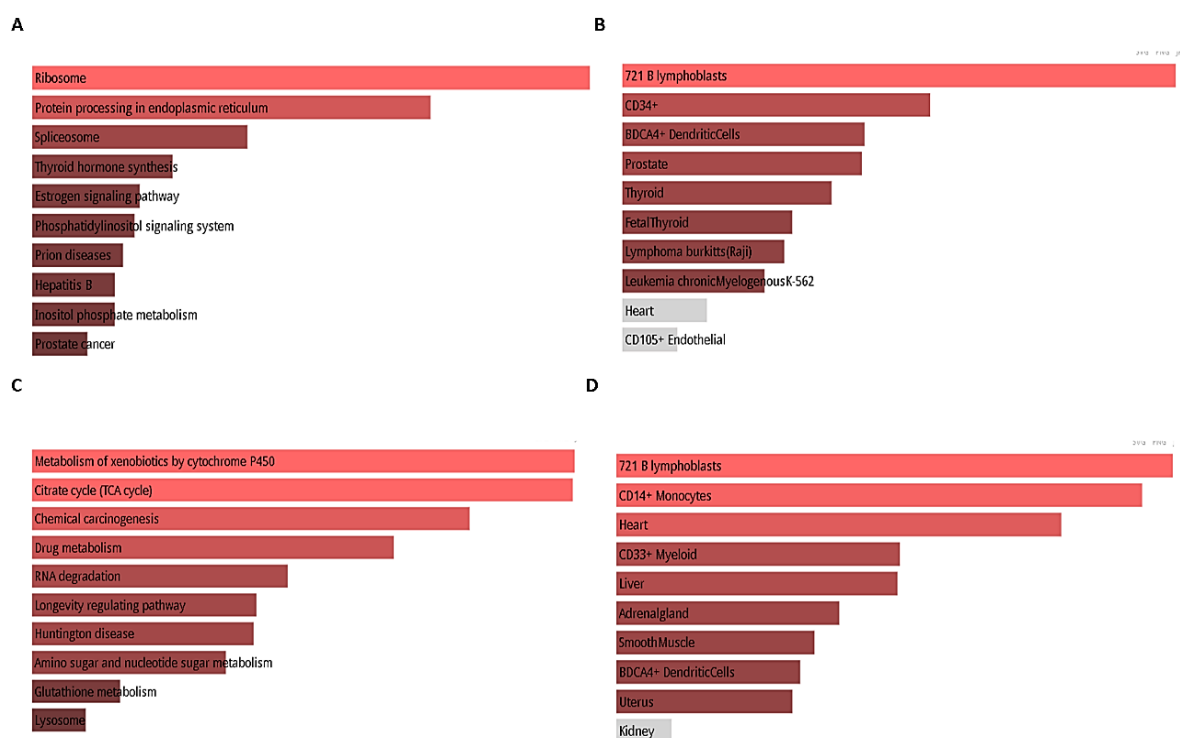


Figura 13. Vias enriquecidas através da plataforma *Enrichr*, por genes diferencialmente expressos através da análise de proteômica. Comparação entre os grupos CTRxRPGL+AÇU. A. Enriquecimento através dos alvos *upregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias do ribossomo e retículo endoplasmático. B. Enriquecimento dos alvos *upregulados* pela plataforma de tipo celular, enfatizando linfoblastos, CD34 e outras células inflamatórias. C. Enriquecimento através dos alvos *downregulados* e pela plataforma KEGG 2019, demonstrando vias de xenobióticos, ciclo de Krebs. D. Enriquecimento dos alvos *downregulados* pela plataforma de tipo celular, elucidando monócitos e células inflamatórias.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Considerando-se a importância da manutenção do **ambiente intrauterino** normal para o desenvolvimento adequado da **prole**, associado ao aumento de doenças crônicas, síndrome metabólica e consumo de “**açúcar de adição**”, principalmente por crianças em idade escolar, julgamos relevante investigar se o consumo de açúcar potencializa os efeitos adversos promovidos pelo microambiente intrauterino alterado pela RPM sobre a prole de ratos, enfocando na reconhecida associação entre consumo de açúcar, ambiente obesogênico e inflamação. Dessa forma, esse trabalho engloba aspectos de condições pré-natais e/ou pós-natais, a fim de caracterizar as alterações que ocorrem no tecido prostático e de forma sistêmica, com enfoque nos parâmetros inflamatórios.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da RPM associada ou não ao consumo de açúcar, em ratos velhos, com ênfase nos mecanismos moleculares envolvidos na inflamação sistêmica e intraprostática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da RPM e do consumo pós-natal de açúcar sobre a incidência de desordens na próstata ventral;
- A caracterização histológica do infiltrado inflamatório;
- O envolvimento de vias de inflamação (sistêmica e intraprostática) mediadas por CCL2 (TNF- α , NF κ -b e TLR-4) e TGF β 1 (Via SMADs);
- A localização tecidual das Interleucinas e células inflamatórias, associando estes resultados aos parâmetros histopatológicos nos diferentes grupos experimentais. A figura 14 explicita o delineamento, de forma resumida, do propósito deste trabalho.

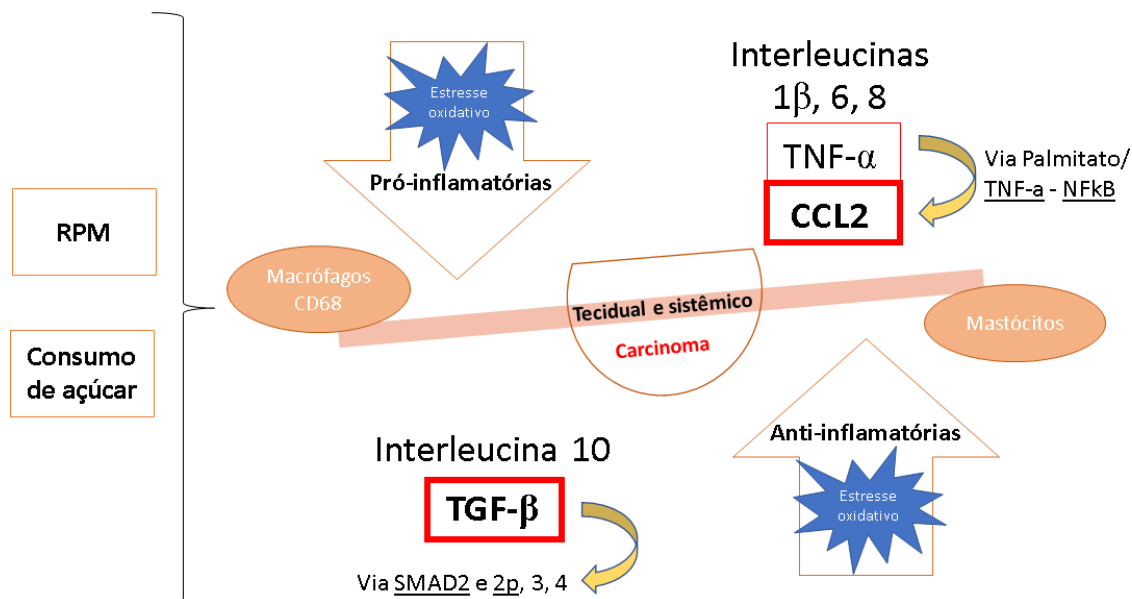


Figura 14. Delineamento dos objetivos deste trabalho. Avaliação dos efeitos da RPM e do consumo de açúcar em relação a parâmetros prostáticos e sistêmicos, inclusive tumorais, correlacionados a moléculas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias e, em específico, das vias do TFG-β1 e CCL2.

4. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão contidos, em forma de artigo científico, no capítulo 2 sob o título “*Maternal low protein diet and sugar consumption in postnatal life alter the prostate morphophysiology and causes inflammation in aging*”.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Doucette, C. A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 55, Issue 2, pp. 71–101). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1422109>.

Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martínez-Ledesma E, Martínez-Torteya A, Chacolla-Huaringa R, Alberto Rodriguez-Barrientos, José G. Tamez-Peña, Victor Treviño (2013) **SurvExpress**: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis.

Ahmad, R.; Al-Roub, A.; Kochumon, S.; Akther, N.; Thomas, R.; Kumari, M.; Koshy, M.S.; Tiss, A.; Hannun, Y.A.; Tuomilehto, J.; Sindhu, S.; Rosen, E.D. The Synergy between Palmitate and TNF-α for CCL2 Production Is Dependent on the TRIF/IRF3 Pathway: Implications for Metabolic Inflammation. **J Immunol.** May 15, 2018, 200 (10) 3599-3611; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701552>.

Alexander, R.B.; Trissel, D. Chronic prostatitis: results of an Internet survey, **Urology** 48 (4)

(1996) 568–574.

Allott, E. H., Masko, E. M., & Freedland, S. J. (2013). Obesity and prostate cancer: Weighing the evidence. In **European Urology** (Vol. 63, Issue 5, pp. 800–809). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.013>.

Allott EH, Howard LE, Cooperberg MR, et al. (2014) Serum lipid profile and risk of prostate cancer recurrence: results from the SEARCH database. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. Prev 23, 2349– 2356.

Antwi, S. Malnutrition: Missed Opportunities for Diagnosis. **Ghana Med J.**, v.42, p. 101-104, 2008.

Aquino, A. M., Salata, G. C., Pinho, C. F., de Freitas, A. T. A. G., Périco, L. L., de Lion Siervo, G.E. M., Mendes, L. O., Da Cunha De Medeiros, P., Justulin, L. A., Fernandes, G. S. A., Perobelli, J. E., & Scarano, W. R. (2019). Arsenic exposure during prepuberty alters prostate maturation in pubescent rats. **Reproductive Toxicology**, 89, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.010>

Arthur R, Williams R, Garmo H, et al. Serum inflammatory markers in relation to prostate cancer severity and death in the Swedish AMORIS study. **Int J Cancer**. 2018;142:2254-2262.

Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben- Baruch A (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. **Cancer Res** 62(4): 1093–2102.

Baccetti, B., La Marca, A., Piomboni, P., Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F., De Leo, V. Insulindependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Hum Reprod**, 17, 2673-2677, 2002.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**. 2001;357(9255):539–545.

Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, 6(2), 62–77.

Barker, D.J.P., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., Wadsworth, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**. 298:564- 7, 1989.

Barker, D.J. The developmental origins of well-being. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 359:1359-66, 2004.

Bartak, V., Josifko, M., Horackova, M. Juvenile diabetes and human sperm quality. **Int J Fertil**, 20,30-32, 1975.

Battle E., Massague J. Transforming growth factor-beta signaling in immunity and cancer. **Immunity** (2019) 50 924–940.

Bhowmick, N. A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A. E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M. K., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). TGF- β Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. **Science**, 303(5659), 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1090922>.

Bianco, JJ, McPherson, SJ, Wang, H, Prins, GS, and Risbridger, GP. Transient neonatal estrogen exposure to estrogen-deficient mice (aromatase knockout) reduces prostate weight and induces inflammation in late life. **Am J Pathol**. 2006; 168: 1869–1878.

Blobe, G.C; Schiemann, W.P; Lodish, H.F. “Role of transforming growth factor β in human disease,” **New England Journal of Medicine**, vol. 342, no. 18, pp. 1350–1358, 2000.

Bouraoui, Y.; Ricote, M.; Garcia-Tunon, I.; Rodriguez-Berriguete, G.; Touffehi, M.; Rais, N.B.; Fraile, B.; Paniagua, R.; Oueslati, R.; Royuela, M. Pro-inflammatory cytokines and prostate-specific antigen in hyperplasia and human prostate cancer, **Cancer Detect. Prev.** 32 (2008) 23–32.

Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of Interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. **Neuro-oncol** 2005;7:122–33.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A **Cancer Journal for Clinicians**, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Brinkmann, A.O. Molecular mechanisms of androgen action- a historical perspective. **Methods Mol Biol.**, v. 776, p. 3-24, 2011.

Burns, S.P., Desai, M., Cohen, R.D., Hales, C.N., Iles, R.A., Germain, J.P., Going, T.C., Bailey, R.A. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **J Clin Invest.** 100:1768-74, 1997.

Burton, G.J., Fowden, A.L., Thornburg, K.L. Placental Origins of Chronic Disease. 2016

Calder, P.C., Carding, S.R., Christopher, G., Kuh, D., Langley- Evans, S.C., McNulty, H., 2018. A holistic approach to healthy ageing: how can people live longer, healthier lives? **J Hum Nutr Diet** 31, 439e450.

Camargo, A.C., Santos, S.A.A., Rinaldi, J.C., Constantino, F. B., Colombelli, K.T., Scarano, W.R., Felisbino, S.L., Justulin, L.A. Streptozotocin-induced maternal hyperglycemia increases the expression of antioxidant enzymes and mast cell number in offspring rat ventral prostate. **Anat.Rec.** 2017.

Chazelas, E. et al. Sugary drink consumption and risk of cancer: Results from NutriNet-Santé prospective cohort. **The BMJ**, v. 366, 2019.

Chiarugi, P., Paoli, P., & Cirri, P. (2014). Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. **Seminars in Oncology**, 41(2), 267–280. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.004>.

Chen, X., Liu, C., Lu, Y., Yang, Z., and Lu, L. (2012). Paeoniflorin regulates macrophage activation in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. BMC Complement. **Alternat. Med.** 12:254. doi: 10.1186/1472-6882-12-254.

Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics.** 2013;128(14).

Cohen-Naftaly, M., & Friedman, S. L. (2011). Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. In Therapeutic Advances in Gastroenterology (Vol. 4, Issue 6, pp. 391–417). **Therap Adv Gastroenterol.** <https://doi.org/10.1177/1756283X11413002>.

Collins, M.M.; Stafford, R.S.; O'Leary, M.P. et al., How common is prostatitis? A national survey of physician visits, **J. Urol.** 159 (4) (1998) 1224–1228.

Colombelli, K. T., Santos, S. A. A., Camargo, A. C. L., Constantino, F. B., Barquilha, C. N., Rinaldi, J. C., Felisbino, S. L., & Justulin, L. A. (2017). Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition.

General and Comparative Endocrinology, 246, 258–269.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.12.016>

Côrtes LS, Silveira HS, Lupi LA, de Mello Santos T, Cavariani MM, Domeniconi RF, Gaiotte LB, de Moraes Oliveira DA, Justulin LA, de Almeida Chuffa LG. Maternal protein restriction impairs nutrition and ovarian histomorphometry without changing p38MAPK and PI3K-AKT-mTOR signaling in adult rat ovaries. **Life Sci.** 2021 Jan 1;264:118693. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118693.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. **Nature.** 2002;420(6917):860–867.

Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. . Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. **J Cell Biochem** 95:497–505, 2005.

Cunha, g.r.; Donjacour, a.a.; Cooke, p.s.; Mee, s.; Bigsby, r.m.; Higgins, s.j.; Sugimura, y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr Rev.**, v. 8, p. 338- 62, 1987.

Dahri, S., Snoeck, A., Reusens-Billen, B., Remacle, C., Hoet, J.J. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes.** 40:115-20, 1991.

Dai J., Lu Y., Roca H. et al. Immune mediators in the tumor microenvironment of prostate cancer. **Chin. J. Cancer** (2017) 36 29.

Da Silva HB1, Amaral EP, Nolasco EL, de Victo NC, Atique R, Jank CC, Anschau V, Zerbini LF, Correa RG. Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. **Prostate Cancer.** 2013;2013:920612. 10.1155/2013/920612.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nat Rev Cancer.** 2007;7:256–69.

Dearden, L., Ozanne, S.E. The road between early growth and obesity: new twists and turns.2014.

Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, Huang HF. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. **Asian J Androl.** 2015 Nov-Dec;17(6):948-53. doi: 10.4103/1008-682X.150844.

Drake, I, Sonestedt, E, Gullberg, B, et al. (2012) Dietary intakes of carbohydrates in relation to prostate cancer risk: a prospective study in the Malmo Diet and Cancer cohort. **Am J Clin Nutr** 96, 1409–1418.

Elaraj, D.M.; Weinreich, D.M.; Varghese, S.; Puhlmann, M.; Hewitt, S.M.; Carroll, N.M.; Feldman, E.D.; Turner, E.M.; Alexander, H.R. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts, **Clin. Cancer Res.** 12 (2006) 1088–1096.

Embleton, N.D., Korada, M., Wood, C.L., Pearce, M.S., Swamy, R., Cheetham, T.D. Catch-up growth and metabolic outcomes in adolescents born preterm. **Arch Dis Child.** Archdischild- 2015-310190, 2016.

Fantuzzi, G.; Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **J. Leukoc Biol**, 68 (4) (2000), pp. 437-446.

Freeman CR, Zehra A, Ramirez V, Wiers CE, Volkow ND, Wang GJ. Impact of sugar on the body, brain, and behavior. **Front Biosci** (Landmark Ed). 2018 Jun 1;23:2255-2266.

Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. **Science**; 201:875– 80, 1978.

Gandaglia, G. et al. The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). **BJU Int.** 112, 432–441 (2013).

Gete DG, Waller M, Mishra GD. Pre-pregnancy diet quality and its association with offspring behavioral problems. **Eur J Nutr.** 2021 Feb;60(1):503-515. doi: 10.1007/s00394-020-02264-7.

Giri A, Edwards TL, Motley SS, Byerly SH, Fowke JH. Genetic determinants of metabolism and benign prostate enlargement: associations with prostate volume. **PloS ONE.** 2015;10:e0132028.

Grochot-Przeczek, A., Dulak, J., & Jozkowicz, A. (2012). Haem oxygenase-1: Non-canonical roles in physiology and pathology. In *Clinical Science* (Vol. 122, Issue 3, pp. 93–103). **Portland Press Ltd.** <https://doi.org/10.1042/CS20110147>.

Guess, H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Epidemiol.Rev.**, v. 23, p. 152-158, 2001.

Gurka, M. J.; Filipp, S. L.; Deboer, M. D. Geographical variation in the prevalence of obesity, metabolic syndrome, and diabetes among US adults article. **Nutrition and Diabetes**, v. 8, n. 1, p. 14, 1 dez. 2018.

Gustafson, B., A. Hammarstedt, C. X. Andersson, and U. Smith. 2007. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 27: 2276–2283.

Habib, S., Zhang, Q., Baum, M. Prenatal programming of hypertension in the rat: Effect of postnatal rearing. **Nephron Extra.** 1:157-65, 2011.

Halova, I., Draberova, L., & Draber, P. (2012). Mast cell chemotaxis chemoattractants and signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). **Front Immunol.** <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00119>.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144: 646–674

Handelsman, D.J., Conway, A.J., Boylan, L.M., Yeu, D.K., Turtle, J.R. Testicular function and glycemic control diabetic men. A controlled study. **Andrology** 17, 488-496, 1985.

Hay, S. M., McArdle, H. J., Hayes, H. E., Stevens, V. J., & Rees, W. D. (2016). The effect of iron deficiency on the temporal changes in the expression of genes associated with fat metabolism in the pregnant rat. **Physiological Reports**, 4(21). <https://doi.org/10.14814/phy2.12908>

Heldin, C.-H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature** 390, 465–471 (1997).

Heldin, C.-H.; Landström, M.; Moustakas, A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Curr. Opin.* **Cell Biol.** 21, 166–176 (2009).

Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-1: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259 (5091) (1993), pp. 87-91.

INCA. (2020). O Câncer de Próstata| INCA - **Instituto Nacional de Câncer**. Câncer de Próstata.

Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, Chang C. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. **EMBO Mol Med.** 2013; 5: 1383-1401.

Jalal, DI, Smits, G, Johnson, RJ, et al. (2010) Increased fructose associates with elevated blood pressure. **J Am Soc Nephrol** 21, 1543–1549.

Johnson, RJ, Perez-Pozo, SE, Sautin, YY, et al. (2009) Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? **Endocr Rev** 30, 96–116.

Johnson, RJ, Sanchez-Lozada, LG & Nakagawa, T (2010) The effect of fructose on renal biology and disease. **J Am Soc Nephrol** 21, 2036–2039.

Jung YS, Lee HY, Kim SD, Park JS, Kim JK, Suh PG, Bae YS (2013) Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils. **Exp Mol Med** 45: e27.

Khan, F. U., Ihsan, A. U., Khan, H. U., Jana, R., Wazir, J., Khongorzul, P., Waqar, M., & Zhou, X. (2017). Comprehensive overview of prostatitis. In Biomedicine and Pharmacotherapy (Vol. 94, pp. 1064–1076). **Elsevier Masson SAS**. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.016>.

Khandia R, Munjal A. Interplay between inflammation and cancer. **Adv Protein Chem Struct Biol**. 2020;119:199-245. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.09.004..

Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. In Nature Reviews Cancer (Vol. 6, Issue 5, pp. 392–401). **Nat Rev Cancer**. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>.

Kolodny, R.C., Kahn, C.G., Goldstein, H.H., Barnett, D.M. Sexual dysfunction in diabetic men. **Diabetes** 23, 306-309, 1974.

Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**. 2016.

Lebrecht A, Grimm C, Lantzsich T, Ludwig E, Hefler L, Ulbrich E, Koelbl H. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer. **Tumour Biol**. 2004;25(1–2):14–17.

Leisegang K, Sengupta P, Agarwal A, Henkel R. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. **Andrologia**. 2021 Feb;53(1):e13617. doi: 10.1111/and.13617.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J Immunol** 2003;170:3369–76.

Li S, Wang W, Zhang N, Ma T, Zhao C (2014) IL-1beta mediates MCP-1 induction by Wnt5a in gastric cancer cells. **BMC Cancer** 14: 480.

Lin TH, Izumi K, Lee SO, Lin WJ, Yeh S, Chang C. Anti-androgen receptor ASC-J9 versus anti- androgens MDV3100 (Enzalutamide) or Casodex (Bicalutamide) leads to opposite effects on prostate cancer metastasis via differential modulation of macrophage infiltration and STAT3-CCL2 signaling. **Cell Death Dis**. 2013; 4: e764.

Liu, Y., Mikrani, R., Xie, D., Wazir, J., Shrestha, S., Ullah, R., Baig, M. M. F. A., Ahmed, A., Srivastava, P. K., Thapa, K. B., & Zhou, X. (2020). Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostate cancer: study of immune cells and cytokines. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 34(2), 160–172. <https://doi.org/10.1111/fcp.12517>.

Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK, Pienta KJ. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. **Neoplasia**. 2006;8(7):578–586.

Loberg RD, Ying C, Craig M, Yan L, Snyder LA, Pienta KJ (2007) CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. **Neoplasia** 9(7): 556–562.

London, E.; Castonguay, T.W. High fructose diets increase 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver and visceral adipose in rats within 24-h exposure. **Obesity**, 19 (5)

(2011), pp. 925-932.

Long, J. M., Trubenbach, L. A., Pryor, J. H., Long, C. R., Wickersham, T. A., SAWYER, J. E., & Satterfield, M. C. (2021). Maternal nutrient restriction alters endocrine pancreas development in fetal heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, 74, 106580. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106580>.

Lu, H., Ouyang, W., Huang, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res**. 2006;4(4):221–233.

Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z, Zhang J. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. **J Cell Biochem**. 2007; 101: 676-685.

Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ. Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. **BMJ**. 1999 Jul 24;319(7204):245-9. doi: 10.1136/bmj.319.7204.245.

Lyngdoh T, Marques-Vidal P, Paccaud F, et al. (2011) Elevated serum uric acid is associated with high circulating inflammatory cytokines in the population-based Colaus study. **PLoS ONE** 6, e19901.

Maolake, A.; Izumi, K.; Shigehara, K.; Natsagdorj, A.; Iwamoto, H.; Kadomoto, S.; Takezawa, Y.; Machioka, K.; Narimoto, K.; Namiki, N.; Lin, W-J.; Wufuer, G.; Mizokami, A. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22–CCR4 axis. 10.18632/oncotarget.14185. 2016.

Marker, P. C., Donjacour, A. a., Dahiya, R., & Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, 253(2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00031-3).

Marsh, T., Pietras, K., & McAllister, S. S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1832, Issue 7, pp. 1070– 1078). **Elsevier**. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>.

Martins, A. D., Majzoub, A., & Agawal, A. (2019). Metabolic syndrome and male fertility. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 37, Issue 2, pp. 113–127). **Korean Society for Sexual Medicine and Andrology**. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180055>.

Massagué, J. TGFβ in cancer. **Cell** 134, 215–230 (2008).

McCord, J.M. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. **ClinBiochem**; 26:351–7, 1993.

McMillen, I.C., Robinson, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol Rev**. 85:571-633, 2005.

McNeal, J. E. (1988). Normal histology of the prostate. **American Journal of Surgical Pathology**. <https://doi.org/10.1097/00000478-198808000-00003>.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. **Br J Cancer** 90:2312–2316, 2004.

Michels N, van Aart C, Morisse J, Mullee A, Huybrechts I. Chronic inflammation towards cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2021 Jan;157:103177. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103177.

Miles, F. L., Neuhouser, M. L., & Zhang, Z. F. (2018). Concentrated sugars and incidence of prostate cancer in a prospective cohort. **Proceedings of the International Astronomical Union**, 120(6), 703–710. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001812>.

Mu, Y.; Gudey, S.K.; Landström, M, Non-Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res.** 347, 11– 20(2012).

Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR (1997) Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. **Am J Pathol** 150(5): 1723–1734.

Newens, K.J., Walton, J. A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. **J Hum Nutr Diet.** 29(2):225-40, 2016.

Nguyen, Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100: 57–70, 2014.

Nickel, J. C., Downey, J., Young, I. & Boag, S. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. **BJU Int.** 84, 976–981 (1999).

Nieto, C. M., Rider, L. C. & Cramer, S. D. Influence of stromal–epithelial interactions on androgen action. **Endocr. Relat. Cancer** 21, T147–T160 (2014).

Niven, M.J, Hitman, G.A., Badenoch, D.F. A study of spermatozoal motility in type 1 Diabetes mellitus. **Diabetic Med,** 12, 921-924, 1995.

Nolan, P. B. et al. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. **Preventive Medicine Reports,** v. 7, p. 211–215, 1 set. 2017.

Noriega, N.C., Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Gray, L.E.Jr. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. **Toxicol Sci.** 111:163-78, 2009.

Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. **Int J Cancer.** 2002;102(3):220–224.

O’Neill, S., & O’Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obesity Reviews,** 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/obr.12229>.

Palladino E, Van Mieghem T, Connor KL. Diet Alters Micronutrient Pathways in the Gut and Placenta that Regulate Fetal Growth and Development in Pregnant Mice. **Reprod Sci.** 2021 Feb;28(2):447-461. doi: 10.1007/s43032-020-00297-1.

Pinho, C.F., Ribeiro, M.A., Rinaldi, J.C., Felisbino, S.L., Pinheiro, P.F., Domeniconi, R.F., Fochi, R.A., Boer, P.A., Scarano, W.R. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reprod Fertil Dev.** 26(7):967-73, 2014.

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., Dörner, G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **J Nutrition.** 130:2582-9, 2001.

Portela LM, Santos SA, Constantino FB, Camargo AC, Colombelli KT, Fioretto MN, Barquilha CN, Périco LL, Hiruma-Lima CA, Scarano WR, Zambrano E, Justulin LA. Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. **Mol Cell Endocrinol.** 2021 Mar 1;523:111148. doi: 10.1016/j.mce.2020.111148.

Porter, C. M., Shrestha, E., Peiffer, L. B., & Sfanos, K. S. (2018). The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. In Prostate Cancer and Prostatic Diseases (Vol. 21, Issue 3, pp. 345–354). **Nature Publishing Group.** <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0041-1>

Powell ES, Smith-Taillie LP & Popkin BM (2016) Added sugars intake across the distribution of US children and adult consumers: 1977–2012. **J Acad Nutr Diet** 116, 1543–1550.e1.

Prins, GS, Huang, L, Birch, L, and Pu, Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. **Ann NY Acad Sci.** 2006; 1089: 1–13.

Pucci, G., Alcidi, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., & Schillaci, G. (2017). Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. In *Pharmacological Research* (Vol. 120, pp. 34–42). **Academic Press**. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.008>.

Ramos, C. da F., Babinski, M.A., Costa, W.S., Sampaio, F.J. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. **Asian J Androl.** 12:180-5, 2010.

Rauner M, Stein N, Winzer M, Goettsch C, Zwerina J, Schett G, Distler JH, Albers J, Schulze J, Schinke T, Bornhauser M, Platzbecker U, Hofbauer LC (2012) WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production. **J Bone Miner Res** 27(3): 575–585.

Ravelli, G.P., Stein, Z.A., Susser, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med.** 12;295(7):349-53, 1976.

Reisinger C, Nkeh-Chungag BN, Fredriksen PM, Goswami N. The prevalence of pediatric metabolic syndrome-a critical look on the discrepancies between definitions and its clinical importance. **Int J Obes (Lond).** 2021 Jan;45(1):12-24. doi: 10.1038/s41366-020-00713-1.

Ricote, M.; Garcia-Tunon, I.; Bethencourt, F.R.; Fraile, B.; Paniagua, R.; Royuela, M. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma, **Cancer** 100 (2004) 1388–1396.

Rinaldi, J.C., Justulin, L.A.Jr., Lacorte, L.M., Sarobo, C., Boer, P.A., Scarano, W.R., Felisbino, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Science.** 92:763-4 2013.

Roberts, R. O., Lieber, M. M., Bostwick, D. G. & Jacobsen, S. J. A review of clinical and pathological prostatitis syndromes. **Urology** 49, 809–821 (1997).

Roberts, R. O., Bergstralh, E. J., Bass, S. E., Lieber, M. M., & Jacobsen, S. J. (2004). Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. **Epidemiology**, 15(1), 93–99. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000101022.38330.7c>

Rodríguez-González, G. L., Viguera-Villaseñor, R. M., Millán, S., Moran, N., Trejo, R., Nathanielsz, P. W., Larrea, F., & Zambrano, E. (2012). Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, 3(5), 321–326. <https://doi.org/10.1017/S2040174412000360>.

Rosenfeld, C. S. (2021). The placenta-brain-axis. **Journal of Neuroscience Research**, 99(1), 271–283. <https://doi.org/10.1002/jnr.2460>.

Ryu, J.K., Kim, D.J., Lee, T., Kang, Y.S., Yoon, S.M., Suh, J.K. The role of free radical in the pathogenesis of impotence in streptozotocin-induced diabetic male. **Yonsei Med J**, 44, 236- 241, 2003.

Santos, A.M., Ferraz, M.R., Teixeira, C.V., Sampaio, F.J., da Fonte Ramos, C. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. **Horm Metab Res.** 36:27-33, 2004.

Santos, M.A., Florencio-Silva, R., Medeiros, V.P., Nader, H.B., Nonaka, K.O., Sasso, G.R., Simões, M.J., Reginato, R.D. Effects of different doses of soy isoflavones on bone tissue of ovariectomized rats. **Climacteric**. 17(4):393-401, 2014.

Santos, S.A.A., Camargo, A.C., Constantino, F.B., Colombelli, K.T., Mani, F., Rinaldi, J.C., Franco, S., Portela, L.M.F., Duran, B.O.S., Scarano, W.R., Hinton, B.T., Felisbino, S.L., Justulin, L.A. Maternal Low Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis with Aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 10.1093/gerona/gly118, 2019.

Santos SAA, Camargo ACL, Constantino FB, Colombelli KT, Portela LMF, Fioretto MN, Vieira JCS, Padilha PM, de Oliveira MB, Felisbino SL, Carvalho RF, Justulin LA. Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging** (Albany NY). 2020 Oct 13;12(20):19954-19978. doi: 10.18632/aging.104093.

Scarano, W.R.; Toledo, F.C.; Guerra, M.T.; et al. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. **Toxicol.**, v. 262, p. 215-223, 2009.

Sheikhpour, E., Noorbakhsh, P., Foroughi, E., Farahnak, S., Nasiri, R., & Neamatzadeh, H. (2018). A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: A narrative. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, 7(1), 30e37.

Schulz, L.C.. The Dutch hunger winter and the developmental origins of health and disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107, 16757–16758, 2010.

Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. **Dtsch Arztebl Int**. 2017 May 12;114(19):339-346. doi: 10.3238/arztebl.2017.0339.

Sene LB, RIZZI VH, GONTIJO JAR, BOER PA. Gestational low-protein intake enhances whole-kidney miR-192 and miR-200 family expression and epithelial-to-mesenchymal transition in rat adult male offspring. **J Exp Biol**. 2018 May 22;221(Pt 10):jeb171694. doi: 10.1242/jeb.171694.

Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**. 2012;60:199–215.

Sfanos, K. S., Hempel, H. A. & De Marzo, A. M. in Inflammation and Cancer, **Advances in Experimental Medicine and Biology** Vol. 816 (eds Aggarwal, B. B., Sung, B. & Gupta, S. B.) 153–181, 2014.

Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nat Rev Urol**. 2018;15:11–24.

Shapiro, A.; Tumer, N.; Gao, Y.; Cheng, K.Y.; Scarpace, P.J. Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. **Br J Nutr**, 106 (2011), pp. 390-397.

Shi Y (2010) Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation. **J Clin Invest** 120, 1809– 1811.

Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., & Imaida, K. (2000). Experimental prostate carcinogenesis - Rodent models. In Mutation Research - **Reviews in Mutation Research** (Vol. 462, Issues 2–3, pp. 219–226). [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00039-9).

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.

Sies,H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. **Annu. Rev. Biochem.** 86:25.1–25.34, 2017.

Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2020 Jul;21(7):363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.

Singhal, A., Fewtrell, M., Cole, T. J., & Lucas, A. (2003). Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. **Lancet**, 361(9363), 1089–1097. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12895-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12895-4).

Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., Deanfield, J., & Lucas, A. (2004). Is Slower Early Growth Beneficial for Long-Term Cardiovascular Health? **Circulation**, 109(9), 1108–1113. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000118500.23649.DF>.

Snel, M.; Jonker, J.T.; Schoones, J. et al. Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. **Int J Endocrinol**, 2012 (2012), Article 983814, 10.1155/2012/983814.

Stanhope, K.L., Schwarz, J.M., Keim, N.L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose- sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J Clin Invest**, 119 (5) (2009), pp. 1322-1334, 10.1172/JCI3738.

Stark JR, Li H, Kraft P, et al. Circulating prediagnostic interleukin-6 and C-reactive protein and prostate cancer incidence and mortality. **Int J Cancer**. 2009;124(11):2683-2689.

Steiner G, Gessl A, Kramer G, Schollhammer A, Forster O, Marberger M. Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. **J Urol** 1994; 151: 480–484.

Sun, D. Y., Wu, J. Q., He, Z. H., He, M. F., & Sun, H. Bin. (2019). Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- β signaling pathway. **Life Sciences**, 235. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116791>.

Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG (2017) Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumour-associated macrophages as tumour promoters. **Mediators Inflamm** 2017: 9294018.

Teixeira, C. Vilanova, Silandre, D., de Souza Santos, A. M., Delalande, C., Sampaio, F. J. B., Carreau, S., & da Fonte Ramos, C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and estrogen receptors expression in rat testis at weaning. **Journal of Endocrinology**, 192(2), 301–311. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06712>.

Tchernof, A., Després, J-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update **Physiol Rev**, 93 (2013), pp. 359-404.

Timms, Barry G. (2008). Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**, 76(6), 565–577. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>.

Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development (Cambridge)**, 144(8), 1382–1398. <https://doi.org/10.1242/dev.148270>.

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions** 160: 1–40, 2006.

Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. **Pathol Res Pract**. 1998;194(5):335–340.

Van Weissenbruch, M.M., Engelbregt, M.J., Veening, M.A., Van Weissenbruch, H.A., et al. Fetal nutrition and timing of puberty. **Endocr Dev.** 8:15-33, 2005.

Vanderkerken K, Vande Broek I, Eizirik DL, Van Valckenborgh E, Asosingh K, Van Riet I, Van Camp B. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), secreted by bone marrow endothelial cells, induces chemoattraction of 5T multiplemyeloma cells. **Clin Exp Metastasis.** 2002;19(1):87–90.

Vasiljević, A.; Bursać, B.; Djordjevic, A. et al. Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11 β HSD1 expression in the liver of Wistar rats. **Eur J Nutr**, 53 (6) (2014), pp. 1393-1402.

Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 379–386). **Nature Publishing Group**. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>.

Vithayathil, M. A., Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., Langley-Evans, S. C., Gibson, R. A., & Muhlhausler, B. S. (2018). Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. **Nutrition and Metabolism**, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0253-3>

Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, BenharrochD, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:2645– 2650, 2003.

Wang Z, Hu L, Salari K, Bechis SK, Ge R, Wu S, et al. Androgenic to oestrogenic switch in the human adult prostate gland is regulated by epigenetic silencing of steroid 5 α -reductase 2. **J Pathol.** 2017;243:457–67.

Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.** 112: 1796– 1808.

Welsh, M.; Saunders, P.T.; Fiskens, M.; Scott, H.M.; Hutchison, G.R.; Smith, L.B. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest.**, v. 118, p.1479-90, 2008.

Welty, FK (2013) How do elevated triglycerides and low HDL cholesterol affect inflammation and atherothrombosis? **Curr Cardiol Rep** 15, 400.

Wenninger, K.; Heiman, J.R.; Rothman, I. et al., Sickness impact of chronic nonbacterial prostatitis and its correlates, **J. Urol.** 155 (3) (1996) 965–968.

West-eberhard, M. J. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 3, p. 723–731, 15 jan. 2019.

World Health Organization (2015). Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. Geneva: World Health Organization. n. http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/en/ (acesso em 30 de setembro de 2020).

Wu, C. Te, Chang, Y. H., Lin, W. Y., Chen, W. C., & Chen, M. F. (2015). TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 22, 1587–1593. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4804-9>.

Yacoub, J. H., & Oto, A. (2018b). MR Imaging of Prostate Zonal Anatomy. In *Radiologic Clinics of North America* (Vol. 56, Issue 2, pp. 197–209). **W.B. Saunders**. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2017.10.003>.

Yang, J.; Wahdan-Alaswad, R.; Danielpour, D. “Critical role of smad2 in tumor suppression and transforming growth factor- β -Induced apoptosis of prostate epithelial cells,” **Cancer Research**, vol. 69, no. 6, pp. 2185–2190, 2009.

Yang, H.-Y.; Lee, T.-H. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. **BMB Rep.**; 48(4): 200-208, 2015.

Zambrano, E., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., García-Becerra, R., Boeck, L., Díaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **J Physiol**. 563:275-84, 2005.

Zana-Taieb, E., Butruille, L., Franco-Montoya, M.L., Lopez, E., Vernier, F., Grandvuillemin, I., Evain-Brion, D., Deruelle, P., Baud, O., Delacourt, C., Jarreau, P.H. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. **PLoS One**. 21:e78326, 2013.

Zenzmaier, C., Untergasser, G., & Berger, P. (2008). Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. In *Experimental Gerontology* (Vol. 43, Issue 11, pp. 981–985). **Exp Gerontol**. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.06.008>.

Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. **Cell Res**. 19, 128–139 (2009).

CAPÍTULO II

ARTICLE

Maternal low protein diet and sugar consumption in postnatal life alter the prostate morphophysiology and causes inflammation in aging.

Matheus N Fioretto¹; Ketlin T Colombelli¹; Cecília F.L. da Silva¹; Sérgio AA Santos¹; Ana CL Camargo¹; Flávia B Constantino¹; Luiz M.F. Portela¹; Ariana M. de Aquino¹; Luisa A. Barata¹; Renato Mattos¹; Wellerson Rodrigo Scarano¹; Luis A Justulin¹

¹ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

Corresponding author: Luis A Justulin

Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil.

Zip Code: 18618-689

Phone number: +551438800481

email: l.justulin@unesp.br

Highlights

- Maternal LPD increases the insertion of inflammatory cells and unbalances the level of interleukins 6, 10 and 1.
- Sugar consumption induces the recruitment of inflammatory cells.
- Maternal LPD added to postnatal sugar consumption induce points of inflammation and inflammatory infiltrate, in addition to activating the TGF β 1-SMAD2/3 pathway in the ventral prostate of rodents.

