

ALLICE SANTOS CRUZ VERAS

**EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E ÔMEGA-3 OTIMIZAM O METABOLISMO LIPÍDICO,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A DIETA
HIPERLIPÍDICA**



PRESIDENTE PRUDENTE

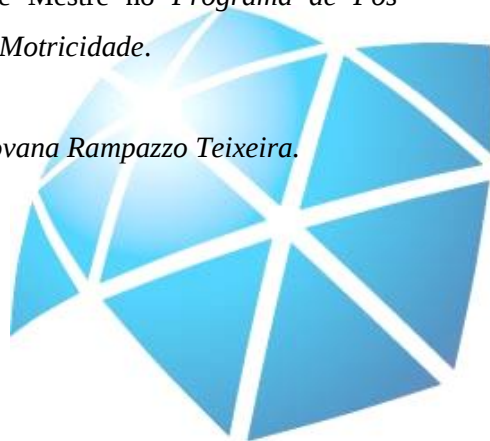
2020

ALLICE SANTOS CRUZ VERAS

**EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E ÔMEGA-3 OTIMIZAM O METABOLISMO LIPÍDICO,
INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS SUBMETIDOS A DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Ciências e Tecnologia FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Motricidade*.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Giovana Rampazzo Teixeira.



PRESIDENTE PRUDENTE

2020

V476e

Veras, Allice Santos Cruz

EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E ÔMEGA-3 OTIMIZAM O
METABOLISMO LIPÍDICO, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS SUBMETIDOS A DIETA HIPERLIPÍDICA / Allice Santos

Cruz Veras. -- Presidente Prudente, 2020

56 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientadora: Giovana Rampazzo Teixeira

1. Metabolismo lipídico. 2. PUFA's. 3. Obesidade. 4. Exercício Físico
Aeróbico. 5. Próstata. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e
Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Presidente Prudente

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO E DA INGESTÃO DE ÔMEGA-3 NA PRÓSTATA DE RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

AUTORA: ALLICE SANTOS CRUZ VERAS

ORIENTADORA: GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, área: Biodinâmica da Motricidade Humana pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA

Departamento de Educação Física. / UNESP/ Presidente Prudente -Faculdade de Ciências e Tecnologia

Profa. Dra. PATRÍCIA CHIMIN PERANDINI **VIDEOCONFERÊNCIA**

Departamento de Fundamentos da Educação Física / Universidade Estadual de Londrina

Professor Adjunto GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES **VIDEOCONFERÊNCIA**

Departamento de Biologia Geral / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Presidente Prudente, 20 de agosto de 2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais ***Ester Henriqueta dos Santos*** e ***Wellington Francisco Rosas da Cruz Veras***, por todo suporte, incentivo, amor e compreensão doados a mim durante toda a minha vida acadêmica, desde a iniciação científica até a escolha da Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus sempre em primeiro lugar por me proporcionar saúde para ir em busca dos meus objetivos, sem desistir, sem desanimar, por me guiar em todas as decisões e trilhar o meu caminho sempre para o melhor. Em segundo lugar a minha família, aos meus pais, em especial aos meus irmãos **Alline Santos Cruz Veras, Allan Santos Cruz Veras, Clecius Rafael Santos Fernandes e Klaus Giovanni Santos e Cruz**, que me inspiram todos os dias, agradeço por todo apoio, incentivo, força e carinho destinados a mim. Não menos importante a uma irmã que a vida me deu, **Gabriela Santana Ugino** que, antes de todos, foi a primeira a acreditar em mim, que me acompanha desde quando a UNESP era apenas um sonho, foi quem me apoiou no vestibular, depositou toda fé e apoio, desde 2012 até o presente momento. Sou grata ainda pelas pessoas que convivo diariamente, por termos formado uma união que vai muito além do trabalho e de “fazer pesquisa”, são irmãos que a pesquisa me concedeu, **Maria Eduarda de Almeida Tavares, Rafael Ribeiro Correia e Victor Rogério Garcia Baptista e Raíssa de Oliveira Mantovani**, gratidão pela amizade, parceria, aos IC’s por serem meus braços de apoio dentro e fora do laboratório, pelos pesquisadores incríveis que estão se tornando e por acreditarem no meu trabalho supervisionando vocês. Agradeço a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento-001*, pelo suporte financeiro e pelo crédito no meu trabalho.

Por fim e não menos importante, a minha orientadora **Giovana Rampazzo Teixeira**, sem você eu não seria metade de quem eu sou hoje, muito obrigada por segurar a minha mão, por acreditar em mim quando a grande maioria subestimou, por me oferecer todo suporte e conhecimento, me aceitar desde o início da iniciação científica (2014), atualmente mestranda e se você permitir, doutoranda também. Graças a você me encontrei na pesquisa, muitas portas se abriram e se abrem diariamente, eu sou feliz no que faço, e acima de ser a minha orientadora encontrei uma grande amiga. Por fim, além de inspiração profissional, deixo registrado que é uma honra trabalhar ao seu lado a 7 anos, obrigada por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE ABREVIações	11
RESUMO	
ABSTRACT	
1.0 - INTRODUÇÃO	
1.1 Doenças Prostáticas, Radicais Livres e Enzimas Antioxidantes.....	
1.2 Suplementação de ômega-3 e seus efeitos na próstata	
1.3 Regulação prostática por efeitos sistêmicos desencadeados pelo exercício físico aeróbio.....	
2.0 Justificativa	
3.0 Objetivos	
3.1 Objetivo Geral.....	
3.2 Objetivos Específicos	
4.0 Materiais e Métodos	21
4.1. Declaração de Ética.....	
4.2. Animais e Procedimentos Experimentais	24
4.3. Dieta hiperlipídica e suplementação de ômega-3 e chia	24
4.4. Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	27
4.5. Coleta e Preparação das amostras	27
4.6. Análises Histológicas	
4.7. Análises Imunohistoquímicas	28
4.8 Extração do RNA e PCR	29
4.9 Análises Estatística.....	30
5.0 Resultados	30
5.1. Dados histopatológicos e peso corporal	
5.2. Dados Imunohistoquímicos	36
5.3 Dados de estresse oxidativo (ROS)	
6.0 Discussão	
7.0 Conclusão	
8.0 Referências Bibliográficas	
9.0 TABELAS	48
10.0 FIGURAS	

“Na ausência de referência, SEJA”.

Autor desconhecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo do protocolo de intervenção durante 14 semanas de dieta hiperlipídica, suplementação de óleo de peixe, óleo de chia (ω -3) e exercício físico aeróbico.

Figura 2. Resultado do peso corporal inicial e final dos animais, ganho de peso, pesos absoluto e relativo da próstata e quantidade de mastócitos dos animais.

Figura 3. Dados nutricionais do consumo de ração, energia ingerida, eficiência alimentar e ganho de peso dos animais.

Figura 4. Dados bioquímicos da razão TG (A), TC (B), LDL (C), VLDL (D), HDL (E) e TC / HDL (F) de animais submetidos ao padrão ou HFD, suplementação de ω -3 e/ou exercício físico aeróbico.

Figura 5. Análises histológicas dos animais submetidos a dieta hiperlipídica, suplementação de ômega-3 e exercício físico aeróbico, pelas técnicas de H&E, azul de toluidina e tricômico de masson na próstata ventral.

Figura 6. Plate imunohistoquímico das proteínas AR, FAS/CD95, SREBP-1 e das proteínas inflamatórias IL-6, NF- κ B e TNF- α na próstata ventral de ratos treinados, obesos e suplementados com ω -3.

Figura 7. Plate imunohistoquímico das proteínas IL-6, NF- κ B e TNF- α na próstata ventral de ratos treinados, obesos e suplementados com ω -3.

Figura 8. Expressão dos genes SOD-1, CAT, NRF-2, GSS e NOS 2 na próstata ventral de ratos Wistar obesos.

Figura 9. Papel do exercício físico aeróbico associado a suplementação de ω -3 no metabolismo lipídico na próstata ventral de ratos Wistar causado pelo excesso de dieta hiperlipídica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificação das sequências dos primers relacionados ao estresse oxidativo, SOD-1, CAT, NRF-2, GSS e NOS 2.

Tabela 2. Análises histopatológicas na próstata ventral de animais obesos, treinados e suplementados com ω -3.

LISTA DE ABREVIACÕES

SFA - ácidos graxos saturados;

TFA - ácidos graxos trans;

PUFAs - ácidos graxos poli-insaturados;

HF - dieta hiperlipídica;

PCR - polymerase chain reaction/ reação em cadeia da polimerase;

HBP - hiperplasia benigna prostática;

NIP - neoplasia intraepitelial;

AP - atrofia prostática;

PIA - atrofia inflamatória proliferativa;

CPa - câncer prostático;

PAH - hiperplasia pós-atrótica;

AR - receptor de andrógeno;

FAS/CD95 - receptor da morte da superfície celular FAS;

IL-6 - interleucina-6;

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa;

NF- κ B - fator de transcrição nuclear beta

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1;

SREBP-1 - proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1;

IL-1ra - receptor antagonista de interleucina-1;

IL-1 β - interleucina 1 beta;

IL-1 α - interleucina 1 alfa;

IL-10 - interleucina 10;

ERMO - espécies reativas do metabolismo oxidativo;

RL - radicais livres;

O² - ânion superóxido;

H²O² - peróxido de hidrogênio;

OH - radical hidroxila;

EO - estresse oxidativo;

SOD - superóxido dismutase;

CAT - catalase;

GSH-Px - glutathiona peroxidase;

GST - glutathiona-S-transferase;

NO₂ - óxido nítrico sintase 2;

GR - glutationa redutase;
NRF2 - fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2;
ARE - elemento de resposta antioxidante;
ω-3 - ômega-3;
ω-6 - ômega-6;
ALA - ácido α -linolênico;
DHA - docosahexaenóico;
EPA - eicosapentaenóico;
Chia - Salvia hispânica;
ROS - espécies reativas de oxigênio;
PPAR-γ - receptores de ativação de proliferação de peroxissomos gama;
G6Pase - glicose-6-fosfatase;
AG - ácidos graxos;
PPAR-α - receptores de ativação de proliferação de peroxissomos alfa;
CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animais;
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
15-LOX - lipooxigenase 15;
PGH₂ - prostaglandina H₂;
PGE₂ - prostaglandina 2;
COX - ciclooxigenase;
HOX - hexapeptídeo/fator de transcrição;
PGG₂ - prostaglandina G₂;
PGE₂ - prostaglandina E₂.
FO - fish oil.
CO - chia oil.

RESUMO

As dietas ocidentais são ricas em ácidos graxos saturados (SFA) e ácidos graxos trans (TFA). A dieta hiperlipídica (HF) promove um aumento de lipídios e dislipidemia. Os poliinsaturados (PUFAs) têm ação anti-inflamatória e antioxidante, têm sido associados ao consumo de ômega-3 e estão relacionados à redução de alguns tipos de doenças. A associação entre exercício e PUFAs reduz o risco de morte. O estudo avalia os efeitos do exercício físico aeróbio associado ao ômega-3 na próstata ventral de ratos Wistar suplementados com um HFD. 49 ratos foram divididos em 7 grupos: CT- recebeu dieta padrão e água *ad libitum*; HF- recebeu apenas dieta hiperlipídica; HF+FO- os animais receberam dieta hiperlipídica e óleo de peixe; HF+Ex- receberam dieta hiperlipídica e fizeram exercício físico aeróbio; HF+FO+Ex- receberam dieta hiperlipídica, óleo de peixe e realizaram exercício físico; HF+CO- receberam dieta hiperlipídica e óleo de chia; HF+CO+Ex- os animais receberam dieta hiperlipídica, óleo de chia e realizaram exercício físico. O estudo teve a duração de 14 semanas, a ingestão ω -3 (óleo de peixe e óleo de chia, 1ml via gavagem) foi suplementado antes do exercício físico, o protocolo de exercício físico aeróbio (natação) consistiu em três vezes por semana, durante 30 minutos, ambos durante 8 semanas. A próstata ventral foi coletada, pesada e processada para análise. O HF modificou o peso corporal final e o ganho de peso, diminuiu a expressão do receptor androgênico (AR); aumento da inflamação prostática via TNF- α ; a suplementação de FO diminuiu o peso corporal final, a inflamação, aumenta a imunorreatividade da AR; o exercício físico aeróbio reduz o peso corporal final e a expressão de IL-6 e TNF- α ; FO e CO associados ao exercício reduzem o peso corporal final e o ganho de peso; o CO aumentou os genes NRF-2 e GSS, o FO reduz essas expressões e o exercício físico aeróbio associado ao FO, potencializando a expressão de CAT e NOS 2. Os PUFAs reduziram os danos causados pelo excesso de HF, em conclusão, para que haja maior eficácia em ω -3, é necessário associar-se ao exercício físico aeróbio.

Palavras-chaves: metabolismo lipídico, PUFAs, obesidade, exercício aeróbio, próstata.

ABSTRACT

Western diets are rich in saturated fatty acids (SFA) and trans fatty acids (TFA). High fat diet (HF) in promote an increase in lipids and dyslipidemia. Polyunsaturated (PUFAs) have anti-inflammatory and antioxidant action, it has been linked to the consumption of omega-3 is related to the reduction of some types of diseases. The association between exercise and PUFAs reduced risk of death. The study evaluate the effects of aerobic physical exercise associated with omega-3 on the ventral prostate of Wistar rats supplemented with a HFD. 49 rats were divided into 7 groups: CT- received a standard diet and water *ad libitum*; HF- received the high fat diet; HF+FO- high fat diet and fish oil; HF+Ex- received a high fat diet and done physical exercise; HF+FO+Ex- high fat diet, fish oil and performs physical exercise; HF+CO - high fat diet and chia oil; HF+CO+Ex- high-fat diet, chia oil and performed physical exercise. The study lasted 14 weeks, the ω -3 intake (fish oil and chia oil, 1ml via gavage) was supplemented before physical exercise, the aerobic exercise (swimming) protocol consisted of three times a week, for 30 minutes, both for 8 weeks. The HF modified the final body weight and the weight gain, decreased the expression of the androgen receptor (AR); increased prostatic inflammation via TNF- α ; the supplementation of FO decreases final body weight, inflammation, increases AR immunoreactivity; aerobic physical exercise reduces the final body weight and the expression of IL-6 and TNF- α ; FO and CO associated with exercise reduces final body weight and weight gain; the CO increased the NRF-2 and GSS genes, FO reduces these expressions and the aerobic physical exercise associated with FO, potentiating the expression of CAT and NOS 2. PUFAs reduced the damage caused by excessive HF, in conclusion, so that there is greater effectiveness in ω -3 intake, it is necessary to associate with aerobic physical exercise.

Keywords: lipid metabolism, PUFAs, prostate, obesity, aerobic exercise.

1.0 Introdução

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina importante para o processo reprodutivo, secreta líquido fino de aspecto leitoso com vários nutrientes que compõem o fluido seminal (Francis et al., 2018). A próstata ventral é uma glândula túbulo-alveolar revestida por epitélio simples andrógeno dependente que regula o seu crescimento, desenvolvimento e manutenção celular. Os andrógenos auxiliam na regulação do equilíbrio funcional entre os processos de proliferação celular e de apoptose. A morfologia e a fisiologia da próstata apresentam alterações que afetam essa glândula. Entre elas, destacam-se a hiperplasia prostática benigna (HPB), neoplasia intraepitelial (PIN), atrofia prostática (AP), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e câncer de próstata (CPa) (Marzo et al., 2007). Alterações hiperplásicas acometem homens com frequência, estima-se que aproximadamente 65.840 novos casos de câncer de próstata ocorrerão no Brasil em 2020, equivalente a 29,2% da população, tornando as doenças o segundo câncer mais comum no mundo (INCA, 2020). Fatores associados ao risco de proliferação prostáticas estão relacionadas ao estilo de vida sedentário, consumo excessivo de refeições com alto teor calórico e pouco nutritivo (Peisch et al., 2017), aumento das taxas de obesidade (Hsing et al., 2002) e prevalência de tabagismo (Peisch et al., 2017). Esses fatores induzem um ambiente inflamatório na próstata (Vykhovanets et al., 2011), podendo promover o aparecimento/desenvolvimento de câncer de próstata (Huang et al., 2012).

Alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em gordura e açúcar desregulam a homeostase energética e promovem a obesidade (Saltiel et al., 2001; Kahn et al., 2001). A dieta hiperlipídica (HF) é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura inflamação crônica de baixo grau, que está relacionada a doenças metabólicas, incluindo diabetes tipo 2, dislipidemia, aterosclerose e hipertensão (Sethi et al., 2015). Notavelmente, as dietas ocidentais são ricas em ácidos graxos saturados (AG) e ácidos graxos trans (AGT), e o excesso de AGS na dieta promove acúmulo de lipídios e dislipidemia. Caracteriza-se por HF o consumo excessivo de lipídios (40%-50% da ingestão calórica total) como ácidos graxos saturados, gorduras saturadas e trans insaturadas (Schrauwen; Westerterp, 2000); (Greenwood; Winocur, 2005). O teor elevado de gordura saturada na dieta aumenta o crescimento de

câncer prostático (CPa) em células *in vitro*, enquanto a dieta com baixo teor de gordura retarda o crescimento de células cancerígenas prostáticas (Bianco et al., 2006; Wang et al., 1995).

O aumento do aporte nutricional promove a obesidade fator primário desencadeador de inflamação sistêmica. O excesso de nutrientes leva primeiramente à ativação da sinalização metabólica ativando vias que incluem c-Jun N-terminal quinase (JNK), fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína quinase R (Tuncman et al., 2006). A ativação dessas vias inflamatórias leva a uma indução de baixo nível de citocinas inflamatórias, resultando em uma resposta inflamatória de baixo grau (Kalra & Dhar et al., 2017). Segundo fato é que o excesso de nutrientes e a obesidade também levam à hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, remodelação do tecido e aumento nos ácidos graxos livres resultando em mudanças na produção de adipocinas e uma resposta inflamatória (Meng et al., 2013). A inflamação é um processo da reação do corpo a agentes desconhecidos ou danos aos tecidos. Entre os principais marcadores pró-inflamatórios estão a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas citocinas têm papel imunoregulatórios (Akira & Kishimoto et al., 1992). A obesidade também leva ao aumento do estresse do retículo endoplasmático, resultando na ativação de NF- κ B, JNK e aumento do estresse oxidativo e, por sua vez, a supra regulação de citocinas inflamatórias (Bays & Mandarin et al., 2004; Wang et al., 2017). Todas essas vias contribuem para o início da inflamação associada à obesidade. Embora a inflamação associada à obesidade esteja localizada principalmente no tecido adiposo branco, outros tecidos mostraram ter aumentado a inflamação na obesidade, incluindo a próstata. No entanto, a resposta inflamatória é um mecanismo imunológico efetor ativado com a consequente progressão tumoral (Mantovani et al., 2008; Gallí et al., 2009). O aumento inflamatório resultante da dieta hiperlipídica pode progredir para alterações prostáticas promovendo a formação de espécies reativas do metabolismo oxidativo (ERMO), fatores que têm merecido atenção especial nos últimos anos (Khandrika et al., 2009).

ERMO ou radicais livres (RL) são moléculas altamente instáveis (Khandrika et al., 2009), são geradas no ambiente intracelular, podem produzir alterações em uma fita ou na dupla fita de DNA, oxidando as bases pirimídicas, púricas e desoxirriboses, levando à mutagênese (Bayraktar et al., 2010). A modificação em alguns genes pode ativar proto-oncogenes ou desativar genes supressores de tumor

(Shi et al., 2004; Badjatia et al., 2010). Além disso, grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas e excretadas pelas células tumorais. Essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas, que podem causar alterações nos componentes celulares: proteínas, DNA e lipídios (Brown-Borg.,1996). O desequilíbrio entre a formação e remoção de ERMO no corpo, devido à diminuição de antioxidantes endógenos ou ao aumento na geração de ERMO, estado de estresse oxidativo aumentado um estado oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, o que pode resultar em morte celular (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Assim, o estresse oxidativo (EO) é instalado, uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies antioxidantes (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010; Brown-borg et al., 1996). O EO persistente em níveis exacerbados pode causar resistência a apoptose, além de promover a proliferação celular, com o crescimento estimulado pela superóxido dismutase (SOD) e H_2O_2 (Brown et al., 2001; Bicknell et al., 2001).

O organismo humano possui um sistema de defesa intrínseco contra a ação dos RL, esse sistema pode ser subdividido em sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. Vitaminas A, C, E e selênio estão entre os principais antioxidantes não-enzimáticos do organismo (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). Dentre as enzimas endógenas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 ; a catalase (CAT), que converte H_2O_2 em oxigênio molecular e água; e a glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a degradação de H_2O_2 e hidroperóxidos e, dessa maneira compõe importantes vias detoxificadoras de enzimas secundárias (Bayraktar et al., 2010). Essas enzimas *secundárias* como a glutathione-S-transferase (GST) e a glutathione redutase (GR) atuam conjuntamente com a GSH-Px na detoxicação de ERMO (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010).

As alterações no balanço entre antioxidantes e oxidantes implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer (Eblin et al., 2009). Desta forma, a quantificação da glutathione pode indicar uma possível correlação entre a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como a GSH-Px, e o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo, comprovando a hipótese de que reações que levam à formação de ERMO podem aumentar a quantidade de células malignas (Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010).

Apesar da relevância clínica das enzimas antioxidantes, na literatura especializada são escassos os dados sobre os perfis de expressão e regulação dessas enzimas no CPa. Maders (et al., 2011) correlacionaram o grau (*Gleason*) e o estágio do CPa com as atividades das enzimas SOD, CAT, GSH-Px e concluíram que a diminuição dos níveis séricos destas enzimas antioxidantes é considerada um importante fator de desenvolvimento e progressão tumoral. Polimorfismos no gene da enzima GST foram associados ao aumento do risco de desenvolvimento do CPa (Qadri et al., 2011). A superfamília da enzima GST está envolvida na biotransformação de vários compostos reconhecidos como fatores de risco para o CPa e o carcinoma urotelial, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e solventes halogenados, catalisando a conjugação desses compostos eletrolíticos em glutatona, o que diminui suas toxicidades e facilita suas excreções pelo organismo (Maders et al., 2011; Qadri et al., 2011). Contudo, nas células tumorais, a ação das GSTs pode levar à resistência de drogas antitumorais (Townsend&Tew et al., 2003). A glutatona S-transferases (GSTP), uma subclasse da enzima GST, também está envolvida na detoxificação de carcinógenos e atividade antioxidante (Qadri et al., 2011). Nelson (et al., 2007) e (Qadri et al., 2011) demonstraram que mutações somáticas causam inativação do gene para GSTP, localizado no cromossomo 11q13 evidenciando a ineficiência de ações terapêuticas. Assim, recursos como a utilização de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) estão sendo indicados e utilizados como antioxidantes para o tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer prostático.

Ácidos graxos são classificados em três categorias baseados na quantidade de duplas ligações em cadeias laterais: ácidos graxos saturados (SFA, sem dupla ligação), ácido graxo monoinsaturado (MUFAs, uma dupla ligação) e os ácidos graxos poli-insaturado (mais que duas duplas ligações). Há duas principais classes de PUFAs: o ômega-3 (ω -3) e o ômega-6 (ω -6), que são considerados poli-insaturados pois, sua cadeia carbônica compreende várias duplas ligações. O ω -3 é classificado como ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa, pois, possui a primeira dupla ligação localizada entre o terceiro e o quarto átomos de carbono do final da cauda. São exemplos de ácidos graxos da família do ω -3: alfa-linolênico (ALA) C18:3, docosahexaenóico (DHA) C22:6 e eicosapentaenóico (EPA) C20:5. É sabido que a composição estrutural de PUFAs afeta sua distribuição na membrana celular (Wiktorowska-Owczarek & Nowak et al., 2015), o que afeta no processo de metabolização e oxidação

dos mesmos, sendo os ácidos graxos ω -3 considerados suscetíveis a oxidação, aumentando sua expressão de acordo com a forma de armazenamento (Cholewski et al., 2018).

Os PUFA's possuem propriedades anti-inflamatórias (Bhangle & Kolasinski et al., 2011) são considerados benéficos para a saúde. No entanto, ácidos graxos ω -3 e ω -6 possuem efeitos opostos nas funções metabólicas do corpo. Diversos estudos têm investigado os efeitos da suplementação de ω -3 em células tumorais prostáticas. (Bratton et al., 2019) estudos recentes têm destacado mudanças na dieta e a redução do CPA, diminuindo a ingestão da proporção de ω -6, aumentando a ingestão de ω -3. Ao analisar os efeitos de PUFA's na proliferação e sobrevida de células do CPA, Bratton (et al., 2019) destacaram que o efeito positivo da *dieta mediterrânea*, baseada no consumo de alimentos frescos e naturais como azeite, frutas, legumes, etc, foi qualitativamente atribuível, em parte, devido ao teor de ácidos graxos ω -3 dos peixes. Efeitos de dietas ocidentais ricas em PUFA's ω -6 estão associadas à inflamação, constrição de vasos sanguíneos e agregação de plaquetas (López-Vicario et al., 2015). Descontrolado aumento de inflamação aguda, devido ao excesso de estímulos, pode prover e influenciar o aumento de microambientes tumorais (Nathan et al., 2010). Persistentes inflamações oriundas da dieta rica em lipídicos com altas concentrações de PUFA's ω -6 tem sido ligada ao risco de câncer e metástases (Calder et al., 2012).

Ao contrário o ω -3 pode reduzir a inflamação, alterar a função vascular, biomarcadores de carcinogêneses, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares e câncer (Tabas et al., 2014). O ω -3 apresenta substancial proteção contra outras doenças metabólicas crônicas, como obesidade, diabetes e osteoporose (Ishihara et al., 2019). Fontes principais de ácidos graxos ω -6 na forma de ácido linoleico (LA) com baixas proporções de ω -3 (ALA) são encontradas em sementes e óleos vegetais como óleo de canola, soja, girassóis e milho (Parrish et al., 2013). Por outro lado, a semente de chia (*Salvia Hispânica*) são abundantes em ALA (ω -3), assim como óleo de peixe que possui grandes proporções de EPA, DPA, DHA e ARA diretamente utilizados para funções fisiológicas no corpo (Deol et al., 2017; Kahraman et al., 2017; Kutzner et al., 2017). Ácidos graxos EPA e DHA são precursores de mediadores como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que em conjunto são chamados de eicosanóides. Eicosanóides são lipídios bioativos de 20 carbonos derivados do metabolismo de ácidos graxos poli-

insaturados, que podem modular vários processos biológicos (Gomes et al., 2018). Estima-se que cerca de 0,2% de ALA é convertido em EPA, 64% de EPA a ácido docosapentaenóico (EPA, 22: 5 ω -3) e 37% de EPA a DHA. Assim, a quantidade total de EPA e DHA convertida de ALA é de cerca de 0,13% e 0,05% do ALA de partida, respectivamente. Esses achados sugerem que qualquer contribuição da síntese de ácidos graxos para o metabólito da PUFAs provavelmente favorece o alongamento de PUFAs ω -6 em ω -3.

A metabolização de ω -3 e ω -6 em eicosanóides ocorre através de um grupo específico de enzimas. Iniciando em ácido araquidônico para prostaglandinas e tromboxanos via cicloxigenase (COX) e hidropoxidase (HOX), produzindo prostaglandina G_2 (PGG₂) e prostaglandina H_2 (PGH₂) (Arima et al., 2011). Na próstata, a prostaglandina E_2 (PGE₂) é o mais abundante mediador pro-inflamatório, e sua expressão está aumentada em tumores prostáticos (Greenhough et al., 2009; Coussens et al., 2010; Gomes et al., 2018). A PGE₂ também pode induzir efeitos anti-inflamatórios aumentando a produção de lipoxina, induzindo 15-LOX (lipooxigenase) (Wiktorowska-Owczarek & Nowak, 2015). O metabólito ALA tem sido associado com EPA e conjugado a taxanos para melhorar os efeitos quimioterápicos de segunda linha, por seu aumento potencial indução de apoptose celular em tumores via ativação de FAS/CD95. Estudos recentes relacionam a suplementação com óleo de peixe, e a diminuição da ativação de NF- κ B induzido por LPS em monócitos reduzindo a fosforilação de I κ B. Outra via pela qual é possível ativação anti-inflamatória dos derivados de ômega-3 (1ml), é pela ativação dos receptores de proliferação de peroxissomos gama (PPAR- γ) induzido por EPA, podendo interferir na translocação de NF- κ B para o núcleo, reduzindo as citocinas associadas, TNF- α e IL-6 (Li et al., 2005).

Vários mecanismos pelos quais PUFAs ω -3 mantêm a homeostase do corpo foram propostos, incluindo os seguintes: 1) Eles podem aumentar a produção de eicosanóides anti-inflamatórios, incluindo lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas que podem aumentar a fagocitose e a resolução da inflamação (Krishnamoorthy et al., 2018; Serhan et al., 2018); 2) eles podem inibir a produção de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) mediadas por receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α e PPAR- γ) (Albadine et al., 2014); 3) podem limitar a produção e a atividade de mediadores inflamatórios, incluindo proteínas quinases (JNK, MAPK, p38), fator

nuclear- κ B, quimiocinas, citocinas (TNF α , TNF-1 β , IL-1, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, etc.) e fatores de crescimento angiogênicos (VEGF) (Pollak et al., 2013); 4) podem inibir o fator nuclear da proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c), que medeia a degradação de lipídios e reduz a biossíntese de lipídios (Isobe et al., 2013) e 5) eles podem melhorar a captação de glicose e a regulação hipotalâmica (Shahidi et al., 2018). O potencial regulatório e a relevância da sinalização inflamatória em alterações prostáticas indicam que o entendimento dessas vias de sinalização induzidas pelos ácidos graxos poli-insaturados possui potenciais terapêuticos.

Atualmente, o exercício físico é incentivado e realizado como estratégia de redução do excesso de peso, pois aumenta o gasto energético, reduz o perfil lipídico, diminui o risco de doenças cardiovasculares, impede o desenvolvimento e a progressão da arteriosclerose e traz benefícios à dislipidemia (Alvarez et al., 2018). Em síntese, a atividade física moderada ou vigorosa, e o exercício físico sistematizado são caracterizados por atividades que aumentam significativamente a demanda energética. Este aumento faz com que ocorram alterações agudas e crônicas tanto no metabolismo celular quanto no controle neuroendócrino (Forjaz et al., 1998). De fato, estas alterações (benéficas) nos sistemas cardiovasculares e autonômicos, após o exercício físico agudo e crônico, têm feito com que o exercício seja fortemente sugerido como uma alternativa não-farmacológica no tratamento de diferentes patologias como a resistência à insulina, o diabetes mellitus, a hipertensão arterial e obesidade (Ficker et al., 2010).

No perfil lipídico, há evidências de que menores concentrações de colesterol total e de LDL colesterol são encontradas em amostras sanguíneas de sujeitos considerados ativos, quando comparados com aqueles sedentários. Da mesma forma, HDL colesterol e triglicérides apresentam maior resposta ao exercício físico, com maior concentração de HDL colesterol e menor de triglicérides (Durstine et al., 2001). Outros estudos demonstram que corredores treinados têm um nível mais alto de enzimas antioxidantes eritrocitárias (SOD, CAT e GPx) do que indivíduos não treinados (Urso et al., 2003). Os efeitos combinados do exercício físico aeróbico e suplementação com ω -3 foram estudados usando uma única sessão de exercício e Thomas (et al., 2000) demonstraram uma concentração reduzida de triglicerídeos após apenas 3 semanas de suplementação com ω -3 em homens treinados.

O músculo esquelético de ratos alimentados com uma dieta rica em DHA era resistente à fadiga durante contrações repetitivas, o ω -3 foi capaz de desempenhar um papel benéfico no aumento do desempenho durante o exercício (Peoples et al., 2014). A associação entre exercício físico e suplementação de ω -3 não resultou em melhora na concentração de lipídios e lipoproteínas séricas, embora sua ação possa ser independente do metabolismo lipídico (Wooten et al., 2019). Dados do nosso laboratório confirmam a ação do exercício físico aeróbio na regulação da atividade prostática de ratos submetidos a dietas alimentares, sendo o exercício físico regulador do metabolismo lipídico e da atividade celular na próstata (Teixeira et al., 2020). Outro achado do nosso grupo demonstrou que o exercício físico combinado (aeróbio e anaeróbio, na mesma sessão) reduzem a inflamação prostática, proliferação celular e aumentam a apoptose na célula (Baptista et al., 2018). O treinamento de força em 8 e 12 semanas reduziu a proliferação celular no ambiente obesogênico prostático, aumentou a apoptose celular, e reduziu a inflamação prostática em animais treinados e animais que foram submetidos a dieta hiperlipídica e ao treinamento físico de força (Veras et al., 2020).