Abbreviations

AGD - Ano-genital distance

BHP - Benign prostatic hyperplasia

CAT - Catalase

CCL – Monocyte Chemoattractant Protein

Col1 – Collagen 1

CTR- Control group

CTR+SUG – Sugar group

DOHaD – *Development Origins Heath and Disease*

FGF - Fibroblast growth factor

FP – Fetal programming

GD - Gestational day

GLLP – Low protein diet group

GLLP+SUG – low protein diet + sugar group

GSH - L- Glutathione reduced

IL – Interleukin

IRA - Inflammatory reactive atypia

LPD – Low protein diet

MetS - Metabolic syndrome

NF-KB – factor nuclear kappa B

PCa – Prostate câncer

PND - Postnatal day

PIN – Prostatic Intraepithelial neoplasia

PV- Próstata ventral PA- Próstata anterior PD- Próstata dorsal

ROS - Reactive oxygen species

SM – Síndrome metabólica

SOD – Superoxide dismutase

TGF- β 1 - Transforming growth factor- β 1

TNF – Tumor necrosis factor

VP – Ventral prostate

Abstract

Several studies have been demonstrated higher rate of chronic diseases in the adult population of individuals whose mothers had maternal low protein diet (LPD). The increasing consumption of sugar has been associated with the global metabolic diseases cases. Maternal LPD and sugar consumption may be associated with inflammatory processes in the prostate. So the aim is to investigate the role of inflammation pathways on the ventral prostate (VP) rats submitted to maternal LPD and sugar consumption. After weaning, male *Sprague Dawley* rats born from dams fed control diet (CTR, 17% protein) or low protein diet (GLLP, 6%) during gestation and lactation period were divided in 4 groups: CTR- consumed control diet and water until postnatal day (PND) 90; CTR+SUG - consumed sugar solution (10%) until PND 90; GLLP - received normal water until PND 90; and GLLP+SUG - consumed sugar solution until PND 90. On PDN 540 they were euthanized. The results demonstrate reduced body weight and less total fat in the GLLP and GLLP+SUG. An increase in mast cells and CD68 macrophages was observed in the VP of all groups, with an emphasis on these infiltrates in the GLLP+SUG. In addition, there was an increase in the inflammatory infiltrate and inflammation, especially in the GLLP+SUG. We verified high expression of TGF- β in systemic and intra-prostatic form occurred in GLLP+SUG. In addition, the phosphorylated SMAD2/3 was decreased. So, maternal LPD and sugar consumption negatively and directly affect prostatic homeostasis in senility and may have a relationship in the biology of cancer in this tissue.

Keywords: Maternal protein restriction, sugar, ventral prostate, inflammation.

1. Introduction

Epidemiological evidence correlates the increase in the chronic diseases incidence to processes suffered during intrauterine development. This period of high vulnerability is important for the development and growth of the different organs and systems (Burton et al., 2016). The English epidemiologist David Barker and colleagues demonstrated that low body weight at birth was related to greater risk of developing coronary heart disease and diabetes (Barker et al., 1989). So, the Barker's Hypothesis was defined, which subsequently led to the creation of an international society focused on this field of research, called Development Origins of Health and Disease (DOHaD) (Schulz, 2010). Thus, an increasing amount of evidence indicates that the risk of non-communicable diseases in adulthood is, in part, determined by the environment delimited in early life (Calder et al., 2018), but also the environment that involves all development can be decisive for some pathological processes.

The fetal programming by maternal diet has been demonstrated in several experimental animal studies, with physiological and metabolic consequences widely reported in offspring in response to maternal micronutrient or macronutrient restriction, and dietary excess (Hay et al., 2016; Vithayathil et al., 2018), altering, for example, the estrous cycle and ovarian histomorphometry (Côtés et al., 2021). Besides that, maternal LPD reduces the process of prostatic angiogenesis in early life (Colombelli et al., 2017), alter serum testosterone and estradiol concentration, increase in biomarkers and oxidative stress in PCa (Portela et al., 2020), in addition to enriching oncological pathways in early life and aging (Santos et al., 2020), which may be related to the increase in the incidence of prostatic carcinogenesis (Teixeira et al., 2007; Santos et al. 2019).

Governmental and health organizations around the world have been dedicated to assessing the relationship between increased consumption of dietary sugars and the incidence of obesity and related diseases, such as diabetes and cardiovascular disease (Newens & Walton, 2016). There are adverse conditions that involve the postnatal life, and one of which is the consumption of sugar, which is correlated with metabolic inflammation, characterized by infiltration of macrophages and release of pro-inflammatory cytokines, leptin resistance and ROS (Reactive oxygen species) release, resulting in monocyte recruitment, as well as bringing about changes in the reward system and in the hypothalamus (Hotamisligil et al., 1993; Fantuzzi et al., 2000; Shapiro et al., 2011; Freeman et al., 2018). In the last decade, metabolic syndrome (MetS) and metabolism markers have been identified as potential risk factors for benign prostatic hyperplasia (BHP) (Giri et al., 2015). The intake of drinks rich in fructose or added sugars, for example, has been associated with METs, characterized by high blood pressure, high cholesterol, uric acid, chronic inflammation, and which can be a risk factor for the development of several cancers, including PcA (Johnson et al., 2009; Johnson et al., 2010; Jalal

et al., 2010; Miles, et al., 2018; West- Eberhard, 2019; Chazelas, et al., 2019). In a Swedish prospective cohort study, it was observed that some refined carbohydrates, such as cakes and biscuits, were associated with low-grade or general PCa (Drake et al., 2012).

In this sense, one of which organ affected is the prostate, that is a sexual accessory gland responsible for the secretion of seminal fluid (Verze et al., 2016), but that encompasses a public health problem, as it can be affected by BHP and cancer in aging (Guess, 2001). Changes that occur during the fetal period can be decisive for the development of these diseases. Therefore, studies related to PCa are of great medical and scientific interest due to the high incidence of pathologies (Banerjee et al., 2018). PCa is the second most common type of cancer and the fifth most common cause of cancer-related death in men worldwide (Bray et al., 2018). Even so, data from the National Cancer Institute (INCA), show that the reality of the PCa is no different in Brazil, and the estimate for the year 2020 was 65,840 new cases, with the estimate for the triennium 2020 to 2022 of 11,180 new cases per year (INCA, 2020).

Thus, the prostate is an immunocompetent organ and is normally populated by a small number of inflammatory cells (Steiner et al., 1994), and inflammation in BPH, for example, is predominantly characterized by infiltration of T lymphocytes and macrophages (Kramer et al., 2007), and is frequently associated with increased CD8 + T lymphocytes, with the stromal insertion of clusters of B lymphocytes and CD4 + T lymphocytes, in addition to the relationship with stromal proliferation and fibrosis (De Nunzio et al., 2011; Hanahan et al, 2011; Pascal et al., 2021). The number of mast cells was found to be elevated in PCa, compared to benign tissues, may also be associated with prognosis in advanced PCa (Sfanos et al., 2014). Specifically, the accumulation of chemokine ligand (CCL2) in the tumor microenvironment has also been associated with high levels of macrophage infiltration in various level of cancer malignancies (Negus et al, 1997; Azenshtein et al, 2002; Loberg et al, 2007; Szebeni et al, 2017). In this context, prostatic inflammation has been linked to all major diseases of the human prostate, including BPH, prostatitis syndromes, and PCa (Sfanos et al., 2018). The close relationship between the development of tumor immunity and the induction of autoimmune reactivity that correlates with it has been fully proven in preclinical and clinical models (Liu et al., 2020). Studies demonstrated relationship between oxidative stress and prostate inflammation, like risk factor for PCa (De Marzo et al., 2007; Sfanos et al., 2012; Sfanos et. al, 2018) and it is common for chronic inflammation to be present in the prostate of adults (Sfanos et al., 2018).

Previous studies demonstrated that the production of a large number of ROS can activate inflammatory signaling pathways, and promote the expression of type I and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) collagen fibers, promoting the occurrence fibrosis (Cohen-Naftaly & Friedman,

2011;Grochot-Przeczek et al., 2012). It has been reported, for example, that the TGF- β , produced by fibroblasts associated with a tumor, promotes the accumulation of fibrotic desmoplastic tissue, and influences the rate of cancer progression, worse prognosis for PCa and initiation and development of inflammatory responses, recruiting and activating several types of cells of the immune system, such mast cells (Bhowmick et al., 2004; Kalluri et al., 2006; Halova et al. 2012; Marsh et al., 2013; Wu et al., 2015).

Considering the importance of maternal nutrition for prostate homeostasis, it becomes necessary to evaluate some possible markers of oxidative stress and inflammation that make up the prostate environment and the systemic approach, evaluating the maternal LPD and the consumption of sugar that have been able to cause possible harmful, inflammatory, and oncogenic processes in VP.

2. Material and methods

2.1. Laboratory animals and experimental procedure

Male and female *Sprague Dawley* rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). The animals and their offspring were kept in the Small Mammals Animal Hospital of the Department of Morphology in polyethylene boxes (2 per box) with autoclaved wood shavings substrate, under controlled light conditions (12 hours of photoperiod) and temperature between 22°C to 25°C. They had free access to filtered water and food. The experimental procedures are in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Botucatu Biosciences Institute (CEUA-951).

Sprague Dawley male and female rats mated and after pregnancy confirmation, dams were placed in individual boxes and separated into two groups: 1) Control group (CTR, n=20), which were fed with control diet (17% protein) during gestation and lactation periods and 2) Gestation and Lactation Low Protein group (GLLP, n=20), which received low protein diet (6% protein - the nutritional table of the diet is contained in the supplementary table 1). After weaning at postnatal day (PND) 21, the male rats were divided into 4 groups and all animals were fed with control diet: Control (CTR): rats were born from CTR dams were given filtered water; Control+Sugar (CTR+SUG): rats were born from CTR dams were given 10% sugar solution diluted in filtered water; Gestation and Lactation Low Protein diet (GLLP): rats were born from GLLP dams were given filtered water; Gestation and Lactation Low Protein diet+Sugar (GLLP+SUG): rats were born from GLLP dams

were given 10% sugar solution diluted in filtered water. The sugar was consumed from PND 21 until PND 90, and after PND 90 the rats consumed normal water until euthanasia PND 540 (Figure 01).

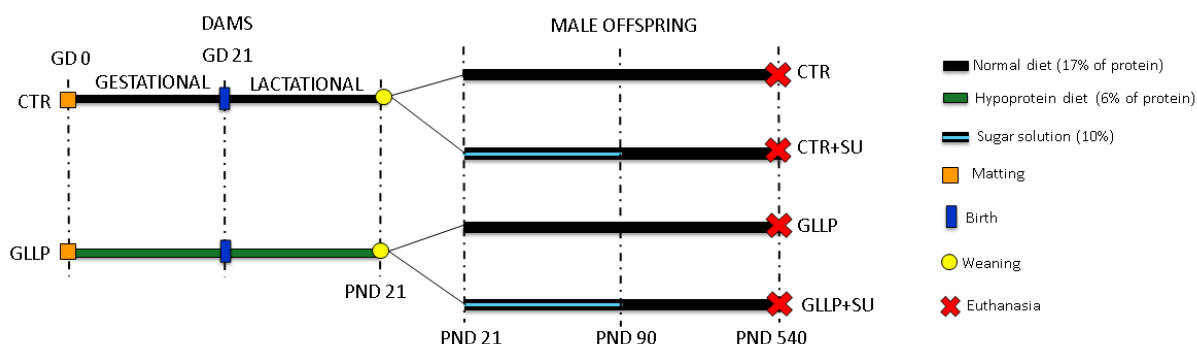


Figure 01. Experimental design. Pregnant rats on gestational day (GD) 0 were separated into 2 groups - one control (normoproteic diet consumption 17%) and the other restricted (6% hypoproteic diet consumption) and the offspring in 4 experimental groups: Control Group (CTR) who received normoproteic diet (gray bar), group CTR + sugar (SUG) who received refined sugar 10% diluted in water from the postnatal day (PND) 21 until PND 90; Maternal Protein Restriction group (GLLP) that received hypoprotein diet (orange bar) during pregnancy and lactation and the GLLP + SUG group that also received hypoprotein diet ration, however the sugar was diluted to 10% in water from DPN 21 to DPN 90 . The rats were euthanized in PND 540.

From PND 90 to PND 540, the animals received free access of water without the addition of sugar and normal diet. Refined sugar was used, the most frequently consumed type, marketed under the same brand for the entire experiment. The 10% sucrose concentration was chosen from data published by Kendig et al. 2015, that demonstrated the male offspring of rats that consumed 10% sucrose showed increased insulin sensitivity, in addition to higher blood glucose levels fasting compared to animals from whose mothers did not consume sugar.

On PND 540 the animals were weighed and anesthetized via intraperitoneal with the combined use of general anesthetic Ketamine at a dose of 0.0075 mL/kg with a concentration of 0.1 g/ml and the muscle relaxant Xylazine at a dose of 0.0025 mL/kg and concentration of 0.02g/ml. After anesthesia, the cervical vessels were ruptured by decapitation using a guillotine for rodents. Then, the lobes of the ventral prostate (VP) and fat were collected and weighed. After that, the right and left lobes of VP were separated, with 12 lobes immersed in fixative and processed by the histological techniques described below, and another 12 lobes were immediately frozen in liquid nitrogen kept in a freezer at -80°C. The animals' blood was collected, centrifuged and the supernatant stored for analysis.

Post-weaning (PND 21), the pups body weight, food and water intake were measured weekly throughout the experiment duration. On PND 90 and PND540, the adult male rats were anesthetized

(ketamine/xylazine), it was weighed and the body length (nose-to-anus or nose-anus length) was measured to determine the following anthropometrical parameters:

- The body mass Index (BMI)= body weight (g)/length² (cm²) (Novelli et al., 2007).
- Lee index= cube root of body weight (g)/ nose-to-anus length (cm) (Bernardis, 1970).

2.2. Systemic and tissue analysis

The blood was collected from male offspring (n=8 per group) on PND 540, it was centrifuged (2400 g for 20 min) and the serum was stored at -20°C until use. Plasma concentrations of total protein (99-250 Labtest, MG, Brazil), glucose (177013 Laborlab, MG, BRAZIL) and triglycerides (1770290 Laborlab. MG. Brazil) were determined by colorimetric methods using manufactures protocols, such as oral glucose analysis.

Plasma levels of CCL2/MCP-1 was measured by ELISA using as sample the blood plasma and VP of the animals collected, and plasma levels of TGF-β1, IL10, and IL1-β were measured by ELISA using a blood plasma samples. The molecules, product codes, detection limit and sensitivity of the analyzed targets are listed in according with *Abbkine* protocol and the procedure took place according to the manufacturer's procedures (*Abbkine*).

2.3. Histological and histopathological analysis

The VPs offspring (n = 6 per group) from PND 540 were fixed in methacarn (70% methanol + 20% chloroform + 10% acetic acid) (Puchtler et al., 1970), dehydrated in ethanol, diaphanized in xylene, and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). The sections were made in a rotating microtome with 5 μm thickness, collected on silanized slides and stored until the moment of use for the immunohistochemistry and histological techniques.

The morphometric analyzes were determined in the different experimental groups, evaluating the percentages of the glandular fractions (epithelial, luminal, and stromal) using the Weibel with 168 test points (Weibel et al., 1966). Measurements were performed in 10 random fields with the 20x objective, in 6 different prostatic lobes. The values the relative values were determined by counting the coincident points in the grid and dividing them by the total number of points.

Histopathological analyzes were performed in partnership with Professor Dr. Wellerson Scarano, of which 10 slides from each group were evaluated, stained in HE. To characterize the incidence of lesions, it was necessary that there was more than one region (field) with them, in the sense of reactive epithelial atrophy, atypical atrophy, focal physiological hyperplasia, dysplasia and

adenocarcinoma.

To identify mast cells, tissue sections were stained with 1% toluidine blue. As the granules within the mast cells contain heparin and sulfated glycosaminoglycan, they will be stained metachromatically using toluidine blue to evaluate and quantify the total mast cells. The number of total mast cells will be measured in 6 animals from each experimental group, and the values will be given in cells/mm². Random images from 60 histological fields per experimental group (10 images/mouse) will be captured by the conventional LeicaDM2500 light microscope (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), coupled to the digital camera and image analysis software (Leica Qwin.V3) using a lens 40x, with each field covering an area of 0.085 mm².

2.4. Immunohistochemistry

Histological sections of 5 µm (n = 6 per group) were deparaffinized, rehydrated, quenched in H₂O₂/methanol solution, and boiled for 30 min in 10 mM sodium citrate solution pH 6.0 or Tris/EDTA solution pH 9.0 for antigen retrieval. Prostatic sections were blocked in 5% nonfat milk in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with anti-CD68 (ab125212, Abcam, 1:500), anti-IL6 (ab6672, Abcam, 1:100), anti-IL10 (ab 9969, Abcam, 1:50), anti-Aquaporin1 (sc25287, Santa Cruz, 1:100), anti-VEGF (sc152, Santa Cruz, 1:50), anti-TNF-α (ab6671, Abcam, 1:150), anti-TGFβ-1 (sc146, Santa Cruz, 1:100), anti-Colagen 1 (sc8788, Santa Cruz, 1:100) and anti-FGF (sc7917, Santa Cruz, 1:100) specific primary antibodies overnight at 4°C. Slides were washed in PBS and incubated for 1 h at room temperature in either horseradish peroxidase (HRP), conjugated secondary antibody. The sections were washed and developed using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) and counterstained in hematoxylin for 30 seconds. The results were analyzed with the Leica DM2500 microscope and photodocumented by the image analyzer in the Leica LAS V4.5 software.

Counts of the amount of CD68 macrophages were made with n/6 per group, with 10 random and distinct fields for each slide, for counting and averaging the number of macrophages. Analyzed with the Leica DM2500 microscope and photodocumented by the image analyzer in the Leica LAS V4.5 software.

2.5. Intraprostatic levels of antioxidant enzymes

Antioxidant enzymes activities superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and L-Glutathione reduced (GSH) were performed as described by Périco et al., (2019) and Ohara et al., (2020). The VPs from different groups on PND 540 (n= 8 per group) were analyzed by the

colorimetric method. Initially, the samples were homogenized in extraction buffer (50 mM Tris- HCl, 0.25% Triton-X 100) and centrifuged at 4000g at 4°C for 30 min. to remove de insoluble material, following the total protein concentrations were quantified by the Bradford method (Bradford, 1976). Determination of SOD activity (Winterbourn et al., 1975), CAT activity. (Aebi, 1984), and GSH levels (Faure & Lafond, 1995). Descriptions of the different solutions and steps for each antioxidant enzyme are described in Portela et al., 2020.

2.6. Western blotting

Ventral prostates (n = 6/group) were homogenized in RIPA extraction buffer (Pierce, Rockford, IL, USA) added with a protease inhibitor. Subsequently, they were centrifuged at 4000 RPM at 4°C for 20 min to remove insoluble material. The determination of protein concentration was performed using the Bradford method (Bradford, 1976). Aliquots (70 µg of proteins) were submitted to electrophoresis, under reducing conditions, in 10% polyacrylamide gel. After the electrophoretic run, the proteins were electrotransferred to a Hybond ECL nitrocellulose membrane (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom). The membranes were blocked with 5% nonfat milk diluted in TBS for 1hours and then incubated for 16 hours at 4° C with the same primary anti- marker antibody, which binds to the desired target, anti-TLR4 (ab217274, Abcam, 1:1000), anti- TGF-β1 (sc146, Santa Cruz, 1:1000), anti-CCL2/MCP-1 (ab21396; Abcam, 1:1000), anti-TNFα (orb129753; 1:1000), anti-SMAD2/3 (#3102, Cell Signaling), anti-SMAD2/3p (D27F4, Cell Signaling), anti-NFκB (ab7970, Abcam, 1:1000), anti-IL6 (ab6672, Abcam, 1:1000), anti-IL10 (ab 9969, Abcam, 1:100), b-Actin (sc47778, Santa Cruz, 1:2000).

After washing in TBS, the membranes were incubated with specific secondary antibody for each primary for 2 hours and again washed in TBS. The relative molecular weight of the bands was determined according to the color-marked molecular weight standard, Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), which was placed together in the electrophoretic run. The reaction was developed using an ECL kit and the images of the bands were acquired using Image Quant 350 equipment (GE - Healthcare). Subsequently, semi-quantitative analyzes were performed by densitometry of the bands and the IOD values were statistically analyzed.

2.7. Statistical analysis

For continuous variables collected from the biometric parameters of the animals in the PND 90, descriptive statistics were calculated (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) for each experimental group (CTR, CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG). As statistical analysis,

generalized linear models (GLM) were adjusted, using the Gamma distribution, which has greater adjustment flexibility for data with asymmetric sample distribution. Differences among groups were tested by means of multiple comparisons using the Tukey-Kramer test with significance when p -value < 0.05 . Statistical analyses were performed using SAS statistical software (version 9.3, Statistical Analysis Systems, SAS Institute, Inc. Cary, NC) and, to adjust the models, the GENMOD procedure was used, which analyzed the continuous variables by means of GLM adjust, considering the gamma distribution (Madsen, 2011).

Statistical analyses of other parameters were performed using GraphPad Prism® software (version 8.0.1, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). The Shapiro-Wilk normality test was realized in all data. The parametric results were submitted to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test, and no-parametric data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunns. Data were expressed as mean $\pm$ SD or median $\pm$ SEM. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Figure 02 has a brief outline of the purpose of this work.