2.0 Justificativa

A obesidade é a doença com maior ascendência na atualidade, tornando-se um problema de saúde pública o que gera altos gastos para o governo anualmente. Esta enfermidade está associada com um quadro inflamatório sistêmico crônico, que pode ser o gatilho para o desenvolvimento de patologias prostáticas e urinárias. Diferentes estudos demonstraram a importância de reguladores hormonais, inflamação e ERMO no desenvolvimento e manutenção da glândula prostática, bem como indicaram que a ação conjunta pode deflagrar lesões prostáticas.

Atualmente, o incentivo de suplementações que atuem como imunossupressoras tornou-se uma opção terapêutica valiosa. No entanto, são escassos os estudos que tentam demonstrar as vias moleculares associadas às disfunções metabólicas, inflamatórias e ao processo de desenvolvimento de doenças prostáticas associadas a suplementação de ômega-3. A identificação de vias moleculares da suplementação direta de ômega-3 e da suplementação de chia e suas ações à nível sistêmico irá provavelmente proporcionar informações importantes sobre a patogênese molecular prostática.

Pesquisas em nosso laboratório apontam que o treinamento físico pode alterar o metabolismo prostático via receptores hormonais. Para melhor entendimento desta vertente avaliaremos o perfil metabólico, inflamatório, assim como o fenótipo (pró ou anti-inflamatórias) das células prostáticas enfatizando o papel central de eicosanoides como EPA, DHA e ALA como fatores de alterações imuno-metabólicas na próstata associadas a desregulação lipídica promovida pelo consumo de dieta hiperlipídica. Na literatura não há trabalhos correlacionando fatores metabólicos com os fatores reparadores de lesão celular e inflamação, receptores de hormônios sexuais esteroides, ERMO e enzimas antioxidantes associados com dieta hiperlipídica, suplementação de ômega-3 e exercício físico no controle das lesões prostáticas. Contudo, a associação entre imuno-metabolismo e o treinamento físico pode ser considerada uma promissora combinação terapêutica.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Considerando a relevância de terapêuticas para reduzir a taxa de lesões e doenças prostáticas, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos do exercício físico aeróbio associado a suplementação de ômega-3 (óleo de peixe e óleo de chia) com o consumo de dieta hiperlipídica na próstata de ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a histopatologia e a progressão das lesões prostáticas induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica e verificar o potencial efeito da suplementação de ômega-3 associada ao exercício físico no lobo ventral prostático de ratos;
- b) Caracterizar e comparar os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica e efeitos da suplementação de ômega-3 e associado ao exercício físico sobre os receptores de hormônios sexuais esteroides e fatores de crescimento (AR e IGF-1) por imunohistoquímica;
- c) Analisar a expressão gênica de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSS, NRF-2 e NOS 2) para avaliar o envolvimento da dieta hiperlipídica com os RL e os potenciais efeitos da suplementação de ômega-3 associado ao exercício físico aeróbio na próstata, por PCR;

d) Avaliar a expressão proteica de marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios e fatores de transcrição lipogênico e verificar os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica e efeitos da suplementação de ômega-3 e os potenciais efeitos do exercício físico sobre os marcadores inflamatórios e anti-inflamatório e fatores de transcrição (IL-6, TNF- α , NF- κ B, FAS/CD95 e SREBP-1) por imunohistoquímica.

4.0 Materiais e Métodos

4.1 Declaração de Ética

A pesquisa foi desenvolvida de acordo com os padrões éticos nacionais e internacionais. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética em Uso de Animais, CEUA (protocolo número 3962), da Universidade do Oeste Paulista-Unoeste, Presidente Prudente (Anexo 1).

4.2 Animais e Procedimentos Experimentais

Foram utilizados 49 ratos Wistar adultos, com 60 dias de idade, mantidos em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura e umidade do ar controlados, 22 $\pm$ 1°C e 60-70%, respectivamente, em um ciclo de 12 horas claro/escuro. Os animais foram randomizados em 7 grupos (n=7): fase de indução (1ª a 6ª semana) animais de controle CT que receberam a dieta padrão e água *ad libitum*; Animais com HF que receberam apenas dieta hiperlipídica e água *ad libitum*; fase experimental (7ª a 14ª semana), os animais com HF foram subdivididos em mais 5 grupos (n=7): HF+FO os animais receberam dieta hiperlipídica e óleo de peixe; HF+Ex foram suplementados com dieta hiperlipídica e realizaram exercício físico; HF+FO+Ex os animais receberam dieta hiperlipídica associada ao óleo de peixe e realizaram exercício físico; HF+CO os animais receberam dieta hiperlipídica e óleo de chia; HF+CO+Ex, os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica, suplementada com chia e realizou exercício. O protocolo de intervenção consistiu em 14 semanas e o exercício físico aeróbio associado à suplementação com ω -3 (óleo de peixe e óleo de chia) foi adicionado na 7ª semana do protocolo experimental, para que houvesse tempo para induzir a obesidade nos animais (Figura 1).

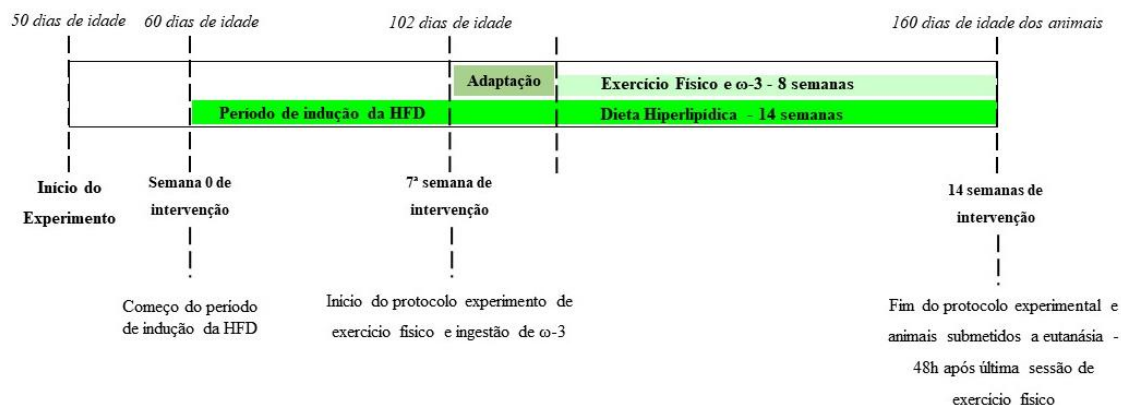


Figura 1. Delineamento experimental referente as 14 semanas do protocolo de intervenção nos animais submetidos a dieta hiperlipídica, ω -3 e exercício físico aeróbico em ratos Wistar.

4.3 Dieta Hiperlipídica e Ômega-3

Aos 60 dias de idade, os animais foram submetidos a tratamento com dieta hiperlipídica por 14 semanas. Foram utilizadas duas dietas: comercial para os animais controle e dieta hiperlipídica para os grupos suplementados. A dieta hiperlipídica utilizada nesta pesquisa foi descrita anteriormente por Estadella (Estadella et al., 2014) e consiste em uma mistura hipercalórica, dieta normoprotéica e hiperlipídica, contendo ração comercial Supralab®, amendoim torrado, chocolate ao leite e amido de milho na proporção 3:2:2:1, esses constituintes foram triturados e misturados. A dieta comercial foi composta por 24,11% de proteínas, 4,27% de lipídios e 52,20% de carboidratos, enquanto a dieta obesogênica foi composta por 18,84% de proteínas, 23,80% de lipídios e 50,4% de carboidratos na mistura. A composição aproximada das dietas experimentais foi avaliada de acordo com os métodos analíticos recomendados pela *Association of Official Analytical Chemists*. O valor energético foi determinado pelo cálculo nutricional. Os animais ω -3 foram suplementados com óleo de peixe e chia, por gavagem, três vezes por semana, durante 8 semanas e os animais dos demais grupos receberam a gavagem diária de água como placebo, para que fossem submetidos ao mesmo tipo de estresse nos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da composição centesimal das dietas.

	Comercial	Obesogênica
Proteína (%)	24,11	18,84
Lipídeos (%)	4,27	23,80
Carboidratos (%)	52,2	50,04
Cinzas (%)	10,86	4,43
Umidade (%)	8,56	2,89
Fibras totais da dieta (%)	18,23	13,54
Energia (Kcal 100 ^{g-1})	343,4	490,42

Legenda: Kcal = Quilocalorias; % = porcentagem. As quilocalorias foram calculadas considerando 4 Kcal por grama de proteína e carboidrato e 9 Kcal por grama de lipídeo. Kcal = Quilocalorias.

4.4 Composição PUFA's

O óleo de peixe foi composto por ácidos graxos saturados (g/dia) em 0,13; enquanto o óleo de chia foi composto por 0,11, ácidos graxos monoinsaturados (g/dia) 0,20 de FO e 0,07 no grupo CO. Apenas o óleo de chia foi composto por ácido linoleico e ácido α -linolênico em sua composição, o óleo de chia nem composto por ALA, EPA nem DHA. Por outro lado, os FO foram compostos por 129,33 mg/dia de EPA e 113,33 de DHA e, finalmente, 3,33 mg/dia de colesterol, diferente do grupo CO. A dose de suplementação estipulada para óleo de chia e óleo de peixe no presente estudo foi de 1 ml por dia por gavagem. O óleo de Chia foi adquirido da *RSBLUMOS* Comercial Produtos Alimentícios Ltda (Tabela 2).

Tabela 2. Componentes dos óleos de peixe e óleo de chia.

	Óleo e Peixe	Óleo de Chia	
Ácidos Graxos Saturados (g/day)	0.13	0.11	
Ácidos Graxos Monoinsaturados (g/day)	0.20	0.07	
Ácidos Graxos Poliinsaturados (mg/day)	Ácido Linoleico (LA)	NC	58.4
	Ácido α -linolênico (ALA)	NC	170.84
	Eicosapentaenoico (EPA)	129.33	-
	Docosahexaenóico (DHA)	113,33	-
Colesterol (mg/day)	3.33	-	
Caloria dos Óleos (Kcal/1g/day)	6	9	

4.5 Protocolo de Exercício Físico Aeróbio

Os animais foram submetidos ao período de adaptação por 1 semana, com o colete sem os pesos acoplados ao peitoral dos animais e após 7 semanas de suplementação da dieta hiperlipídica, aos 109 dias de idade, iniciaram o protocolo de exercício físico aeróbio. Os animais exercitados realizaram o protocolo de treinamento físico aeróbio nadando (29°C) em um tanque com tubos cilíndricos de PVC de 25 cm de diâmetro e 100 cm de altura, com água na profundidade de 70cm, com divisores construídos especificamente para esse tipo de treinamento, para que os animais realizassem as sessões individualmente. O protocolo de exercício físico aeróbio obteve uma frequência de três vezes por semana, com duração de 30 minutos cada sessão, durante 8 semanas e a intensidade utilizada foi de 70% do limiar anaeróbio, representada por 5% do peso corporal ou seja, 5% do peso corporal do animal corresponde a 100% do limiar anaeróbio (Machado et al., 2014). Essa intensidade foi reajustada ao final das primeiras 4 semanas de treinamento, a fim de evitar a adaptação do animal. Para a realização do exercício físico de natação, um colete adaptado foi acoplado à região posterior do tórax dos animais, contendo um peso em gramas referente a 70% do limiar.

4.6 Coleta das Amostras

Em jejum durante 12 horas, 48 horas após a última sessão de treinamento físico, os animais foram submetidos a eutanásia, o sangue foi coletado sob anestesia intraperitoneal de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg), logo a seguir foi realizada a laparotomia abdômino-pélvica, a próstata ventral e os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérica foram removidos, pesados e processados.

4.7 Amostras de sangue

Os níveis séricos de colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triacilglicerol (TAG) foram analisados, usando um método colorimétrico com o equipamento Cobas® C111 (Roche Diagnostics-Brazil) e o kit comercial ROCHE, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de TC/HDL foram calculados com base no colesterol total (mg/dl) dividido por HDL (mg/dl), os níveis de

VLDL foram calculados por TAG dividido por cinco, o LDL foi calculado usando valores de colesterol total menos HDL mg/dl menos razões VLDL.

4.8 Análises Histopatológicas

A próstata ventral foi removida, pesada e embebida em Paraplast e as seções de 5 µm foram cortadas. Essas seções foram então coradas com hematoxilina e eosina (H&E), cinco cortes histológicos por próstata ventral intermediária foram avaliados e os campos histológicos foram fotografados, resultando em 10 ou mais campos por grupo. As lâminas foram analisadas e fotografadas em um microscópio de luz óptico, modelo AxioCam ECR5s Zeiss. A próstata ventral foi coletada, fixada, preparada e processada para lâminas histológicas, coradas com as técnicas de hematoxilina e eosina (H&E), azul de toluidina e tricômico de masson. Para dados tricômico de masson, a quantificação foi realizada pelo método de Weibel (Weibel et al., 1966).

4.9 Análises Imunohistoquímicas

Amostras prostáticas de animais de cada grupo foram usadas para imunocoloração. De acordo com as características de cada antígeno, a recuperação antigênica foi realizada através da incubação dos cortes. Para bloquear a peroxidase endógena, as seções foram submetidas a uma solução de peróxido de hidrogênio+metanol (3%) e bloco de peroxidase. O bloqueio proteico foi realizado por incubação em solução bloqueadora com albumina sérica bovina (BSA3%), com tampão TBS-T. Na próxima etapa, as seções foram submetidas à reação com anticorpos primários específicos AR (1:100, N-20); NF-κB (1:100, p-65, A, sc-109); IL-6 (1:100, E-4, sc-28343); TNF-α (1:50, 52B83, sc-257); SREBP-1 (1:50, H-160, sc-8984); FAS/CD95 (1:100, X-20, sc-1024), IGF-1 (1:100, G-17, sc-1422) e incubados em uma câmara úmida durante a noite. As seções foram incubadas com anticorpos secundários, HRP anti-rabbit (1:200, IgG-HRP, conjugado sc-2030), anticorpo anti-rabbit (1:200, IgG-HRP, sc-2354 ou m-IgGK (1:200, IgG-HRP, sc-516) à temperatura ambiente, desenvolvido com diaminobenzidina (DAB), corada com hematoxilina Harris e analisadas pelo microscópio da Zeiss Axiophoto (Zeiss, Munique, Alemanha).

4.10 Análises de PCR-RT

As amostras de próstata foram armazenadas no freezer a -80°C , imersas em trizol, trituradas no homogeneizador de tecidos e submetidas ao protocolo de extração Trizol®, seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total recuperado foi medida por espectrofotometria, todas as amostras do RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-qPCR, de acordo com as instruções do DNase I-Amplification Grade. A transcrição reversa foi realizada de acordo com o protocolo de alta capacidade, usando iniciadores aleatórios como oligonucleotídeos iniciador. A expressão dos genes SOD-1, CAT, NRF-2, GSS E NOS-2 foi avaliada por PCR em tempo real (Tabela 1) e, para normalização da expressão relativa dos genes alvo, foram utilizados os valores médios de expressão do gene GAPDH (Pfaffl, 2001). A padronização inicial das amplificações de PCR em tempo real ocorreu em um termociclador Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems. Os parâmetros cíclicos iniciais foram um passo inicial a quente a 95°C , seguido de 40 repetições a 95°C e 60°C . A curva de calibração para cada gene em estudo foi feita com diluições em séries de um conjunto de cDNA sintetizado a partir de 20 μg de mRNA da próstata.

Tabela 3. Sequências de primers direto e reverso usados para RT-PCR. Determinado pela fórmula 2 ($-\Delta\text{Cq}$) (Pfaffl, 2001).

Primers	SEQUÊNCIA (5' - 3')	AMPLICON
GSS	F – TATCTCTGCCAGCTTTGGGG	95
	R - TCTTGGAAGCTTCGTTGGTCT	
NFR2	F – TCCATTCCCGAGTTACAGTGTC	91
	R - TCTCTGTCAGTGTGGCCTCT	
NOS2	F – AAACAACAGGAACCTACCAGCT	100
	R - GACCACTGAATCCTGCCGAT	
SOD1	F - GCGTCATTCACTTCGAGCAG	191
	R - CCTCTCTTCATCCGCTGGAC	
CAT	F - GCGGATTCTGAGAGAGTGG	188
	R - GAGGGTCACGAACTGTGTCA	
GAPDH	F- CCATCACCATCTTCCAGGAG	102
	R-TCTCCATGGTGGTGAAGACA	

Legenda: GSS: Glutathione sintase, NRF-2: fator nuclear fator 2 relacionado ao eritróide 2, NOS-2: óxido nítrico sintase-2, SOD-1: superóxido dismutase, CAT: catalase, GAPDH: gene do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

4.11 Análises Estatísticas

Foi realizada a análise de variância para medidas repetidas com intervalo de confiança de 95% ajustado pelas variáveis de controle *grupo* e *tempo*. A análise estatística de *Mann-Whitney* e *Chi-Square* foi realizada para comparação dos dados histopatológicos da próstata ventral, a análise de variância de médias marginais estimadas unidirecional (ANOVA) foi usada para comparar a mobilidade dos sete grupos analisados, seguida pelo pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 25 (após a versão 19, os autores devem citar: IBM SPSS Statistics, versão 25 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA)).

5.0 Resultados

5.1 O exercício físico aeróbio associado à suplementação de óleo de peixe e óleo de chia reduziu o peso corporal e a adiposidade de ratos que foram alimentados com HFD.

O peso corporal inicial e final, juntamente com o ganho de peso, não apresentaram diferenças significativas entre os demais grupos (Figura 2 A-C). Na figura 2 D-E, observamos que os grupos HF, HF+FO e HF reduziram os pesos prostáticos em relação ao grupo CT e os grupos HF+Ex, HF+FO+Ex e HF+CO+Ex não apresentando diferenças significativas entre eles. No entanto, verificamos que as reservas adiposas diferiram significativamente entre os grupos, conforme mostrado na figura 2, pelas diferenças de gordura epididimal ($p=0,004$), gordura mesentérica ($p=0,0008$), gordura retroperitoneal ($p=0,002$) e índice adiposo ($p=0,06$). A análise *post-hoc* revelou que o grupo com HF aumentou significativamente a gordura epididimal, gordura mesentérica e retroperitoneal, apresentando também maior índice de adiposo em comparação aos grupos CT e exercício físico aeróbio (Figura 2 D-F). Embora não significante, o índice adiposo e índice de gordura retroperitoneal foi menor nos animais após exercício físico aeróbio com suplementação de óleo de peixe e óleo de chia em comparação com os grupos HF+FO e HF+CO (Figura 2 D,F).

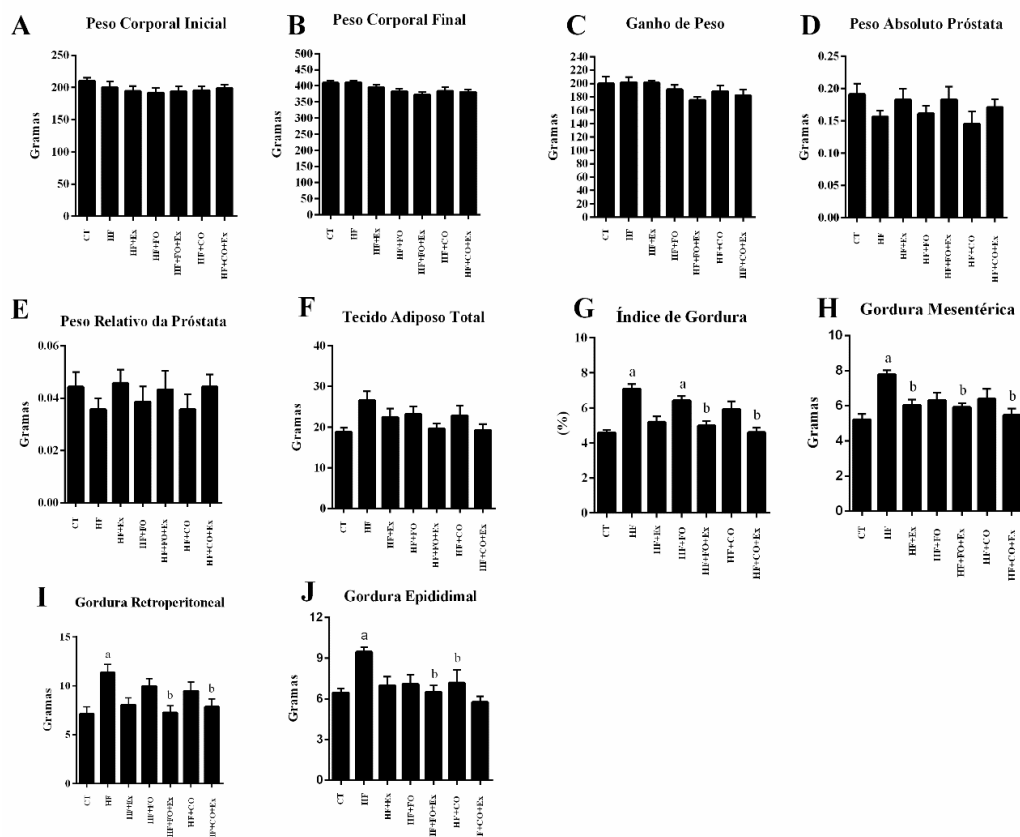


Figura 2:. (A) Peso corporal inicial; (B) Peso Corporal Final; (C) Ganho de Peso; (D) Peso Absoluto da Próstata; (E) Peso Relativo da Próstata; (F) Tecido Adiposo Total; (G) Índice de Gordura; (H) Gordura Mesentérica; (I) Gordura Retroperitoneal; Gráfico (J) Gordura Epididimal dos animais submetidos à suplementação padrão ou HFD, ω -3 e/ou exercício físico aeróbico. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM (n=7) e as diferenças significativas foram adotadas com base em $p<0,05$. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex.

5.2 Suplementação de PUFAs, eficiência alimentar e peso corporal associados ao treinamento aeróbico

Durante o período de indução de seis semanas, diferenças significativas no peso corporal, consumo de alimentar ($p=0,0001$) e ingestão de energia ($p=0,0001$) foram observadas entre os grupos. Os ratos nos grupos CT demonstraram maior ganho de peso nas semanas três últimas semanas (Figura 3-L), e maior consumo de ração e ingestão de energia nas semanas dois a seis (Figura 3 C, F) em comparação com os grupos HF. Diferenças significativas no ganho de peso ($p=0,15$) e eficiência alimentar ($p=0,3$) também foram observadas entre os grupos e tempo, valores maiores para o grupo CT nas semanas dois e três, no entanto, houve uma maior eficiência alimentar no grupos HFD na semanas quatro e seis (Figura 3-I).

Após o período de indução da dieta, os animais foram divididos em 6 subgrupos (HF, HF+Ex, HF+FO, HF+FO+Ex, HF+CO, and HF+CO+Ex), suplementados com óleo de peixe e óleo de chia e realizaram exercício físico até a 14ª semana (Figura 3). Os grupos suplementados com óleo de peixe com e sem exercício físico apresentaram o menor peso corporal em relação a todos os outros grupos (Figura 3 A-B). O grupo controle demonstrou aumento significativo no consumo alimentar comparado a todos os grupos tratados ($p=0,0001$; Figura 3-F), contudo, apresentou baixa eficiência alimentar quando comparado a todos os grupos tratados ($p=0,3$; Figura 3-I). Exercício físico combinado com HF não reduziu a energia ingerida e eficiência alimentar comparado ao grupo HF (Figura 3-I). Por outro lado, suplementação com óleo de peixe (FO) reduziu a energia ingerida comparado aos animais HF (Figura 3-C), e o exercício associado com óleo de peixe (HF+FO+Ex) reduziu eficiência alimentar na 10ª semana em relação ao grupo HF+FO apenas (Figura 3-H). Da mesma forma, o óleo de chia com e sem exercício físico reduziu a energia ingerida e eficiência alimentar comparado aos grupos HF+FO, HF e HF+Ex (Figura 3 C, I). Consumo alimentar foi menor em todos os grupos HFD comparado ao grupo CT (Figura 3-F).

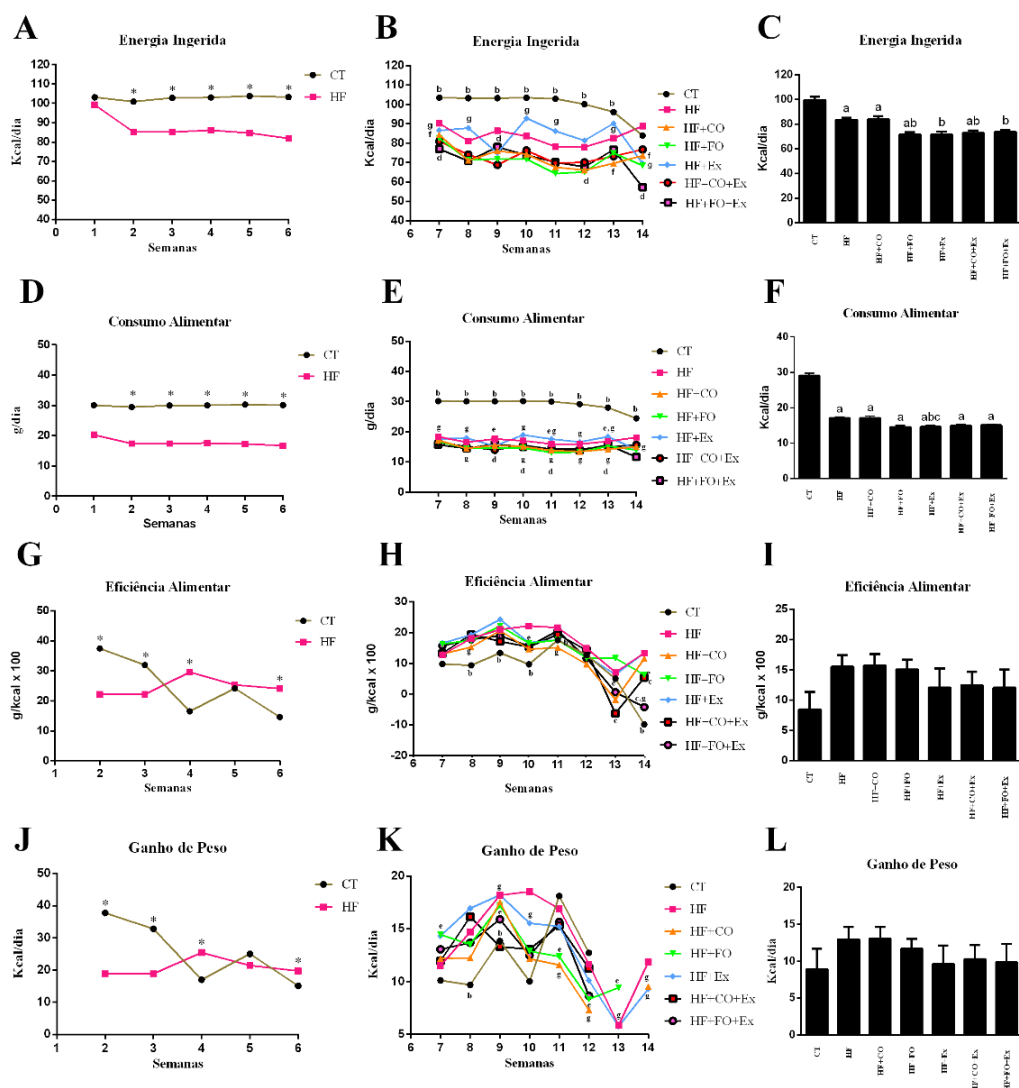


Figura 3: Dados nutricionais de energia ingerida (A-C), consumo alimentar (D-F), eficiência alimentar (G-I), ganho de peso (J-L). Os gráficos à esquerda mostram os dados em cada semana do período de indução a obesidade, os gráficos do meio mostram os dados a cada semana da fase experimental e os gráficos à direita mostram os valores médios durante a fase experimental. Os dados são apresentados como a média±SEM com significância de $p<0,05$ indicada por letras minúsculas. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex. Os asteriscos demonstram diferenças significativas entre os grupos

5.3 Efeitos da Composição de PUFAs no perfil lipídico associado ao exercício físico aeróbio

A composição lipídica no plasma foi analisada na 14ª semana de consumo da dieta hiperlipídica (Figura 4). As comparações entre os grupos revelaram um efeito significativo nos níveis de TAG ($p=0,0001$, Figura 4-A). Houve redução de 2,7 vezes no TAG plasmático observada no grupo HF+FO+Ex quando comparado com CT ($p<0,0001$); da mesma forma, foi observada uma redução de 2,2 vezes no TAG em relação ao grupo HF ($p<0,001$; Figura 4-A). Além disso, os níveis de TAG nos

grupos HF+FO, HF+CO e HF+CO+Ex foram significativamente menores do que no grupo CT, os níveis de TAG do grupo HF+CO+Ex foi menor significativamente do que os animais HF ($p<0.05$; Figura 4-A). Contudo, os níveis de TC foram menores nos grupos tratados com óleo de peixe em relação aos grupos não suplementados, as diferenças nos níveis de colesterol total não foram significativos (Figura 4-B).

O efeito principal da lipoproteína de baixa densidade (LDL) sérica também foi aparente ($p=0,0002$), com uma redução de 4 vezes e 2,1 vezes no LDL observada após o tratamento com HF+FO+Ex em comparação com CT e grupos HF, respectivamente (Figura 4-C), e uma redução de 2,3 vezes em comparação com o tratamento com HF+FO. Além disso, a suplementação de chia (HF+CO) e a suplementação de chia com treinamento físico aeróbico (HF+CO+Ex) concomitante também foram capazes de reduzir os níveis de LDL quando comparados ao tratamento com TC (Figura 4-B). Efeitos similares dos níveis de LDL e VLDL foram observados nos grupos HF+FO, HF+FO+Ex, HF+CO, e HF+CO+Ex ($p=0,0001$) comparado aos animais CT e HF, e os níveis de VLDL reduziu nos animais HF+FO comparado ao grupo CT ($p=0,0001$). Contudo, os níveis de VLDL nos grupos HF+Ex não apresentaram diferença significativamente nos grupos CT, HF (Figura 4-D).

Em contraste com os níveis de TAG, LDL e VLDL, o grupo CT demonstrou níveis mais baixos de HDL em comparação com todos os outros grupos (Figura 4-C). No entanto, não foram observadas diferenças nos níveis de HDL entre os grupos que foram alimentados com HF, independentemente da suplementação de ômega-3 ou exercício físico aeróbico. Observamos mudanças significativas na proporção de TC para HDL associadas à suplementação com os óleos e exercício físico aeróbico sugerindo que esses tratamentos alteram o perfil lipídico plasmático ($p=0,0001$); a suplementação de PUFA e a suplementação de PUFA juntamente com a prática de exercício físico (HF+FO, HF+FO+Ex, HF+CO e HF+CO+Ex) reduziram as razões TC/HDL em comparação com o grupo CT, embora esta proporção não diferiu significativamente nos grupos HF e HF+Ex em comparação com CT (Figura 4-E).