3.RESULTS

3.1. Biometric parameters

Regarding the biometric parameters, at birth, in development and senility, decreased weight and ano-genital distance (AGD) in the GLLP and GLLP + SUG groups are observed when compared to the CTR (supplementary table 2). A fact due to the lower amount of feed consumption of protein by mothers, indicating an already initial effect of maternal LPD and extending to aging. The change in these two parameters (body weight and AGD) shows maternal LPD impact in the offspring body structure (Table 01). In addition, on PND 540 smaller amounts of visceral, epididymal, and retroperitoneal fat (totaling total fat) were also observed in the GLLP and GLLP + SUG groups. The weight of Organs' reproductive organs (VP, testis, and epididymis) is shown in table 01. We observed an increase in the relative prostatic weight in the GLLP and GLLP + SUG groups.

Table 01. Biometric parameters of animals on PND540.

Parameters	Experimental Groups			
	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG
Initial body weight (g)	51.8 ± 1.43*	55.50 ± 1.71†	19.0 ± 1.16*	18.15 ± 0.92†
Final body weight (g)	556.4 ± 36.52 ^a	665.5 ± 18.76 ^{a†}	502.6 ± 16.99	461.7 ± 13.90†
Weight gain	503.3 ± 35.61 ^a	620.0 ± 18.19 ^{a†}	485.3 ± 16.95	442.2 ± 15.41†
Length	26.5 ± 0.51	26.5 ± 0.40†	25.2 ± 0.39	24.1 ± 0.37†
Anogenital distance (AGD) (cm)	32.00 ± 1.24	35.59 ± 1.05†	29.66 ± 1.02	30.00 ± 1.10†
Lee index (g/cm)	3.19 ± 0.08	3.26 ± 0.04	3.21 ± 0.04	3.27 ± 0.04
BMI (g/cm)	0.87 ± 0.07	0.93 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.87 ± 0.02
Adiposity index	6.71 ± 0.69	7.62 ± 0.56†	7.14 ± 0.37	6.75 ± 0.32†
Visceral fat absolute weight (g)	12.88 ± 2.48	14.25 ± 1.13	12.16 ± 0.94	9.68 ± 0.76
Visceral fat relative weight (g)	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001
Epididymal fat absolute weight (g)	18.27 ± 1.11*	18.52 ± 1.94†	11.76 ± 0.84*	11.69 ± 0.63†
Epididymal fat relative weight (g)	0.03 ± 0.002	0.03 ± 0.002†	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001†
Retroperitoneal fat absolute weight (g)	20.27 ± 1.41*	22.95 ± 2.03†	9.31 ± 0.88*	9.99 ± 1.02†
Retroperitoneal fat relative weight (g)	0.03 ± 0.002*	0.03 ± 0.002†	0.02 ± 0.001*	0.02 ± 0.001†
Total fat weight (g)	49.23 ± 4.36*	53.15 ± 4.61†	31.33 ± 2.25*	29.59 ± 2.17†
Relative fat weight (g)	0.08 ± 0.011*	0.08 ± 0.005	0.07 ± 0.003*	0.07 ± 0.003
VP absolute weight (g)	0.50 ± 0.05	0.46 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.61 ± 0.03
VP relative weight [‡]	0.0008 ± 0.0001 ^a	0.0007 ± 0.00006 ^{a†}	0.001 ± 0.00009	0.001 ± 0.00007†

^a Statistical difference by 't' test (p <0.05) between the control (CTR) and control + sugar (CTR + SUG) groups. * Statistical difference by 't' test (p <0.05) between the control groups (CTR) and gestational and lactational protein restriction (GLLP). † Statistical difference by 't' test (p <0.05) between the CTR + SUG groups and gestational and lactational protein restriction + sugar (GLLP + AÇÚ). ‡ Statistical difference by 't' test (p <0.05) between the GLLP and GLLP + SUG groups. Anogenital distance (AGD). descriptive statistics were calculated (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) for each experimental group (CTR, CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG). As statistical analysis, generalized linear models (GLM) were adjusted, using the Gamma distribution, which has greater adjustment flexibility for data with asymmetric sample distribution. Differences among groups were tested by means of multiple comparisons using the Tukey-Kramer test with significance when p-value < 0.05. VP- ventral prostate.

3.2. Metabolic parameters

In the metabolic analyzes related to glucose, total proteins and triglycerides, no significant differences were observed (Supplementary Figure 01 a/b/c), although there is a higher amount of triglycerides in the CTR + SUG group.

We realized the oral glucose tolerance test (OGTT). On PND 90, there was a significant increase in CTR+SUG group in area on the curve (AUC). In aging animals, there was an increase in AUC in the CTR + SUG group but not significant (Supplementary Figure 01 d/e).

3.3. Histopathological parameters

The results of the morphometric analysis showed that there was no difference in the epithelial compartment, but a luminal decrease in the GLLP + SUG group, when comparing CTR and CTR + SUG. In the stromal portion, there was an increase in the GLLP + SUG group in relation to the GLLP and CTR + SUG (Figure 02).

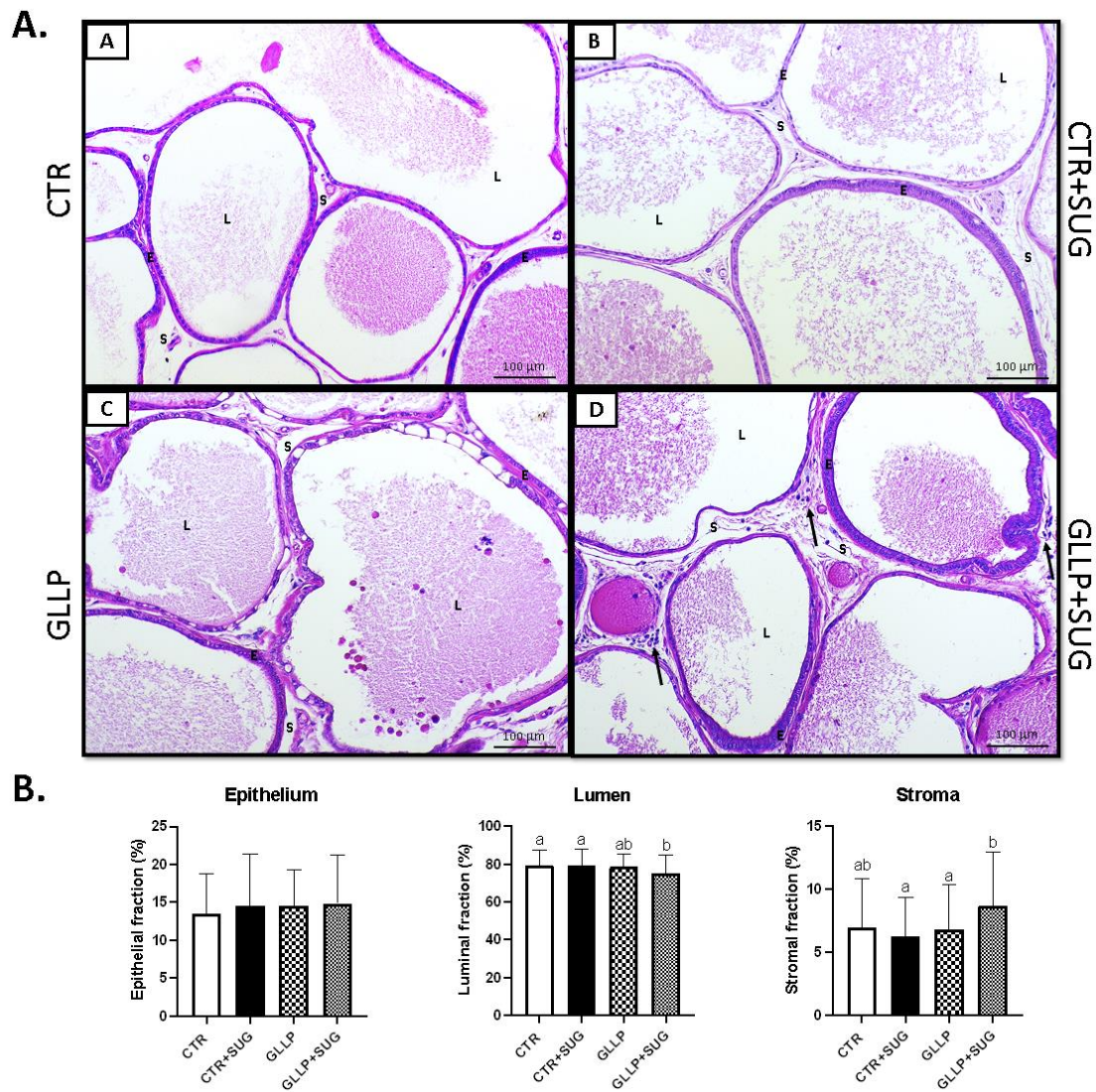


Figure 02. Morphometric analysis of the DPN540 animals. A. Plank representing the prostatic lobes stained in HE, from different experimental groups. The arrows indicate, specifically in the GLLP + SUG group, a stromal increase with insertion of inflammatory cells. E. Epithelium. S. Stroma. L. Lumen. A. CTR. B. CTR + SUG. C. GLLP. D. GLLP + SUG. 20x magnification. B. Tables referring to glandular compartment statistics, showing luminal decrease and stromal increase in the GLLP + SUG group. The letters (a and b) indicate the differences between the experimental groups. Differences among groups were tested by means of multiple comparisons using the Tukey-Kramer test with significance when p-value < 0.05.

Regarding histopathological analyzes, lesions were observed in all experimental groups, which is typically associated with the aging process. Atrophy, atypia epithelia, focal peripheral hyperplasia, dysplasia, and PIN were observed in all groups (Figure 03), with emphasis on a high concentration of inflammatory foci and inflammatory reactive atypia in the groups, when compared with CTR (Figure 04). Regarding the tumor processes, we did not see an increase in incidence, but we found a tumor in some animals in the CTR + SUG, GLLP, and GLLP + SUG group (Figure 05).

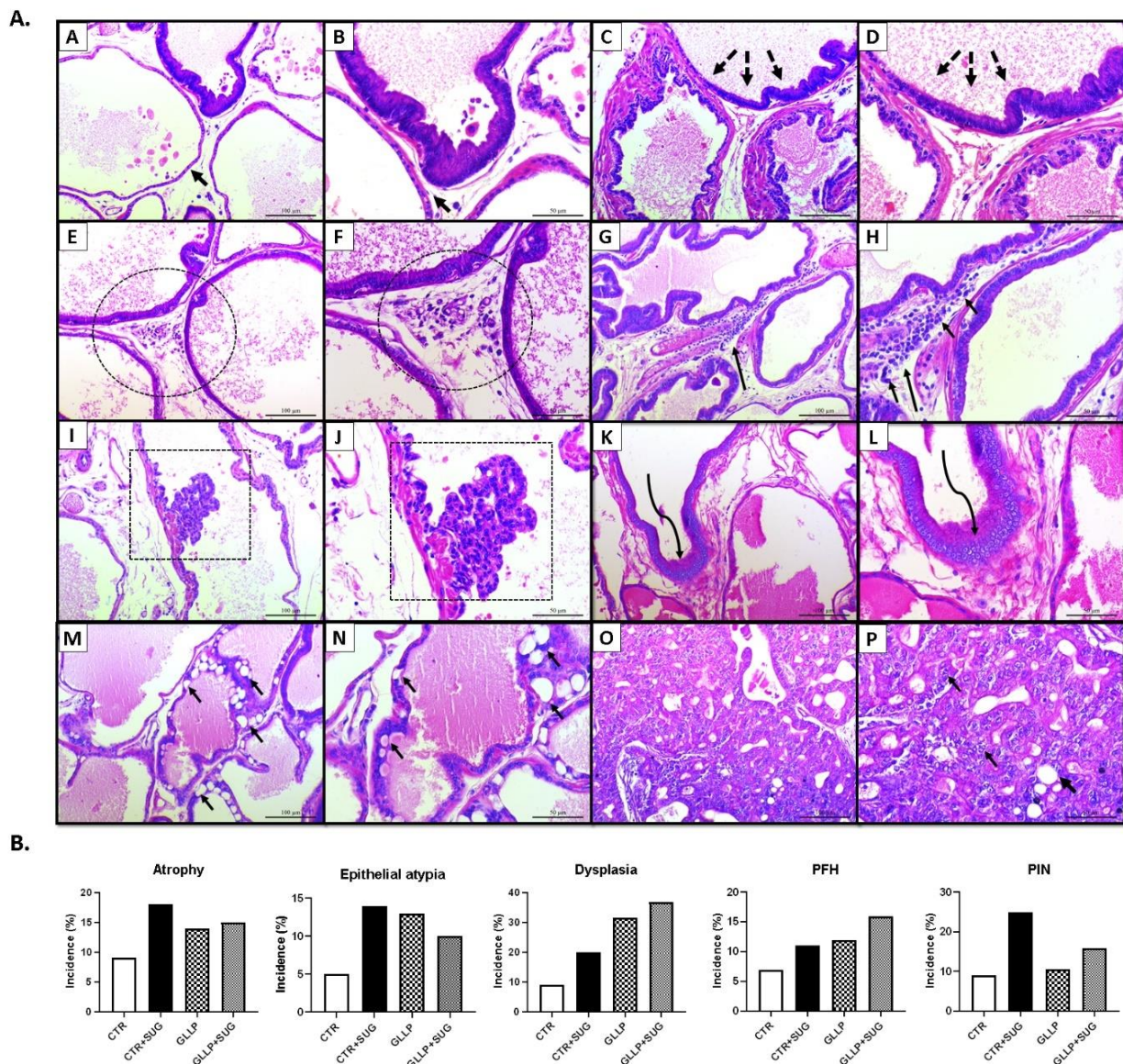


Figure 03. A. Representative image of the histopathological analysis, showing all the lesions found. The analysis emphatically demonstrated a higher incidence of injury in the CTR + SUG, GLLP and GLLP + SUG groups, of which some animals had adenocarcinoma, which did not occur in the CTR. A and B. Atrophy (indicated by the arrow). C and D. Epithelial atypia (indicated by dashed arrows). E and F. Inflammatory reactive atypia (dashed circle). G and H. Inflammation (arrows point to some inflammatory cells, such as lymphocytes). I and J. Dysplasia (dashed square). K and L. Peripheral focal hyperplasia (non-linear arrow). M and N. Intraepithelial neoplasia (PIN) (neoplasia points indicated

by arrows). O and P. Carcinoma in situ. Prostate lobes stained with hematoxylin-eosin. Magnification of 20x and 40x. **B.** Incidence rate of prostatic lesions in different experimental groups.

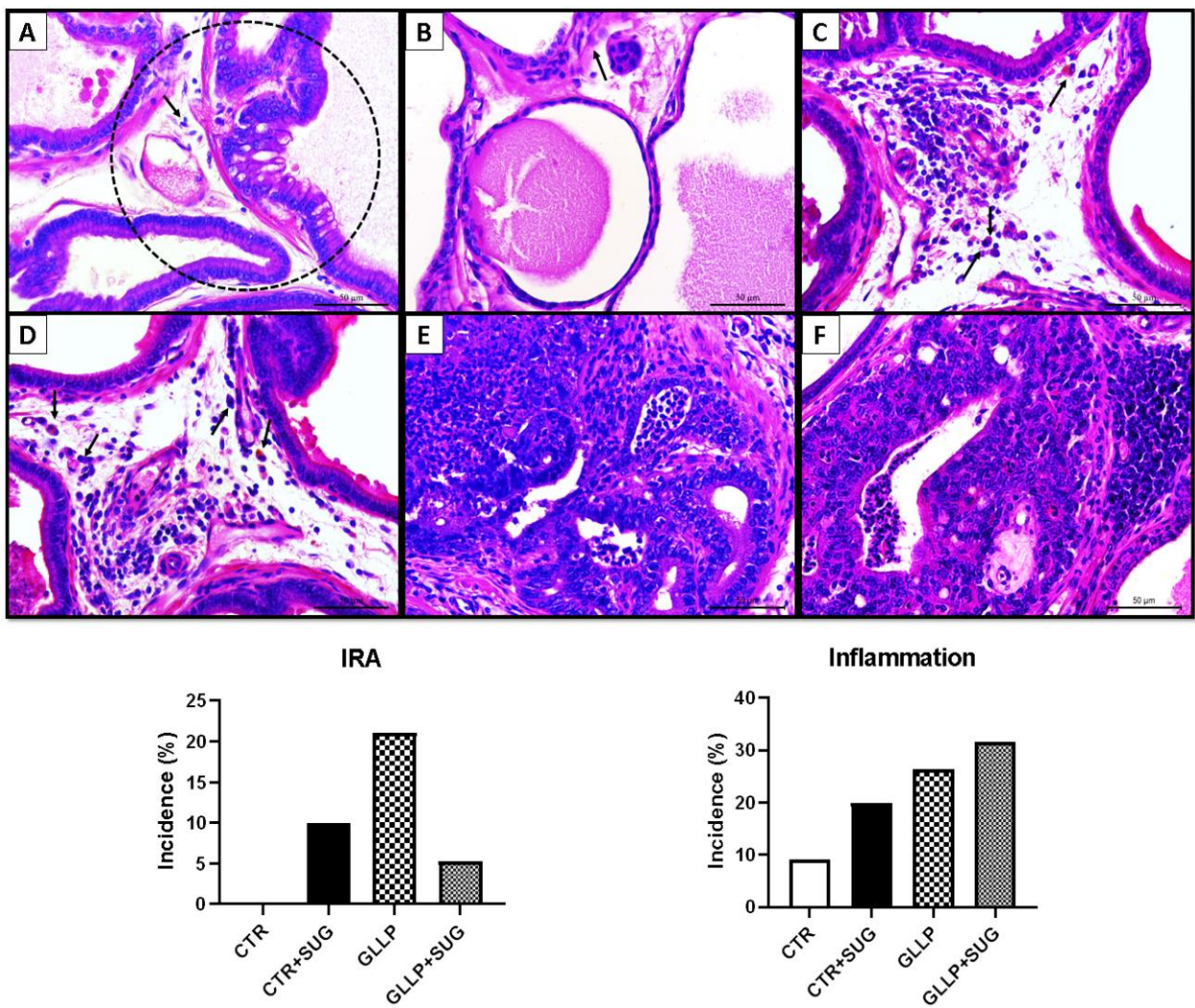


Figure 04. A. Representative images of histopathological analyzes of inflammatory reactive atypia and inflammation. A and B. inflammatory reactive atypia - Dashed circle indicates the aggregate region of inflammatory cells and epithelial and glandular changes, while the arrow points to one of these cells. C, D, E, F. Inflammation - Arrows point to inflammatory cells (lymphocytes and macrophages). Prostate lobes stained with hematoxylin-eosin (HE). Increase 20x and 40x. **B.** Representation of the incidence of inflammatory reactive atypia (IRA) and inflammation.

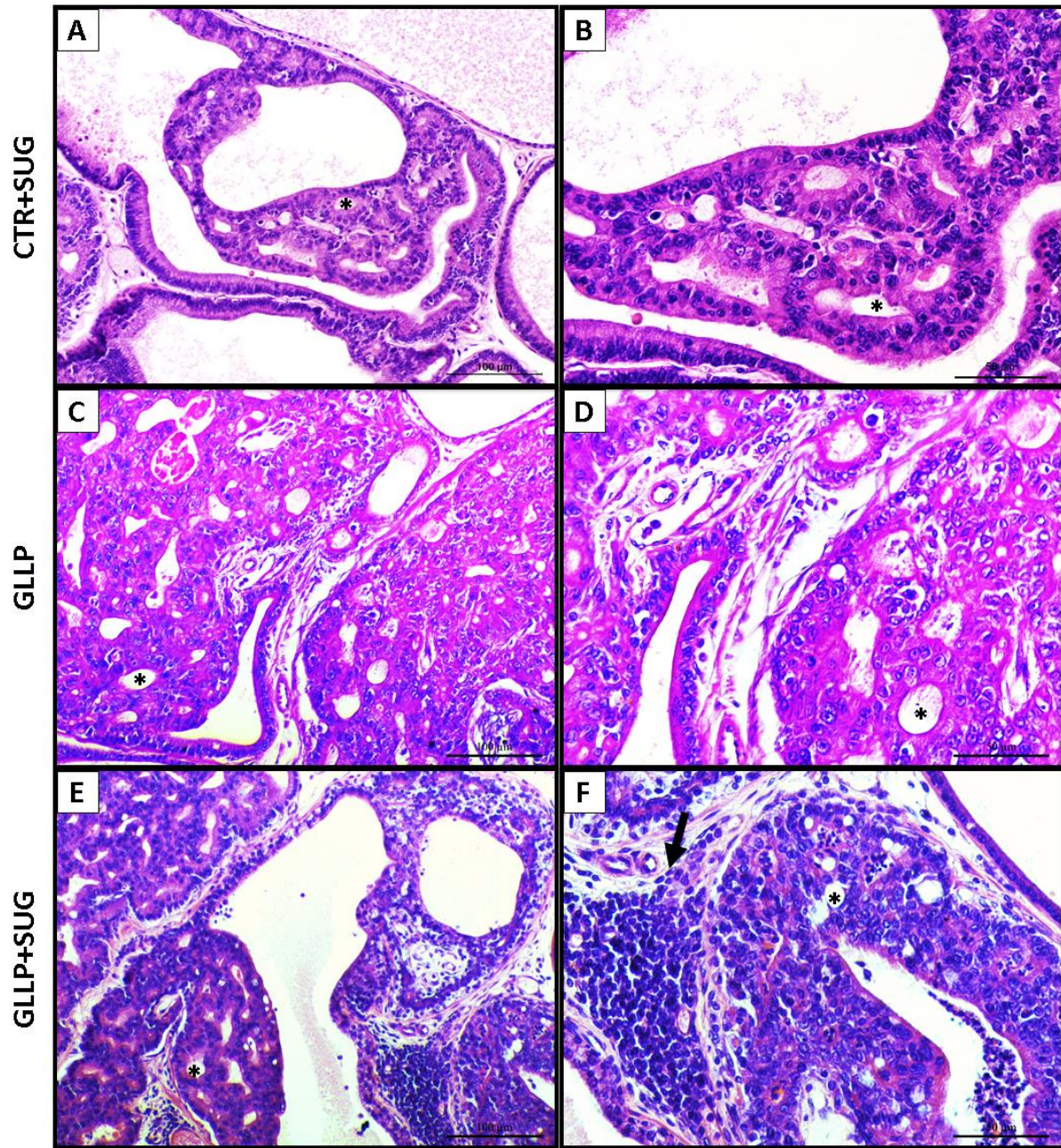


Figure 05. Representative images of the adenocarcinomas found in the groups CTR + SUG (A and B), GLLP (C and D) and GLLP + SUG (E and F). Asterisks (*) indicate vacuolization regions. Exacerbated proliferation, loss of epithelial polarity and the insertion of inflammatory cells is notable, specifically in the GLLP + SUG (Arrow). Hematoxylin-eosin staining. Magnification of 20x and 40x.

3.4. Oxidative stress

Figure 06 shows a decrease in the antioxidant enzymes CAT and SOD in maternal LPD animals, although not significant, which demonstrates an imbalance in cellular components and the release of free radicals with the response of antioxidant enzymes. But this does not trigger the oxidative stress process itself.

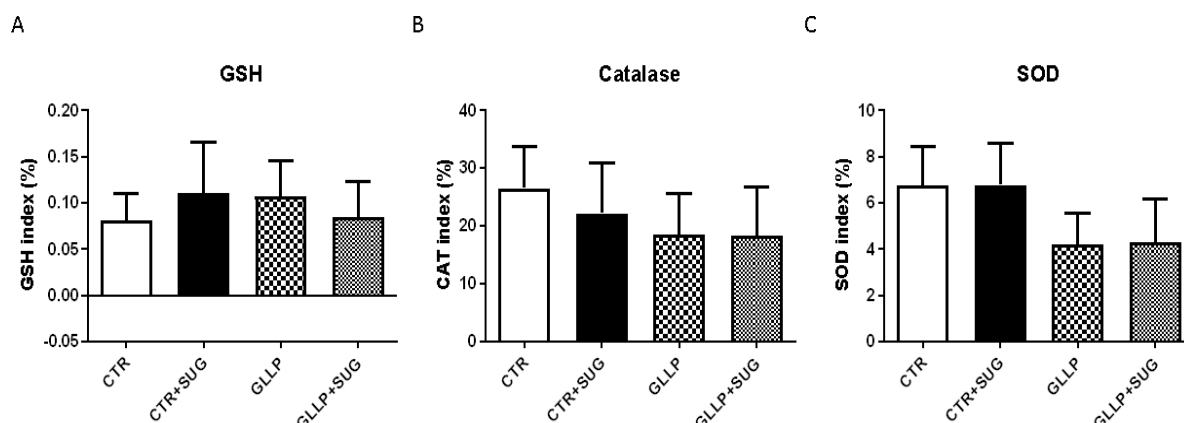


Figure 06. Measurement of antioxidant enzyme activity in the VP of animals in the experimental groups. Glutathione-peroxidase activity (GSH - A); Catalase activity (CAT - B) and superoxide dismutase (SOD - C). Performed by the ELISA technique.

In the senile animal, it was observed that a large number of vessels inserted in the VP, visualized on the representative board with immunostaining for aquaporin, obviously through the process of nutrition and tissue oxygenation (Figure 07).

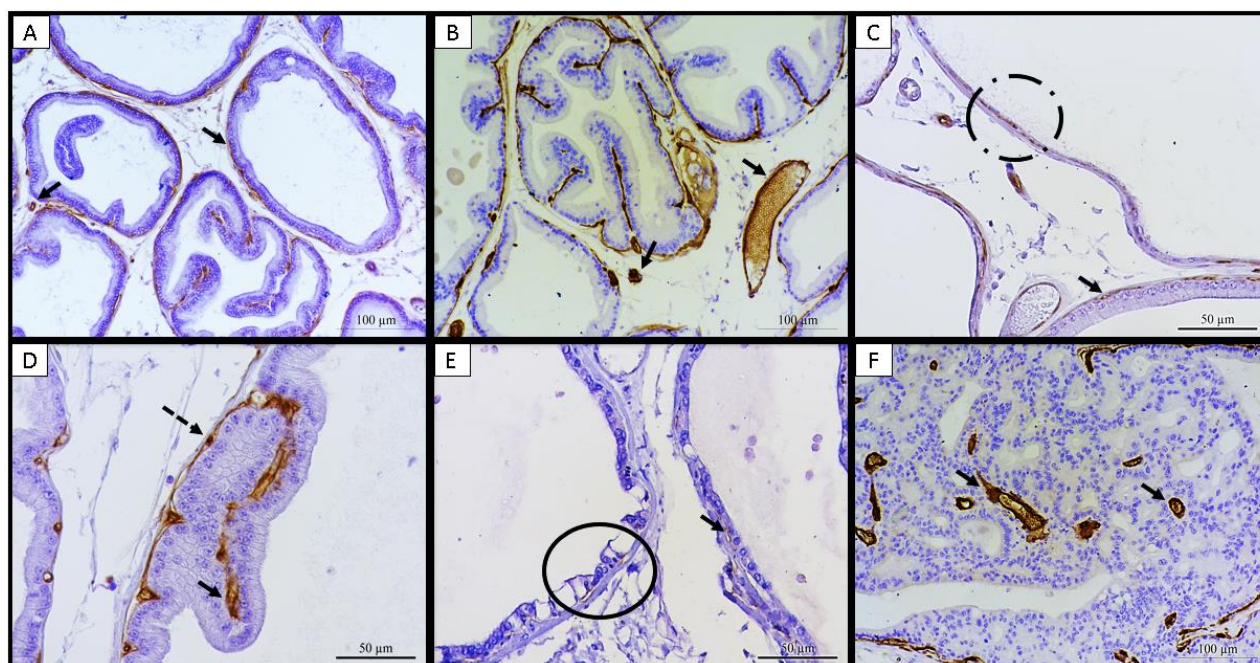


Figure 07. Representative images of the VPs marked by immunohistochemistry for Aquaporin-1, from which the blood vessel endothelium is expressed. A. CTR Group -normal region. B C D E. Prostatic lesions in the GLLP and CTR + SUG groups, demonstrating the insertion of vessels in different regions. F. Carcinoma in situ of a GLLP animal, characterizing a large number of vessels present in the tumor microenvironment. Smaller arrows point to vessel insertion. Dashed arrows indicate vessels in a hyperplasia region. Dashed circle demonstrates aquaporin immunostaining in a region of epithelial atrophy. Continuous circle shows vessels inserted in a PIN region. Magnification of 20x and 40x.

3.5. Inflammatory parameters - Systemic and intra-prostatic

There were morphological changes in development, in the CTR + SUG, GLLP and GLLP + SUG groups, such as pleated acids and an increase in apoptotic regions and mast cell concentration (supplementary figures 5 and 6). There was an increase in these cells in all groups when compared to CTR, in aging (Figure 08).

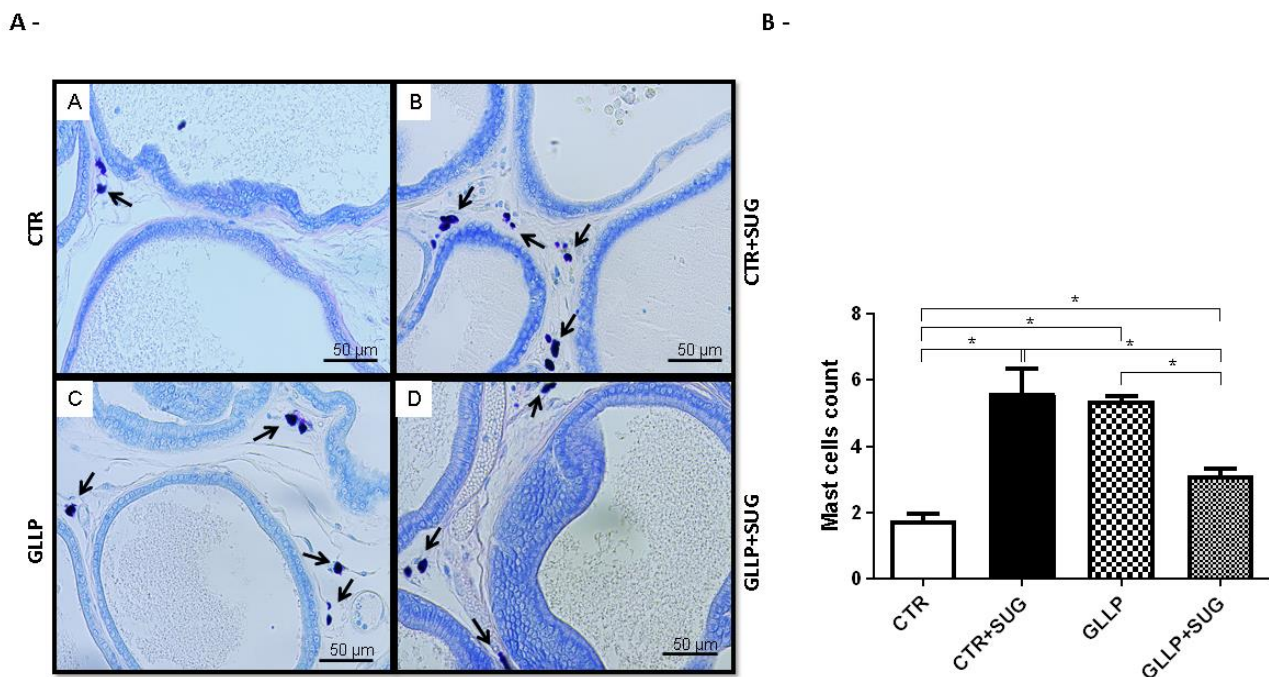


Figure 08. A. Representative figure of ventral prostate stained with Toluidine Blue. This marker indicates the presence of mast cells (arrowhead) in the stroma, articulating chronic inflammation processes in these animals. B. Statistics of the total number of mast cells, performed by counting 10 random fields per animal, with a total n of 6 per group. The asterisk (*) and the bars indicate a significant difference between the experimental groups. 40x magnification. A. Control group. B. Control + sugar group. C. Maternal low protein diet. D. Maternal low protein diet + sugar. E. Comparison between groups made by ANOVA test and “a posteriori” Student's T-test.

Immunohistochemistry was also performed to label CD68 macrophages, from which larger amounts of these cells were found in all groups, when compared to CTR. (Figure 09). In addition to this greater number of inflammatory cells such as mast cells and macrophages, there was a significant increase in these regions of the lesion and, mainly, in the tumor, with significant infiltration of these cells mainly in the GLLP + SUG group (Figure 10 and supplementary figure 02). In addition to the high amount of collagen 1 (Col1) and fibroblast growth factor (FGF) – (Supplementary figure 03).

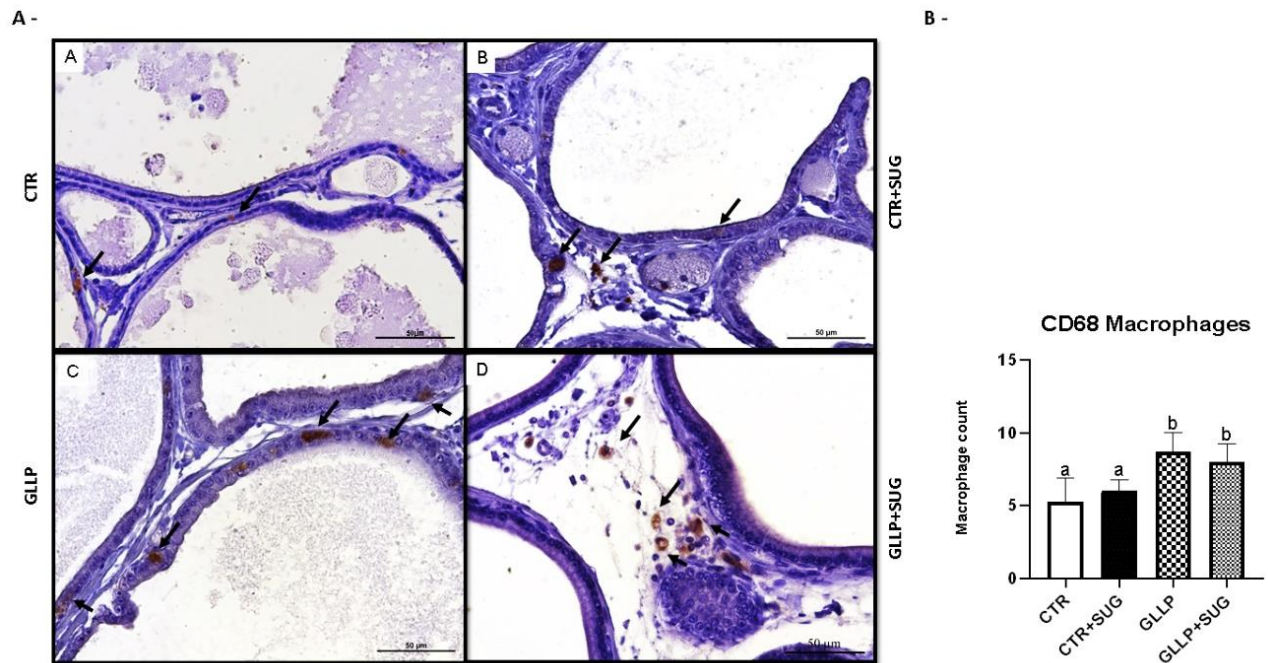


Figure 09. A. Representative image of the experimental groups and their respective VPs with immunostaining for CD68, a marker for a specific type of macrophage. The arrows indicate these cells, both in stromal and intraepithelial regions. B. The different letters (a and b) indicate the difference between the experimental groups. Magnification of 40x.

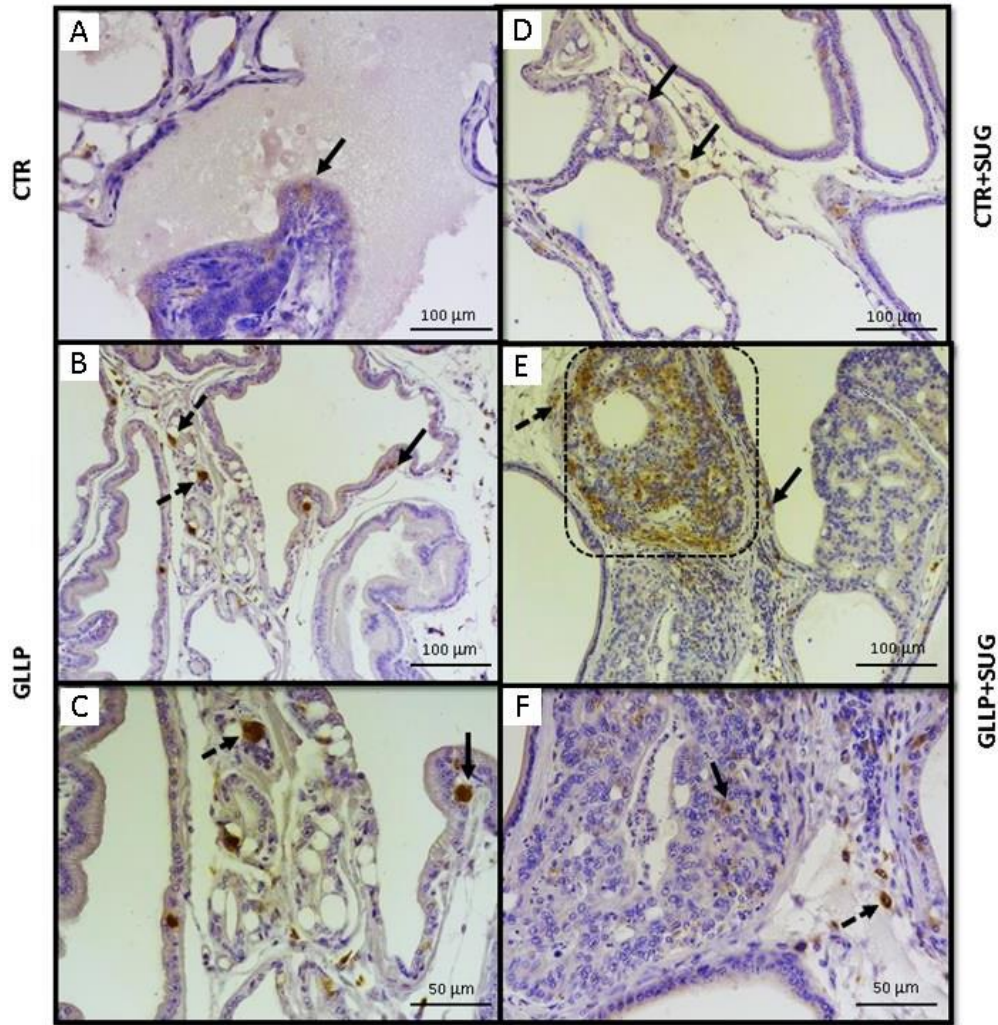


Figure 10. Representative image of the experimental groups on PND 540 and their respective VPs with immunostaining for CD68 macrophages. Schematic representation of the accumulation of these cells in regions of prostatic injury, in different experimental groups. A. CTR. B and C. GLLP - metaplasia region with an association of many macrophages. D. CTR + SUG Group - Metaplasia region with an association of macrophages. E and F. GLLP + SUG Group - Association of macrophage infiltrate in the tumor, demonstrating the influence of these cells and inflammation on the prostatic oncogenic issue in this animal. Magnification of 20x and 40x.

Serum ELISA analyzes showed a decrease in the systemic amount of IL1 β in the GLLP group, compared to CTR. There was a small increased of IL10 in the GLLP group, both systemic and prostatic, an important anti-inflammatory mediator. In relation to IL6, there was an increase in expression in the GLLP group, when compared to GLLP+SUG (Figure 11). In immunohistochemistry, all groups had a stromal expression of IL6 and IL10, and in some specific cells, with an emphasis on the GLLP group and less expression on GLLP +SUG. In the tumor or in regions in inflammatory infiltrate, the expression of interleukins proved to be relevant in the CTR+SUG, but principally in GLLP and GLLP+SUG groups, and in addition to immunostaining for CD68 and staining by Toluidine blue for mast cells (Supplementary Figure 04).