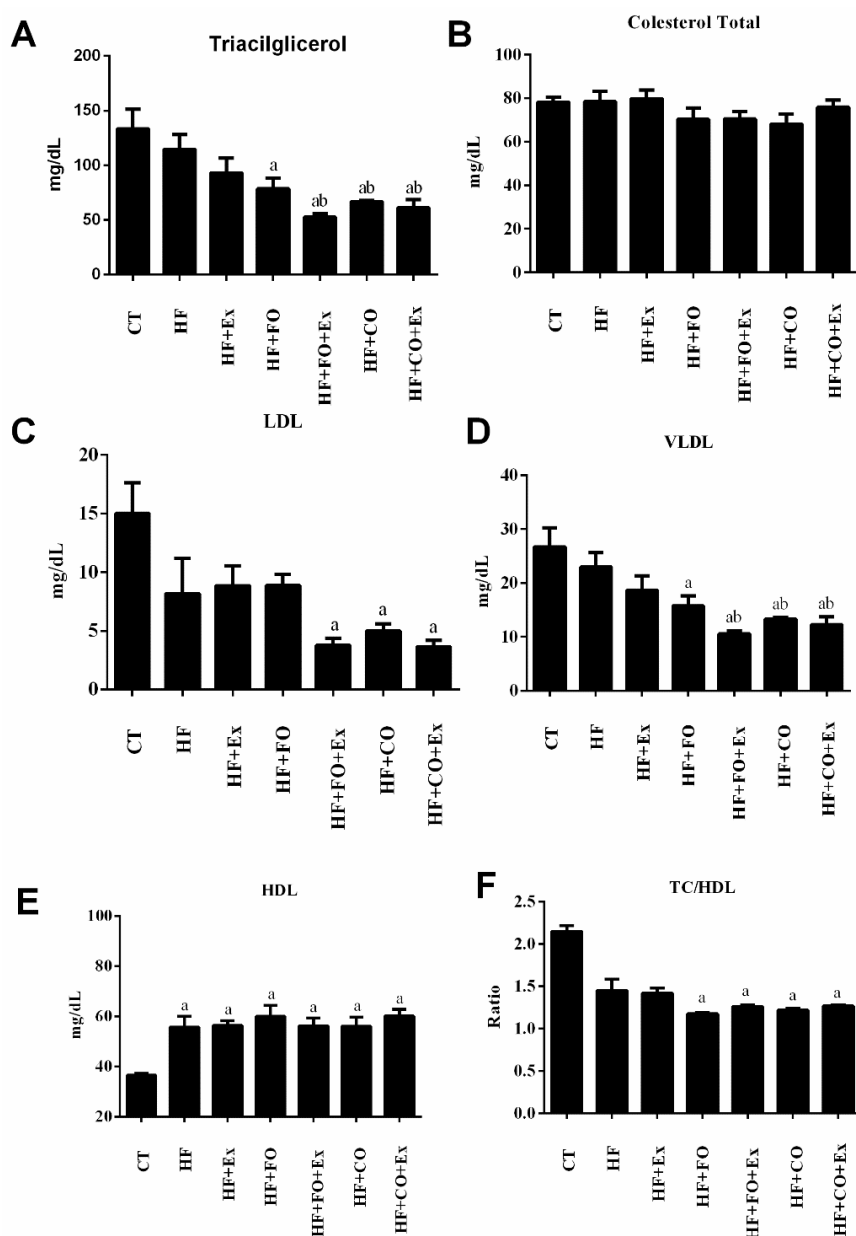


Figura 4: (A) Dados bioquímicos de TG, (B) Colesterol Total, (C) HDL, (D) LDL, (E) VLDL, (F) razão TC/HDL de animais submetidos a padrão ou HFD, suplementação de ω -3 e/ou exercício físico aeróbio. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM com significância de $p < 0,05$ indicada por letras minúsculas. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex.

5.4 Alterações na análise histopatológica, mastócitos e estereologia na próstata de ratos submetidos ao exercício físico aeróbio com suplementação de PUFA's e submetidos a HF

A estrutura da próstata ventral no grupo CT apresentou prevalência de ácinos com epitélio cilíndrico simples, núcleos polarizados na parte basal das células e uma região supranuclear clara, a última das quais corresponde à área do Aparelho de Golgi (Figura 5-A). A análise estereológica mostra

redução do epitélio e tecido conjuntivo no grupo HF+Ex em comparação com os grupos, no entanto, não apresentou diferenças significativas (Figura 5-C).

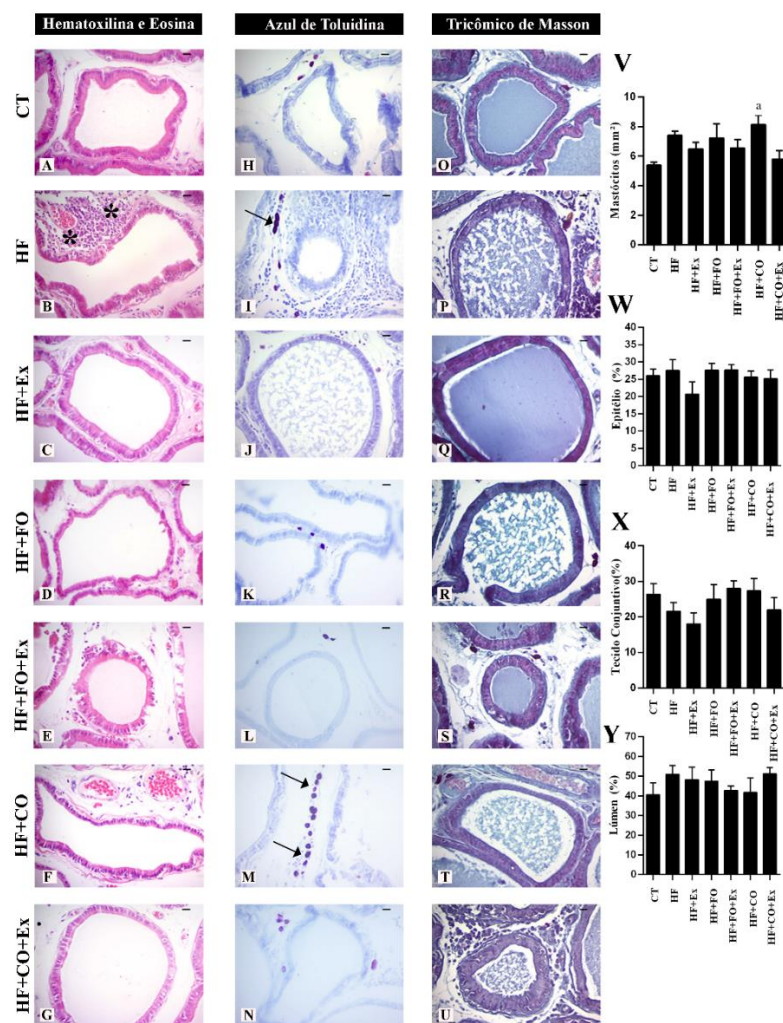


Figura 5: Plate histológica das técnicas de hematoxilina e eosina H&E, azul de toluidina e tricômico de masson na próstata ventral de ratos Wistar submetidos a dieta hiperlipídica, exercício físico aeróbico e suplementação com ω -3. **Gráfico V:** quantidade de mastócitos (mm²); **Gráfico W:** referente ao epitélio prostático; **Gráfico X:** referente ao tecido conjuntivo prostático; **Gráfico Y:** referente ao lúmen prostático. Os asteriscos representam inflamação no tecido conjuntivo e as setas demonstram os mastócitos recrutados pelo processo inflamatório. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM com significância de $p < 0,05$ indicada por letras minúsculas. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex.

Foi possível observar núcleos de células epiteliais em áreas apicais, onde apresentavam células com alturas diferentes apresentando aspecto pseudoestratificado ao tecido, sendo frequentemente observado no grupo HF (Figura 5-B). A presença de células em divisão que se deslocam para a parte apical do epitélio indica atividade proliferativa nesse tecido e, em algumas áreas, o epitélio se tornou

espesso com núcleos aglomerados de várias alturas semelhantes à neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), e mostrou aumento de 37% do PIN no grupo HF (Tabela 2). A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) caracterizada por células epiteliais aglomeradas com fenótipos heterogêneos, padrão epitelial estratificado e diferentes padrões nucleares de cromatina compactada mostra atipia inflamatória epitelial em 24% e 39% dos animais dos grupos HF e HF+CO, respectivamente (Tabela 2). Os focos inflamatórios observados nos animais dos grupos HF (39%) e HF+CO (24%) apresentaram características semelhantes, incluindo prevalência de linfócitos e células plasmocíticas (Figura 5-B e Tabela 2). O grupo HF+FO apresentou poucas alterações como PIN e focos de inflamação quando comparado aos demais grupos (Tabela 2). Por outro lado, o exercício físico aeróbico reduziu alteração histopatológica na próstata associada à suplementação ou com ação isolada (Tabela 2). Os animais dos grupos HF, HF+FO e HF+CO apresentaram maior número de mastócitos quando comparados ao grupo CT (Figura 5 B, D, F). O exercício físico aeróbico reduziu a quantidade de mastócitos associados à suplementação de óleo de peixe e chia (Figura 5 E, G).

Tabela 4. Ocorrência de dados histopatológicos de animais experimentais.

Groups	PIN	PIA	Inflammation
CT	17 (85) - 20,76% ^{f,e,g}	13 (85) - 14,08% ^{b,f,g}	13 (85) - 14,28% ^f
HF	43 (114) - 37,30% ^{e,g}	27 (114) - 24,20% ^{e,f,g}	46 (114) - 39,97% ^{d,f,g}
HF+Ex	16 (83) - 20,30%	7 (83) - 7,60%	3 (83) - 3,41%
HF+FO	13 (68) - 18,16%	14 (68) - 21,93%	1 (68) - 1,32%
HF+FO+Ex	22 (101) - 21,60% ^g	20 (101) - 19,42% ^g	5 (101) - 5,00%
HF+CO	23 (103) - 21,53% ^g	39 (103) - 39,06%	26 (103) - 24,69%
HF+CO+Ex	37 (100) - 35,65%	22 (100) - 22,01%	14 (100) - 12,73%

Legenda: CT: Grupo Controle; HF: dieta hiperlipídica; HF+Ex: dieta hiperlipídica e exercício físico aeróbico; HF+FO: dieta hiperlipídica e óleo de peixe; HF+FO+Ex: dieta hiperlipídica, óleo de peixe e exercício físico aeróbico; HF+CO: dieta hiperlipídica e óleo de chia; HF+CO+Ex: dieta hiperlipídica, óleo de chia e exercício físico aeróbico. Os resultados foram expressos em valores absolutos e ocorrência de porcentagens. As diferenças significativas foram adotadas com base em $p < 0,05$. Mann-Whitney and Chi-square. indicada por letras minúsculas. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex.

5.5 Efeito da composição da dieta PUFA na modulação androgênica, lipogênica e via apoptótica

A imunorreatividade de AR, FAS/CD95, SREBP-1 foi avaliada, quantificada e será mostrada na figura 6. O grupo HF (em comparação com o grupo CT) reduziu significativamente a imunorreatividade do AR na próstata. O grupo HF+FO apresentou aumento dos valores de AR na

próstata quando comparado ao grupo HF (Figura 6 B, D). Da mesma forma, a média de AR foi maior nos ratos suplementados com óleo de chia e submetidos ao exercício físico aeróbico (HF+CO+Ex, $p=0,0001$), e grupo com óleo de chia (HF+CO, $p=0,001$), houve diferença significativa no grupo com HF (Figura 6-B). Ao comparar os efeitos do exercício físico aeróbico e do exercício físico aeróbico associado ao óleo de chia na expressão do AR prostático foi possível verificar a aumento na expressão do AR estimulado pelo óleo de chia no grupo HF+CO+Ex quando comparado ao HF+Ex ($p = 0,01$).

Para verificar os efeitos prostáticos da dieta hiperlipídica e da adição de óleo de peixe e chia na dieta associada ao exercício físico, analisamos a lipogênese por meio da expressão do SREBP-1 (Figura 6). Houve um aumento significativo na expressão de SREBP-1 nos grupos HF ($p=0,001$), HF+FO ($p=0,01$) e HF+CO ($p=0,01$), quando comparados ao grupo CT (Figura 6 A, B, D, F). Por outro lado, o exercício físico aeróbico reduziu a expressão de SREBP-1 isoladamente (HF+Ex, $p=0,001$) e associada ao óleo chia (HF+CO+Ex $p=0,001$) quando comparado ao grupo HF (Figura 6 C, G). O exercício físico reduziu os efeitos lipogênicos do óleo de chia na próstata vs. grupo HF+CO ($p=0,01$).

Foi investigada a atividade dos receptores de morte FAS/CD95, onde o grupo HF apresentou a maior expressão quando comparado aos grupos HF+FO+Ex e HF+CO+Ex, respectivamente (Figura 6 E,G). A suplementação de chia apresentou maiores valores de FAS/CD95 quando comparado ao grupo HF+CO+Ex (Figura 6-G). O grupo HF+Ex apresentou maiores valores de FAS/CD95 quando comparado ao grupo HF+CO+Ex (Figura 6 C, G).

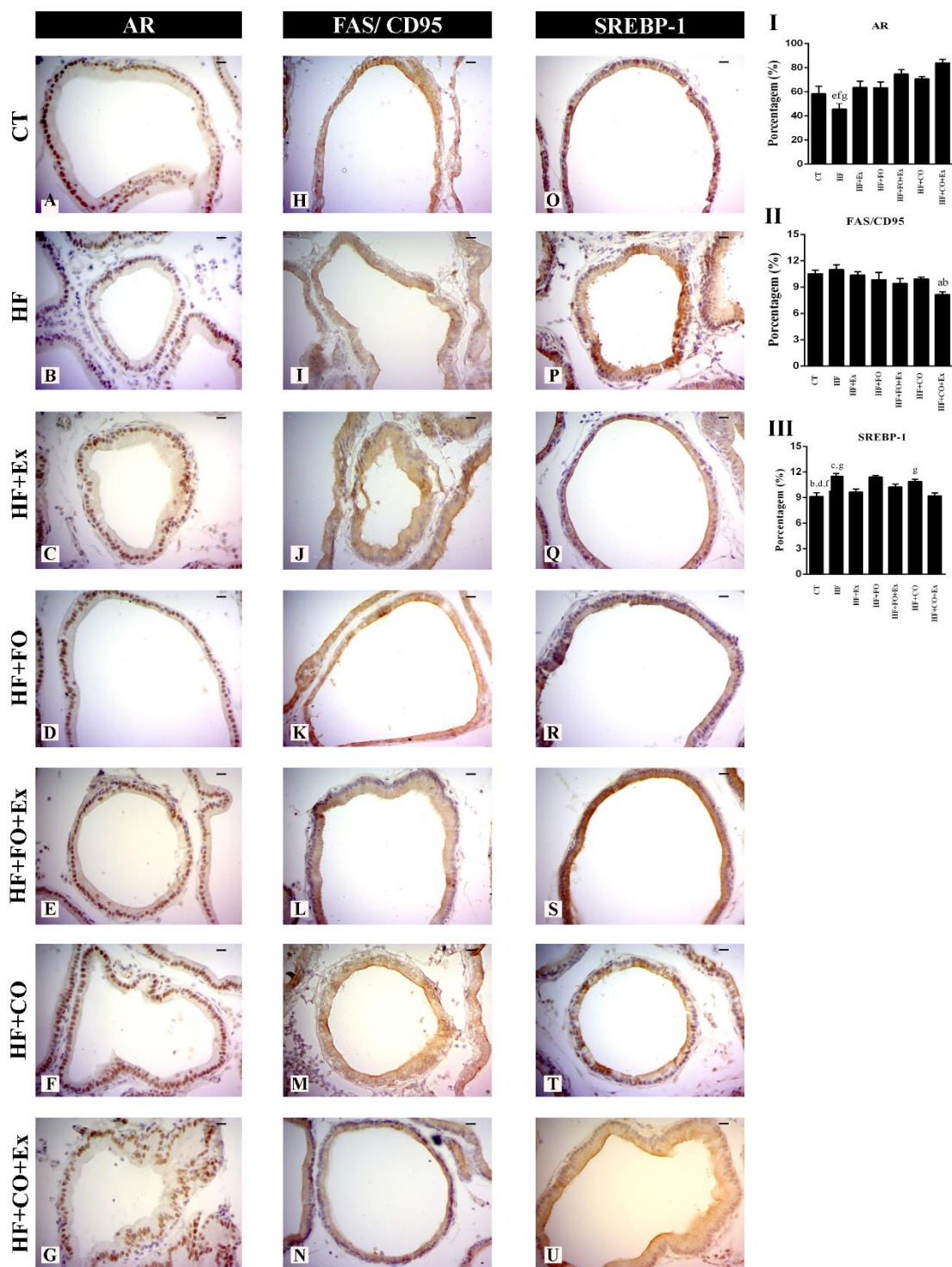


Figura 6: Gráfico I: Expressão do receptor de andrógeno (AR); Gráfico II: Expressão do receptor de morte (FAS/CD95); Gráfico III: Fator-1 de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1). O teste One-Way ANOVA foi utilizado para comparar as médias, com o pós-teste de Tukey. Bar = 20 μ m; Resolução = 40x. As diferenças significativas foram adotadas com base em $p < 0,05$. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM com significância de $p < 0,05$ indicada por letras minúsculas. **a:** diferente do grupo CT; **b:** diferente do grupo HF; **c:** diferente do grupo HF+Ex; **d:** diferente do grupo HF+FO; **e:** diferente do grupo HF+FO+Ex; **f:** diferente do grupo HF+CO; **g:** diferente do grupo HF+CO+Ex.