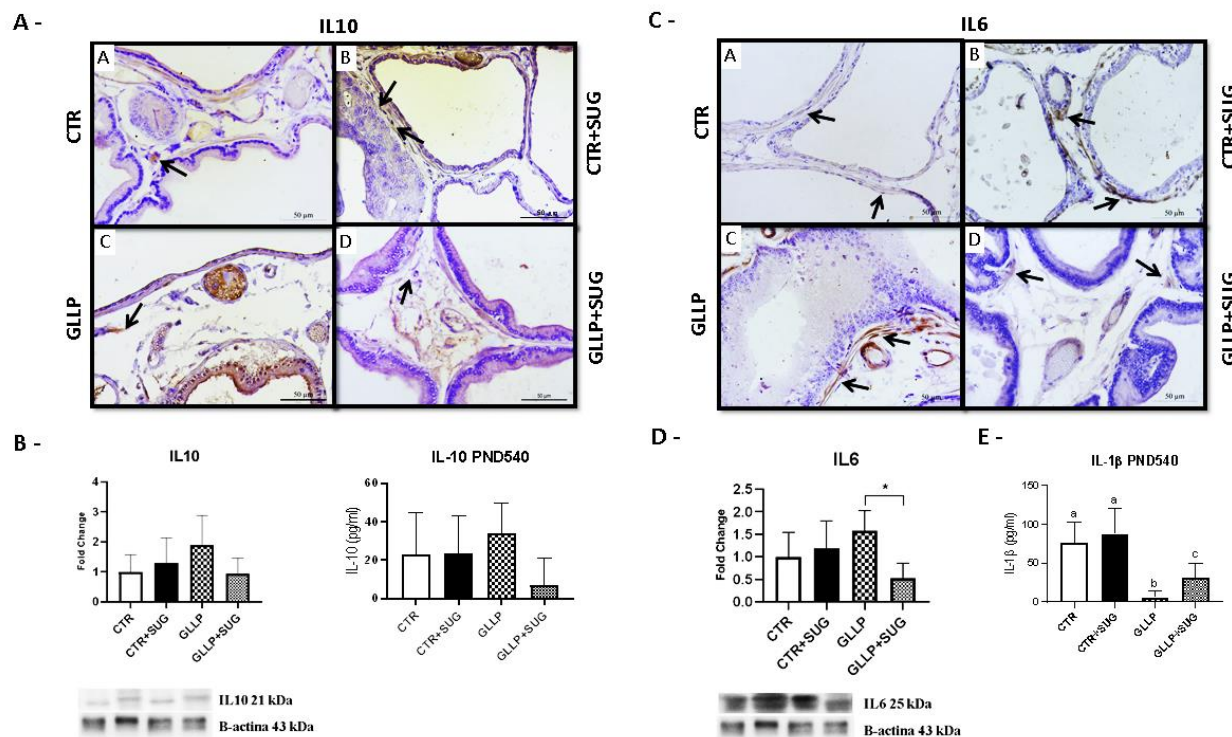


Figure 11. Immunohistochemistry, ELISA, and Western Blotting for Interleukins. Prostatic and systemic analysis. A. Representative IL10 immunostaining board in the VPs of the experimental groups. The high stromal expression is observed in some cells, as indicated by the arrows. magnification 40x. B. Western Blotting for VP and ELISA blood expression for IL10. There was no significant difference, despite an increase in prostatic IL10 in the GLLP and a systemic decrease in the GLLP+SUG. C. Representative immunochemical board for IL6 in the VPs of the experimental groups. The high stromal expression is observed in the cells of the CTR+SUG and GLLP group, shown by the arrows. magnification 40x. D. Western Blotting for prostatic IL6 expression. There is a significant increase in the GLLP group when compared to the GLLP+SUG. E. ELISA in blood for IL1b. There is a decrease in the GLLP and GLLP+SUG groups when compared to the CTR. Significant differences for $p < 0.05$.

There were no significant differences in the expression of TNF- α , NF κ B, and MCP-1 in blotting, but there was, through ELISA, a decrease in prostatic MCP-1 in the GLLP group and a systemic increase when compared to the CTR group (Figure 12).

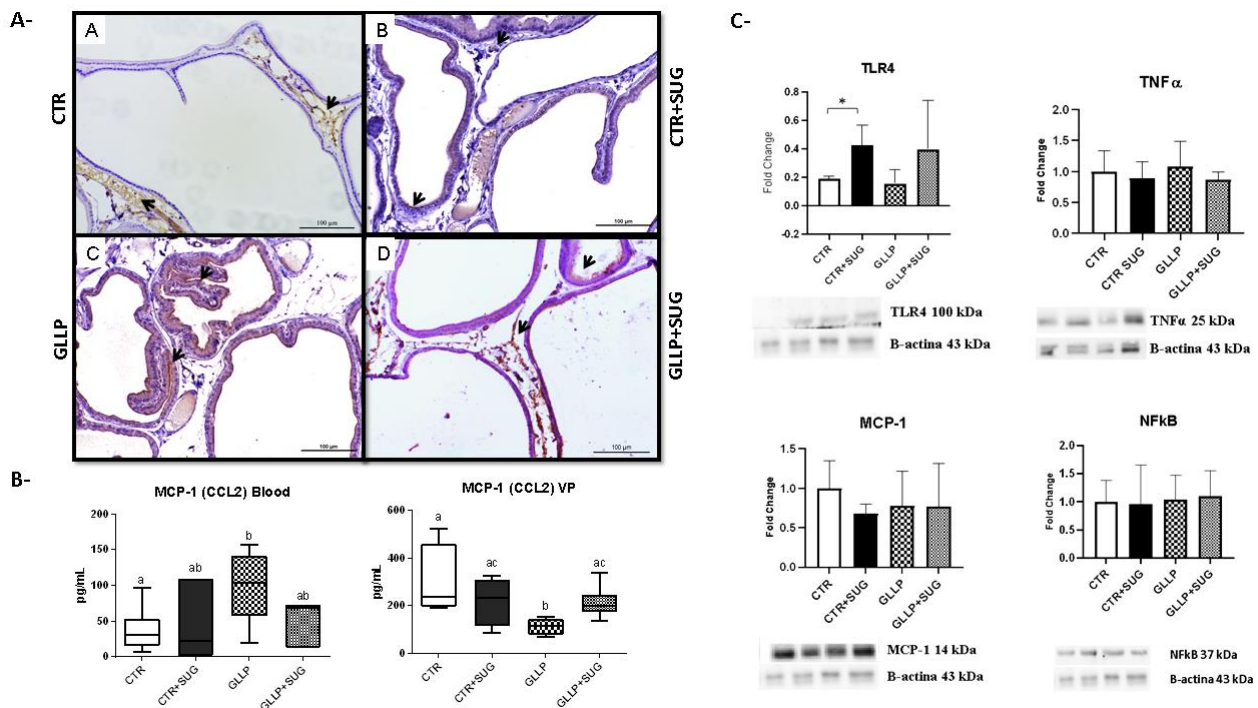


Figure 12. Components of the TNF- α pathway - CCL2. A. Photomicrograph of the ventral prostatic lobe with the immunohistochemical reaction for tumor necrosis factor- α (TNF- α), in different experimental groups. B. ELISA technique for CCL2 (MCP-1) in the blood and VP of different experimental groups (n = 8). With an increase in systemic CCL2 in the GLLP group and a decrease in VP when compared to CTR. C. Western Blotting for TLR4 (receptor), TNF- α , MCP-1, and NF κ B, components of the inflammatory pathway that expresses CCL2. There was a difference only in TLR4, with an increase in the CTR+SUG group, when compared to the CTR. Significant differences represented by a letter (a, b, c) or an asterisk (*), with p < 0.05.

In our analyzes demonstrated in figure 13, we found an increase in systemic TGF- β 1 in the GLLP+SUG group and an intraprostatic increase. In addition, there was a decrease in SMAD2/3 and an increase in phosphorylated SMAD2/3.

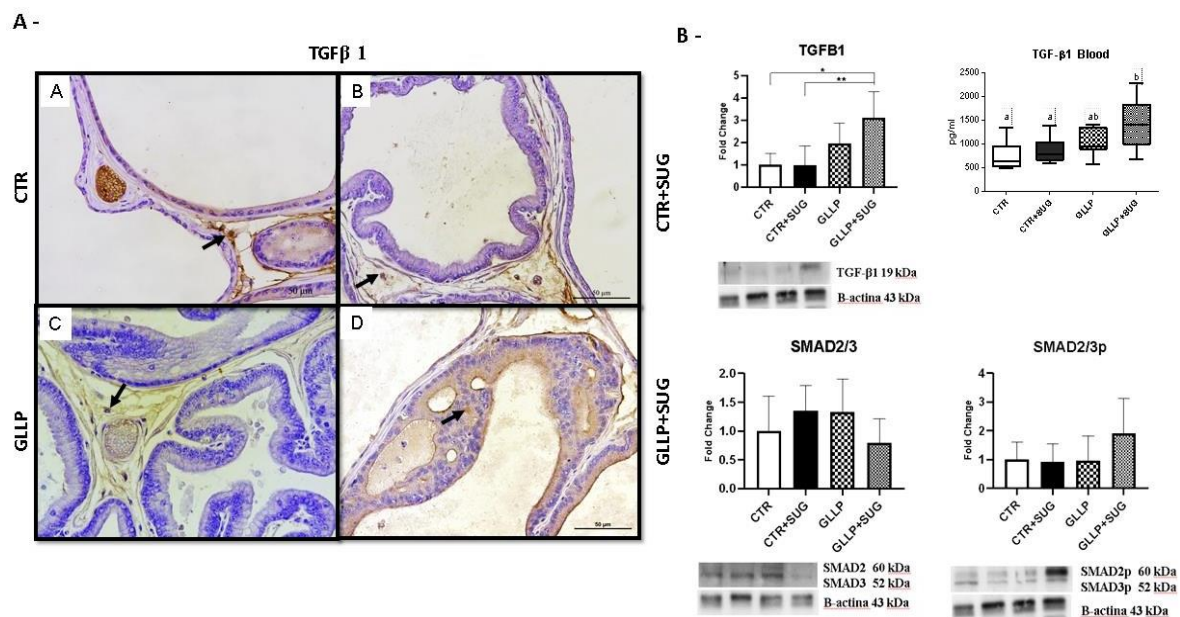


Figure 13. A. Representative plate for immunohistochemistry marking TGF β 1. An increased expression is observed in the GLLP+SUG group, but we also see a certain stromal expression in the other groups. The arrows point to some stromal cells expressing this molecule. B. Western blotting in the VP for TGF β 1, SMAD2/3, and phosphorylated SMAD2/3 and blood ELISA for TGF β 1. In blotting, the asterisk (*) and the bars indicate significant differences between the groups, and the letters, in the ELISA, indicate differences. P <0.05.

We also verified some specific immunostaining in the tumor of the animals of the groups CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG, indicating expression for TNF- α , TGF- β 1, VEGF, AR (figure 14) and IL6, IL10, Toluidine blue and CD68 (Tumor and inflammatory infiltrate – Supplementary figure 04).

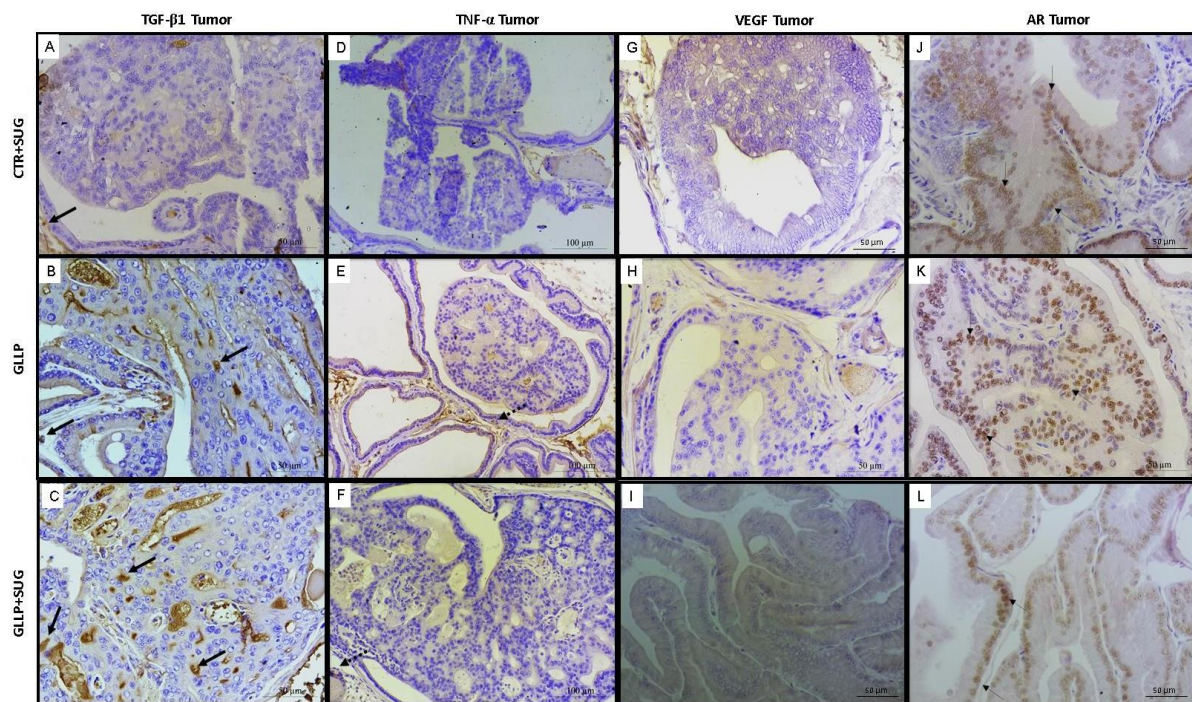


Figure 14. Representative board with immunostaining in groups CTR + SUG, GLLP and GLLP + SUG. A.B.C. Immunohistochemistry for TGF β -1 in the tumor. Stromal marking and arrows represent expression in cells. D.E.F. Immunohistochemistry for TNF- α in the tumor. Stromal marking and arrows represent expression in cells. G.H.I. Immunohistochemistry for VEG-F in the tumor. J.K.L. Immunohistochemistry for AR in the tumor. Arrows represent nuclear marking. Magnification of 20 and 40x.

4. DISCUSSION

The essential and novelty of this work included fetal programming (FP) and maternal LPD (pre- and post-natal effect), sugar (post-natal condition), prostate, and inflammation, demonstrating that both conditions, individualized or combined, cause systemic and intraprostatic effects, inducing inflammatory cell recruitment and imbalance in cytokines and growth factors. The maternal LPD causes increase time of puberty onset (Van Weissenbruch et al., 2005; Noriega et al., 2009), lower

fertility rate (Santos et al., 2004; Zambrano et al., 2005), reduction of the ano-genital distance (Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017), lower expression of androgenic receptors in the testis (Rodrigues-Gonzales et al., 2012), and PCa in aging (Santos et al., 2019). In this context, in rodents a prostatic environment particularly sensitive to estrogenic exposure during development in fetal and neonatal life, before puberty, cause inflammatory processes throughout life (Bianco et al., 2006; Prins et al., 2006). Thus, our results on the biometric parameters in the GLLP and GLLP+SUG groups consolidate the prolonged effect of maternal LPD, while sugar consumption also provides changes in development, which materialize in senility. In addition, the pattern of consumption is also shown to be altered, which may indicate effects on satiety and the pattern of choice of food, knowing that the animals consumed more sugar, however less feed. Thus, the control of weight and body composition depends on other factors, such as energy intake, energy expenditure, and fat deposition, which are interconnected and under full regulation of the neural and endocrine systems, in which different neuropeptides and hormones participate (Martinez, 2000 ; González-muniesa et al., 2017).

Aging and pathologies have a very small relationship. Thus, understanding the ways and reasons that can exacerbate this relationship can help in understanding diseases, as well as strategies to reach tumor microenvironments (Dai et al., 2017). The aging process itself is accompanied by the progressive loss of tissue homeostasis, which is marked by an increase in the accumulation of senescent cells (Erusalimsky, 2009; Northcott et al., 2017), and dietary factors such as restriction have been associated with changes in different organs (Yzydorczyk, et al., 2019). In this context, aging, damaging processes and inflammatory parameters in different tissues have an articulated and interesting correlation to be investigated. Our results demonstrate effective glandular changes, such as increased stroma in the GLLP+SUG group and lesions in all groups, with emphasis on inflammation and inflammatory reactive atypia in the GLLP and GLLP+SUG. Still in this sense, several studies indicate that the stroma may have a central role in the inflammatory processes of the prostate (Nieto et al., 2014). Contextualized to this, cytokines secreted by immunosuppressive cell compartments have been associated with progression to androgen-independent prostate cancer and reduced survival (Sharma et al., 2014; Calcinotto et al., 2018). Associated with this, the understanding of inflammatory parameters is a relevant issue, as currently there is no strong observational evidence to selectively suppress specific pro-inflammatory mediators as a cancer prevention / treatment strategy (Fouad & Aanei, 2017).

Inflammation in the prostate is therefore considered multifactorial and may be related to viral or bacterial infection, eating habits, hormonal influences, urine reflux or physical injury. Thus, sustained and uncontrolled inflammatory processes can lead to cellular and tissue damage (Archer et

al., 2020). Inflammation and existing oncogenes can activate transcription factors (NF-KB), which can be correlated with tumor cells that produce inflammatory mediators such as acute phase proteins, cytokines (interleukins 1, 6, 10, chemokines, adipokines, interferons, TNF, TGF family), reactive oxygen species, prostaglandins and enzymes (Michels et al., 2021). Histologically, the prostate epithelium can lose its homeostasis due to several environmental factors, such as inflammatory disorders. In this context, the pro-carcinogenic inflammatory processes can promote cell transformation, mediated by the activation of the transcription factor NF-kB that leads to the positive regulation of cytokines of inflammatory processes such as TNF- α and IL-6 (Nguyen et al., 2014 ; Cai et al., 2019). Pro-inflammatory cytokines and chemokines are correlated through the production of some factors called chemotactics, converging in the production of angiogenic factors and helping to maintain inflammation through continuous feedback (Balkwill et al., 2001; Coussens et al., 2002; Lu et al., 2006; Nguyen et al., 2014). The literature already explains the role of inflammation in the development of PCa, based on the hypothesis that the inflammatory lesion can lead to carcinogenesis, causing several glandular changes due to cell stress and repeated genomic damage (Davidsson et al., 2011; Boehm et al. , 2016; Perletti et al., 2017). Thus, the insertion of inflammation and lesions associated with inflammatory cells in the CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG groups determined an interesting starting point, as they have different altered structural and molecular components.

Maternal LPD causes several effects throughout the individual's life, and recent data and news from our group have already shown that this condition decreases prostate angiogenesis, increases oxidative stress, and the incidence of cancer with aging (Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2019; Santos et al., 2020; Portela et al., 2021). Jin et al. (2019) demonstrated that malnutrition in rats during periods of pregnancy and lactation induces the expression of inflammation-related genes in the offspring, and the offspring can develop glucose tolerance. Our results regarding maternal LPD did not show changes in the metabolism itself, however, there was an increase in the recruitment of inflammatory cells (mast cells and CD68 macrophages) and circulating CCL2, glandular remodeling and changes in cytokines, such as IL6 and 10, in addition to inflammatory and atypical inflammatory reactive. Thus, T lymphocytes, macrophages, and B lymphocytes that are present in the adult prostate, in pathological conditions, can cause damage to epithelial and stromal cells, causing tissue remodeling by fibromuscular growth (Gandaglia, et al, 2013), which can lead to continuous feedback and progression of the injury. In addition to its involvement during normal immune responses, IL-6 can influence processes such as apoptosis and angiogenesis (Culig et al., 2005). Some cells that make up the PCa can increase the secretion of IL10 through mononuclear cells (Salman et al., 2012), and the hormone-refractory to PCa has been associated with a systemic increase in IL10 (Wise et al.,

2000) and inhibiting the differentiation of immune cells and the secretion of pro-inflammatory mediators the risk of various inflammatory conditions (Mosser et al., 2008; Trifunovic et al., 2015).

In contrast, sugar consumption, the effect of environmental exposure on another window of susceptibility, that is, the stage of development and adolescence, has not effectively altered metabolic parameters, and some studies have already pointed out that there is insufficient evidence to indicate that sugar in the diet it is harmful to health, compared to any other source of calories (Kaiser et al., 2013; Kahn & Sievenpiper. 2014; Rippe & Angelopoulos 2016). Thus, apparently, the time of exposure to sugar (PND 21 to 90) was not enough to trigger chronic diseases such as diabetes, obesity, MeT and high incidence of PCa, but it influenced some inflammatory parameters, such as cell recruitment and changes in prostatic fibromuscular disorders, in addition to the circulating increase in IL1 β . In this context, elevated serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 are correlated with advanced disease and, consequently, decreased survival in patients with PCa (Voronov et al., 2003; Michalaki et al., 2004).

When the two effects are added, the stromal environment undergoes significant changes, such as progression, recruitment of inflammatory cells, and the presence of secretory proteins in the prostate stroma, which can induce inflammation, proliferation, or fibrosis. In this sense, chronic prostate inflammation and increased TGF- β 1 have already been associated with factors related to age and prostate disease (Fibbi et al., 2010; Rodriguez-Nieves et al., 2013; De Nunzio et 2016; Pascal et al., 2021). Thus, TGF β is an important molecule in inflammatory responses, of which the members of this family are important regulators of epithelial cell differentiation and apoptosis, but it can promote tumorigenesis (Massagué, 2008; Heldin et al., 2009). TGF- β binds to type II (TGFbR) and type I serine and threonine kinase receptors, inducing the formation of a complex. In this sense, the constitutively active T β RII phosphorylates T β RI causing the activation of T β RI kinase, leading to the phosphorylation and nuclear translation of SMADs associated with the receptor, and they regulate the expression of some target genes (Heldin et al, 1997; Mu et al., 2012). In castration, with this decrease there is an increase in TGF- β 1 in the prostate, with reversion after testosterone replacement (Halova et al., 2000). Thus, apparently, the TGFb1-SMAD2 / 3 pathway appears to be active in these animals, in addition to converging several changes. Mast cells, for example, are involved in several processes, such as angiogenesis, fibrosis, and metabolic disorders (Mukai et al., 2018), and their increase leads to the accumulation of leukocytes, which can lead to increased inflammation in different tissues and organs (Saperas, 1996; Dumont et al., 2007; Carlos et al., 2007; Cote et. Al, 2008). Figure 15 shows the illustrated summary of the work and the results.