5.6 Efeitos da suplementação de PUFA's associado ao exercício físico aeróbio na inflamação prostática após a alimentação com HF

Nós investigamos os efeitos da suplementação de óleo de peixe e óleo de chia associado ao exercício físico aeróbio na próstata após o consumo de dieta hiperlipídica e verificamos o potencial efeito inflamatório. Os grupos HF, HF+CO e HF+CO+Ex apresentaram aumento significativo de IL-6 quando comparados aos grupos CT e HF+Ex (Figura 7 A, C). A suplementação de óleo de peixe isolada ou associada ao exercício físico aeróbio (HF+FO e HF+FO+Ex respectivamente) reduziu consideravelmente a imunomarcagem prostática de IL-6 quando comparado ao grupo HF (Figura 7 B, D, F). Efeitos da suplementação de óleo de peixe e chia foram verificados na imunorreatividade de TNF- α . Os grupos HF+FO e HF+CO apresentaram significativa redução nos valores de TNF- α quando comparado aos grupos CT, HF e HF+Ex (Figura 7 A-C). Contudo, podemos verificar que o efeito associado do exercício físico aeróbio com a suplementação de óleo de peixe e chia reduziram consideravelmente a imunomarcagem de TNF- α na próstata de ratos submetidos a dieta hiperlipídica quando comparado aos grupos HF+Ex, HF+FO e HF+CO (Figura 7 C, D, F). Valores menores de NF- κ B foram evidenciados no grupo HF+FO+Ex quando comparado ao grupo HF (Figura 7 B, E), os demais grupos não apresentaram diferenças significativas. A imunomarcagem da proteína IGF não apresentou diferenças significativas entre os grupos, contudo, foi possível observar que as suplementações de óleo de peixe e óleo de chia apresentaram a tendência a maiores valores quando comparado ao grupo HF, HF+Ex e CT (Figura 7).

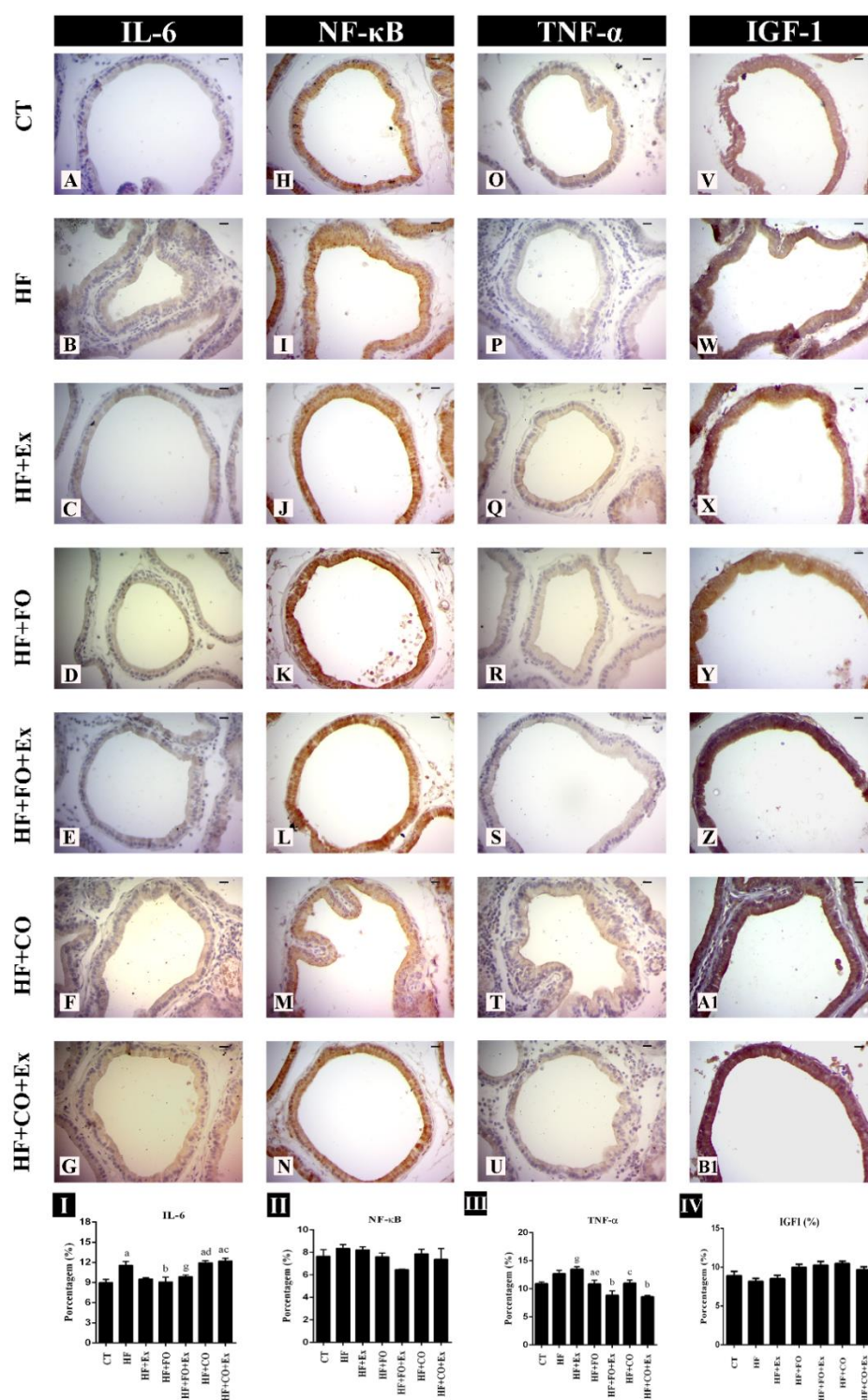


Figura 7: Gráfico I: dados relacionados à expressão de IL-6. **Gráfico II:** dados relacionados à expressão de NF-κB; **Gráfico III:** dados relacionados à expressão do TNF-α; **Gráfico IV:** dados relacionados à expressão de IGF-1 na próstata ventral de ratos Wistar. As diferenças significativas foram adotadas com base em $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM ($n=7$). As letras minúsculas representam respectivamente **a:** CT - grupo controle; **b:** HF - grupo dieta hiperlipídica; **c:** HF+Ex - grupo dieta hiperlipídica e exercício físico aeróbio; **d:** HF+FO - grupo dieta hiperlipídica e óleo de peixe; **e:** HF+FO+Ex - grupo dieta hiperlipídica, óleo de peixe e exercício físico aeróbio; **f:** HF+CO - grupo dieta hiperlipídica e óleo de chia; **g:** HF+CO+Ex - grupo dieta hiperlipídica, óleo de chia e exercício físico aeróbio.

5.7 Efeito da suplementação da dieta PUFA no estresse oxidativo associado ao exercício físico aeróbico

Para investigar os efeitos da suplementação de óleo de peixe e chia no balanço da produção de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante analisamos a expressões gênicas de SOD1, CAT, GSS, NRF-2 e NOS2 na próstata de ratos que consumiram dieta hiperlipídica (Figura 8 A-E). A expressão de mRNA de SOD1 e CAT foi menor no grupo HF+CO em relação ao grupo HF+FO, contudo, o grupo suplementado com óleo de chia apresentou maiores expressão de mRNA de GSS, NRF2 e NOS2 em relação aos demais grupos (Figura 8). O exercício físico aeróbico aumentou a expressão de mRNA SOD1 e CAT associados a suplementação de óleo de peixe e óleo de chia (Figura 8), no entanto, os grupos que praticaram exercício físico aeróbico apresentaram baixas expressões de mRNA de GSS e NRF2 (Figura 8). Os grupos suplementados com óleo de chia (HF+CO e HF+CO+Ex, respectivamente) aumentaram significativamente a expressão de mRNA de NOS2 quando comparados aos demais grupos (Figura 8).

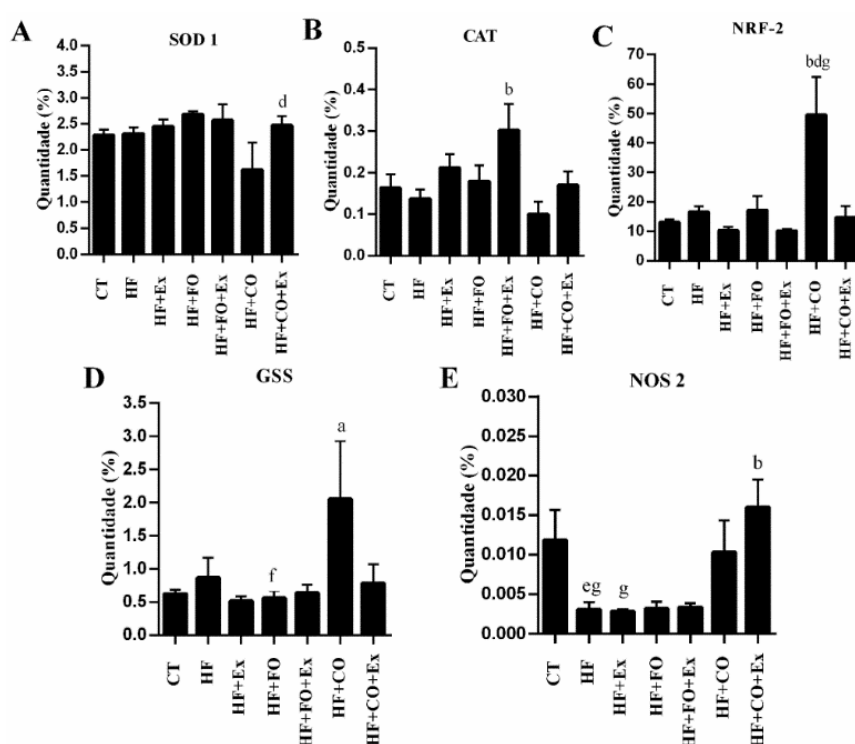


Figura 8: Gráfico A: quantidade do gene da superóxido dismutase (SOD-1) na próstata ventral; Gráfico B: quantidade de catalase (CAT) na próstata ventral; Gráfico C: quantidade de NRF-2 na próstata ventral; Gráfico D: quantidade de glutathione (GSS) na próstata ventral; Gráfico E: quantidade de óxido nítrico sintase 2 (NOS-2) na próstata ventral. O teste One-Way ANOVA foi utilizado para comparar as médias, com o pós-teste de Tukey. As diferenças significativas foram adotadas com base em $p < 0,05$. As letras minúsculas representam respectivamente **a**: CT - grupo controle; **b**: HF - grupo dieta hiperlipídica; **c**: HF+Ex - grupo dieta hiperlipídica e exercício físico aeróbico; **d**: HF+FO - grupo dieta hiperlipídica e óleo de peixe; **e**: HF+FO+Ex - grupo dieta hiperlipídica, óleo de peixe e exercício físico aeróbico; **f**: HF+CO - grupo dieta hiperlipídica e óleo de chia; **g**: HF+CO+Ex - grupo dieta hiperlipídica, óleo de chia e exercício físico aeróbico.

6.0 Discussão

Neste presente estudo, comparamos os efeitos biológicos da suplementação com óleo de peixe e óleo de chia isoladamente ou em combinação com exercício físico aeróbio em ratos que consumiram uma dieta hiperlipídica. Nossos principais achados foram: **(a)** HF aumenta consideravelmente a eficiência alimentar e a ingestão de energia ao longo do período experimental, **(b)** a suplementação de óleo de chia com e sem o exercício físico aeróbio reduziu os valores de ingestão de energia e eficiência alimentar quando comparado ao grupo HF e HF+Ex; **(c)** a suplementação de óleo de peixe e chia com e sem exercício físico reduziram os níveis de TAG, LDL e VLDL em relação aos ratos com dieta padrão; **(d)** dieta hiperlipídica reduziu na expressão AR e potencializou a expressão de TNF- α ; **(e)** o exercício físico aeróbio reduz o peso corporal, adiposidade e a expressão de IL-6 e TNF- α ; **(f)** a suplementação de chia aumenta NRF-2 e GSS, enquanto que óleo de peixe reduz a expressões de mRNA de NRF2 e GSS aumentando a expressão de CAT e SOD1. Em conjunto, esses dados indicam que a suplementação de óleo de peixe com exercício físico aeróbio reduziu os sinais de obesidade induzida pelo consumo de HF e reduzem os efeitos inflamatórios e antioxidantes.

Nossos resultados bioquímicos sugerem que a ingestão de uma dieta rica em colesterol produz os efeitos típicos observados em várias doenças metabólicas, como esteatose hepática não alcoólica, diabetes, lesões cardiovasculares, como aumento do colesterol plasmático e aumento do fígado. Beynen (Beynen et al., 1984) mostraram que a ingestão de colesterol por meio de uma HF reduziu o peso corporal, aumentou o armazenamento de colesterol no fígado e a gordura dos adipócitos. O peso corporal observado nos animais com dieta HF foi aproximadamente igual comparado ao grupo CT após 14 semanas. No entanto, a HF induziu maior gordura de adipócitos e índice de gordura em relação aos ratos que consumiram a dieta padrão. Isso está de acordo com estudos anteriores que mostram que a suplementação de ω -3 reduz a taxa de ganho de peso em ratos que consomem HF (Nakatani et al., 2003), evitando a conversão do excesso de lipídios em TAG (Bargut et al., 2014). Além disso, o exercício físico aeróbio eleva os níveis de hidroperóxidos, as funções mitocondriais e a sensibilidade à insulina, e esses efeitos podem ser aumentados por ω -3 para inibir o ganho de peso (Mataix et al., 1998; Kim et al., 2014). Como observado, o menor ganho de peso sugere que o óleo de peixe e óleo de chia associados ao

exercício físico aeróbio, após oito semanas de tratamento, apresentaram menor ganho de peso, menor ingestão de energia e menor eficiência alimentar. Essas descobertas sugerem que tanto o peixe quanto o óleo de chia reduzem o ganho de peso e melhoram a eficiência alimentar em animais alimentados com HF. No entanto, o treinamento físico aeróbio sozinho produziu maiores efeitos de redução de gordura, possivelmente devido ao aumento da beta-oxidação.

O valores de colesterol total e triacilglicerol (TC, TAG), que são sintetizados predominantemente no fígado, são marcadores importantes de distúrbios metabólicos lipídicos. O óleo de chia foi descrito como um regulador do colesterol devido ao efeito dos PUFA no metabolismo lipídico (Okada et al., 2012). Quando os ratos foram alimentados com HF e suplementados com óleo de peixe ou chia, o nível de colesterol HDL no plasma não foi visivelmente diferente daqueles que não receberam óleo, enquanto os níveis de colesterol total foram ligeiramente mais baixos em relação aos grupos não suplementados. Essas mudanças resultaram em uma redução na razão TC/HDL nos grupos suplementados com óleo, independentemente do tratamento com exercícios. A relação TC/HDL seja um indicador importante do desequilíbrio do colesterol (Linn et al., 1991) Os valores de TC mais baixos subjacentes a mudanças significativas nas razões TC/HDL observadas aqui podem ser explicados pela diminuição da atividade da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase, uma enzima crucial na síntese de colesterol, que foi observada em animais alimentados com dieta rica em ácido docosahexaenóico e ácido α -linoleico (Du et al., 2003).