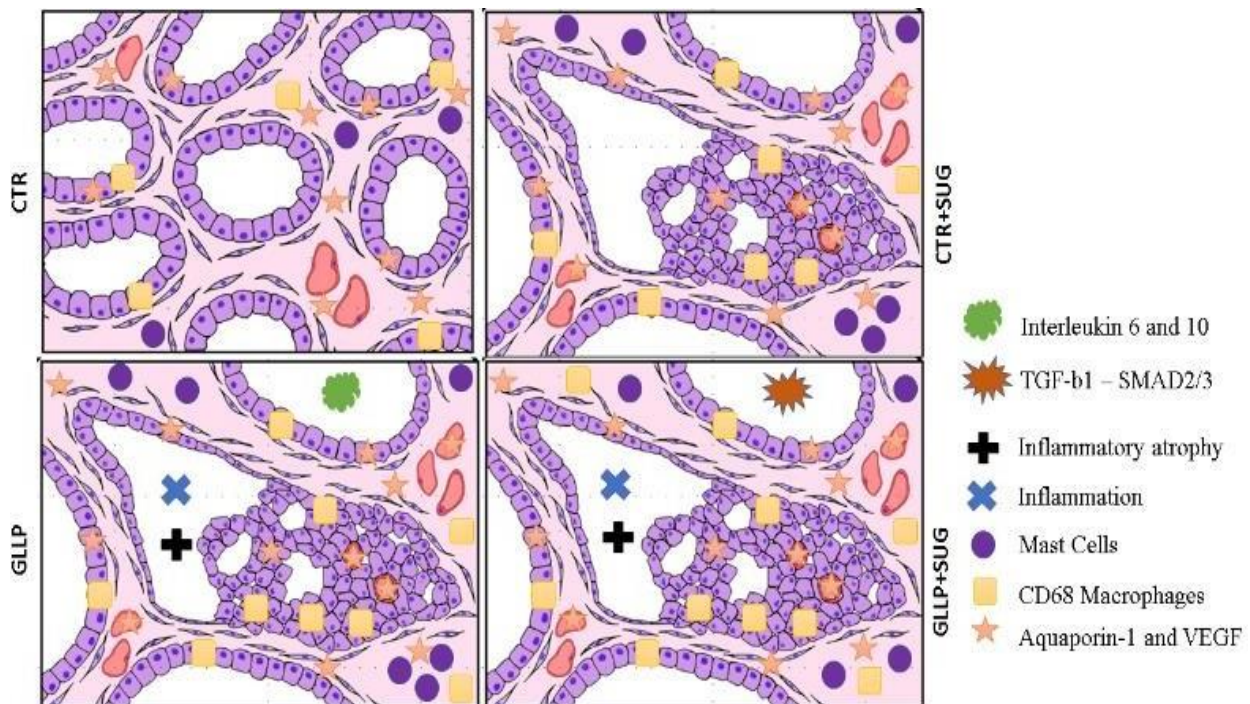


Figure 15. Representative image of the inflammatory parameters that are correlated to the experimental groups, in a generalized way. This figure represents, in general, the role of inflammatory, prostatic and systemic components in different experimental groups. Thus, IL6 and IL10 expression is observed in the GLLP group, incidence of the TGF-B1 - SMAD2 / 3 pathway in the GLLP + SUG group. Inflammatory atrophy is also observed in the GLLP and GLLP + SUG groups, in addition to emphatic inflammatory infiltrate and inflammation. There are mast cells and macrophages in the prostate of all animals, with more emphasis on the GLLP and GLLP + SUG group. There is also insertion of vessels in the stromal regions and lesions, in all groups. The figure further demonstrates the presence of some carcinomas in the CTR + SUG, GLLP and GLLP + SUG groups, with the exception of CTR, although the incidence is not significant. Adapted from Santos et al. 2020.

5. CONCLUSION

Therefore, both sugar consumption and maternal LPD modulate the prostatic microenvironment, whether in early life, in development, or in aging. We were able to observe that the two effects, in different development windows, isolated or combined, lead to considerable prostatic changes, with increased expression of certain inflammatory molecules, infiltration of inflammatory cells, and some morphophysiological changes in aging. So, mast cells and macrophages play a decisive role in inflammation and in the characterization of the injured microenvironment in all treated groups. Apparently, the combined effect of adverse conditions leads to the recruitment of inflammatory cells and activation of the TGFβ1 - SMAD2 / 3 pathway, inducing angiogenic increase, invasion of inflammatory cells, and prostatic inflammation, which makes it an interesting form in later studies.

6. ACKNOWLEDGMENT

Authors thank Dr. Patricia Aline Boer and Clelia Akiko Hiruma by providing the antibodies for immunohistochemical and western blotting analyzes.

7. FINANCIAL SUPPORT

This research was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant 2017/01063-7, LAJ). The following grants also helped support this work: FAPESP (grant # 2019/10410-8, MNF); National Council for Scientific and Technological Development (CAPES grant 3001).

8. CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

9. ETHICAL STANDARDS

The animal procedures were approved by the Institute of Biosciences/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol #951) and were in accordance with ethical animal research principles and the Brazilian legislation established by the Brazilian Council of Control in Animal Experimentation.

10. REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Ahmad, R.; Al-Roub, A.; Kochumon, S.; Akther, N.; Thomas, R.; Kumari, M.; Koshy, M.S.; Tiss, A.; Hannun, Y.A.; Tuomilehto, J.; Sindhu, S.; Rosen, E.D. The Synergy between Palmitate and TNF- α for CCL2 Production Is Dependent on the TRIF/IRF3 Pathway: Implications for Metabolic Inflammation *J Immunol* May 15, 2018, 200 (10) 3599-3611; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701552>.
- Aquino, A. M., Salata, G. C., Pinho, C. F., de Freitas, A. T. A. G., Périco, L. L., de Lion Siervo, G.E. M., Mendes, L. O., Da Cunha De Medeiros, P., Justulin, L. A., Fernandes, G. S. A., Perobelli, J. E., & Scarano, W. R. (2019). Arsenic exposure during prepuberty alters prostate maturation in pubescent rats. *Reproductive Toxicology*, 89, 136–

144. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.010>

Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben-Baruch A (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res* 62(4): 1093–2102

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–545.

Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 6(2), 62–77.

Barker, D.J.P., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., Wadsworth, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 298:564–7, 1989.

Bernardis, L. L. (1970). Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's “nutritive ratio” in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*, 26(7), 789–790.

Bhowmick, N. A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A. E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M. K., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). TGF- β Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science*, 303(5659), 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1090922>

Bianco, JJ, McPherson, SJ, Wang, H, Prins, GS, and Risbridger, GP. Transient neonatal estrogen exposure to estrogen-deficient mice (aromatase knockout) reduces prostate weight and induces inflammation in late life. *Am J Pathol*. 2006; 168: 1869–1878

Boehm, K.; Valdivieso, R.; Meskawi, M.; Larcher, A.; Schiffmann, J.; Sun, M.; Graefen, M.; Saad, F.; Parent, M.É.; Karakiewicz, P.I. Prostatitis, other genitourinary infections and prostate cancer: Results from a population based case-control study. *World J. Urol*. 2016,

34, 425–430.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem.*, 72, pp. 248–254, 1976.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Burton, G.J., Fowden, A.L., Thornburg, K.L. Placental Origins of Chronic Disease. 2016

Cai, T., Santi, R., Tamanini, I., Galli, I. C., Perletti, G., Bjerklund Johansen, T. E., & Nesi, G. (2019). Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3833. <https://doi.org/10.3390/ijms20153833>

Calcinotto A, Spataro C, Zagato E, et al. IL-23 secreted by myeloid cells drives castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2018; 559(7714):363-369. 8.

Calder, P.C., Carding, S.R., Christopher, G., Kuh, D., Langley- Evans, S.C., McNulty, H., 2018. A holistic approach to healthy ageing: how can people live longer, healthier lives? *J Hum Nutr Diet* 31, 439e450.

Carlos, D, de Souza, DA Junior, de Paula, L, Jamur, MC, Oliver, C, Ramos, SG, Silva, CL, and Faccioli, LH. Mast cells modulate pulmonary acute inflammation and host defense in a murine model of tuberculosis. *J Infect Dis*. 2007; 196: 1361–1368

Chazelas, E. et al. Sugary drink consumption and risk of cancer: Results from NutriNet-Santé prospective cohort. *The BMJ*, v. 366, 2019.

Cohen-Naftaly, M., & Friedman, S. L. (2011). Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 4, Issue 6, pp. 391–417). *Therap Adv Gastroenterol.*

<https://doi.org/10.1177/1756283X11413002>

Colombelli, K. T., Santos, S. A. A., Camargo, A. C. L., Constantino, F. B., Barquilha, C. N., Rinaldi, J. C., Felisbino, S. L., & Justulin, L. A. (2017). Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. *General and Comparative Endocrinology*, 246, 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.12.016>

Côrtes LS, Silveira HS, Lupi LA, de Mello Santos T, Cavariani MM, Domeniconi RF, Gaiotte LB, de Moraes Oliveira DA, Justulin LA, de Almeida Chuffa LG. Maternal protein restriction impairs nutrition and ovarian histomorphometry without changing p38MAPK and PI3K-AKT-mTOR signaling in adult rat ovaries. *Life Sci.* 2021 Jan 1;264:118693. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118693.

Cote, CH, Tremblay, MH, Duchesne, E, and Lapoite, BM. Inflammation-induced leukocyte accumulation in injured skeletal muscle: role of mast cells. *Muscle Nerve.* 2008; 37: 754–763

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860–867.

Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. . Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth.

J CellBiochem 95:497–505, 2005.

Dai J., Lu Y., Roca H. et al. Immune mediators in the tumor microenvironment of prostate cancer. *Chin. J. Cancer* (2017) 36 29.

Da Silva HB1, Amaral EP, Nolasco EL, de Victo NC, Atique R, Jank CC, Anschau V, Zerbini LF, Correa RG. Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. *Prostate Cancer.* 2013;2013:920612. 10.1155/2013/920612.

Davidsson, S.; Fiorentino, M.; Andrén, O.; Fang, F.; Mucci, L.A.; Varenhorst, E.; Fall, K.; Rider, J.R. Inflammation, focal atrophic lesions, and prostatic intraepithelial neoplasia

- with respect to risk of lethal prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 2011, 20, 2280–2287.
- De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* (2007) 25:398–400. doi:10.1016/j.urolonc.2007.05.007
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* (2007) 7:256–69. doi:10.1038/nrc2090
- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schroder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011;60(1):106-117.
- De Nunzio C, Presicce F, Tubaro A. Inflammatory mediators in the development and progression of benign prostatic hyperplasia. *Nat Rev Urol.* 2016;13(10):613-626.
- Dearden, L., Ozanne, S.E. The road between early growth and obesity: new twists and turns. 2014
- Drake, I, Sonestedt, E, Gullberg, B, et al. (2012) Dietary intakes of carbohydrates in relation to prostate cancer risk: a prospective study in the Malmo Diet and Cancer cohort. *Am J Clin Nutr* 96, 1409–1418.
- Dumont, N, Lepage, K, Cote, CH, and Frenette, J. Mast cells can modulate leukocyte accumulation and skeletal muscle function following hindlimb unloading. *J Appl Physiol.* 2007; 103: 97–104
- Erusalimsky, J. D. Vascular endothelial senescence: From mechanisms to pathophysiology *Journal of Applied Physiology* American Physiological Society, jan. 2009. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111111/>
- Fantuzzi, G.; Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, 68 (4) (2000), pp. 437-446

- Faure, P., & Lafond, J.-L. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of Free Radicals in Biological Systems* (pp. 237–248). Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8_17
- Fibbi B, Penna G, Morelli A, Adorini L, Maggi M. Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Int J Androl.* 2010;33(3):475-488.
- Freeman CR, Zehra A, Ramirez V, Wiers CE, Volkow ND, Wang GJ. Impact of sugar on the body, brain, and behavior. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018 Jun 1;23:2255-2266. PMID: 29772560.
- Fouad, Y.A., Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7 (5), 1016–1036.
- Gandaglia, G. et al. The role of chronic prostatic inflammation in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia (BPH). *BJU Int.* 112, 432–441 (2013).
- Giri A, Edwards TL, Motley SS, Byerly SH, Fowke JH. Genetic determinants of metabolism and benign prostate enlargement: associations with prostate volume. *PloS ONE.* 2015;10:e0132028.
- González-muniesa, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.
- Grochot-Przeczek, A., Dulak, J., & Jozkowicz, A. (2012). Haem oxygenase-1: Non-canonical roles in physiology and pathology. In *Clinical Science* (Vol. 122, Issue 3, pp. 93–103). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20110147>
- Guess, H.A. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol.Rev.*, v. 23, p. 152-158, 2001.
- Halova, I., Draberova, L., & Draber, P. (2012). Mast cell chemotaxis chemoattractants and signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). *Front Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00119>
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674

- Hay, S. M., McArdle, H. J., Hayes, H. E., Stevens, V. J., & Rees, W. D. (2016). The effect of iron deficiency on the temporal changes in the expression of genes associated with fat metabolism in the pregnant rat. *Physiological Reports*, 4(21). <https://doi.org/10.14814/phy2.12908>
- Heldin, C.-H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471 (1997).
- Heldin, C.-H.; Landström, M.; Moustakas, A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 166–176 (2009).
- Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-1: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259 (5091) (1993), pp. 87-91.
- INCA. (2020). O Câncer de Próstata| INCA - Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Próstata.
- Jalal, DI, Smits, G, Johnson, RJ, et al. (2010) Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 21, 1543–1549.[CrossRefGoogle ScholarPubMed](#)
- Jin, F. et al. Undernutrition in pregnant rats induces glucose intolerance with enhanced expression of inflammation-related genes in peripheral leukocytes of the offspring. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 65, n. 6, p. 534–540, 2019.
- Johnson, RJ, Perez-Pozo, SE, Sautin, YY, et al. (2009) Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev* 30, 96– 116.[CrossRefGoogle ScholarPubMed](#)
- Johnson, RJ, Sanchez-Lozada, LG & Nakagawa, T (2010) The effect of fructose on renal biology and disease. *J Am Soc Nephrol* 21, 2036–2039.[CrossRefGoogle ScholarPubMed](#)
- Kahn R, Sievenpiper JL. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: we have, but the pox on sugar is overwrought and

- overworked. *Diabetes Care*. 2014;37(4):957-62
- Kaiser KA, Shikany JM, Keating KD, Allison DB. Will reducing sugar-sweetened beverage consumption reduce obesity? Evidence supporting conjecture is strong, but evidence when testing effect is weak. *Obes Rev*. 2013;14(8):620-33
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 6, Issue 5, pp. 392–401). *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Kendig MD, Ekayanti W, Stewart H, Boakes RA, Rooney K. Metabolic Effects of Access to Sucrose Drink in Female Rats and Transmission of Some Effects to Their Offspring. *PLoS One*, 10, 0131107, 2015.
- Kramer G, Mitteregger D, Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol*. 2007;51(5):1202-1216.
- Landskron, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research*, v. 2014, 2014.
- Lebrecht A, Grimm C, Lantzsch T, Ludwig E, Hefler L, Ulbrich E, Koelbl H. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2004;25(1– 2):14–17.
- Liu, Y., Mikrani, R., Xie, D., Wazir, J., Shrestha, S., Ullah, R., Baig, M. M. F. A., Ahmed, A., Srivastava, P. K., Thapa, K. B., & Zhou, X. (2020). Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostate cancer: study of immune cells and cytokines. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 34(2), 160–172. <https://doi.org/10.1111/fcp.12517>
- Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK, Pienta KJ. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia*. 2006;8(7):578–586.
- Loberg RD, Ying C, Craig M, Yan L, Snyder LA, Pienta KJ (2007) CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage

- infiltration. *Neoplasia* 9(7): 556–562.
- Lu, H., Ouyang, W., Huang, C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006;4(4):221–233.
- Madsen, H. , T. P. (2011). *Introduction to General and Generalized Linear Models* (Chapman & Hall/CRC (ed.); 1st ed., Vol. 1).
- Martinez, J. A. Body-weight regulation: Causes of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society. Anais.**CAB International, 2000
- Marsh, T., Pietras, K., & McAllister, S. S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1832, Issue 7, pp. 1070– 1078). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>
- Massagué, J. TGF β in cancer. *Cell* 134, 215–230 (2008).
- Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 90:2312–2316, 2004.
- Michels, N., van Aart, C., Morisse, J., Mullee, A., & Huybrechts, I. (2021). Chronic inflammation towards cancer incidence: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 157, p. 103177). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103177>
- Miles, F. L., Neuhouser, M. L., & Zhang, Z. F. (2018). Concentrated sugars and incidence of prostate cancer in a prospective cohort. *Proceedings of the International Astronomical Union*, 120(6), 703–710. <https://doi.org/10.1017/S0007114518001812>
- Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008;226:205-218. 30.
- Mu, Y.; Gudey, S.K.; Landström, M, Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11–20(2012).

- Mukai, K., Tsai, M., Saito, H., & Galli, S. J. (2018). Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. In *Immunological Reviews* (Vol. 282, Issue 1, pp. 121–150). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12634>
- Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR (1997) Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol* 150(5): 1723–1734.
- Newens, K.J., Walton, J. A review of sugar consumption from nationally representative dietary surveys across the world. *J Hum Nutr Diet.* 29(2):225-40, 2016
- Nguyen, Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70, 2014.
- Nguyen, D.P.; Li, J.; Yadav, S.S.; Tewari, A.K. Recent insights into NF-kappaB signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.* 2014, 114, 168–176.
- Nguyen, D.P.; Li, J.; Tewari, A.K. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 2014, 113, 986–992.
- Nieto, C. M., Rider, L. C. & Cramer, S. D. Influence of stromal–epithelial interactions on androgen action. *Endocr. Relat. Cancer* 21, T147–T160 (2014).
- Noriega, N.C., Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Wilson, V.S., Gray, L.E.Jr. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci.* 111:163-78, 2009.
- Northcott, j. m.; czubryt, m. p.; wiple, j. T. Vascular senescence and ageing: A role for the MEOX proteins in promoting endothelial dysfunction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* Canadian Science Publishing, , 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28727928/>>. Acesso em: 25 jun. 2020
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A. H., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical

- parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111–119.
<https://doi.org/10.1258/002367707779399518>
- Ohara, R., Périco, L. L., Rodrigues, V. P., Bueno, G., Zanatta, A. C., Campaner dos Santos, L., Vilegas, W., Constatino, F. B., Justulin, L. A., & Hiruma-Lima, C. A. (2020). Terminalia catappa L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112793>
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2002;102(3):220–224.
- Pascal, L. E., Mizoguchi, S., Chen, W., Rigatti, L. H., Igarashi, T., Dhir, R., Tyagi, P., Wu, Z., Yang, Z., De Groat, W. C., Defranco, D. B., Yoshimura, N., & Wang, Z. (2021). Prostate-Specific Deletion of Cdh1 Induces Murine Prostatic Inflammation and Bladder Overactivity. *Endocrinology* (United States), 162(1).
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa212>
- Périco, L. L., Rodrigues, V. P., Ohara, R., Nunes, V. V. A., da Rocha, L. R. M., Vilegas, W., dos Santos, C., & Hiruma-Lima, C. A. (2019). Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats? *Journal of Ethnopharmacology*, 235, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.012>
- Perletti, G.; Monti, E.; Magri, V.; Cai, T.; Cleves, A.; Trinchieri, A.; Montanari, E. The association between prostatitis and prostate cancer. Systematic review and meta-analysis. *Arch. Ital. Urol. Androl.* 2017, 89, 259–265.
- Pinho, C.F., Ribeiro, M.A., Rinaldi, J.C., Felisbino, S.L., Pinheiro, P.F., Domeniconi, R.F., Fochi, R.A., Boer, P.A., Scarano, W.R.. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev.* 26(7):967-73, 2014.

- Portela LM, Santos SA, Constantino FB, Camargo AC, Colombelli KT, Fioretto MN, Barquilha CN, Périco LL, Hiruma-Lima CA, Scarano WR, Zambrano E, Justulin LA. Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. *Mol Cell Endocrinol.* 2020 Dec 31;523:111148. doi: 10.1016/j.mce.2020.111148. Epub ahead of print. PMID: 33387600.
- Prins, GS, Huang, L, Birch, L, and Pu, Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1089: 1–13
- Puchtler, H. et al. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation - Practical and theoretical considerations. *Histochemie*, v. 21, n. 2, p. 97–116, 1970.
- Ramos, C. da F., Babinski, M.A., Costa, W.S., Sampaio, F.J. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl.* 12:180-5, 2010.
- Rinaldi, J.C., Justulin, L.A.Jr., Lacorte, L.M., Sarobo, C., Boer, P.A., Scarano, W.R., Felisbino, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science.* 92:763-4 2013.
- Rippe JM, Angelopoulos TJ. Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease. *Int J Obes (Lond).* 2016;40 Suppl 1:S22-7
- Rodríguez-González, G. L., Viguera-Villaseñor, R. M., Millán, S., Moran, N., Trejo, R., Nathanielsz, P. W., Larrea, F., & Zambrano, E. (2012). Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 3(5), 321–326. <https://doi.org/10.1017/S2040174412000360>
- Rodriguez-Nieves JA, Macoska JA. Prostatic fibrosis, lower urinary tract symptoms, and BPH. *Nat Rev Urol.* 2013;10(9):546-550.
- Salman H, Ori Y, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H. Human prostate cancer cells induce inflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells. *Biomed*

- pharmacother. 2012;66(5):330-333. 33.
- Santos, A.M., Ferraz, M.R., Teixeira, C.V., Sampaio, F.J., da Fonte Ramos, C. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *HormMetab Res.* 36:27-33, 2004.
- Santos, M.A., Florencio-Silva, R., Medeiros, V.P., Nader, H.B., Nonaka, K.O., Sasso, G.R., Simões, M.J., Reginato, R.D. Effects of different doses of soy isoflavones on bone tissue of ovariectomized rats. *Climacteric.* 17(4):393-401, 2014.
- Santos, S.A.A., Camargo, A.C., Constantino, F.B., Colombelli, K.T., Mani, F., Rinaldi, J.C., Franco, S., Portela, L.M.F., Duran, B.O.S., Scarano, W.R., Hinton, B.T., Felisbino, S.L., Justulin, L.A. Maternal Low Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis with Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 10.1093/gerona/gly118, 2019.
- Santos SAA, Camargo ACL, Constantino FB, Colombelli KT, Portela LMF, Fioretto MN, Vieira JCS, Padilha PM, de Oliveira MB, Felisbino SL, Carvalho RF, Justulin LA. Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. *Aging (Albany NY).* 2020 Oct 13;12(20):19954-19978. doi: 10.18632/aging.104093.
- Saperas, E. The role of mast cells in gastrointestinal inflammation. *Gastroenterology.* 1996; 110: 1656–1658
- Scarano, W.R.; Toledo, F.C.; Guerra, M.T.; et al. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol.*, v. 262, p. 215-223, 2009.
- Schulz, L.C.. The Dutch hunger winter and the developmental origins of health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16757–16758, 2010.

- Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012;60:199–215.
- Sfanos, K. S., Hempel, H. A. & De Marzo, A. M. in *Inflammation and Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 816 (eds Aggarwal, B. B., Sung, B. & Gupta, S. B.) 153– 181, 2014.
- Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol*. 2018;15:11–24.
- Shapiro, A.; Tumer, N.; Gao, Y.; Cheng, K.Y.; Scarpace, P.J. Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br J Nutr*, 106 (2011), pp. 390-397.
- Sharma J, Gray KP, Harshman LC, et al. Elevated IL-8, TNF- α , and MCP-1 in men with metastatic prostate cancer starting androgen- deprivation therapy (ADT) are associated with shorter time to castration-resistance and overall survival. *Prostate*. 2014;74(8): 820-828.
- Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:25.1–25.34, 2017.
- Steiner G, Gessl A, Kramer G, Schollhammer A, Forster O, Marberger M. Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1994; 151: 480–484
- Szebeni GJ, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG (2017) Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumour-associated macrophages as tumour promoters. *Mediators Inflamm* 2017: 9294018.
- Teixeira, C. Vilanova, Silandre, D., de Souza Santos, A. M., Delalande, C., Sampaio, F. J. B., Carreau, S., & da Fonte Ramos, C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and estrogen receptors expression in rat testis at weaning.

- Journal of Endocrinology, 192(2), 301–311. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06712>
- Trifunovic J, Miller L, Debeljak Z, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression—a review. *Biochem Med.* 2015;25(1):36-48.
- Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathol Res Pract.* 1998;194(5):335–340.
- Van Weissenbruch, M.M., Engelbregt, M.J., Veening, M.A., Van Weissenbruch, H.A., et al. Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocr Dev.* 8:15-33, 2005.
- Vanderkerken K, Vande Broek I, Eizirik DL, Van Valckenborgh E, Asosingh K, Van Riet I, Van Camp B. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), secreted by bone marrow endothelial cells, induces chemoattraction of 5T multiplemyeloma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(1):87–90.
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 379–386). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Vithayathil, M. A., Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., Langley-Evans, S. C., Gibson, R. A., & Muhlhausler, B. S. (2018). Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. *Nutrition and Metabolism*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0253-3>
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, BenharrochD, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 isrequired for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2645– 2650, 2003.
- Weibel, E. R.; Kistler, G. S.; Scherle, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology*, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.
- West-eberhard, M. J. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of

- pathogenic obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 3, p. 723–731, 15 jan. 2019.
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85(2), 337–341.
- Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D. Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *J Urol*. 2000; 164(3 pt 1):722-725.
- Wu, C. Te, Chang, Y. H., Lin, W. Y., Chen, W. C., & Chen, M. F. (2015). TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 22, 1587–1593. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4804-9>
- Yang, H.-Y.; Lee, T.-H. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep.*; 48(4): 200-208, 2015.
- Yzydorczyk, C. et al. Calorie restriction in adulthood reduces hepatic disorders induced by transient postnatal overfeeding in mice. *Nutrients*, v. 11, n. 11, 1 nov. 2019.
- Zambrano, E., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., García-Becerra, R., Boeck, L., Díaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*. 563:275-84, 2005.
- Zenzmaier, C., Untergasser, G., & Berger, P. (2008). Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. In *Experimental Gerontology* (Vol. 43, Issue 11, pp. 981–985). *Exp Gerontol*. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.06.008>

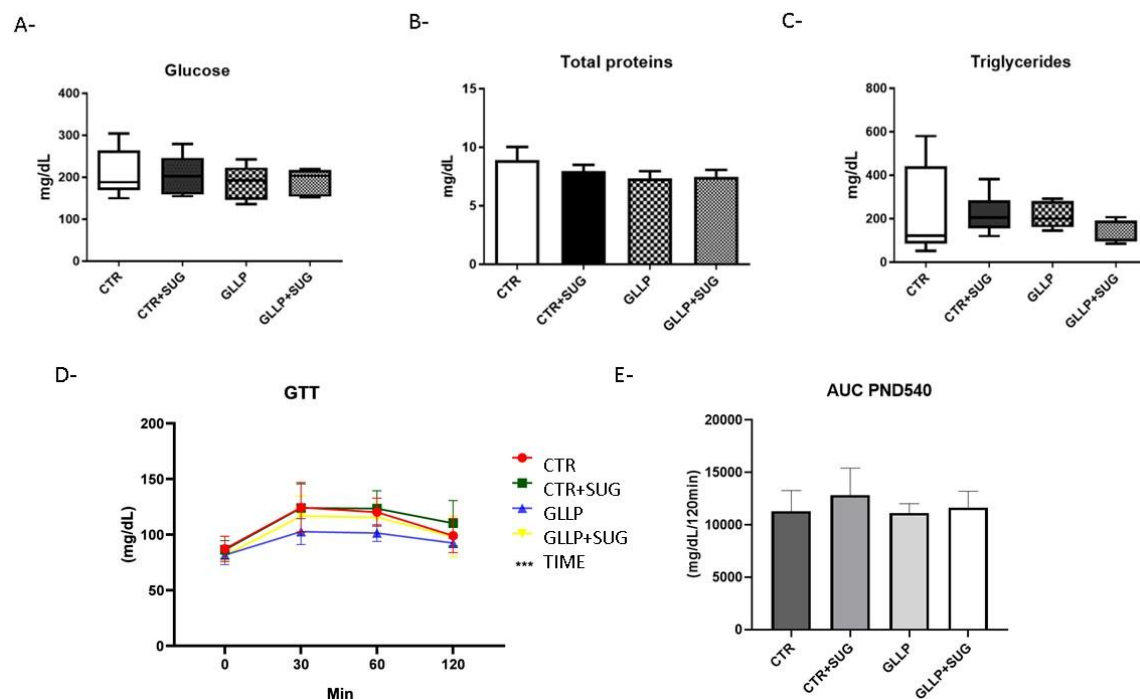
11. SUPPLEMENTARY FILES

Ingredients	Normal (CTR) diet (17% of protein) g/Kg	Low protein diet (6% of protein) g/Kg
Casein (84% protein)	202	71.5
Starch	397	480
Dextrin	130.5	159
Sucrose	100	121
L-cystine	3	1
Fiber of pH 101 or pH 102 (microcellulose)	50	50
Soyoil	70	70
Mixture of vitamins AIN93G*	10	10**
Mixture of salts AIN93G*	35	35***
Choline hydrochloride or Choline bitartrate	2.5	2.5

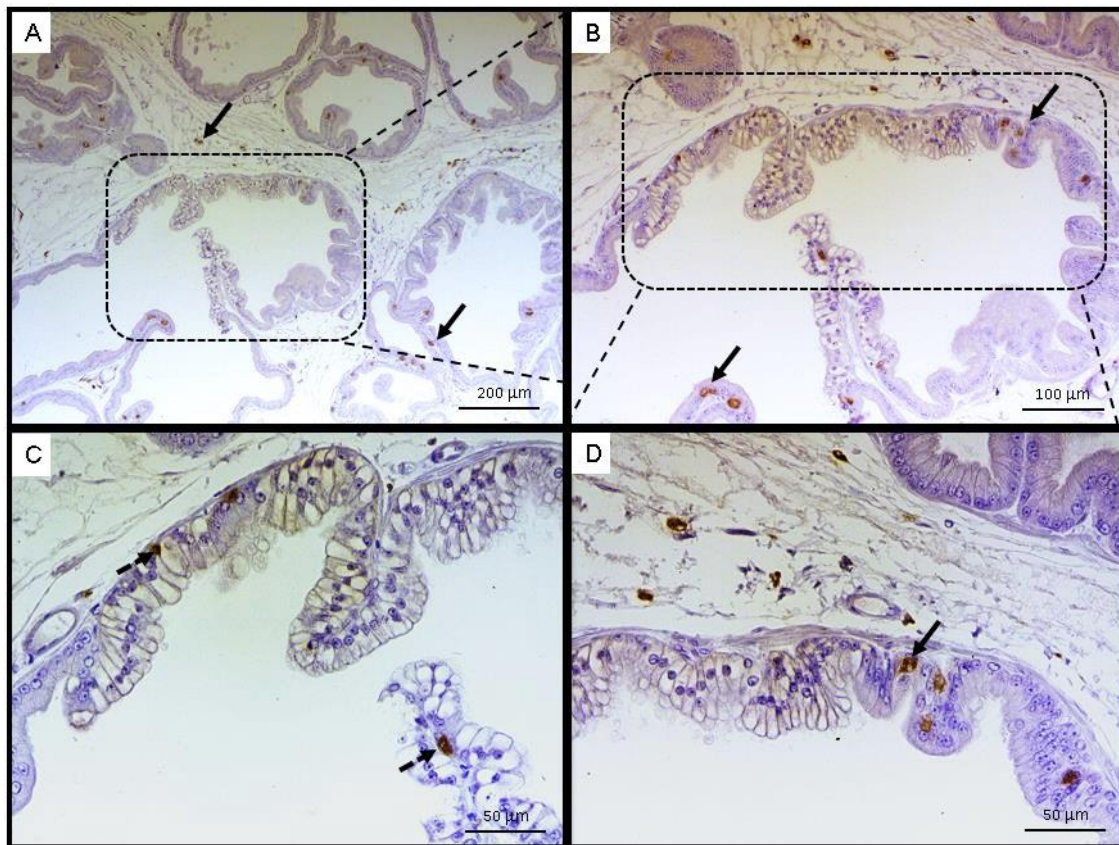
Supplementary table 01. A. hypoprotein diet was prepared by PragSoluções (PragSoluções, SP, Brazil). This diet was supplemented with L-Cystine is a sulfuric amino acid. B. Mix of vitamins and minerals were formulated by the American Institute of Nutrition AIN-93G recommended for rodent diets (Reeves et al., 1993). c Potassium phosphate, monobasic, was added to the mixture of salts from this diet to maintain the phosphorus at the levels found in the casein control diet (3g / kg of the diet) and the calcium ratio: the phosphorus rate was maintained at 1.3 in both. diets.

Parameters	Experimental Groups			
	CTR	GLLP	CTR+SUG	GLLP+SUG
PND 0				
Body Weight (g)	7.02 ± 0.47	5.77 ± 1.22*	-	-
AGD (mm)	2.96 ± 0.35	2.75 ± 0.21*	-	-
PND 21				
Body Weight (g) ¹	50.90 ± 0.95	19.20 ± 0.44*	-	-
AGD (mm)	14.48 ± 1.95	9.23 ± 1.17*	-	-
PND 90				
Body Weight (g) ¹	420.20 ± 11.32	402.80 ± 10.31	327.20 ± 7.91*	294.40 ± 8.98*#
AGD (mm)	31.14 ± 6.19	30.44 ± 7.62	28.97 ± 6.49	25.05 ± 3.42*#

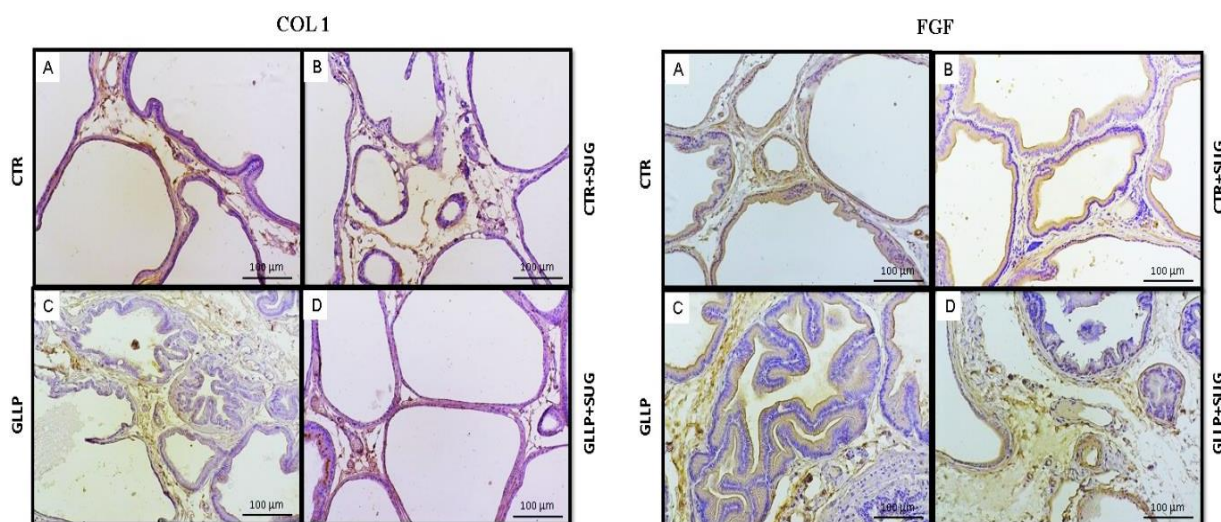
Supplementary table 02. Biometric parameters of male offspring at PND 0, 21 and 90. Data are expressed as mean ± SD. ¹Data are expressed as median ± SEM. *Demonstrated statistically difference between Control (CTR) group and Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) group (p < 0.05). AGD- Ano-Genital Distance; PND- Post Natal Day.



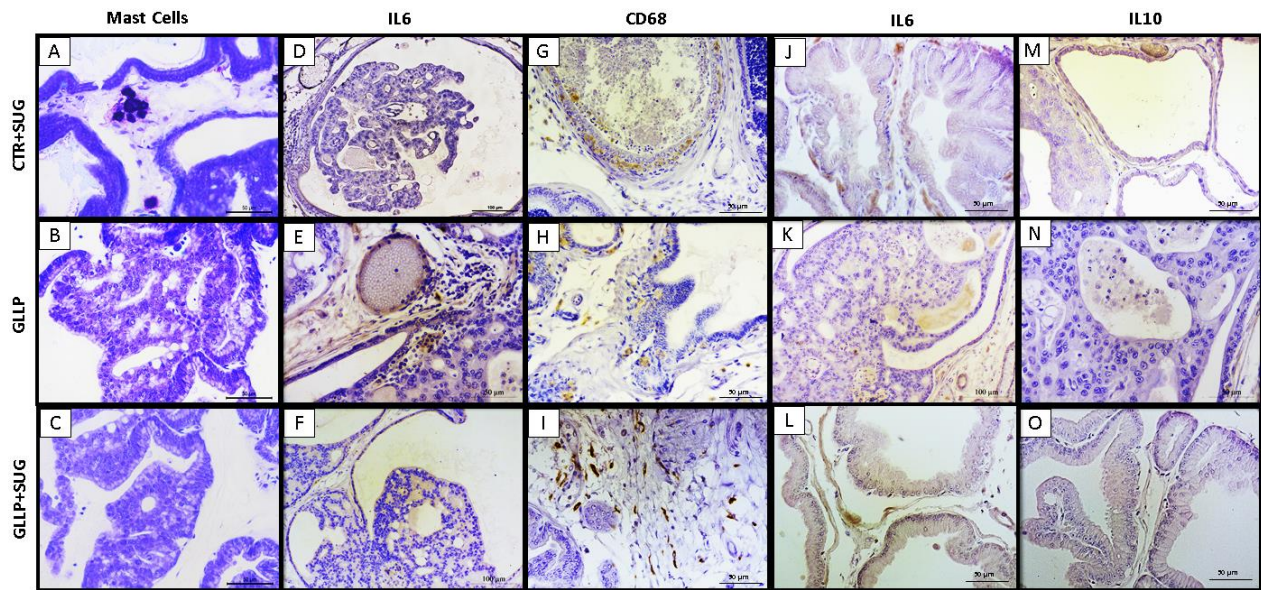
Supplementary Figure 01. Metabolic analysis of aging. A. Amount of circulating glucose. B. Total proteins. C. Triglycerides. D. Glycemic curve at fasting time, 15, 30, 60 and 120 minutes after consumption of sucrose solution via fasting. E. Statistics of the area on the curve.



Supplementary Figure 02. Representative board for immunohistochemistry (CD68). A considerable amount of macrophages is observed in the intraepithelial and stromal regions, including the lesion, mucinous metaplasia. Animal from the GLLP + SUG group, which had a higher incidence of these cells in VP.



Supplementary Figure 03. Representative board for immunohistochemistry Collagen 1 and FGF. A considerable increase in the extracellular matrix observed in the GLLP and GLLP + SUG groups, with the expression of collagen 1 and FGF. 20x magnification.



Supplementary Figure 04. Representative board of the CTR + SUG, GLLP, and GLLP + SUG groups. A.B.C. Staining for Toluidine Blue in the Tumor of the animals, showing an aggregate of mast cells. 40x magnification. D.E.F. Immunohistochemistry for IL6 in the regions of inflammatory infiltrate, showing high expression of this molecule. 40x magnification. G.H.I. Immunohistochemistry for CD68, showing aggregates of macrophages in the regions of inflammatory infiltrate. J.K.L. Immunohistochemistry for IL6 in the tumor of the different groups. M.N.O. Immunohistochemistry for IL10 in the tumor.

Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos da restrição proteica perinatal associado ao consumo do açúcar sobre o metabolismo, parâmetros reprodutivos e morfofisiologia prostática na prole de ratos", Protocolo nº 951-CEUA, sob a responsabilidade de **Luis Antônio Justulin Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	☐ Ensino	☒ Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 01/4/2017	Término: 01/4/2018
Espécie/linhagem:	Rato Sprague Dawley	
Nº de animais:	450	
Peso:	200-450g	Idade: 90 e 540 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP – Campinas/SP	

Botucatu, 10 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/nº CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: scc@ibb.unesp.br