É sabido que o treinamento físico aeróbio reduz os níveis séricos de LDL e VLDL. Da mesma forma, foi relatado que a suplementação de ω -3 reduz os níveis de LDL (Cazzola et al., 2007). Evidências sugerem que o óleo de peixe pode aumentar a atividade da lipoproteína lipase (Park et al., 2003) e que o exercício físico aeróbio pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares por meio da redução de LDL e VLDL. Neste estudo, não evidenciamos diferenças nos níveis séricos de LDL e VLDL entre os grupos suplementados com óleo de peixe, contudo, os grupos que receberam suplemento de óleo de peixe associados ao exercício físico aeróbio em comparação com HF, dando a entender que não há benefícios adicionais da suplementação de óleo de peixe e exercícios físico nos níveis séricos de LDL e VLDL. A incorporação de óleo peixe e óleo de chia juntos ao exercício físico aeróbio claramente tem

mais efeito no perfil lipídico em comparação com a suplementação de óleo de peixe ou óleo de chia sozinho, como demonstrado pelos níveis reduzidos de LDL, VLDL e TAG pela suplementação de óleo de chia sozinho. Esses resultados fornecem evidências de que o exercício físico aeróbico e a suplementação com ω -3 podem melhorar sinergicamente a quantidade de lipoproteínas circulantes e reduzir os estoques de lipídios no tecido adiposo, apesar de não haver mudanças aparentes no peso durante o consumo de HF.

O consumo da dieta hiperlipídica e a obesidade causam redução da testosterona e mesmo assim promovem alterações prostáticas como prostatite, BHP, HGPIN (Tewari et al., 2012; Ferrucci et al., 2019; Kwon et al., 2016) até câncer (Ribeiro et al., 2012). Os níveis de testosterona induzidos pela obesidade reduzem a ativação do AR prostático (Blarigan et al., 2014; Tewari et al., 2014). Mecanismos prováveis que explicam a relação do aumento proliferativo prostático após níveis reduzidos de testosterona e AR são devido ao aumento de aromatase induzida pelo tecido adiposo. A produção contínua de estradiol causada pelo acúmulo de tecido adiposo visceral reduz a expressão de gonadotropinas e consequentemente a redução de testosterona (Teixeira et al., 2012; Mendes et al., 2015). Nossos resultados evidenciaram aumento da adiposidade visceral nos animais tratados com HF e concomitantemente apresentaram menores valores de AR e aumento considerável de neoplasias intraepiteliais. O óleo de peixe tem maiores concentrações de EPA e DHA considerados ativadores da esterificação de colesterol, mecanismo importante para redução do colesterol (Tunstall et al., 2002; Bargut et al., 2014). Assim, associamos o aumento na expressão de SREBP-1 ao consumo da dieta hiperlipídica e, por outro lado, a suplementação de óleo de chia associado ao exercício físico reduziu os níveis de SREBP-1 prostático e seus efeitos lipogênicos concomitante o aumento de AR. Contudo, os efeitos do treinamento físico promoveram o aumento de AR na próstata regulando desta forma a expressão de SREBP-1, reduzindo a lipogênese tecidual.

A desregulação da apoptose é um mecanismo de grande importância para carcinogênese. A via extrínseca de apoptose tem um crítico papel de eliminação imunológica e não imunológica de células com DNA danificado. O receptor de membrana FAS/CD95 inicia a sinalização intracelular da via de apoptose ativando caspase 8 e 9. Contudo, foi demonstrado que Fas ligante (FasL) é secretado por

células de carcinoma prostático e juntamente com FAS/CD95 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de células anormais (Sharma et al., 2019). No entanto, Jiang et al., relatou que FAS é mais expresso em PIN de alto grau. A ativação de FAS/CD95 acontece por TNF- α iniciando as vias proteolíticas de clivagem, na ausência de TNF- α essa via é minimizada (Jiang et al., 2017).

Tem sido publicado na literatura afirmações que os PUFAS (ω -3) são importantes de quantidade e qualidade de respostas imunológicas (Wiktorowska-Owczarek & Nowak, 2015). Os dados deste estudo claramente indicam que o óleo de peixe com maior quantidade de EPA e DHA possui um papel importante na redução da inflamação prostática. Nós demonstramos que a suplementação de óleo de peixe, contendo uma mistura de ω -3 PUFA, reduz a expressão de IL-6, TNF- α e NF- κ B na próstata ventral. O grupo CO não alterou as expressões das citocinas inflamatórias. Possivelmente a maior concentração de EPA e DHA no óleo de peixe inibiu a sinalização de células T (Calder, 2010). diferente das concentrações de óleo de chia com maior concentração de ácido alfa-linolênico (ALA). Os PUFAs podem ser metabolizado por LOX e COX formando um arranjo biológico como as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (Isobe et al., 2013). Existe a possibilidade da via lipogênica produzir a ativação de LOX pro-carcinogênico (incluindo 5, 8 e 12-LOX) reduzindo a produção de LOX anti-carcinogênico (15-LOX). Estudos sugerem que a suplementação de óleo de peixe com maior quantidade de EPA e DHA promoveu a inibição da enzima 6-desaturase bloqueando a atividade de LOX-12 aumentando a apoptose tecidual. Outro efeito descrito de EPA e DHA é a inibição de COX que reduz a inflamação e produção de ROS (Kim et al., 2016). O exercício físico associado a suplementação de óleo de peixe (concentração de EPA e DHA) reduziu consideravelmente a inflamação prostática. Ainda, há poucas relações existentes sobre a suplementação de óleo de chia com maior concentração de ALA como substrato enzimático prostático.

A dieta hiperlipídica aumenta a peroxidação lipídica modificando indiretamente os níveis de expressão enzimática de NOS2 e reduz a capacidade antioxidante (Dröge, 2002). Por outro lado, o exercício físico é clinicamente associado a redução da peroxidação lipídica por aumentar a expressão das enzimas antioxidantes (Radak et al., 2017). As enzimas SOD-1 e CAT foram mais expressas nos grupos tratados com óleo de peixe e óleo de chia associados ao exercício físico aeróbio. Por outro lado,

a suplementação com o óleo de chia aumentou os níveis de GSS, NOS 2 e NRF-2 na próstata ventral. Assim como outros estímulos exógenos, o óleo de chia pode promover a via de ativação do NRF-2, a fim de controlar a resposta pró-oxidativa (Santos-López, 2017), uma vez ativada, participa da regulação de funções programáticas estimuladas por oxidantes, incluindo autofagia, estresse do retículo e biogênese mitocondrial (Figura 9).

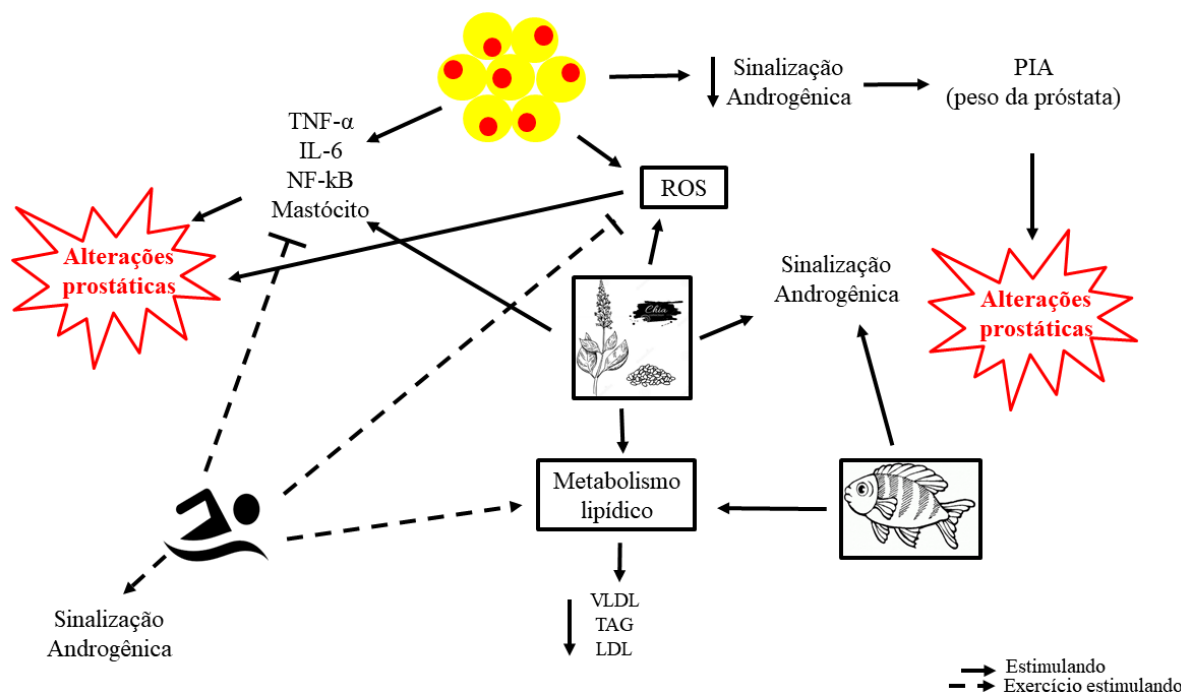


Figura 9: Efeitos do exercício físico aeróbio associado a suplementação de ômega-3 no ambiente obesogênico prostático causado pelo excesso de dieta hiperlipídica em ratos Wistar durante 14 semanas de protocolo experimental. A dieta hiperlipídica hipertrofia os adipócitos que, por sua vez, sinalizam citocinas inflamatórias como $TNF-\alpha$, IL-6, fator de transcrição NF- κB e os mastócitos recrutados pelo processo inflamatório, causando alterações prostáticas. Os adipócitos reduzem a sinalização androgênica (AR), potencializando os fatores pró-oxidantes nas espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo levar a atrofia inflamatória prostática (PIA). Por sua vez o exercício físico de caráter aeróbio inibe todos esses danos causados pela dieta hiperlipídica, estimulando a sinalização androgênica, o metabolismo lipídico, através da redução dos níveis das lipoproteínas VLDL, TAG, LDL e surge como um “fator” de tamponamento estimulando as proteínas anti-oxidativas durante o ROS. Por fim os óleos de peixe e chia potencializam os efeitos iniciados pelo exercício físico, melhorando a sinalização androgênica, metabolismo lipídica e sinalização de ROS.

7.0 Conclusão

Em conclusão, quando incorporamos a suplementação de óleo de peixe e chia a uma dieta hiperlipídica verificamos a capacidade de prevenir danos oxidativos com o uso do óleo de chia e a capacidade anti-inflamatória do óleo de peixe. Esta proteção foi mais eficaz quando associada ao

exercício físico aeróbio sugerindo uma regulação da atividade antioxidante. Esses resultados enfatizam a importância de incorporar EPA, DHA e ALA na dieta e associar com a prática de exercício físico.

8.0 Agradecimentos

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

9.0 Referências Bibliográficas

- Akira, S., Kishimoto, T (1992). IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunol Rev*, 127(1), 25-50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1992.tb01407.x>
- Albadine, R., Rousseau, E., Morin, C., Sirois, M., Vincent, E (2010). 17 , 18-Epoxyeicosatetraenoic Acid Targets PPAR γ and p38 Mitogen - Activated Protein Kinase to Mediate Its Anti-inflammatory Effects in the Lung Role of Soluble Epoxide Hydrolase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(5), 564-575. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0155OC>
- Alvarez, C., Ramirez-Campillo, R., Martinez-Salazar, C., Castillo, A., Gallardo, F., Ciolac, E. G (2018). High-Intensity Interval Training as a Tool for Counteracting Dyslipidemia in Women. *Int J Sports Med*, 39(5), 397-406. <https://doi.org/10.1055/s-0044-100387>
- Arima, M., Fukuda, T (2011). Prostaglandin D₂ and T(H)₂ inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med*, 26(1), 8-18. <https://doi.org/10.3904/kjim.2011.26.1.8>
- Badjatia, N., M., Satyam, A., Singh, P., Seth, A., Sharma, A (2010). Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Oncol*, 28(4), 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.12.010>
- Baptista, D. B., Dutra de Santana, L. F., Veras, A. S. C., Alves de Menezes, V., Dos Santos, N. J., Papoti, M., Teixeira, G. R. (2018). Effect of concurrent training and supplementation with β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on the prostate: Alterations in the androgen receptor and inflammation. *Int. J. Morphol*, 36(1), 74-79. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022018000100074>
- Bargut, T. C. L., Frantz, E. D. C., Mandarin-de-Lacerda, C. A., Aguila, M. B (2014). Effects of a Diet

Rich in n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Hepatic Lipogenesis and Beta-Oxidation in Mice. *Lipids*, 49(5), 431-444. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3892-9>

Bayraktar, N., Kilic, S., Bayraktar, M. R., Aksoy, N (2010). Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Cancerous Bladder Tissue and Their Relation with Bacterial Infection: a controlled clinical study. *J Clin Lab Anal*, 24(1), 25-30. <https://doi.org/10.1002/jcla.20356>

Bays, H., Mandarino, L. DeFronzo, R.A (2004). Role of the Adipocyte , Free Fatty Acids , and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach, *J Clin Endocrinol Metab*, 89(2), 463-478. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030723>

Beynen, A.C., Boogaard, A., Van Laack, H.L., Katan, M.B (1964). Cholesterol Metabolism in Two Strains of Rats with High or Low Response of Serum Cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr*, 114(9), 1640-1651. doi:10.1093/jn/114.9.1640.

Bhangle, S., Kolasinski, S. L (2011). Fish Oil in Rheumatic Diseases. *Rheum Dis Clin North Am*, 37(1), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2010.11.003>

Bianco, J. J., McPherson, S. J., Wang, H., Prins, G. S., Risbridger, G. P (2006). Transient neonatal estrogen exposure to estrogen-deficient mice (aromatase knockout) reduces prostate weight and induces inflammation in late life. *Am J Pathol*, 168(6), 1869-1878. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050623>

Van-Blarigan, E. L., Ma, J., Ken, S. A., Stampfer, M. J., Sesso, H. D., Giovannucci, E. L., et al., (2014). Plasma Antioxidants , Genetic Variation in SOD2 , CAT , GPX1 , GPX4 , and Prostate Cancer Survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(6), 1037-1047. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0670>

Bratton, B. A., Maly, I.V., Hofmann, W.A (2019). Effect of polyunsaturated fatty acids on proliferation and survival of prostate cancer cells. *PLoS One*, 14(7), 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0219822.

Brown-Borg, H. M., Borg, K.E., Meliska, C.J., Bartke, A (1996). Dwarf mice and the ageing process. *Nature*, 384(6604):33. doi: 10.1038/384033a0.

Brown, N. S., Bicknell, R (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress : its effects on the growth , metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 3(5), 323-327. doi: 10.1186/bcr315

- Calder, P. C (2010). Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients*, 2(3), 355-374. doi:10.3390/nu2030355
- Calder, P. C. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes : nutrition or pharmacology ? *Br J Clin Pharmacol*, 75(3), 645-662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Miles, E. A., Rees, D., Banerjee, T., Roynette, C. E., et al., (2007). Age- and dose-dependent effects of an eicosapentaenoic acid-rich oil on cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Atherosclerosis*, 193(1), 159-167. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.008
- Cholewski, M., Tomczykowa, M., Tomczyk, M (2018). A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids. *Nutrients*, 10(11):1662. doi:10.3390/nu10111662
- Coussens, L. M., Werb, Z (2010). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867. doi:10.1038/nature01322.
- Deol, P., Fahrman, J., Yang, J., Evans, J. R., Rizo, A., Salemi, M., et al., (2017). Omega-6 and omega-3 oxylipins are implicated in soybean oil- induced obesity in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. doi:10.1038/s41598-017-12624-9
- Dhar, A (2017). The Role of PKR as a Potential Target for Treating Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rev*, 13(1), 28-31. doi: 10.2174/1573403X12666160526
- Dröge, W (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Du, C., Sato, A., Watanabe, S., Wu, C.Z., Ikemoto, A., Ando, K., Kikugawa, K et al., (2003). Cholesterol Synthesis in Mice Is Suppressed but Lipofuscin Formation Is Not Affected by Long-Term Feeding of n-3 Fatty Acid-Enriched Oils Compared with Lard and n-6 Fatty Acid-Enriched Oils. *Biol Pharm Bull*, 26(6), 766-770. doi: 10.1248/bpb.26.766.
- Durstine, J. L., Grandjean, P. W., Davis, P. G., Ferguson, M. A., Alderson, N. L., DuBose, K. D (2001). Blood Lipid and Lipoprotein Adaptations to Exercise. *Sports Medicine*, 31(15), 1033-1062. doi:10.2165/00007256-200131150-00002
- Eblin, K.E., Jensen, T.J., Wnek, S.M., Buffington, S.E., Futscher, B.W., Gandolfi, A.J (2009). Reactive

oxygen species regulate properties of transformation in UROtsa cells exposed to monomethylarsonous acid by modulating MAPK signaling. *Toxicology*, 6(4), 247-253. doi: 10.1016/j.tox.2008.10.007

Estadella, D., Oyama, L.M., Dâmaso, A.R., Ribeiro, E.B., Do Nascimento, C.M.O (2014). Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Nutrition*, 20(2), 218-224. doi:10.1016/j.nut.2003.10.008

Ferrucci, D., Silva, S. P., Rocha, A., Nascimento, L., Vieira, A.S., Taboga, S.R., et al., (2019). Dietary fatty acid quality affects systemic parameters and promotes prostatitis and pre-neoplastic lesions. *Sci Rep*, 9(1):19233. doi:10.1038/s41598-019-55882-5

Ficker, E. S., Maranhão, R. C., Chacra, A. P. M., Neves, V. C., Negrão, C. E., Martins et al., (2010). Exercise training accelerates the removal from plasma of LDL-like nanoemulsion in moderately hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis*, 212(1), 230-236. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.030

Forjaz, C.L., Santaella, D.F., Rezende, L.O., Barretto, A.C., Negrão, C.E (1998). A Duração do Exercício Determina a Magnitude e a Duração da Hipotensão Pós-Exercício. *Arq Bras Cardiol*, 70(2), 15-20. doi:10.1590/s0066-782x1998000200006.

Francis, J. C., Swain, A. (2018). Prostate Organogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(7):a030353. doi:10.1101/cshperspect.a030353

Gallí, M., Gool, F.V., Rongvaux, A., Andris, F., Leo, O (2009). The Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: A Molecular Link between The Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: a molecular link between metabolism , inflammation , and cancer. *Cancer Res*, 70(1), 8-11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2465

Gomes, R. N., Da-Costa, S.F., Colquhoun, A (2018). Eicosanoids and cancer. *Clinics (Sao Paulo)*, 3(17), 1-10. doi:10.6061/clinics/2018/e530s

Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C et al., (2009). The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30(3), 377-386. doi:10.1093/carcin/bgp014

Greenwood, C. E., Winocur, G (2005). High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive

function. *Neurobiol Aging*, 1:42-45. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.017

Hsing, A. W., Reichardt, J. K. V., Stanczyk, F. Z (2002). Hormones and prostate cancer: Current perspectives and future directions. *The Prostate*, 52(3), 213-235. doi:10.1002/pros.10108

Huang, W. C., Li, X., Liu, J., Lin, J., Chung, L. W. K (2012). Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 10(1), 133-142. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0206

Ishihara, T., Yoshida, M., Arita, M (2019). Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. *Int Immunol*, 31(9), 559-567. doi:10.1093/intimm/dxz001

Isobe, Y., Arita, M., Iwamoto, R., Urabe, D., Todoroki, H., Masuda, K et al., (2013). Stereochemical assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3. *J Biochem*, 153(4), 355-360. doi:10.1093/jb/mvs151

Jiang, Y., Yu, M., Hu, X., Han, L., Yang, K., Ba, H et al., (2017). STAT1 mediates transmembrane TNF-alpha-induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death Differ*, 24(4), 660-671. doi:10.1038/cdd.2016.162

Kahraman, A. (2017). NUTRITIONAL VALUE AND FOLIAR, 22(1), 55–66. <https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.1.1106>

Kalra, J., Dhar, A. (2017). Double-stranded RNA-dependent protein kinase signalling and paradigms of cardiometabolic syndrome. *Fundam Clin Pharmacol*, 31(3), 265-279. doi:10.1111/fcp.12261

Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., Koul, H. K (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett*, 282(2), 125-136. doi:10.1016/j.canlet.2008.12.011

Kim, C.Y., Chung, K.-S., Cheon, S.Y., Lee, J.H., Park, Y.B., An, H.J. (2016). Rice Hull Extract Suppresses Benign Prostate Hyperplasia by Decreasing Inflammation and Regulating Cell Proliferation in Rats. *Journal of Medicinal Food*, 19(8), 746-754. doi:10.1089/jmf.2016.3686

Kim, H., Kang, C., Park, H., Lee, M (2014). Effects of vitamin D supplementation and circuit training on indices of obesity and insulin resistance in T2D and vitamin D deficient elderly women. *J Exerc Nutrition Biochem*, 18(3), 249-257. doi:10.5717/jenb.2014.18.3.249.

- Krishnamoorthy, N., Abdulnour, R. E., Walker, K. H., Engstrom, B. D., Levy, B. D (2018). Specialized Proresolving Mediators in Innate and Adaptive Immune Responses in Airway Diseases. *Physiol Rev*, 98(3), 1335-1370. doi:10.1152/physrev.00026.2017
- Kutzner, L., Ostermann, A. I., Konrad, T., Riegel, D., Hellhake, S., Schuchardt, J. P et al., (2017). Lipid class specific quantitative analysis of n-3 polyunsaturated fatty acids in food supplements. *J Agric Food Chem*, 65(1), 139-147. doi:10.1021/acs.jafc.6b03745
- Kwon, O.J., Zhang, B., Zhang, L., Xin, L (2016). High fat diet promotes prostatic basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate epithelial hyperplasia originated from basal cells. *Stem Cell Research*, 16(3), 682-691. doi:10.1016/j.scr.2016.04.009
- Li, H., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Fernando, R., Mon, W. Y., Wheeler, D. C et al., (2005). EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: Evidence for a PPAR- γ -dependent mechanism. *Kidney Int*, 67(3), 867-874. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00151.x
- Linn, S., Fulwood, R., Carroll, M., Brook, J.G., Johnson, C., Kalsbeek, W.D., Rifkind, B.M (1991). Serum total cholesterol: HDL cholesterol ratios in US white and black adults by selected demographic and socioeconomic variables (HANES II). *Am J Public Health*, 81(8), 1038-1043. doi: 10.2105/ajph.81.8.103.
- López-Vicario, C., Alcaraz-quiles, J., García-alonso, V., Rius, B., Hwang, S. H., Titos, E et al., (2015). Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: Role for omega-3 epoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 2-7. doi:10.1073/pnas.1422590112
- Machado, J., Horie, G., Castoldi, R., Camargo, R., Camargo Filho, J (2014). Efeito do treinamento concorrente na composição corporal e massa muscular de ratos Wistar. *R. Bras. Ci. e Mov.*, 22(3), 34-42. doi: 10.18511/0103-1716/rbcm.v22n3p34-42.
- Maders, D. K., Bagatini, M. D., Gustavo, L., Reetz, B., Chiesa, J., Battisti, V., et al., (2011). Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients : Relation to Gleason score , treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother*, 65(7), 516-524. doi:10.1016/j.biopha.2011.06.003
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*,

454(7203), 436-333. doi:10.1038/nature07205

Marzo, A. M. D., Nakai, Y., Gelson, W.G (2007). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*, 25(5), 398-400. doi:10.1016/j.urolonc.2007.05.007

Mataix, J., Quiles, J.L., Huertas, J.R., Battino, M., Mañas, M (1998). Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 24(4), 511-521. doi:10.1016/s0891-5849(97)00288-8.

Mendes, L. O., Scarano, W. R., Rochel-Maia, S. S., Fioruci-Fontaneli, B. A., Chuffa, L. G. A., Anselmo-Franci, J. A et al., (2015). Androgen therapy reverses injuries caused by ethanol consumption in the prostate: Testosterone as a possible target to ethanol-related disorders. *Life Sciences*, 120, 22-30. doi:10.1016/j.lfs.2014.11.003

Meng, H., Shen, Y., Shen, J., Zhou, F., Shen, S., N Das, U (2013). Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. *Lipids Health Dis*, 29, 160. doi:10.1186/1476-511X-12-160

Nakatani, T., Kim, H., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Ezaki, O (2003). A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade , while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver : relationship to anti-obesity. *J Lipid Res*, 44, 369-379. doi:10.1194/jlr.M200289-JLR200

Nathan, C., Ding, A (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029

Nelson, M. E., Rejeski, W. J., Blair, S. N., Duncan, P. W., Judge, J. O., King, A. C et al., (2007). Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116(9), 1-12. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185650

Okada, K., Warabi, E., Sugimoto, H., Horie, M., Tokushige, K., Ueda, T et al., (2012). Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol*, 47(8), 924-935. doi:10.1007/s00535-012-0552-9

Park, Y., Harris, W. S (2003). Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res*, 44, 455-463. doi:10.1194/jlr.M200282-JLR200

- Parrish, C. C (2013). Lipids in Marine Ecosystems. *Int Schol Resear Notic*, 1-17. doi:10.5402/2013/604045.
- Peisch, S. F., Van Blarigan, E. L., Chan, J. M., Stampfer, M. J., Kenfield, S. A (2017). Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. *World J Urol*, 35(6), 867-874. doi:10.1007/s00345-016-1914-3
- Peoples, G. E., McLennan, P. L (2014). Long-chain n-3 DHA reduces the extent of skeletal muscle fatigue in the rat in vivo hindlimb model. *Br J Nutr*, 111(6), 996-1003. doi:10.1017/S0007114513003449
- Pfaffl, M. W (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9),16-21. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Pollak, M., Beamer, W., Zhang, J. C (1999). Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 17(4), 383-390. doi:10.1023/a:1006154108619
- Qadri, Q., Sameer, A. S., Shah, Z. A., Hamid, A., Alam, S., Manzoor, S (2011). Genetic polymorphism of the glutathione-S- transferase P1 gene (GSTP1) and susceptibility to prostate cancer in the Kashmiri population. *Genet Mol Res*, 10(4), 3038-3045. doi:10.4238/2011.December.6.4
- Radak, Z., Ishihara, K., Tekus, E., Varga, C., Posa, A., Balogh, L et al., (2017). Redox Biology Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biology*, 12, 285-290. doi:10.1016/j.redox.2017.02.015
- Ribeiro, D. L., Pinto, M. E., Rafacho, A., Bosqueiro, J. R., Maeda, S. Y., Anselmo-Franci, J. A et al., (2012). High-Fat Diet Obesity Associated With Insulin Resistance Increases Cell Proliferation, Estrogen Receptor, and PI3K Proteins in Rat Ventral Prostate. *Journal of Andrology*, 33(5), 854-865. doi:10.2164/jandrol.111.016089
- Saltiel, A. R., C. Ronald Kahn (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 1-8. doi:10.1038/414799a
- Santos-López, J.A., Garcimartín, A., López-Oliva, M.E., Bautista-Ávila, M.B., González-Muñoz, M.J., Bastida, S et al., (2017). Chia Oil-Enriched Restructured Pork Effects on Oxidative and Inflammatory Status of Aged Rats Fed High Cholesterol/High Fat Diets. *J Med Food*, 20(5), 526-534.

doi:10.1089/jmf.2016.0161

Schrauwen, P., Westerterp, K. R (2000). The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr*, 84(4), 417-427. doi:10.1017/s0007114500001720.

Serhan, C. N., Levy, B. D (2018). Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest*, 128(7), 2657-2669. doi:10.1172/JCI97943

Sethi, J.K., Vidal-Puig, A.J (2015). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*, 48(6), 1253-1262. doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200.Thematic

Shahidi, F., Ambigaipalan, P (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol*, 25, 1-37. doi:10.1146/annurev-food-111317-095850.

Sharma, S., Carmona, A., Skowronek, A., Yu, F., Collins, M. O., Naik, S et al., (2019). Apoptotic signalling targets the post-endocytic sorting machinery of the death receptor Fas/CD95. *Nature Communications*, 10(1), 3105. doi:10.1038/s41467-019-11025-y

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Philip, A.C et al., (2004). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 77 Avenue Louis Pasteur. *Cell*, 119(7), 941-953. doi:10.1016/j.cell.2004.12.012.

Tabas, I., Glass, G.K (2013). Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. *Science*, 3(2), 567-598. doi: 10.1126/science.1230720

Teixeira, G R, Fávoro, W. J., Pinheiro, P. F. F., Chuffa, L. G., Amorim, J. P., Mendes, L. O et al., (2012). Physical exercise on the rat ventral prostate: steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports*, 22(5), e86-92. doi:10.1111/j.1600-0838.2012.01501.x

Teixeira, G.R., Mendes, L. O., Veras, A. S. C., Thorpe, H. H. A., Fávoro, W. J., de Almeida Chuffa, L. G et al., (2020). Physical resistance training-induced changes in lipids metabolism pathways and apoptosis in prostate. *Lipids Health Dis*, 19(1), 14. doi:10.1186/s12944-020-1195-0

Tewari, R., Chhabra, M., Natu, S. M., Goel, A., Dalela, D., Goel, M. M et al., (2014). Significant Association of Metabolic Indices , Lipid Profile , and Androgen Levels with Prostate Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(22), 9841-9846. doi:10.7314/apjcp.2014.15.22.9841

Tewari, R., Rajender, S., Natsu, S. M., Dalela, D., Goel, A., Goel, M. M et al., (2012). Diet, obesity, and prostate health: Are we missing the link? *Journal of Andrology*, 33(5), 763-776. doi:10.2164/jandrol.111.015578

Thomas, T. O. M. R., Fischer, B. A., Kist, W. B., Horner, K. E., Cox, R. H (2000). Effects of exercise and n-3 fatty acids on postprandial lipemia. *J Appl Physiol* (1985), 88(6), 2199-21204. doi:10.1152/jappl.2000.88.6.2199

Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57(3-4), 7369-7375. doi:10.1038/sj.onc.1206940.

Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., Hotamisligil, G.S (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28), 10741-10746. doi:10.1073/pnas.0603509103

Tunstall, R. J., Mehan, K. A., Wadley, G. D., Collier, G. R., Bonen, A., Hargreaves, M et al., (2002). Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(1), E66-72. doi:10.1152/ajpendo.00475.2001

Urso, M. L., Clarkson, P. M (2003). Oxidative stress , exercise , and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54. doi:10.1016/S0300-483X(03)00151-3

Veras, A. S. C., de Freitas, M. C., Thorpe, H. H. A., Seraphim, P. M., Teixeira, G. R (2020). Strength Training Modulates Prostate of Wistar Rats Submitted to High-Fat Diet. *Reprod Sci*, 29, 1-10. doi:10.1007/s43032-020-00238-y

Vykhovanets, E. V, Shankar, E., Vykhovanets, O. V, Shukla, S., Gupta, S (2011). High-fat diet increases NF- κ B signaling in the prostate of reporter mice. *Prostate*, 71(2), 147-156. doi:10.1002/pros.21230

Wang, Q., Wu, Q., Wang, J., Chen, Y., Zhang, G., Chen, J et al., (2017). Ketamine analog methoxetamine induced inflammation and dysfunction of bladder in rats. *Int J Mol Sci*, 18(1), 117. doi:10.3390/ijms18010117

Wang, Y., Corr, J. G., Thaler, H. T., Tao, Y., Fair, W. R., Heston, W. D. W (1995). Decreased Growth of Established Human Prostate LNCaP Tumors in Nude Mice Fed a Low-Fat Diet. *J Natl Cancer Inst*, 87(19), 1456-1462. doi:10.1093/jnci/87.19.1456

- Wiktorowska-Owczarek, A., Berezińska, M., Nowak, J. Z (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*, 24(6), 931-941. doi:10.17219/acem/31243
- Wooten, J. S., Biggerstaff, K. D., Ben-Ezra, V (2009). Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 107(3), 794-800. doi:10.1152/japplphysiol.91062.2008.
- Yanai, R., Mulki, L., Hasegawa, E., Takeuchi, K., Sweigard, H., Suzuki, J et al., (2014). Cytochrome P450-generated metabolites derived from ω -3 fatty acids attenuate neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(26), 9603-9608. doi:10.1073/pnas.1401191111

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE CHIA (SALVIA HISPANICA L.) OU ÔMEGA-3 ASSOCIADA AO TREINAMENTO AERÓBIO NO PERFIL GLICÊMICO E ESTEATOSE HEPÁTICA DE RATOS INDUZIDOS A SÍNDROME METABÓLICA POR DIETA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3962 e tendo como participante(s) RAYANA LOCH GOMES (discente), THAISSA FERNANDA SANTOS DOMINGUES (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), SABRINA ALVES LENQUISTE (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

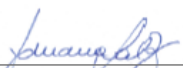
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 06/09/2017.

Vigência do projeto: 07/2017 a 06/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos Wistar	70	200 gramas	48 dias	M	Biotério Central Unoeste

Presidente Prudente, 18 de Dezembro de 2017.


 Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI


 Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE