



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

Tatiane Pereira Scarpelli

**Influência da obesidade materna e do consumo de dieta hiperlipídica
sobre a próstata de ratos senis**

São José do Rio Preto

2022

Tatiane Pereira Scarpelli

**Influência da obesidade materna e do consumo de dieta hiperlipídica
sobre a próstata de ratos senis**

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

Financiadora: CNPq- Processo nº 163297/2018-5

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rejane Maira Goes

São José do Rio Preto

2022

Scarpelli, Tatiane Pereira.

Influência da obesidade materna e do consumo de dieta hiperlipídica sobre a próstata de ratos senis/ Tatiane Pereira Scarpelli. -- São José do Rio Preto, 2022

93 f.: il.

Orientador: Rejane Maira Goés

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Próstata. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Envelhecimento. I. Influência da obesidade materna e do consumo de dieta hiperlipídica sobre a próstata de ratos senis.

Tatiane Pereira Scarpelli

**Influência da obesidade materna e do consumo de dieta hiperlipídica
sobre a próstata de ratos senis**

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

Financiadora: CNPq- processo 163.297/2018-5

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Glaura Scantamburlo A. Fernandes
UEL – Universidade Estadual de Londrina

Dr^a. Larissa Kido
UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Dr^a. Cristiane Figueiredo Pinho
UNESP – Câmpus de Botucatu

São José do Rio Preto

15 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao Max, meu companheiro inseparável desde o comecinho de tudo, meu maior apoio, sem você eu nem teria chegado ao final. Te amo.

Aos meus pais por todo o apoio e por serem desde sempre os maiores incentivadores dos meus estudos.

Aos meus amigos do laboratório que transcenderam a amizade além do IBILCE, rimos inúmeras vezes, nos frustramos mais ainda, aprendemos juntos e fizeram o dia a dia ser mais prazeroso, obrigada Alana e Gustavo.

À Rejane, minha orientadora desde 2014, que me acolheu no LHRDE, teve infinita paciência, transmitiu muito conhecimento, foi muito paciente, grande exemplo de competência, já disse que teve muita paciência com as minhas falhas? Obrigada.

Ao professor Sebaka, a Patrícia, ao Luiz e ao pessoal do LMM, por abrirem as portas do laboratório, pelas ajudas e por dividirem tantos conhecimentos.

À minha amiga Juliana, que está comigo desde 2012 no IBILCE, pela amizade fiel, pelos conselhos, troca de experiências, conversas, cafés na cantina e muita conversa boa sobre a vida pessoal e profissional

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida, possibilitando a permanência desta pesquisa

Ao IBILCE, por ser minha casa, fonte de conhecimento por mais de dez anos!

RESUMO

A dieta materna rica em lipídios (HFD) compromete a próstata da prole adulta, causando diversas alterações patológicas, mas não se tem conhecimento dos efeitos sobre a histofisiologia principalmente somado à dieta hiperlipídica (HFD) até o envelhecimento. É necessário compreender se os efeitos já reconhecidos da exposição aos lipídios nas diferentes fases ontogenéticas permanecem, e se eles se agravam quando analisados na velhice da prole. Assim, o presente estudo investigou os efeitos prolongados e tardios do ambiente nutricional rico em lipídios (ANRL) nos diferentes períodos do desenvolvimento da próstata ventral e dorsolateral. Para isso, foram utilizados seis grupos de ratos Wistar (56 sem de idade; n=12 por grupo): alimentados com dieta balanceada (controle – C2, 3% de lipídeos) ou que foram expostos ao ANRL por meio de dieta hiperlipídica (20% de lipídeos) durante a gestação (G e G2), gestação e lactação (G e GL2), a partir do desmame (W e D), a partir da lactação (L e L2) e gestação por toda a vida (AL e GT). O ANRL na gestação e lactação foi garantido por meio da indução da obesidade materna através da alimentação HFD por 15 semanas. O ANRL aumentou o colesterol total e os níveis de triglicerídeos em todos os grupos e levou à resistência à insulina em GL/GL2, AL/GT e obesidade em L/L2. Os níveis séricos de testosterona diminuíram ~67% em GL/GL2, ~146% em L/L2 e W/D e ~233% em AL/GT. A análise histológica e estereológica revelou um incremento do compartimento estromal e das fibras colágenas nas próstatas ventrais (PV) de todos os grupos ANRL, bem como as lesões degenerativas - vacuolização celular e concreções prostáticas. Na PV, o ANRL agravou a atrofia acinar em G, GL e L e em AL atingiu mais de 50% da área da próstata para a maioria dos animais. Os focos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) aumentaram na AL. Ainda na PV, a expressão tecidual do AR teve maior expressão no estroma para G e GL, mas não mudou no epitélio. Já a próstata dorsolateral, apresentou aumento do peso somente em GT, além de um aumento na densidade de células proliferativas. A histopatologia indicou aumento de NIPs e focos de infiltrados inflamatórios. Também houve aumento de células em descolamento em GT e a partir da lactação. A contagem de mastócitos mostrou aumento na próstata dorsolateral do grupo GT. A frequência de AR não se alterou no epitélio de nenhum grupo, contudo aumentou no compartimento estromal a partir do desmame. Nossos dados mostram que a exposição prolongada dos lipídios desde a gestação e por toda a vida pós-natal até a velhice, leva a modificações no metabolismo lipídico e de glicose, e potencializa as alterações comuns da idade na próstata diferentemente entre os lobos ventral e dorsolateral. De modo geral, a ANRL agrava as lesões degenerativas da idade, e aumenta os focos de NIPs, além do aumento da expressão de AR no estroma prostático. A presença de focos inflamatórios também ocorre mais acentuadamente na dorsolateral. Por fim, concluímos que, quando analisada mais tardiamente, a exposição prolongada ao ANRL promove um estado permanente de alterações metabólicas, hormonais e morfológicas, além do acúmulo de lesões histopatológicas que são associadas ao potencial desenvolvimento de câncer de próstata.

Palavras-chaves: Próstata. Dieta hiperlipídica. Envelhecimento. Próstata ventral. Próstata dorsolateral. Alterações histopatológicas.

ABSTRACT

The maternal diet rich in lipids (DRL) compromises the prostate of the adult offspring, causing several pathological changes, but the effects on histophysiology are not known, mainly added to the high-fat diet until aging. It is necessary to understand if the already recognized effects of exposure to lipids in the different ontogenetic phases remain and if they worsen when analyzed in the old age of the offspring. Thus, the present study studied the prolonged and late effects of the high-lipid nutritional environment (HLE) in different periods of development. For this, six groups of Wistar rats (56 weeks old; n=12 per group) were used: rats fed a balanced diet (control - C2, 3% lipids) or that were exposed to HLE through a high-fat diet (20% lipids) during pregnancy (G and G2), pregnancy and lactation (G and GL2), from weaning (W and D), from lactation (L and L2) and lifelong pregnancy (AL and GT). ANL increased total cholesterol and triglyceride levels in all groups and led to insulin resistance in GL/GL2 and AL/GT and obesity in L/L2. Serum testosterone levels decreased ~67% in GL/GL2, ~146% in L/L2 and W/D and ~233% in AL/GT. Histological and stereological analysis revealed an increase in the stromal compartment and collagen fibers in the prostates of all HLE groups, as well as degenerative lesions, such as cellular vacuolization and prostatic concretions. HLE aggravated acinar atrophy in G, GL and L and in AL it reached more than 50% of the prostate area for most animals. The foci of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) increased in LA. Tissue androgen receptor expression did not vary between groups, except for higher stromal expression for G and GL. In the dorsolateral prostate, the GT group showed an increase in the weight of the dorsolateral prostate, as well as an increase in the density of proliferating cells. Histopathology indicated an increase in NIPs and foci of inflammatory infiltrates, as well as detachment cells in animals exposed to HLE for life. The number of mast cells was increased in the prostate of the GT group. The HLE from lactation also led to an increase in foci of cell detachment in the dorsolateral prostate. The frequency of AR did not change in the epithelium of any group, however it increased in the stromal compartment after weaning. The blood glucose level was altered in D and L2, while the GL2 and GT groups became insulin resistant. All groups showed drops in testosterone levels, except for G2. Our data show that prolonged lipid exposure from pregnancy and throughout postnatal life into old age leads to changes in lipid and glucose metabolism, and potentiates common age changes in the prostate differently between the ventral and dorsolateral lobes. In general, HLE aggravates the degenerative lesions of age, and increases the foci of NIPs, in addition to increasing AR expression in the prostatic stroma. The presence of inflammatory foci also occurs more markedly in the dorsolateral area. Finally, we understand that when analyzed later, prolonged exposure to HLE promotes a permanent state of metabolic, hormonal and morphological changes, in addition to the accumulation of histopathological lesions that are associated with the potential development of prostate cancer.

Keywords: Prostate. High-fat diet. Aging. Ventral prostate. Dorsolateral prostate. Histopathological changes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANRL- ambiente nutricional ricos em lipídios

HLE- do inglês: high-lipid nutritional environment (ambiente nutricional rico em lipídios)

AR- receptor de andrógeno

PCNA- antígeno nuclear de proliferação celular

T- testosterona

NIP- neoplasia intraepitelial prostática

HFD- do inglês: Hig fat diet

PIN- do inglês: prostatic intra-epithelial neoplasia

PCa- do inglês: prostate adenocarcinoma

BPH- do inglês: Benign prostatic hyperplasia

DHT- do inglês: dihydrotestosterone

ER- receptor de estrógeno

LXR α - do inglês: liver X receptor alpha

PPAR γ - do inglês: Peroxisome proliferator-activated receptor

Akt- serina-treonina quinase

Pten- fosfatase homóloga a tensina

ipITT- teste de tolerância à insulina intraperitoneal

HDL- lipoproteína de alta densidade

LDL- lipoproteína de baixa densidade

Kitt – constante de decaimento de glicose

PBS- tampão fosfato-salino

TBS- solução salina de trisma

BSA- albumina de soro bovino

DAB- diaminobenzidina

GLUT4- transportador de glicose 4

PSA- antígeno específico da próstata

SUG- seio urogenital

EUG- epitélio urogenital

MUG- mesênquima urogenital

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
<i>Próstata</i>	10
1. Considerações gerais	10
2. Desenvolvimento e Organogênese	13
3 Envelhecimento da próstata e Patologias	15
<i>Dieta e programação fetal</i>	16
OBJETIVOS	19
RESULTADOS	20
CAPÍTULO 1	21
Abstract	23
INTRODUCTION	23
MATERIALS AND METHODS	26
Animals and diet	26
Metabolic and physiological parameters	27
Histological processing and stereological analyses	28
Histopathological analysis	28
Immunohistochemistry	29
Statistical Analysis	30
RESULTS	30
Metabolic and hormonal analysis	30
Prostate alterations	31
DISCUSSION	32
DECLARATION OF INTEREST, FUNDING AND ACKNOWLEDGEMENTS	36
REFERENCES	36
TABLES	44
LEGENDS OF FIGURES	46
FIGURES	50
CAPÍTULO 2	60
Resumo	62
INTRODUÇÃO	63
MATERIAIS E MÉTODOS	64
Animais e delineamento experimental	64
Parâmetros hormonais e metabólicos	65
Parâmetros biométricos	66
Análise histopatológica	66

Análise imuno-histoquímica	67
Determinação da proliferação celular e frequência de células AR-positivas.....	68
Análise dos mastócitos	68
RESULTADOS.....	69
Parâmetros fisiológicos e metabólicos	69
Reações imuno-histoquímicas	69
Alterações no lobo dorsolateral.....	70
Contagem de mastócitos	70
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
LEGENDAS DAS FIGURAS.....	77
FIGURAS.....	79
MATERIAL SUPLEMENTAR	84
CONCLUSÕES GERAIS.....	87
REFERÊNCIAS	88
ANEXO 1	92

INTRODUÇÃO

Próstata

1. Considerações gerais

A próstata é uma glândula exócrina acessória, de extrema importância para o sistema genital masculino, encontrada na maioria dos mamíferos. Possui algumas variações morfológicas entre os grupos animais, podendo ser de organização compacta, multilobular ou difusa (TIMMS, 2008; TOIVANEN, SHEN 2017). A principal função prostática é a produção, secreção e o armazenamento de uma importante fração do líquido seminal, constituído de íons citrato, fosfato, açúcares, enzimas, lipídios estruturais de membrana, substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias, além de proteínas específicas (BLOOM, FAWCETT, 1993; LONG et al., 2005). O líquido seminal é essencial à viabilidade dos espermatozoides, garantindo sobrevivência e motilidade para o sucesso reprodutivo das espécies (REBELLO et al., 2021).

A próstata está localizada na região pélvica, na base da bexiga urinária, envolvendo uma porção do canal da uretra prostática (MCNEAL, 1984). É uma glândula formada por unidades túbulo-alveolares ramificadas, com epitélio de células secretoras apresentando um padrão de polaridade apical-basal, secretando para o lúmen glandular (TOIVANEN, SHEN 2017). A próstata humana difere na organização morfológica da próstata de roedores, sendo que a primeira é dividida em zonas: a zona central (ZC), que corresponde a aproximadamente 25% do volume da glândula, a zona de transição (ZT), e a zona periférica (ZP), mais volumosa, representando 70% da próstata (MCNEAL, 1988). Além das zonas, a próstata humana possui a região periuretral e a região fibromuscular ou estromal (Fig. 1) (REBELLO et al., 2021). Cada região possui uma predisposição para os tipos de patologias associadas à próstata, como neoplasias, hiperplasias e câncer (SHAPPELL, 2004).

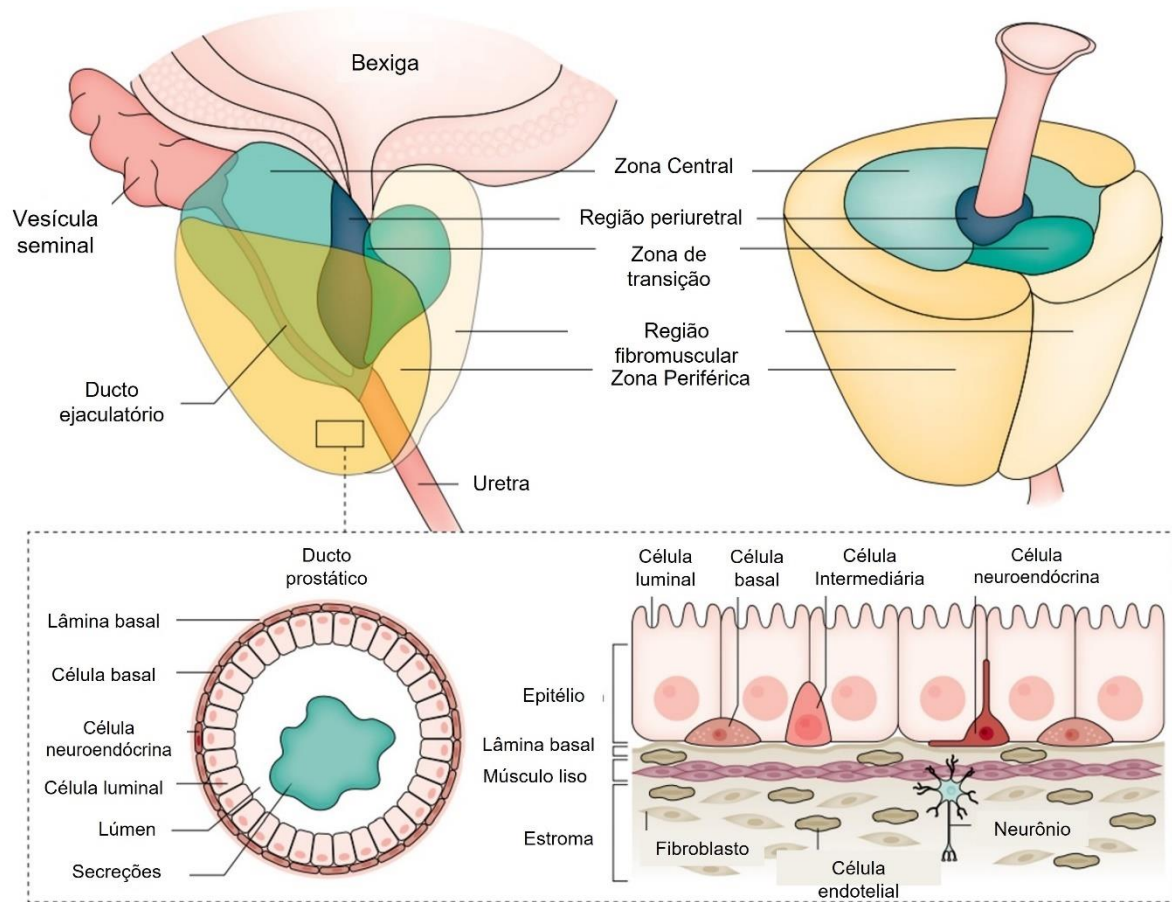


Figura 1. Esquema da estrutura anatômica e histológica da próstata humana. O primeiro, apresentando as regiões zonais: periférica, de transição e central, na base da bexiga urinária e envolvendo a uretra prostática. O esquema de baixo mostra um ácino formado por uma camada colunar simples de células secretoras, envolvidas por células basais, responsáveis pela deposição da lâmina basal. Em meio às células basais, é possível encontrar células neuroendócrinas. Na região estromal há fibroblastos, terminações de células nervosas, células musculares lisas e demais componentes (adaptado de REBELLO et al., 2021).

A próstata do rato apresenta uma organização multilobular, em pares: os lobos anteriores, o ventral, o dorsal e o lateral (Fig. 2), com particularidades nos padrões de formação e respostas moleculares diferentes (THOMSON; MARKER, 2006). Os lobos dorsais e laterais são comumente tratados como um par de lobos dorsolaterais, devido à proximidade das unidades secretoras (TOIVANEN; SHEN, 2017). O lobo anterior é caracterizado histologicamente por um epitélio apresentando muitos dobramentos ou pregas, o dorsolateral apresentando menos pregas e o ventral é minimamente pregueado (MARKER et al., 2003).

A distribuição celular nos roedores difere um pouco do humano, exceto que em ambos, o epitélio é composto de células secretoras, algumas células neuroendócrinas e células basais,

envolto por uma camada de células musculares lisas (MCNEAL, 1984; BERMAN et al., 2012; REBELLO et al., 2021). Os ductos e ácinos estão inseridos em um estroma de tecido conjuntivo vascularizado contendo fibroblastos, mastócitos e demais componentes (YU, 2011).

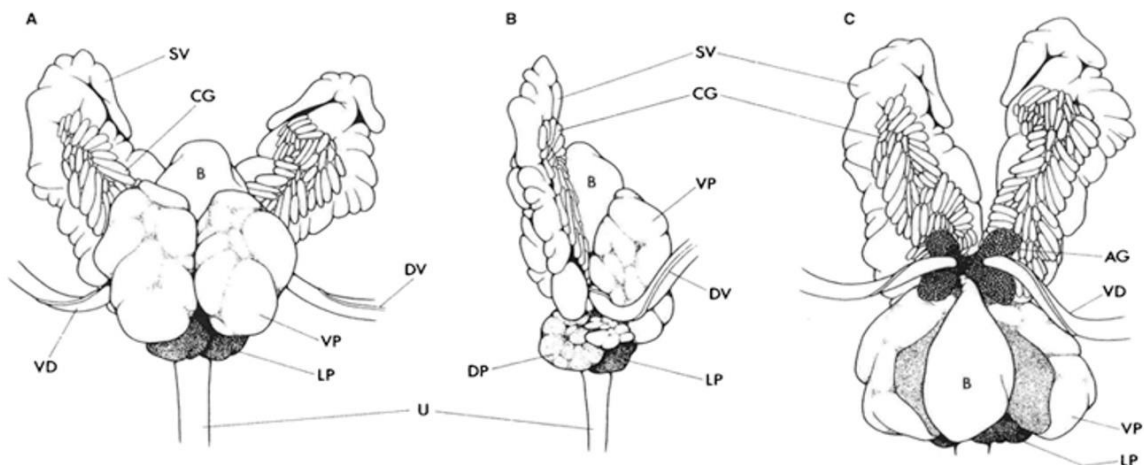


Figura 2. Desenho esquemático da próstata de rato adulto: A- visão anterior, B- visão lateral, C- visão anterior com o lobo dorsolateral inclinado à frente e a bexiga amostra. Legenda: SV- vesícula seminal, CG- glândula coaguladora, B- bexiga urinária, VD- ducto deferente, DV- vaso do ducto deferente, VP- próstata ventral, LP- próstata lateral, DP- próstata dorsal, U- uretra, AG- glândulas ampulares (TIMMS, 2008).

No homem, as células do epitélio glandular são caracterizadas histologicamente como colunares e secretam componentes como o antígeno específico da próstata (PSA) (ITTMANN *et al.*, 2018). Associadas à lâmina basal, estão as células basais e algumas células neuroendócrinas adjacentes (ITTMANN *et al.*, 2018). Em roedores, as células neuroendócrinas estão presentes em menor quantidade, entre as células basais, e o estroma é menos denso de células musculares, comparado à próstata humana (TOIVANEN; SHEN, 2017). No rato, o epitélio dos lobos ventral e lateral é formado de células luminais cuboides, enquanto o lobo dorsal apresenta células mais colunares e os ácinos são um pouco menores que dos outros lobos (ITTMANN *et al.*, 2018).

As células epiteliais secretoras possuem alta expressão de receptor de andrógeno (AR) em comparação com os outros tipos celulares, que se liga aos dois principais hormônios esteróides: a testosterona (T) e a di-hidrotestosterona (DHT). Desde o desenvolvimento, a maturação e a manutenção do funcional do tecido prostático, são processos altamente regulados

e dependentes dos hormônios sexuais, sobretudo a testosterona (MARKER et al., 2003; PRINS; PUTZ, 2008, TOIVANEN; SHEN, 2017). Os andrógenos se ligam ao AR, um receptor da superfamília de receptores nucleares que atua como fator de transcrição, desencadeando respostas primordiais de sobrevivência, desenvolvimento e na ativação de outros genes dependentes de andrógenos (PRINS, 2008; BOBERG et al., 2015).

2. *Desenvolvimento e Organogênese*

Os processos de desenvolvimento e organogênese da próstata são semelhantes entre humanos e roedores, contudo há uma considerável diferença temporal em que os eventos ocorrem nas espécies (TOIVANEN SHEN 2017). Cunha e colaboradores (1987) descreveram o desenvolvimento prostático em cinco fases: o pré-brotamento, o brotamento inicial, o alongamento, a morfogênese ramificada e canalização ductal, e a citodiferenciação (Fig. 3). O controle do desenvolvimento e da atividade prostática é bastante complexo e depende de fatores extrínsecos e intrínsecos (CUNHA et al., 2004, VILAMAIOR et al., 2006).

O desenvolvimento da próstata se inicia no período embrionário no seio urogenital (SUG), a partir do epitélio do seio urogenital primitivo (EUG) circundado pelo mesênquima (MARKER et al., 2003; TOIVANEN; SHEN 2017; BUSKIN et al., 2021). O SUG surge em camundongos machos e fêmeas aproximadamente 13 dias após a concepção (dpc) e em humanos por volta de 7 semanas de gestação (HAMILTON et al., 1959). Os seios urogenitais masculinos e femininos são morfologicamente indistinguíveis até cerca de 17,5 dpc no camundongo e 10-12 semanas em humanos, quando a morfogênese prostática começa em um processo que é iniciado e dependente de andrógenos circulantes produzidos pelos testículos fetais originando os brotos prostáticos (MARKER et al., 2003). Na primeira fase da organogênese, a ação androgênica na próstata é mediada pela DHT - metabolizada pela enzima 5α -redutase a partir da testosterona - que se liga ao AR expresso no mesênquima urogenital (MUG), iniciando assim, uma cascata de sinalizações resultando no desenvolvimento e diferenciações da próstata (BUSKIN et al., 2021).

No homem, a formação dos brotos prostáticos no EUG se inicia na décima semana de gestação (OLIVEIRA et al., 2016; TOIVANEN; SHEN, 2017), enquanto em roedores, por volta dos 16,5 dias pós coito (BHATIA-GAUR et al., 1999; TOIVANEN; SHEN, 2017). Devido aos processos hormônio-dependentes, inicia-se a formação de cordões epiteliais sólidos, e nesse estágio de desenvolvimento, por mediação do AR, se inicia a canalização ducto/acinar, com

consequente citodiferenciação do epitélio glandular da próstata (MARKER et al., 2003; TOIVANEN & SHEN, 2017) (Fig. 3). Nos roedores, a próstata é uma glândula ainda rudimentar no nascimento, enquanto no homem, a próstata já é compactada e totalmente formada (OLIVEIRA et al., 2016). A formação do lúmen acinar e a citodiferenciação do epitélio glandular da próstata, conforme apresentado por Toivanen e Shen (2017), ocorrem por volta de 15 a 20 dias após o nascimento, em ratos.

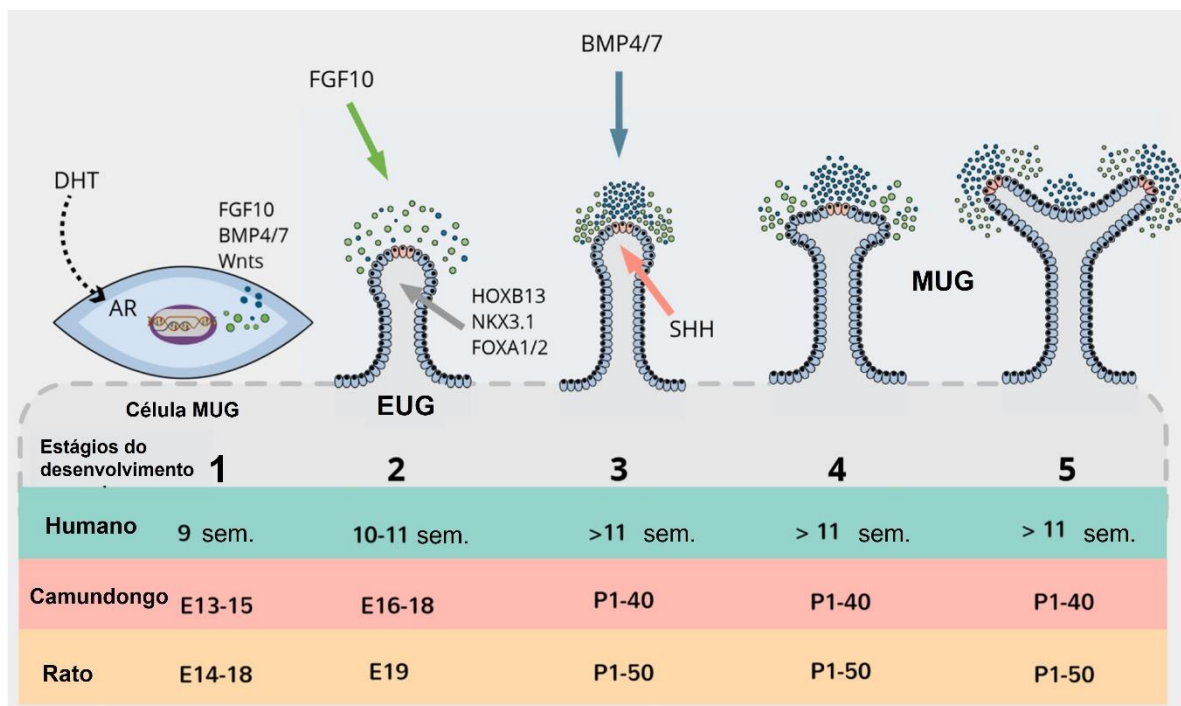


Figura 3. Desenvolvimento da próstata de humanos, camundongos e ratos. 1: fase de pré-brotamento; 2: brotamento inicial; 3: alongamento; 4: morfogênese ramificada; 5: ramificação e canalização ductal. As setas sólidas representam a localização das proteínas e a seta pontilhada representa o movimento (adaptado de BUSKIN et al., 2021).

Os processos de organogênese da próstata são direta ou indiretamente mediados por andrógenos. Os primeiros brotos epiteliais emergem devido à sinalização parácrina do mesênquima para o EUG, via AR (MARKER et al., 2003; BUSKIN et al., 2021). O desenvolvimento inicial e a organogênese prostática é determinada pela interação epitelial-mesenquimal (BOUFAIED et al., 2017). Um dos primeiros estágios do desenvolvimento é precedido da sinalização de fatores em resposta à ligação da DHT ao AR, como Fgf, Wnt, TGFbeta, Shh, Notch (BOUFAIED et al., 2017), e em particular, o NKX3. O fator NKX3 é expresso desde os primeiros brotos e durante o desenvolvimento e a organogênese da próstata,

tanto de humanos, como de ratos e camundongos (Fig.3), sendo regulado pela sinalização de Wnt (BUSKIN et al., 2021). A partir do brotamento, os ductos se originam e crescem diferentemente em cada espécie: no rato, originará os pares de lobos (OLIVEIRA et al., 2016), enquanto no homem forma as zonas prostáticas unilobular (CUNHA et al., 1987; TIMMS, 2008). No estágio final, os cordões epiteliais sólidos sofrem canalização para formar o lúmen ductal e citodiferenciação para dar origem ao epitélio glandular funcional com tipos celulares totalmente diferenciados (TOIVANEN; SHEN 2017).

3 Envelhecimento da próstata e Patologias

O envelhecimento é um processo de declínio funcional dos tecidos e órgãos, acarretando processos de deterioração a nível sistêmico ao longo do tempo, portanto, é um dos principais fatores para o aumento de diversas doenças a nível morfológico e molecular, como diabetes, doenças cardiovasculares, cânceres, osteoporose, demência etc. (MCHUHG; GIL, 2018). Acúmulos de danos no DNA, alterações epigenéticas, disfunções mitocondriais, redução de telômeros e senescência celular, são eventos descritos na literatura como intimamente associados ao envelhecimento (SCHMEER, 2019). As alterações endócrinas que ocorrem no envelhecimento são consequência da desregulação no eixo de hormônios esteróides, como a testosterona e o estrógeno (TONON; SCHOFFEN, 2009; SHAH et al., 2011; WALSH, 2011), além de alterações nos níveis de cortisol, insulina, hormônio da tireóide e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) e insulina, que são relacionados com o desenvolvimento de doenças prostáticas (CANNARELA et al., 2021). Comumente grande parte das doenças que acometem o homem, estão fortemente associadas à idade avançada, ocorrendo principalmente nos homens com mais de 50 anos, incluindo a hiperplasia benigna da próstata (HBP) e o adenocarcinoma da próstata (BIANCHI-FRIAS et al., 2010).

Estudos *in vivo* indicam que o processo de envelhecimento tem papel importante na modificação dos constituintes estromais da próstata, sinalizando um maior crescimento das células epiteliais (BIANCHI-FRIAS et al., 2010). Begley e colaboradores (2005) demonstraram com um estudo *in vitro*, que fibroblastos envelhecidos da próstata tinham uma menor capacidade de suprimir a atividade proliferativa de células epiteliais, comparadas com fibroblastos jovens, e quando co-cultivadas com linhagens pré-malignas, os fibroblastos envelhecidos promovem a proliferação destas células, sugerindo que as alterações no ambiente prostáticos em uma condição de envelhecimento, leva a respostas associadas com a promoção de patologias.

O declínio da testosterona é um fato já bem descrito como alteração associada ao envelhecimento, sendo muito comum em homens idosos e menos comum em homens de meia-idade, relacionado com o hipogonadismo. Muitos estudos também associam a diminuição androgênica a desregulações metabólicas como consequência de diabetes tipo 2, obesidade e síndrome metabólica, que também podem elevar os níveis de estrogênio (CARANNELLA et al., 2021). A exposição a certas condições, mesmo antes da velhice, pode influenciar no acúmulo de danos ou redução dos mecanismos de reparo no DNA, influenciando indiretamente a chance de ocorrência de processos patológicos, como o câncer (RICHIE et al., 2012).

Dieta e programação fetal

Nas últimas décadas observou-se no Brasil, assim como em outros países, um processo de transição nos padrões da dieta e a ocidentalização dos hábitos alimentares, com o aumento de alimentos ricos em lipídios e carboidratos (CAGIGAL et al., 2003; COUTINHO et al., 2008; SANTOS et al., 2013). A análise realizada por Micha et al. (2014), em 266 países, entre os anos 1990 e 2010, indicou que o consumo de diferentes tipos de gorduras e óleos está intimamente relacionado com fatores socioeconômicos. Constatou-se que em países mais pobres há o maior consumo de gorduras trans (de fontes caseiras ou das ruas, através de gorduras hidrogenadas), enquanto os países localizados em regiões do Mediterrâneo e da Ásia apresentam um consumo ótimo de ômega-3 (MICHA et al., 2014). Além de induzir o sobrepeso e a obesidade, o excesso de lipídios na dieta é um fator de risco não apenas para o desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes e doenças coronarianas (CAGIGAL et al., 2003; COUTINHO et al., 2008; SANTOS et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), mas também para o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer como o de mama, o de cólon e o de próstata (LOVEJOY; DIGIROLAMO, 1992; MAYER et al., 1993; PARKER et al., 1993; MARSHALL et al., 1997; MAYER-DAVIS et al., 1997; SHAH et al., 2008). Uma dieta rica em “fast-foods” proporciona baixo valor nutricional e fornece altos níveis de gordura, principalmente a saturada, o que afeta negativamente o metabolismo e a saúde de quem o ingere regularmente (ERHARDT et al., 1997). A praticidade da alimentação baseada em alimentos industrializados contribui para o consumo, de maneira geral, de alto teor em ácidos graxos poliinsaturados, gorduras saturadas, além das gorduras trans, componentes que são associados com o desenvolvimento de diversos tipos de doenças e alguns tipos de cânceres (TAMMA et al., 2015).

As consequências negativas de uma dieta com alto teor de lipídeos sobre a histofisiologia prostática e as implicações para o desenvolvimento e progressão do câncer têm sido cada vez mais investigadas na literatura (CAI et al., 2001; CAI et al., 2006; ESCOBAR et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012a, b; SILVA et al., 2015; JESUS et al., 2015). Estes dados experimentais reforçam o impacto negativo de lipídeos na dieta sobre a fisiologia da próstata e reafirmam a correlação positiva com o desenvolvimento e a progressão do câncer de próstata (CAGIGAL et al., 2003; GIOVANNUCCI et al., 2003; CHAN et al., 2005). O consumo de uma dieta rica em gordura é um fator de risco modificável estabelecido para muitos tipos de câncer, e a obesidade leva a resultados adversos em pacientes com câncer de próstata agressivo (BENESH et al., 2013).

Estudos epidemiológicos e experimentais mostraram que os substratos alimentares fornecidos ao feto durante a gravidez e ao recém-nascido imediatamente após o nascimento podem ter efeitos a longo prazo sobre a saúde e no desenvolvimento de doenças metabólicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensão e obesidade (HEERWAGEN et al., 2010; BRUCE; HANSON, 2010). Assim, uma grande variedade de desordens embrionárias e adultas são programadas pela dieta gestacional materna (BENESH et al., 2013). A hipótese da Origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD), postula que fatores ambientais gestacionais e perinatais transmitem da mãe à sua prole, a predisposição a determinadas doenças que podem se apresentar durante a vida adulta (SKOGEN; OVERLAND, 2012; BENESH et al., 2013).

Em ratos, estudos de nutrição cruzada têm mostrado que a partir da fase de lactação, o leite materno de mães obesas programa a obesidade na ninhada de mães magras (HOWIE et al., 2009; PYTOLWANCIV et al., 2016). O leite materno programa mudanças na atividade do sistema nervoso central, como os centros de ingestão alimentar do hipotálamo, além de que também pode programar órgãos e células, como as células beta pancreáticas, e até mesmo a composição da microbiota intestinal (Fig. 4) (PICÓ et al., 2020). Dados sistemáticos da literatura mostram que a influência da dieta materna na composição do leite varia significativamente de acordo com os nutrientes, sendo a lactose o conteúdo aparentemente mais resistente às variações na ingestão materna, enquanto os lipídios, as vitaminas e mesmo a leptina, tem os mesmos níveis daqueles que estão presentes na dieta materna (LAURITZEN et al., 2002; BRAVI et al., 2016; KEIKHA et al., 2017).

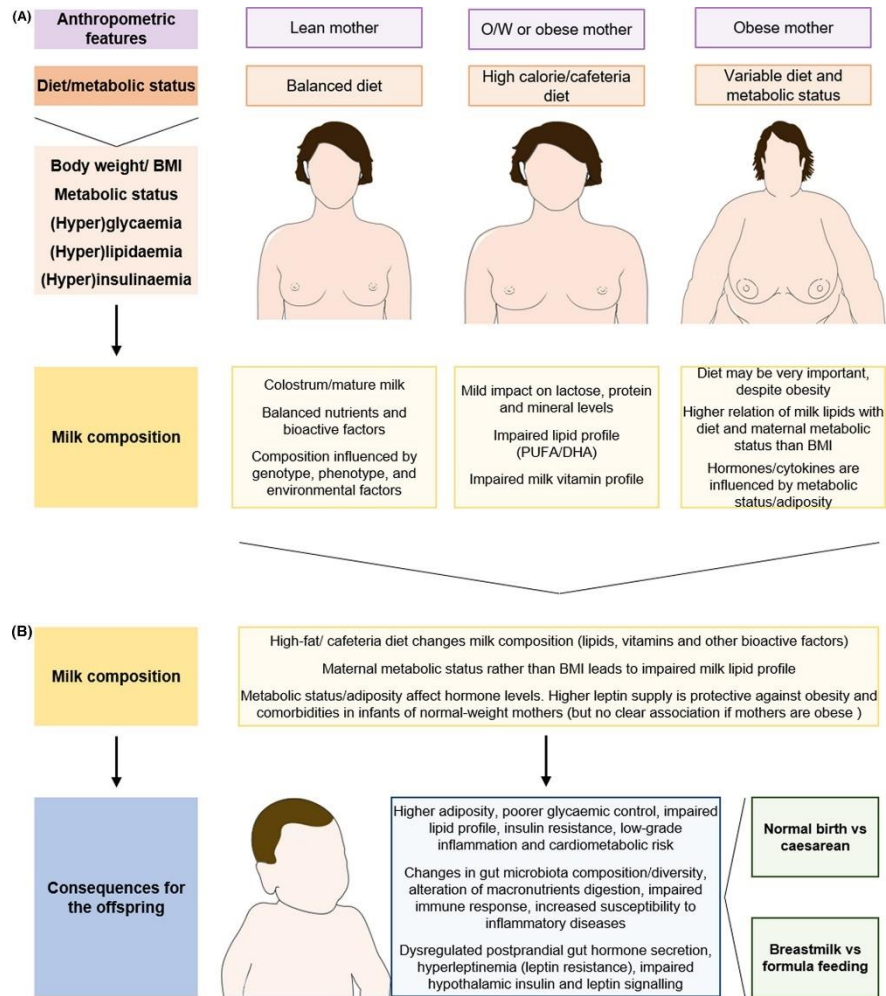


Figura 4. A- Diferenças na composição do leite de mães magras e com sobrepeso (O/W) e como consequência dos hábitos alimentares durante o período de amamentação. As variações na composição do leite ocorrem devido a fatores genéticos, bem como de acordo com as condições ambientais e maternas, principalmente o estado metabólico e os hábitos alimentares. B- Mudanças na composição do leite demonstraram ser responsáveis por alterações metabólicas e na programação da prole, que podem estar parcialmente relacionadas à colonização inadequada da microbiota intestinal (adaptado de PICÓ et al., 2020).

OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivo investigar a influência do ambiente nutricional rico em lipídeos (ANRL), em diferentes períodos ontogenéticos, sobre a histofisiologia da próstata de ratos em idade avançada. As respostas teciduais do lobo prostático ventral e do dorsolateral foram examinadas com base nas alterações morfológicas e proliferativas, na incidência de lesões patológicas, na expressão tecidual de receptores nucleares e de outros marcadores. Foram analisados os seguintes períodos de exposição ao ANRL: (1) gestação, (2) gestação e lactação, (3) a partir do desmame, (4) a partir da lactação e (5) por toda a vida (da vida intra-uterina e pós-natal). Assim, o presente estudo pretende esclarecer as seguintes questões:

- 1) Qual o impacto da obesidade materna induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica sobre a histofisiologia prostática, utilizando grupos expostos ao ANRL durante a gestação ou nas fases de gestação- amamentação;
- 2) Qual o impacto da exposição ao ANRL por toda a vida, ou seja, obesidade materna/dieta hiperlipídica na gestação e amamentação, seguida do consumo de dieta hiperlipídica ao longo da vida;
- 3) Qual o impacto da exposição do ANRL durante toda a vida pós-natal, ou seja, a partir de fase de amamentação ou da fase de desmame;

RESULTADOS

Os dados resultados desse trabalho foram organizados em dois manuscritos, que focalizam o lobo ventral (Capítulo 1) e o dorsolateral (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

HIGH-LIPID NUTRITIONAL ENVIRONMENT IN DIFFERENT ONTOGENETIC PERIODS INDUCE DEVELOPMENTAL PROGRAMMING OF RAT PROSTATE AT AGING

Manuscrito submetido para a Revista “Reproduction”

**High-lipid nutritional environment in different ontogenetic periods induce
developmental programming of rat prostate at aging**

Tatiane Pereira Scarpelli¹, Eloisa Zanin Pytlowanciv^{1,2}, Maria Etelvina Pinto-Fochi ^{1, 3},
Sebastião Roberto Taboga¹, Rejane Maira Góes^{1*}

¹ Departament of Biological Sciences, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

³ Faculdade de Medicina, União das Faculdades dos Grandes Lagos (UNILAGO), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

*Corresponding author: E-mail: rejane.goes@unesp.br

Short title: Developmental programming of prostate

Abstract

Maternal obesity and high-fat diet (HFD) affect permanently prostate histophysiology in adulthood, but the consequences during aging are unknown. Here we evaluated the prostate alterations in middle-aged rats subjected to a high-lipid nutritional environment (HLE) in different ontogenetic periods. Wistar rats (56 wk.a.) were assigned into groups exposed to standard nutrition (C) or HLE during gestation (G), gestation and lactation (GL), from lactation onward (L), from weaning onward (W) and from gestation onwards (AL). HLE in the periods after weaning consisted of HFD (20% fat) and during gestation and lactation it also included previous maternal obesity induced by the HFD. HLE increased total cholesterol and triglycerides levels in all groups and led to insulin resistance in GL and AL and obesity in L. Serum testosterone levels decreased ~67% in GL, ~146% in L and W, and ~233% in AL. Histological and stereological analysis revealed an increment of the stromal compartment and collagen fibers in the prostates of all HLE groups, as well as degenerative lesions, such as cell vacuolation and prostate concretions. HLE aggravated acinar atrophy in G, GL, and L and in AL it reached more than 50% of the prostate area for most animals. The foci of prostatic intra-epithelial neoplasia (PIN) increased in AL. Tissue expression of androgen receptor did not vary among groups, except for a higher stromal expression for G and GL. Even when restricted to gestation and lactation, HLE induces diffuse acinar atrophy in the aging prostate and worsens degenerative and premalignant lesions when it continues throughout life.

Keywords: prostate, histopathology, DOHaD, maternal obesity, lipids, high-fat diet.

In Brief

Maternal obesity plus high-fat diet in breastfeeding induces stromal hyperplasia and diffuse acinar atrophy in the rat prostate at aging, related to dyslipidemia and testosterone reduction.

The high-lipid nutritional environment from intrauterine and throughout life favors the development of prostatic intra-epithelial neoplasia and aggravated degenerative alterations in the gland.

INTRODUCTION

The prostate is an accessory gland of the male genital tract responsible for secretion of

a wide range of substances which enhance the fertility rate in eutherian mammals. In men, this gland is subject to changes during aging, especially hyperplasia and prostate adenocarcinoma (Vuichoud *et al.*, 2015; Madersbacher *et al.* 2019; Cannarella *et al.*, 2021; National Cancer Institute, 2021; Rebello *et al.*, 2021), alterations that have also been investigated in experimental studies with rodents (Sanches *et al.*, 2020; Freeland *et al.*, 2021; Tamarindo *et al.*, 2021). Prostate adenocarcinoma (PCa) is the most frequent type of cancer in men and the fifth leading cause of death worldwide, with highest prevalence in developed countries (Rawla, 2019; Sung *et al.*, 2021). In 2020, there were estimated 1.4 million new cases and 375,000 deaths caused by PCa worldwide (Sung *et al.*, 2021). PCa, more than any other type of cancer, is considered a cancer of the elderly, as approximately 75% of the cases worldwide occur after 65 years of age (Rawla, 2019). Benign prostatic hyperplasia (BPH) affects 30-40% of men, being considered the most frequent disease in aging men, with a prevalence of 5%-10% in men aged 40 and about 80% in men aged 70–80 (Vuichoud *et al.*, 2015; Madersbacher *et al.*, 2019). Such pathological increase in the volume of the prostate usually affects the transition zone and is due to cellular proliferation, inflammatory response, deregulation of sexual steroids, and metabolic alterations, such as metabolic syndrome, obesity, dyslipidemia and diabetes (Madersbacher *et al.*, 2019; Cannarella *et al.*, 2021). Prostate diseases are known to be related to epigenetic alterations and reprogramming of several factors; however, the influence maternal obesity and high-fat nutrition have on prostate health at aging is still little studied (National Cancer Institute, 2021; Pomerantz *et al.*, 2020; Rebello *et al.*, 2021).

The development, maturation and aging of prostate are complex processes and regulated by both extrinsic and intrinsic factors; sexual steroids, such as testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT), have crucial roles (Thomson & Cunha, 1999; Cunha *et al.*, 2004; Prins & Korach, 2008; Toivanen & Shen, 2017). Prostate development begins in the mesenchyme of urogenital sinus under the influence of DHT, which acts via the androgen receptor (AR) (Thomson & Cunha, 1999; Prins & Korach, 2008; Toivanen & Shen, 2017). The initial morphogenesis sequence of the prostatic buds follows the same pattern in humans and rodents (Marker *et al.*, 2003; Vilamaior *et al.*, 2006; Timms, 2008; Oliveira *et al.*, 2016). In humans, the formation of prostatic buds begins in the 10–12th week of gestation (Oliveira *et al.*, 2016; Toivanen & Shen, 2017), while in rodents, it happens around the 16.5th day post-coitum (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Toivanen & Shen, 2017). However, postnatal development differs in the two groups because in humans there is a rise of testosterone shortly after birth, in the period known as “mini-puberty”, which plays a crucial role in prostate development, following by a

period of decrease in T levels and prostate volume, when prostate growth remains quiescent until puberty (Toivanen & Shen, 2017). During puberty, an increase in T triggers a second phase of growth for the human prostate and later, at middle adulthood, there is a third phase of prostate proliferation, which will continue up to the old age, yet involving mainly the transition zone (Schauer *et al.*, 2011). During this period, the changes in the levels of sex steroids and the increase in the estrogen/testosterone ratio are accompanied by alterations in the expression of AR and estrogen receptors (ER) (Prins *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2011; Walsh, 2011).

In recent decades, overweight and obesity rates have increased worldwide, with an estimate that in 2016, 50% of women of reproductive age in Latin America and the Caribbean were either overweight or obese (Osório-Costa *et al.*, 2009; Ogden *et al.*, 2014; WHO, 2016). Furthermore, there is an increase in the prevalence of pre-gestation obesity, especially in the USA (Desai *et al.*, 2014). Maternal obesity can lead to metabolic impairment of offspring at birth, which can extend into adulthood (Symonds, 2007; Sullivan *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2014; Brodowski *et al.*, 2019). The development of the fetus and the newborn is extremely sensitive to hormonal disturbances and to maternal nutritional and metabolic status (Sullivan *et al.*, 2010). Thus, acute or chronic stimuli during the gestation and perinatal period can produce persistent effects on the structure, physiology, and metabolism of various organs, through epigenetic mechanisms, which may impair their functioning — a process known as Developmental Origin of Health and Diseases (Armitage *et al.*, 2005; Evagelidou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Drake *et al.*, 2011).

In the last decades, increased interest has been directed toward the impact of excessive dietary lipids on prostate development and health. In general, clinical data show a positive correlation between excessive consumption of lipids and PCa and BPH (Lovegrove *et al.*, 2015; Stoykova & Schlaepfer *et al.*, 2019; Mann *et al.*, 2020, National Cancer Institute 2021). Such findings are corroborated by experimental studies (Ribeiro *et al.*, 2012 a, b; Benesh *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2009; Furriel *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Tamarindo *et al.*, 2021). A high-lipid nutritional environment (HLE) during gestation and lactation induces a hyperproliferative status to the adult prostate, with perturbations on AR, ER and other nuclear receptors, such as Liver X receptor alpha (LXR α) and Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ (De Jesus *et al.*, 2015; Pytlowanciv *et al.*, 2016). Also, the hyperproliferation observed in the prostate from the mice of mothers which were fed a high-fat diet (HFD) was related to a higher activation of Pten and Akt signaling (Benesh *et al.*, 2013). However, the consequences of

maternal or perinatal HLE for the developmental programming prostate at aging is largely unknown. Nor is it known whether these consequences are exacerbated by a high-fat diet later in life. The present study compared alterations in the prostate of middle-aged rats subjected to a high-lipid nutritional environment in different ontogenetic periods, namely, (1) gestation, (2) gestation and lactation, (3) from weaning onward, (4) from lactation onward, and (5) for all life (from intra-uterine to postnatal life).

MATERIALS AND METHODS

Animals and diet

In the present study 60 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) at 56 weeks of age were used. They were submitted to a high-lipid nutritional environment (HLE) in different phases of life and divided into six experimental groups. To obtain the groups, initially, twenty male and twenty female rats at 4 weeks old were purchased from ANILAB Company—Laboratory Animals (Paulinia/SP). These animals received standard rodent diet up to 8 weeks old, when the females were divided into two groups: 1) continued to be fed with a balanced rat diet (4% lipid) and 2) subjected to HLE by a high-fat diet containing 20% of lipid (Table 1). The HFD used in this study was standardized by the Experimental Laboratory of the Medical Clinic of the Faculty of Medicine of Botucatu – UNESP (Nascimento *et al.*, 2008) according to the information provided by the suppliers; through previous experiments carried out in our laboratory (Ribeiro *et al.*, 2012a, b) it was confirmed that maternal obesity was induced after 15 weeks with this type of diet. After 15 weeks, females were mated with lean males, and the same nutritional regime was maintained during gestation. At birth, the litters born from HFD mothers were reduced to five pups per mother, to standardize the food offer during lactation. In addition, at birth, some pups were cross-fostered to a mother with a different nutritional environment from that of gestation. Thus, as detailed in Figure 1, the following experimental groups were obtained (n=10 per group): C (*control*) – rats born from mothers fed with conventional murine chow (lean) and fed with the same chow from weaning onward; G (*HLE during gestation*) – rats born from mothers treated with a high-fat diet, subjected to cross-fostering to lean mothers for lactation, following conventional chow feeding from weaning onward; GL (*HLE during gestation and lactation*) – rats born and fed by mothers treated with a high-fat diet and standard diet from weaning onward; W (*HLE from weaning onward*) – rats born from lean mothers and fed with a high-fat diet from weaning onward; L (*HLE from lactation onward*) – rats born from lean mothers, cross-fostered to HFD-treated mothers for

lactation and fed with HFD from weaning onward; AL (*HLE from gestation onward*) – rats born and fed by HFD-treated mothers and with HFD from weaning onward.

The animals were kept in polyethylene boxes, with the substrate of wood shavings, under controlled light conditions (12h light/dark cycle) and the average temperature of 24°C, with filtered water and the specific food *ad libitum*. The experiments were carried out following the "Ethical Principles in Animal Experimentation" adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), having been approved by the Ethics Committee in the Use of Animals of IBILCE-UNESP (CEUA/IBILCE protocol nº 88 /2013) (Annex 1). The animals were euthanized by isoflurane inhalation followed by decapitation.

Metabolic and physiological parameters

Body weight and waist circumference measurements were taken at weaning (4 week of age) and before euthanasia. Blood glucose was determined using an “Accu-Chek Active” tape system (digital monitor) (Roche Diagnostics), also before euthanasia. In the week before euthanasia, intraperitoneal insulin tolerance tests were performed (ipITT). Animals were anesthetized with Pentobarbital Sodium 3% (Hypnol -Syntec, SP, Brazil; 30 mg/kg) following the measurement of the basal glycemia (time 0) and an intraperitoneal injection of insulin (2 U/kg body weight; Humulin, Eli Lilly and Company, IN). Blood samples were collected from the tips of the paws at times 15, 30, and 45 min after insulin for measuring glycemia. The glucose decay constant (Kitt) was calculated from the slope of the regression line obtained using log-transformed glucose values between 0 and 45 min (Rafacho *et al.*, 2007).

After euthanasia, retroperitoneal, visceral, epididymal, and periprostatic fat deposits were isolated and weighed to determine the adiposity index [(sum of retroperitoneal, visceral, and epididymal fat/body weight) x 100] (Taylor & Phillips, 1996; Jeyakumar *et al.*, 2009). The collected blood samples were centrifuged at 1,200g for 20 minutes and the serum was used for assessing testosterone and estradiol by the Capture/Sandwich ELISA method (antibody-antigen-antibody) using specific commercial kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; sensitivity: 0.030 ng/mL) and for determining total cholesterol, HDL (high-density lipoprotein cholesterol), LDL (low-density lipoprotein cholesterol), and triglycerides, through enzymatic tests (In vitro Diagnóstica Ltda, Itabira, MG, Brazil). For the ELISA analysis, seven animals per group were used, all in duplicate. Lipid profile analyses and ELISA were performed in a SpectraMax-Plus 384 reader (Molecular Devices, CA, USA).

Histological processing and stereological analyses

The ventral prostate lobes were isolated and wet weight was determined. Then, prostate lobes were fixed by immersion in a 4% paraformaldehyde solution, for 24 hours or in Metacarn (60% methanol, 30% chloroform, and 10% acetic acid), for 3 hours and embedded in Paraplast (Merck) to obtain histological sections (4µm thick).

To estimate the relative frequency of prostate tissue compartments, tissue sections were stained with Tuchmann's Blue trichrome and submitted to Weibel's point counting method (Weibel, 1966). The microscopic images of tissue sections were obtained with a Zeiss-Jenaval microscope, AxioCam HRc digital camera coupled, and AxioVision Image analysis system (Carl-Zeiss, Jena, Germany). Images from 20 contiguous microscopic fields at x400 magnification per animal were used; a 130-point reticulum was overlaid for determining the relative frequency of the acinar epithelium, lumen, stroma, and stromal components (De Jesus *et al.*, 2015).

Histopathological analysis

For the histopathological analysis, the whole tissue section of the prostate lobe stained with Haematoxylin-eosin was digitized with an Olympus Virtual Slide System scanner (VS120-S5-OAI). The whole section was examined for identifying the main pathological changes, based on the work by Creasy *et al.*, (2012) and other researchers (Shappel *et al.*, 2004; Rosa-Ribeiro *et al.*, 2014). The main pathological alterations observed were recognized as: (1) *Diffuse epithelial atrophy with a cystic pattern* – characterized by large reduction in cytoplasmic volume, very low or even squamous epithelium and wide acinar lumen; (2) *Single-cell necrosis* – isolated cells undergoing necrotic death in the epithelium, characterized by pyknotic nucleus, due to chromatin compaction, a very evident halo around the nucleus and very clear cytoplasm; (3) *Cell detachment* – collective cell death, characterized by cells adhered to each other, found loose in the lumen of the acini, with the appearance of necrotic cells, often in rows of cells that seem to detach from the basal lamina of the epithelium; (4) *Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)* – a focal lesion, characterized by an increase in the proliferation of atypical cells, which show enlarged nuclei and evident nucleolus (low-grade PIN), with a cribriform or papillary aspect (high-grade PIN); (5) *Inflammatory infiltrates* – periacinar areas containing at least ten lymphocytic or other inflammatory cells; (6) *Cytoplasmic vacuolization* – a focal epithelial atypia also called vacuolar or hydropic degeneration, where cells are in the process of

degeneration and can accumulate fluid or lipids, such as the formed vacuole. Consequently, the cell is disformed, the nucleus is displaced, becoming flattened; (7) *Prostatic concretions – corpora amylacea* or other prostatic concretions found in the lumen of the acinus, with a basophilic or eosinophilic aspect, depending on the nature of the concretions.

For estimating the diffuse atrophy, prostates were classified according to the area showing such alteration at the following grades: 1) less than 25%; 2) 26-50%; 3) 51-75%; and 4) greater than 76% of total tissue area. Then, the percentage of animals at each grade was expressed in percentage terms for each group. For estimating the frequency of prostatic concretions and cytoplasmic vacuolization, the whole sections were examined, the number of acini with these alterations was counted and each animal was classified according to the following score: 0) absent; 1) up to 10 acini; 2) between 10 and 20 acini; and 3) more than 20 acini. The other lesions were evaluated for the multiplicity of lesions (number of lesion foci in each histological section).

Immunohistochemistry

Tissue sections of the ventral prostate previously fixed in Paraformaldehyde were submitted to antigen retrieval in citrate buffer (10mM pH 6.0) at 92°C for 40 minutes followed by 20 minutes at room temperature. Endogenous peroxidase blocking was performed with 3% H₂O₂ in methanol, for 20 min, in the dark, followed by blocking of nonspecific proteins with nonfat milk at 5% diluted in PBS (PCNA) or TBS (AR) buffer for 40 min. The sections were incubated with primary antibody diluted in BSA 1% with anti-PCNA (1:100, sc-56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 1 hour at 37°C or anti-AR (1:75, sc816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight at 4°C. Antigen-antibody interaction was detected using the Max Polymer kit (Novocastra, RE7260-K, Leica Biosystems) and the reaction was revealed with diaminobenzidine DAB (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako, K3468) for 3 or 2 min. with counterstaining in Harris Hematoxylin.

The density of PCNA-positive cells (cell number/mm²) was estimated in the whole tissue section previously digitized with Olympus Virtual Slide System scanner (VS120-S5-OAI), with a 20x objective. For estimating the relative frequency of AR-positive cells in the epithelium and stroma, 20 contiguous microscopic fields (digitized with a 20x objective) per animal were used; the total number of cells and the number of marked cells were determined. These analyses were performed using the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics version

4.5 for Windows, MD, USA) and 5 animals per group. The mean values and standard deviation were represented.

Statistical Analysis

The quantitative parameters obtained were statistically evaluated using the GraphPad Prism 6.1 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Firstly, we evaluated the normality of the data. For parametric data, the One-way ANOVA method was applied, using the post-hoc Tukey test, and for non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was applied, followed by Dunns test for multiple comparisons between groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Metabolic and hormonal analysis

Body weight, weight gain, and waist circumference remained unchanged for G, GL and AL groups when compared to C group (Table 2). W group had lower body weight in comparison to C, yet weight gain and waist circumference remained unchanged. L group had higher body weight, weight gain, and waist circumference compared to C (Table 2). Fat deposit weights also increased in this group, including periprostatic fat, resulting in ~37% increase in adiposity index (Table 2). Neither these deposits nor adiposity index were altered in other groups.

W and L had higher glycemia (Fig. 2A), while GL and AL had insulin resistance evidenced by the glucose decay constant (Fig. 2B). According to the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT), glycemic values of GL and AL remained higher even after a high dose of insulin, in the periods of 15, 30, and 45 minutes, thus showing a deficiency of insulin action in glycemic normalization.

Total cholesterol (Fig. 2C), triglyceride (Fig. 2D), and LDL levels (Fig 2F) increased in all groups exposed to the HLE, compared to C. This alteration was accompanied by a decrease in HDL levels in GL, W, L and AL groups (139%, 115%, 87%, 133%, respectively) (Fig. 2E). Compared to C, plasma testosterone levels (Fig. 3A) decreased ~34% in G ($p=0.07$), ~ 67% in GL, ~146% in L and W, and ~233% in AL ($p < 0.05$). There were no differences in estradiol levels among the groups (Fig. 3B).

Prostate alterations

The wet and relative prostate weight did not change in the groups; however, the weight of the prostate complex increased in AL compared to C (Table 2). Ventral prostates of C had large acini with columnar epithelium, and sparse stroma (Figs. 4A, 5A). The stereological analysis showed a reduction in relative frequency of acinar epithelium, of ~22% in GL and AL, and ~10% in G and L groups (Fig. 4B). W was the only exception to this pattern, with a relative frequency of acinar epithelium ~24% higher (Fig. 4B). The frequency values of luminal compartment decreased in G and W (~12%), and in L and AL (~25%) (Fig. 4B). The stromal compartment increased ~39% in G and GL, ~69% in L, and ~86% in AL (Fig. 4B), due to the increase in collagen fibers (Fig. 4C). In addition, there was an increase in the frequency of blood vessels in GL, W, and AL groups (Fig. 4C).

As shown in Figures 5 to 7, the prostates of all groups, including C, had all kinds of pathological lesions, yet they were more frequent in the HLE-groups. Higher levels of atrophy were observed in G and AL, of which 75% and 90% of animals showed grades 3 and 4 of atrophy, respectively, whereas GL and L had a lower incidence of these grades (Fig. 5). W had a more attenuated profile of diffuse atrophy, with only 8% of animals at grade 4 (Fig. 5). When compared to C, cell vacuolization increased in the prostates of G, in which 100% of animals were at grade 1 (Fig. 6F). Most animals in the GL, L, and AL groups also presented grade 1 of cell vacuolization, yet for these groups ~8% of animals cell vacuolation was more frequent (grade 2) (Fig. 6F). Grade 3 prostatic concretions were more frequent in AL (22%), followed by GL (8%) (Figure 6F). No difference was found in multiplicity single-cell necrosis or cell detachment among the groups (Fig. 7). PIN foci did not differ statistically among the other groups, except for AL, which showed increased foci of low-grade PINs compared to C ($p=0.037$) (Fig. 7I). No high-grade PINs were identified (Fig. 7). Although isolated inflammatory cells were found in all groups, no inflammatory infiltrate foci were observed in the C and W groups and few were detected in G, GL, L and AL, which showed an incidence of 17, 25, 7 and 15%, respectively.

When compared to C, the proliferating cells (PCNA-positive cells) did not vary among the groups, except for AL, which had higher levels (Fig.8A-D). The frequency of AR-positive cells (Fig. 9 A-D) increased in the stroma of G and GL, compared to C (Fig. 9F) and did not alter in acinar epithelium of any groups (Fig 9E).

DISCUSSION

Most studies about developmental programming of the prostate by maternal high-fat diet focus on the effects during adulthood (Pytlowanciv *et al.*, 2016; Campos-Silva *et al.*, 2020) and, to the best of our knowledge, this is the first study to address the consequences at older ages. We also examine the interference of postnatal high-lipid nutritional environment (HLE) in these alterations. We observed that, even when restricted to gestation and lactation (maternal obesity + HFD), HLE affected prostate histology at aging and increased degenerative alterations, which became worse if HLE continued throughout life. HLE induced dyslipidemia, regardless of the ontogenetic period of exposure, and reduced testosterone levels, except for the G group.

Although morphological changes caused in the prostate by HLE in gestation and lactation may go unnoticed, using stereological analyses we show that histological alterations indeed occur, with an increase in gland stroma and collagen fibers for groups G and GL, and a decrease in acinar epithelium counterparts in the latter. Stroma increments were higher if HLE continued throughout life (AL group) and also occurred in the L group. The increase in prostate stroma and collagen fibers can be characterized as mild stromal hyperplasia and had been previously observed in adult prostate of offspring subjected to the similar HLE used herein, even when restricted to gestation only (Pytlowanciv *et al.*, 2016). It had also been reported in adult prostate after HFD, diabetes, and estradiol treatment (Scarano *et al.*, 2005 Ribeiro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015). Hence, stromal hyperplasia seems to be a common result of the obesogenic environment, even if restricted to maternal nutrition (G and GL groups). Considering that blood glucose or estrogen levels were unchanged in G and GL, we hypothesize that this stromal remodeling with accumulation of collagenous components may have been caused by epigenetic alterations which resulted in modulation of growth factor signaling in the gland. Then, HLE in gestation and lactation may have altered epigenetically the expression of paracrine factors modulators of extracellular matrix, such as TGF β metalloproteinases, TNF- α , and IL-6 (Fukabori *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2015; Mirzaei *et al.*, 2022). Stromal remodeling and collagen increment are critical events of BPH, whose etiology is complex (Madesbracher *et al.*, 2019; Devlin *et al.*, 2020); in addition, several mechanisms previously described to BPH were observed in all groups in the present study, e.g., dyslipidemia, or in a variable way among the groups, e.g., insulin resistance and obesity. However, prostate weight was not affected in any group, neither proliferative nor inflammatory alterations occurred.

Based on our data, we concluded that the prostate response is preferentially atrophic, assuming a cystic pattern in groups exposed during gestation or lactation (G, GL, L, and AL) and an involution profile in group exposed to HLE from weaning onward (W).

All degenerative alterations detected in our study to the prostate of control middle-aged rats, such as prostate concretions, cell vacuolation, and acinar epithelium atrophy, had been previously described in aged prostate (Tamarindo *et al.*, 2020). Our results indicate that HLE, regardless of the ontogenetic period of exposure, exacerbates these alterations and aggravates prostate aging, even when via maternal nutrition only. Acinar epithelium atrophy was particularly exacerbated by HLE, being that 90% of animals had more than 50% of prostate containing atrophic areas. This diffuse epithelial atrophy is a typical alteration of aging, characterized by numerous low-epithelial acini scattered throughout the prostate (Billis, 2010; Isaacs, 1984). The acinar atrophy observed herein did not have proliferative or inflammatory features, and it was not similar to Proliferative Inflammatory Atrophy (PIA), which has been related to promoting high-grade PIN and prostate carcinogenesis (De Marzo *et al.*, 1999). In contrast, it may be featured by reduction of secretory activity of the gland, without inflammatory or proliferative disturbances. The groups showing higher levels of epithelial atrophy (GL, L and AL) also had lower concentrations of testosterone. Considering that testosterone is the main trophic factor for prostate cells and regulator of their secretory activity and proliferation, such acinar atrophy probably results from its low levels (Wright *et al.*, 1996; Creasy *et al.*, 2012), which may have impaired histology and gland functionality. When rats were treated from adult age for 30 weeks with a similar HFD to ours, epithelial atrophy was also observed, while the distal region of the gland had notable epithelial hyperplasia (Silva *et al.*, 2015). We also found areas of epithelial hyperplasia in the group exposed to HLE after weaning (W), in which the percentage of acinar epithelium increased, and acinar atrophy was also frequent. The histological alterations we observed in L, W and AL groups, when compared with those described after 30 weeks of HFD intake (Silva *et al.*, 2015), suggest a shift from a hyperplastic to an atrophic profile for the acinar epithelium, as HLE continued during aging.

HLE also increased the cytoplasmic vacuolization. Such degenerative alteration was observed at a low frequency for 100% of animals (grade 1) in G and at higher frequencies in GL, L and AL groups. Cytoplasmic vacuolization results from osmotic disturbances in organelles of the endosomal-lysosomal pathway, with fluid drainage by osmotic pressure resulting in a "swelling" of the cells (Aki *et al.*, 2012; Shubin *et al.*, 2016). Besides being a

response to the osmotic stress triggered in the endoplasmic reticulum by HLE, cytoplasmic vacuolization can also be triggered by changes in the metabolism of the cells, which precede cell death at some point. In this context, further studies are needed to understand the mechanism by which such changes occurred (Shubin *et al.*, 2016, Sperandio *et al.*, 2004).

Prostatic concretions have been related to several physiological changes during aging in the human and rodent prostate and reflect a degenerative condition of the gland (Röcken, Linke, Saeger, 1996; Creasy *et al.*, 2012). We observed an increase in prostatic concretions in GL, L and AL which were seen as basophilic or eosinophilic bodies, probably originated from prostatic cells which died and became concentrated in the acinus lumen, being related to epithelial atrophy (Röcken, Linke, Saeger, 1996; Creasy *et al.*, 2012). They were also seen as *corpora amylacea*, which are composed by polysaccharides originated from granules of inflammatory cells, such as neutrophils, being related to a chronic inflammatory process or associated to other degenerative changes (Dupre *et al.*, 2018; Sfanos, Isaacs, De Marzo, 2013). An increment of *corpora amylacea* was found in the prostate of aged rats fed from the 24th to 62nd week of age with HFD and was also associated to epithelial atrophy and PINs (Tamarindo *et al.*, 2021). In that study, a treatment with antioxidant melatonin avoided *corpora amylacea* formation, and stimulated prostatic glutathione-S-transferase activity. An increase in prostatic concretions observed to HLE groups may reflect the degenerative effects of lipids via oxidative damages. Although obesity has been related to a higher incidence of prostatic concretions in men, through the secretion of cytokines from adipocytes, conditioning the prostate and prostatic concretions to a pro-inflammatory environment, the implications for carcinogenesis are still unclear (Dupre *et al.*, 2018).

AL was the only group with a higher frequency of PINs. A PIN is a premalignant lesion related to the development of PCa (Bostwick, 2010; Haffner *et al.*, 2016). This neoplasm is identified as an atypical proliferation, characterized by cell sheets and marked nuclear atypia (Berman *et al.*, 2000; Shapell *et al.*, 2004). In addition, AL was the only group in which carcinoma *in situ* was found, which is coherent with the increased PIN. Excessive dietary fat is known to stimulate the appearance and progression of lesions such as PIN in rodent prostate (De Jesus *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015). However, only one focus of carcinoma *in situ* was observed in one animal of the AL group. Then, the hypothesis that HLE throughout life favors PCa in the rat at this age is not validated by the present data.

Figure 10 summarizes the metabolic and hormonal alterations caused by HLE in different ontogenetic periods. As shown, regardless of the ontogenetic period, HLE induced dyslipidemia in the aged offspring and reduced serum testosterone levels in all groups, except for G. HLE (maternal obesity + HFD), even when restricted only to gestation (G), led to permanent alterations in lipid metabolism and dyslipidemia in the aged offspring and if continued on during lactation (GL), it also caused insulin resistance and reduced testosterone levels (hypogonadism). These results indicate that HLE during lactation exacerbates metabolic and steroidogenic impairments to offspring at aging. HFD throughout all postnatal life (W group, which was exposed to HLE from weaning onward) induced dyslipidemia, insulin resistance, discrete hyperglycemia (~120mg/dl) and hypogonadism, yet not obesity. According to our data, the only group with obesity was the one exposed to HLE from lactation onward (L). This suggests that lactation is a critical period for developmental reprogramming of obesity at aging, as it has been demonstrated to adulthood (Agnoux et al., 2014). The dyslipidemia detected herein was characterized by higher serum levels of total cholesterol, triglycerides and LDL with detriment of HDL levels; the latter was not observed to G group. Although all groups had a similar profile of dyslipidemia, we should consider that for G group it involves epigenetic mechanisms related to the regulation of the expression of enzymes or cofactors involved in lipid synthesis, whereas for GL, besides this, there are other mechanisms related to insulin resistance and liver metabolism which may occur as well. The exposure to maternal obesity during gestation and lactation resulted in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease in mice, indicating insulin resistance as the driver for these alterations (Oben *et al*, 2010). Several mechanisms are involved in the developmental programming of lipid metabolism by maternal obesity, including the action of milk leptin (Oben *et al*, 2010). The decrease in serum testosterone levels in all experimental groups (except for G) may have contributed to changes in energy metabolism, by action on the liver and skeletal muscles. In this context, testosterone plays a role with insulin in glycemic control, including the translocation of GLUT4 (glucose transporter) in muscle cells, illustrating a positive correlation with muscle glucose uptake (Pasquali, Gambineri, 2006). The low levels of testosterone identified in the aged animals seem to be related to the insulin resistance also described in the results.

We previously evaluated the effects of the same periods of HLE used herein on the testicular steroidogenesis of adult rat offspring and, similarly, the impairment on testosterone synthesis was observed to all groups, except for the group exposed only during gestation (G) (Pinto-Fochi *et al.*, 2016). We noticed that functional capacity of Leydig cells occurred due

to the atrophy of these cells in GL, which in L and AL groups was added to deregulation of leptin, a relevant regulator of steroidogenesis in these cells (Pinto-Fochi *et al.*, 2016). Therefore, our data confirm that this model of maternal obesity leads to permanent impairment of steroidogenic capacity with reduced circulating testosterone until older age. The reduction in serum testosterone levels was a pivotal mechanism leading to histological and degenerative alterations in the prostate.

In conclusion, even when restricted to gestation and lactation, HLE induced stromal hyperplasia, acinar atrophy and degenerative alterations in the prostate at aging, as cytoplasmic vacuolation and prostate concretions. Degenerative alterations and prostatic intraepithelial neoplasia increased when HLE was maintained throughout life, worsen prostate aging. Prostate alterations induced by HLE were related to dyslipidemia and marked reduction in serum testosterone, as described in previous reports, but proliferative disturbances were not observed for the aging prostate, except in the group exposed from lactation onwards. Thus, HLE regardless ontogenetic period, induces degenerative and atrophic alterations and worsen gland ageing favoring the development of pre-malign lesions when extended from intra-uterine throughout life.

DECLARATION OF INTEREST, FUNDING AND ACKNOWLEDGEMENTS

Declarations of interest: none

Funding: This work was supported by the Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP)- Grant numbers: 2011/01612-4 (R. M. Góes), 2011/03596-6 (E. Z. Pytlowanciv) and by National Research Council (CNPq)- 2018/21891 (R. M. Góes), 163297/2018-5 (T. P. Scarpelli).

Acknowledgements: The authors are grateful for the technical assistance of Luiz Roberto Faleiros Jr and Maysa Succi.

REFERENCES

Agnoux, A. M., Antignac, J. P., Simard, G., Poupeau, G., Darmaun, D., Parnet, P., & Alexandre-Gouabau, M. C. 2014 Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 307(2), R184–R197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00015.2014>

- Aki T, Nara A, Uemura K. 2012 Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology*. 28(3):125-31. [https://doi: 10.1007/s10565-012-9212-3](https://doi.org/10.1007/s10565-012-9212-3).
- Armitage, J.A; Taylor P.D.; Poston L. 2005 Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy-rich diet during development. *Journal Physiology*. 565, 3–8. [https://doi: 10.1113/jphysiol.2004.079756](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079756).
- Benesh, E. C., Humphrey, P. A., Wang, Q., & Moley, K. H. 2013 Maternal high-fat diet induces hyperproliferation and alters Pten/Akt signaling in prostates of offspring. *Scientific reports*, 3, 3466. <https://doi.org/10.1038/srep03466>
- Berman, D. M.; Yang, J.; Epstein, J. I. 2000 Foamy gland high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*. 24(1):140–144. [https://doi: 10.1097/00000478-200001000-00018](https://doi.org/10.1097/00000478-200001000-00018).
- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A. A., Sciavolino, P. J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C. R., Gridley, T., Cardiff, R. D., Cunha, G. R., Abate-Shen, C., & Shen, M. M. 1999 Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes & development*, 13(8), 966–977. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.966>.
- Billis A. 2010 Prostatic atrophy. Clinicopathological significance. *International Brazilian JournalUrology*. 36(4): 401-9, [https://doi: 10.1590/s1677-55382010000400003](https://doi.org/10.1590/s1677-55382010000400003).
- Bostwick, D. G.; Qian, J. 2001 Effect of androgen deprivation therapy on prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 85(2) Suppl 1: 91–3, [https://doi: 10.1016/s0090-4295\(01\)01248-1](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01248-1).
- Brodowski, L., Büter, W., Kohls, F., Hillemanns, P., Von Kaisenberg, C., & Dammann, O. 2019 Maternal Overweight, Inflammation and Neurological Consequences for the Preterm Child: Results of the ELGAN Study. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 79 (11), 1176–1182, [https://doi: 10.1055/a-0960-0939](https://doi.org/10.1055/a-0960-0939).
- Campos-Silva P, Fernandes A, Costa W, Sampaio Fj, Gregorio B. 2020 Fetal programming by high-fat diet promoted the decreased of the prostate in adult Wistar albino rats. *Mechanisms of Development*. 164:103649. [https://doi: 10.1016/j.mod.2020.103649](https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103649).
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Barbagallo, F., La Vignera, S., & Calogero, A. E. 2021 Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts. *Frontiers in endocrinology*, 12, 554078. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.554078>.
- Creasy, D.; Bube, A.; De Rijk, E.; Kandori, H.; Kuwahara, M.; Masson, R.; Nolte, T.; Reams, R.; Regan, K.; Rehm, S.; Rogerson, P.; Whitney, K. 2012 Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology*. 40 (6S), [https://doi: 10.1177/0192623312454337](https://doi.org/10.1177/0192623312454337).
- Cunha G. R.; Ricke W.; Thomson A.; Marker P. C.; Risbridger G.; Hayward S. W.; Wang Y. Z.; Donjacour A. A.; Kurita T. 2004 Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 92, (4), 221-236. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.10.017>

- De Jesus, M. M., Negrin, A. C., Taboga, S. R., Pinto-Fochi, M. E., & Góes, R. M. 2015 Histopathological alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl phthalate individually or in combination. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 52, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.02.005>.
- De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Epstein, J. I., & Nelson, W. G. 1999 Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *The American journal of pathology*, 155(6), 1985–1992. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65517-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65517-4)
- Desai, M.; Jellyman, J.K.; Han, G.; Beall, M.; Lane, R.H.; Ross, M.G. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. 2014 *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 211(3), p. 237 e1- 237 e-13. <https://doi:10.1016/j.ajog.2014.03.025>.
- Devlin, C. M.; Simms, M.S.; Maitland, N. J. 2020 Benign prostatic hyperplasia - what do we know? *BJU International*. 127 (4), 389-399. <https://doi: 10.1111/bju.15229>.
- Drake, A.J. And Reynolds, R.M.; 2010 Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. *Society for Reproduction and Fertility*. 1403, 387–398. <https://doi: 10.1530/REP-10-0077>.
- Dupre, N. C., Flavin, R., Sfanos, K. S., Unger, R. H., To, S., Gazeeva, E., Fiorentino, M., De Marzo, A. M., Rider, J. R., Mucci, L. A. 2018 Corpora amylacea in prostatectomy tissue and associations with molecular, histological, and lifestyle factors. *The Prostate*. 78(15):1172–1180. <https://doi: 10.1002/pros.23692>.
- Escobar, E. L., Gomes-Marcondes, M. C., & Carvalho, H. F. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. *The Prostate*, 69(5), 548–558. <https://doi.org/10.1002/pros.20905>.
- Evagelidou, E.; Kiortsis, D.N.; Bairaktari, E.; Giapros; V.; Cholevas, V.; Tzallas, C.; Andronikou, S.; 2006 Lipid profile, glucose homeostasis, blood pressure, and obesityanthropometric markers in macrosomic offspring of nondiabetic mothers. *Diabetes Care*. 269 (6),1197-1201. <https://doi: 10.2337/dc05-2401>.
- Freeland, J.; Crowell, P. D.; Giafaglione, J. M.; Boutros, P. C.; Goldstein, A. S. 2021 Aging of the progenitor cells that initiate prostate cancer. *Cancer Lett.* v. 515, p.28-35. <https://doi:10.1016/j.canlet.2021>.
- Fukabori, Y., Nakano, K., Ohyama, A., & Yamanaka, H. 1997. Stimulative effect of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by human prostatic stromal cells in vitro. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*, 4(6), 597–602. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.1997.tb00316.x>
- Furriel, A.; Campos-Silva, P.; Silva, P.C.G.P.; Costa, W.S.; Sampaio, F.J.B.; Gregório, B.M. 2014 Diets Rich in Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids Induce Morphological Alterations in the Rat Ventral Prostate. *PLOS one*, 9(7). <https://doi: 10.1371/journal.pone.0102876>.

- Haffner, M. C.; Weier, C.; Xu, M. M.; Vaghasia, A.; Gürel, B.; Gümüşkaya, B.; Esopi, D. M.; Fedor, H.; Tan, H. L.; Kulac, I.; Hicks, J.; Isaacs, W. B.; Lotan, T. L.; Nelson, W. G.; Yegnasubramanian, S.; De Marzo, A. M. 2016 Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *Journal of Pathology*. 238(1):31-41. [https://doi: 10.1002/path.4628](https://doi.org/10.1002/path.4628).
- Isaacs J. T. 1987. Development and characteristics of the available animal model systems for the study of prostatic cancer. *Progress in clinical and biological research*, 239, 513–576. PMID: 3309963
- Jeyakumar, S.M.; Lopamudra, P.; Padmini, S.; Balakrishna, N.; Iridharan, N.V.; Vajreswari, A. 2009. Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rats, strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. *Nutrition & Metabolism*. 6 (27), <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-27>.
- Li, M.; Sloboda, D.M.; Vickers, M.H.; 2011 Maternal Obesity and Developmental Programming of Metabolic Disorders in Offspring: Evidence from Animal Models. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 1-9, doi: 10.1155/2011/592408.
- Lovegrove, C.; Ahmed, K.; Challacombe, B.; Khan, M.S.; Popert, R.; Dasgupta, P. 2015 Systematic review of prostate cancer risk and association with consumption of fish and fish-oils: analysis of 495,321 participants. *International Journal of Clinical Practice*. 69 (1), 87–105. [https://doi: 10.1111/ijcp.12514](https://doi.org/10.1111/ijcp.12514).
- Madersbacher, S., Sampson, N., & Culig, Z. 2019 Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review. *Gerontology*, 65(5), 458–464. <https://doi.org/10.1159/000496289>
- Mann, S. Do, Sidhu, M. Do, Gowin, K. Do. 2020 Understanding the Mechanisms of Diet and Outcomes in Colon, Prostate, and Breast Cancer; Malignant Gliomas; and Cancer Patients on Immunotherapy. *Nutrients*. 12, (8), 2226. doi:10.3390/nu12082226.
- Marker P. C.; Donjacour A. A.; Dahiya R.; Cunha G. R. 2003 Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*. 253, 165-174.
- McLean D. T.; Strand D. W.; Ricke W. A. 2017 Prostate cancer xenografts and hormone induced prostate carcinogenesis. *Differentiation*. 97, 23-32. doi: 10.1016/j.diff.2017.08.005.
- Mirzaei, S., Paskeh, M., Saghari, Y., Zarrabi, A., Hamblin, M. R., Entezari, M., Hashemi, M., Aref, A. R., Hushmandi, K., Kumar, A. P., Rabiee, N., Ashrafizadeh, M., & Samarghandian, S. 2022. Transforming growth factor-beta (TGF- β) in prostate cancer: A dual function mediator? *International journal of biological macromolecules*, 206, 435–452. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.094>
- Nascimento, A. F., Sugizaki, M. M., Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Luvizotto, R. A., Nogueira, C. R., & Cicogna, A. C. 2008. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 52(6), 968–974. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000600007>

- Narita, S., Nara, T., Sato, H., Koizumi, A., Huang, M., Inoue, T., & Habuchi, T. 2019. Research Evidence on High-Fat Diet-Induced Prostate Cancer Development and Progression. *Journal of clinical medicine*, 8(5), 597. <https://doi.org/10.3390/jcm8050597>
- Oben, J. A., Mouralidarane, A., Samuelsson, A. M., Matthews, P. J., Morgan, M. L., McKee, C., Soeda, J., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Ozanne, S. E., Sigala, B., Novelli, M., Poston, L., & Taylor, P. D. 2010. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of hepatology*, 52(6), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.042>
- Ogden C.L.; Carroll M.D.; Kit B.K.; Flegal K.M. 2014 Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA*. 311 (8), 806–814. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.732>
- Oliveira, D. S. M., Dzinic, S., Bonfil, A. I., Saliganan, A. D., Sheng, S., & Bonfil, R. D. 2016 The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 16 (1), 8–13. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.917>.
- Osório-Costa, F.; Rocha, G.Z.; Dias, M.M.; Carvalheira, J.B.C. 2009 Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. *Brazilian Archives of Endocrinology & Metabology*. 53 (2), 213–226. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000200013>.
- Pasquali, R.; Gambineri, A. 2006. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*. 12:542–551. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61179-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61179-0)
- Pinto-Fochi, M.E.; Pytlowanciv, E.Z.; Reame, V.; Rafacho, A.; Ribeiro, D. L.; Taboga, S.R.; Góes, R.M. 2016. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction*. 152(6): 795–808. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0072>
- Pomerantz, M. M., Qiu, X., Zhu, Y., Takeda, D. Y., Pan, W., Baca, S. C., Gusev, A., Korthauer, K. D., Severson, T. M., Ha, G., Viswanathan, S. R., Seo, J. H., Nguyen, H. M., Zhang, B., Pasaniuc, B., Giambartolomei, C., Alaiwi, S. A., Bell, C. A., O'Connor, E. P., Chabot, M. S., ... Freedman, M. L. 2020. Prostate cancer reactivates developmental epigenomic programs during metastatic progression. *Nature genetics*, 52(8), 790–799. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0664-8>
- Prins G. S.; Korach K. S. 2008 The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*. 73, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.10.013>
- Pytlowanciv, E.Z.; Pinto-Fochi, M.E.; Reame, V.; Gobbo, M.G.; Lisboa, D. L.; Taboga, S.R.; Góes, R.M.; 2016 Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors unbalance in the rat prostate at adulthood. *The Prostate*, 76, 662–678. <https://doi.org/10.1002/pros.23158>.
- Rafacho, A., Roma, L. P., Taboga, S. R., Boscherio, A. C., & Bosqueiro, J. R. 2007. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(5), 536–545. <https://doi.org/10.1139/y07-037>.
- Rawla P. 2019 Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*. 10 (2), 63–89.

- <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. 2021. Prostate cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Ribeiro D. L.; Taboga S. R.; Góes R. M. 2009 Diabetes induces stromal remodeling and increases in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. *International Journal of Experimental Pathology*. 90: 400–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00657.x>
- Ribeiro, D.L.; Pinto, M.E.; Maeda, S.Y.; Taboga, S.R.; Góes, R.M.; 2012b High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. *Cell Tissue Research*. 349, 577–588. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1420-x>
- Ribeiro, D.L.; Pinto, M.E.; Rafacho, A.; Bosqueiro, J.; Maeda, S.Y.; Anselmo-franci, J.A.; Taboga, S.R.; Góes, R.M.; 2012a High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. *International Journal of Andrology*. 33(5), 854-65. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.016089>.
- Röcken, C., Linke, R. P., & Saeger, W. 1996 Corpora amylacea in the lung, prostate and uterus. A comparative and immunohistochemical study. *Pathology, research and practice*, 192(10), 998–1006. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(96\)80041-0](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(96)80041-0).
- Rosa-Ribeiro, R.; Barbosa, G. O.; Kühne, F.; Carvalho, H. F. 2014 Desquamation is a novel phenomenon for collective prostate epithelial cell deletion after castration. *Histochemistry and Cell Biology*, 141 (2), 213- 20. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1152-3>.
- Sanches, B., Tamarindo, G. H., Dos Santos Maldarine, J., da Silva, A., Dos Santos, V. A., Lima, M., Rahal, P., Góes, R. M., Taboga, S. R., Felisbino, S. L., & Carvalho, H. F. 2020 Telocytes contribute to aging-related modifications in the prostate. *Scientific reports*, 10(1), 21392. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78532-7>.
- Scarano, W.R.; Cordeiro, R.S.; Góes, R.M.; Carvalho, H.F.; Taboga, S.R. 2005. Tissue remodeling in Guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. *Cell Biology International*. 29(9):778-784. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.05.003>.
- Schauer, I. G., & Rowley, D. R. 2011. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation; research in biological diversity*, 82(4-5), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.05.007>
- Sfanos, K. S., Isaacs, W. B., & De Marzo, A. M. 2013 Infections and inflammation in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology*. 1(1): 3–11, PMID: 25110720 PMCID: PMC4219279 .
- Shah, S.; Jha, B.; Khanal, M.P. 2011 Effects of aging and ethnicity on serum free prostate specific antigen. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12 (10), 2509-2512. Available in: <http://journal.waocp.org/?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:22320948&key=2011.12.10.2509>
- Shappell S.B.; Thomas G.V.; Roberts R.L. 2004. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice:

- Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*, 64, 2270–2305. [https://doi: 10.1158/0008-5472.can-03-0946](https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-0946).
- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., Kostrov, S.V. 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7(34): 55863–55889. [https://doi: 10.18632/oncotarget.10150](https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150).
- Silva, S. A., Gobbo, M. G., Pinto-Fochi, M. E., Rafacho, A., Taboga, S. R., Almeida, E. A., Góes, R. M., & Ribeiro, D. L. 2015. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. *International journal of experimental pathology*, 96(1), 21–30. <https://doi.org/10.1111/iep.12107>
- Sperandio, S.; Poksay, K.; De Belle, I.; Lafuente, M. J.; Liu, B.; Nasir, J.; Bredesen, D. E. 2004 Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death & Differentiation*. 11: 1066–1075. [https://doi: 10.1038/sj.cdd.4401465](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401465)
- Stoykova, G. E.; Schlaepfer, I. R. 2019. Lipid Metabolism and Endocrine Resistance in Prostate Cancer, and New Opportunities for Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, (11), 2626. [https://doi: 10.3390/ijms20112626](https://doi.org/10.3390/ijms20112626).
- Sullivan, E.L. & Grove, K.L. 2010 Metabolic imprinting in obesity. *Forum of Nutrition*. Karger. 63, 186–194. [https://doi: 10.1159/000264406](https://doi.org/10.1159/000264406).
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal of Clinicians*. 71(3):209-249. [https://doi: 10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660).
- Symonds, M.E. 2007. Integration of physiological and molecular mechanisms of the developmental origins of adult disease: new concepts and insights. *Proceedings of the Nutrition Society*. 66, 442-450. [https://doi: 10.1017/S002966510700571X](https://doi.org/10.1017/S002966510700571X).
- Tamarindo, G. H., Gobbo, M. G., Taboga, S. R., Almeida, E. A., & Góes, R. M. 2021. Melatonin ameliorates degenerative alterations caused by age in the rat prostate and mitigates high-fat diet damages. *Cell biology international*, 45(1), 92–106. <https://doi.org/10.1002/cbin.11472>
- Taylor, B.A.; Phillips, S.J. 1996. Detection Of Obesity Qtls On Mouse Chromosomes 1 And 7 By Selective DNA Pooling. *Genomics*. 34 (3), 389–398. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0302>
- Thomson A. A.; Cunha G.R. 1999 Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development.*, 126 (16), 3693-3701. [https://doi: 10.1242/dev.126.16.3693](https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3693).
- Timms, B. G. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*. 76, (6), 565-577. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>
- Toivanen R.; Shen M. M. 2017. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and Cell-type specification. *Development*. 144, 1382- 1398. <https://doi.org/10.1242/dev.148270>
- Vilamaior, P. S. L.; Taboga, S. R.; Carvalho, H. F. 2006 Postnatal growth of the ventral prostate in wistar rats: a stereological and morphometrical study. *The anatomical Record, part A*. 288A, 885–

892. [https://doi: 10.1002/ar.a.20363](https://doi.org/10.1002/ar.a.20363).
- Vuichoud, C.; Loughlin, K. R. 2015. Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation. *Cancer Journal of Urology*. 22 (1), 1–6. PMID: 26497338
- Walsh, T.J. 2011. Male reproductive health and prostate cancer risk. *Current Opinion in Urology*. 21(6), 506–513. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834bdf14>
- Weibel, E.R.; Kistler, G.S.; Scherle, W.F. 1966 Practical stereological methods formorphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*. 30, 23-37. <https://doi.org/10.1083/jcb.30.1.23>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. *WHO Fact sheets*, n. 854, 2016.
- Wright, A. S.; Thomas, L. N.; Douglas, R. C.; Lazier, C. B.; Rittmaster R. S. 1996 Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *The American Society for Clinical Investigation*. 98(11): 2558-2563. [https://doi: 10.1172/JCI119074](https://doi.org/10.1172/JCI119074)

TABLES

Table 1: Composition of diets

Composition	Standard diet	High-fat diet
Protein (%)	22	20
Carbohydrates (%)	48	37
Lipids (%)	4	20
Others* (%)	26	23
Calories (Kcal/g)	3,16	4,8

* Others: vitamins, minerals e water

Table 2. Biometric parameters of middle-aged rats subjected to conventional rodent nutrition (C) or to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and lactation (GL), from weaning onwards (W), from lactation onward (L) and throughout intrauterine and post-natal life (AL). The values represent mean $\pm$ standard deviation. a, b, c - significant differences among the experimental groups ($p < 0.05$).

Biometric parameters	C	G	GL	W	L	AL
Parameter						
Body weight (g)	539.7 $\pm$ 44.9 ^{a,c}	498.6 $\pm$ 54.3 ^{a,b}	551.5 $\pm$ 46.1 ^{a,c}	487.7 $\pm$ 27.2 ^b	568.3 $\pm$ 52.5 ^c	496.9 $\pm$ 50.7 ^{a,c}
Weight gain (g)	455.9 $\pm$ 52.3 ^{a,b}	421.9 $\pm$ 52.3 ^a	454.2 $\pm$ 44.4 ^{a,b}	422.6 $\pm$ 32.8 ^a	472.6 $\pm$ 44.3 ^b	417.5 $\pm$ 47.4 ^a
Waist (cm)	22.4 $\pm$ 0.8 ^a	22.7 $\pm$ 0.8 ^{a,b}	22.4 $\pm$ 0.7 ^{a,b}	21.9 $\pm$ 1.9 ^a	23.9 $\pm$ 1.4 ^b	22.1 $\pm$ 0.9 ^a
Epididymal fat weight (g)	9.3 $\pm$ 2.9 ^{a,b}	8.6 $\pm$ 2.5 ^a	8.7 $\pm$ 2.1 ^{a,b}	10 $\pm$ 3.1 ^{a,b}	11.3 $\pm$ 2.5 ^b	8.2 $\pm$ 2.7 ^a
Retroperitoneal fat weight (g)	9 $\pm$ 0.8 ^a	8.3 $\pm$ 0.8 ^a	11.4 $\pm$ 1.7 ^{a,b}	11.1 $\pm$ 1.3 ^{a,b}	15.5 $\pm$ 1.3 ^b	13.3 $\pm$ 1.7 ^{a,b}
Visceral fat weight (g)	5.5 $\pm$ 0.4 ^a	6.5 $\pm$ 0.6 ^{a,b}	7.2 $\pm$ 0.8 ^{a,b}	5 $\pm$ 0.3 ^a	9.2 $\pm$ 0.7 ^b	5.3 $\pm$ 0.7 ^a
Periprostatic fat weight (mg)	284.3 $\pm$ 27.5 ^a	242.5 $\pm$ 26.8 ^a	311.2 $\pm$ 37.9 ^a	310.1 $\pm$ 24.4 ^a	507.9 $\pm$ 32.9 ^b	342.9 $\pm$ 47.4 ^a
Adiposity index (%)	4.8 $\pm$ 0.4 ^a	4.8 $\pm$ 0.3 ^a	5 $\pm$ 0.5 ^{a,b}	5.3 $\pm$ 0.4 ^{a,b}	6.6 $\pm$ 0.4 ^b	5.6 $\pm$ 0.5 ^{a,b}
Prostate complex weight (g)	3.2 $\pm$ 0.2 ^{a,b}	3.3 $\pm$ 0.5 ^{a,b}	2.7 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.5 ^a	3.1 $\pm$ 0.5 ^{a,b}	3.4 $\pm$ 0.4 ^b
Ventral prostate weight (mg)	657.3 $\pm$ 115.5	554.1 $\pm$ 158.1	525.5 $\pm$ 97.3	582.9 $\pm$ 170.4	580 $\pm$ 129.9	596.2 $\pm$ 75.1
Relative prostate weight (x103)	1.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3	1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.1

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Scheme of the experimental design of study. Middle-aged rats were subjected to conventional rodent nutrition (C) or to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). The red arrow indicates the time of euthanasia.

Figure 2. Metabolic profile of animals. (A- D) Lipid profile. Levels of (A) total cholesterol (parametric data, $p < 0.0001$), (B) triglycerides (non-parametric data, $p=0.001$), (C) high-density lipoprotein cholesterol (parametric data, $p < 0.0001$) and (D) low-density lipoprotein cholesterol (parametric data, $p < 0.0001$). (F) Mean glycemic levels (non-parametric data, $p=0.006$). (G) glucose decay constant -Kitt (parametric data, $p < 0.0014$). Groups: Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). Values represent mean $\pm$ standard deviation. a, b, c – significant differences among experimental groups.

Figure 3. Serum hormone levels. Variations in serum levels of (A) testosterone (parametric data, $p < 0.0001$). and (B) estradiol (parametric data, $p= 0.082$). Groups: Control group, fed standard ratio (C), and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and for all life (AL, intrauterine and post-natal life). Values represent mean $\pm$ standard deviation. a, b and c – significant differences among the experimental groups.

Figure 4. Histological (A) and stereological (B, C) analysis of rat ventral prostates. (A) Details of prostate after staining with Tuchmann's Blue trichrome. (B) Variations in the relative

frequency of main tissue compartments of the gland. (C) Variations in main components of the gland stroma. Groups: Control group, fed standard ratio (C), and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). Legend: c – collagen fibers; ep – acinar epithelium, st – stroma, f – smooth muscle cells; l – acinar lumen, bv – blood vessel. Bar = 100 μ m. Values represent means and $\pm$ standard deviation. a, b, c, d – significant differences among the experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 5. Level of epithelial atrophy. Details of HE-stained histological sections showing prostate acinar epithelium (left) and variations in the atrophy degrees (right). Legend: ep – acinar epithelium, st – stroma, f – smooth muscle cells; l – acinar lumen, bv – blood vessel. Bar = 12 μ m. Diffuse acinar atrophy was classified according percentage of total tissue area showing this alteration at grades (1) less than 25%; (2) 26-50%; (3) 51-75% and (4) greater than 76%. Groups: Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life).

Figure 6. Levels of cell vacuolization and prostate concretions. Histological sections of ventral prostate stained with HE showing (A - C) vacuolated cells in the acinar epithelium and (D, E) prostatic concretions (arrowheads) in the acinar lumen. Such concretions exhibited acidophilic or basophilic aspect (D) or correspond to *corpora amylacea* (E). (F-G) Graphic representations of percentage of animals exhibiting (F) Cell vacuolization and (G) Prostatic concretions. Animals were classified according the number of acini exhibiting these alterations in the scores: 0) absent; 1) up to 10 acini; 2) between 10 and 20 acini; and 3) more than 20 acini. Groups: Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and

breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). Legend: ep – acinar epithelium, l – acinar lumen, st – stroma. Bars: A, B = 80µm; C, E = 50µm; D = 70µm.

Figure 7. Pathological lesions in the prostate. **A-E:** Histological sections of ventral prostate stained with HE (A-E) showing single-cell necrosis (A), inflammatory infiltrate (B), cell detachment and (C, D) and prostatic intraepithelial neoplasia (E). **F-H:** Multiplicity of lesions (number of lesion foci). Groups: C- Control group (standard ratio) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). Arrows- Single-cell necrosis; Arrowheads – cell detachment. Legend: ep – acinar epithelium, bv- blood vessel, l – acinar lumen, st – stroma. Bars: A, B: 70 µm; C, E: 50 µm; D: 100 µm. Values represent mean ± standard deviation. * Significant difference of control group ($p = 0.037$).

Figure 8. Cell proliferation. **(A – D)** Tissue sections of the ventral prostate submitted to immunocytochemistry for the PCNA protein. Proliferating cells are stained in brown (arrows). Legend: ep – acinar epithelium, bv- blood vessel, l – acinar lumen, st – stroma. Bars: A, B: 100 µm; C, D: 23 µm. **(E)** Density of proliferating cells (number of cells/mm² of section). Values represent means ± standard deviation. * Significant difference of control group ($p < 0.05$). Groups: Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life).

Figure 9. Tissue expression of androgen receptor (AR). **(A)** Tissue sections of the ventral prostate submitted immunohistochemistry for AR. AR-positive cells are stained in brown (arrows). **(B, C)** Frequency of AR-positive cells (number of labeled cells / total number of cells). Groups: Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid

nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life). Legend: ep – acinar epithelium, bv- blood vessel, l – acinar lumen, st – stroma. Bar: 90µm. Values represent means $\pm$ standard deviation. a, b– significant differences between the experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 10. Venn Diagram of metabolic alterations. Groups: C- Control group, fed standard ratio (C) and groups subjected to high-lipid nutritional environment during gestation (G), gestation and breastfeeding (GL), from weaning onwards (W), from breastfeeding onwards (L) and from gestation onwards (AL, intrauterine and post-natal life).

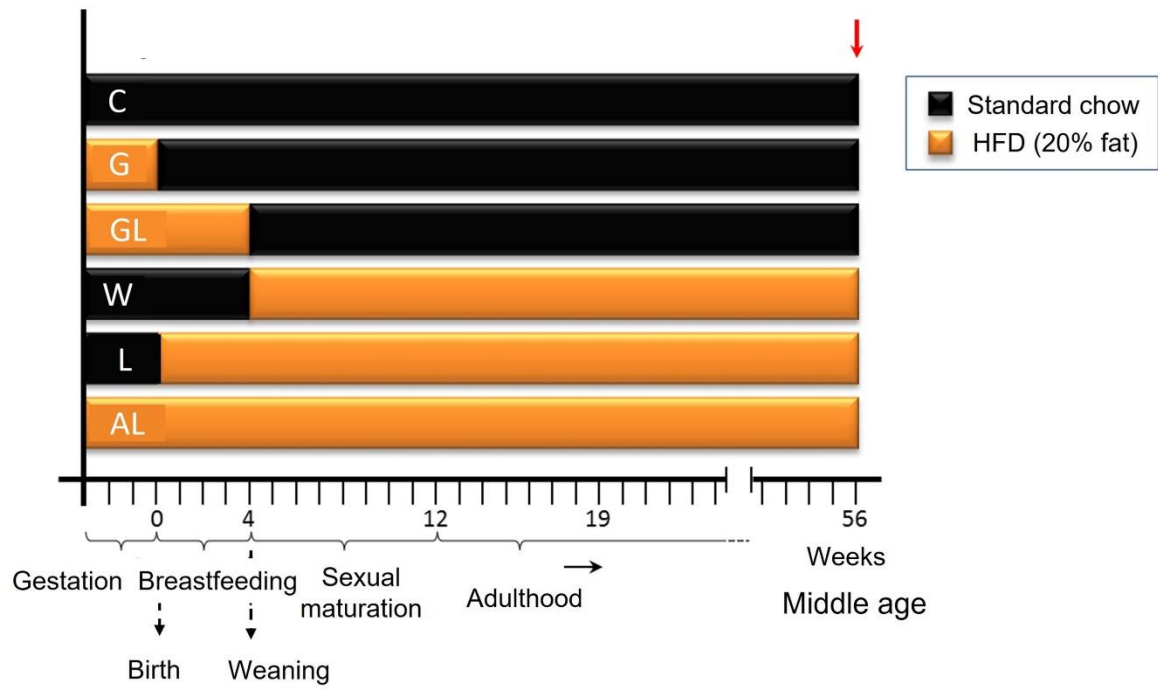
FIGURES**Figure 1**

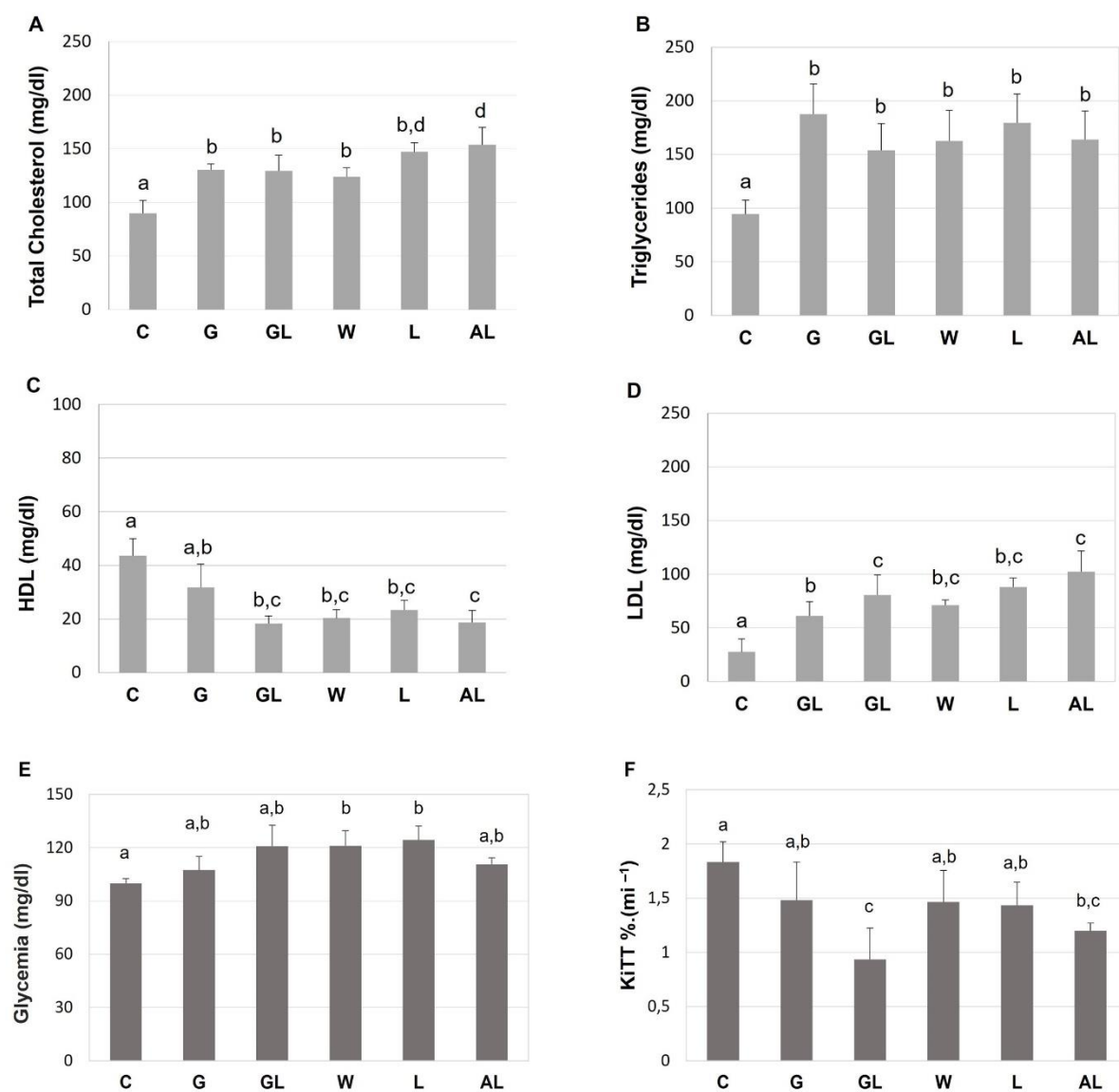
Figure 2

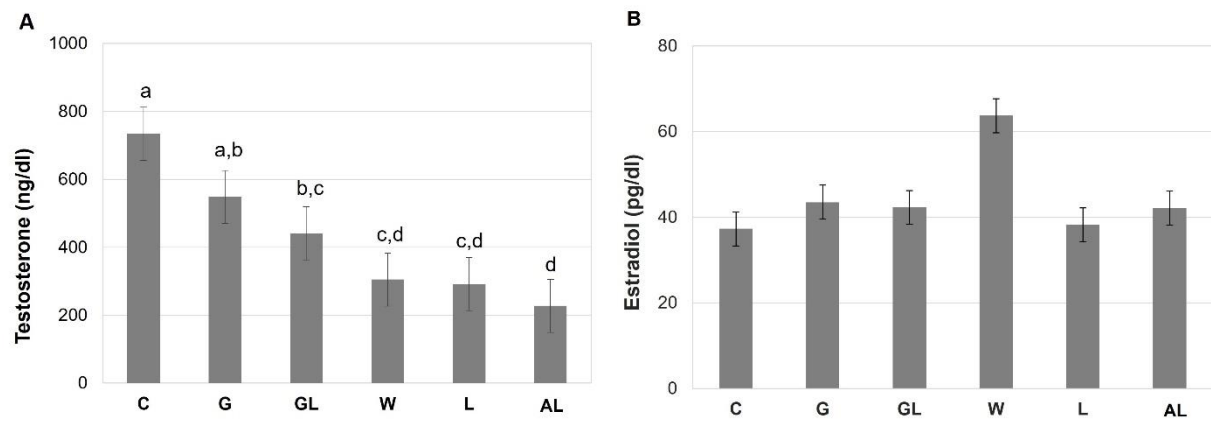
Figure 3

Figure 4

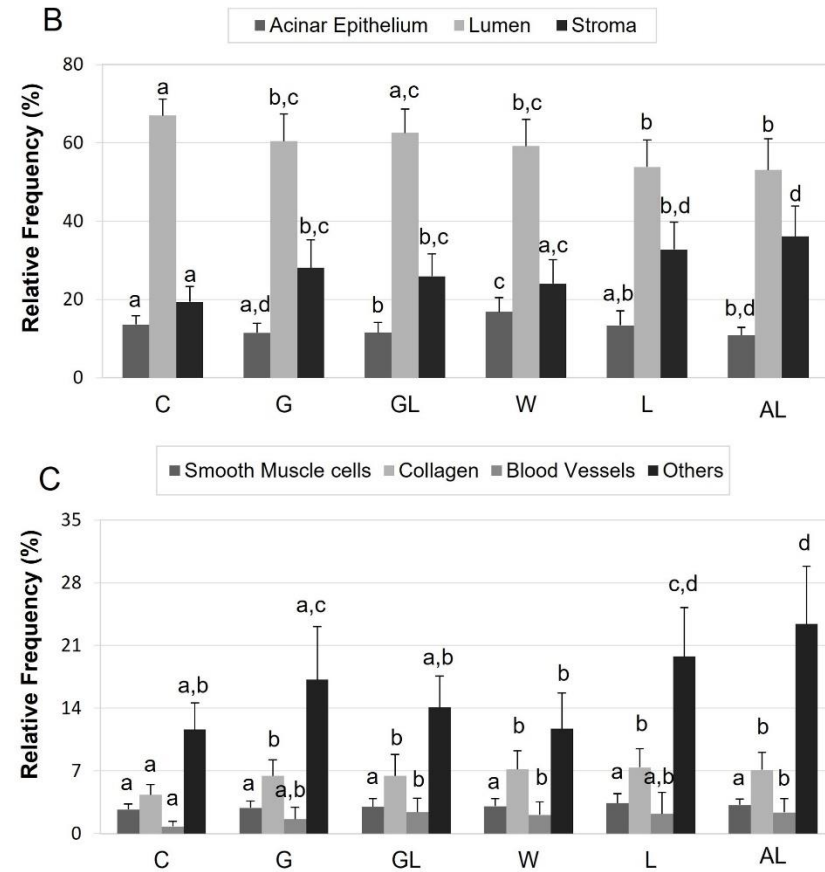
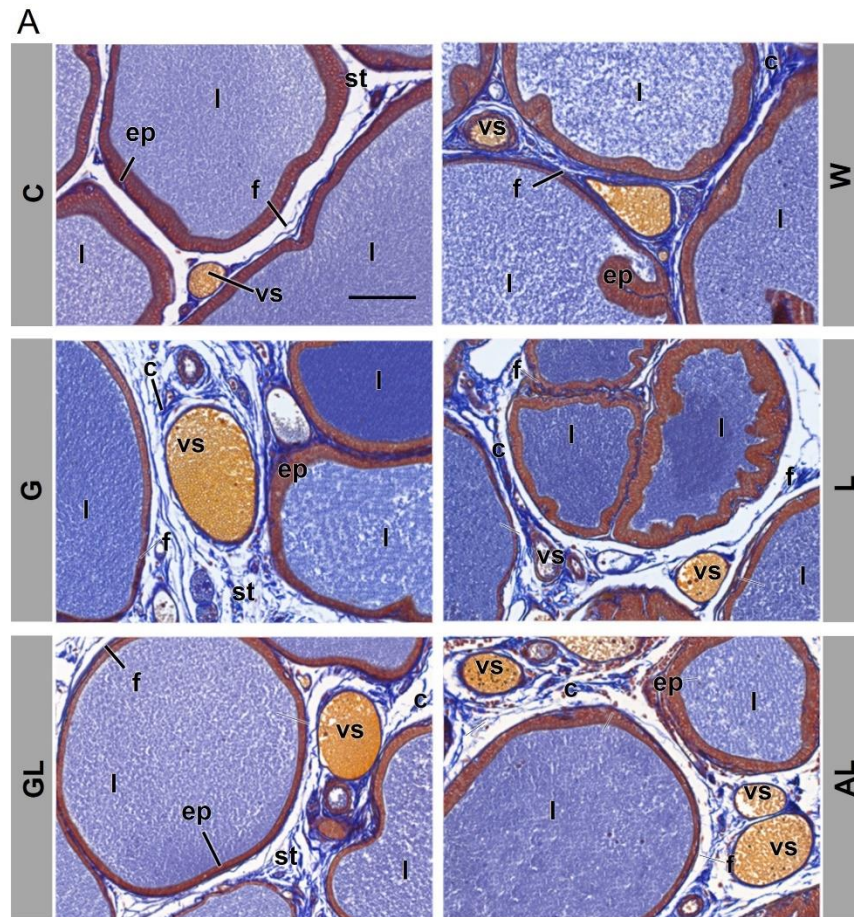


Figure 5

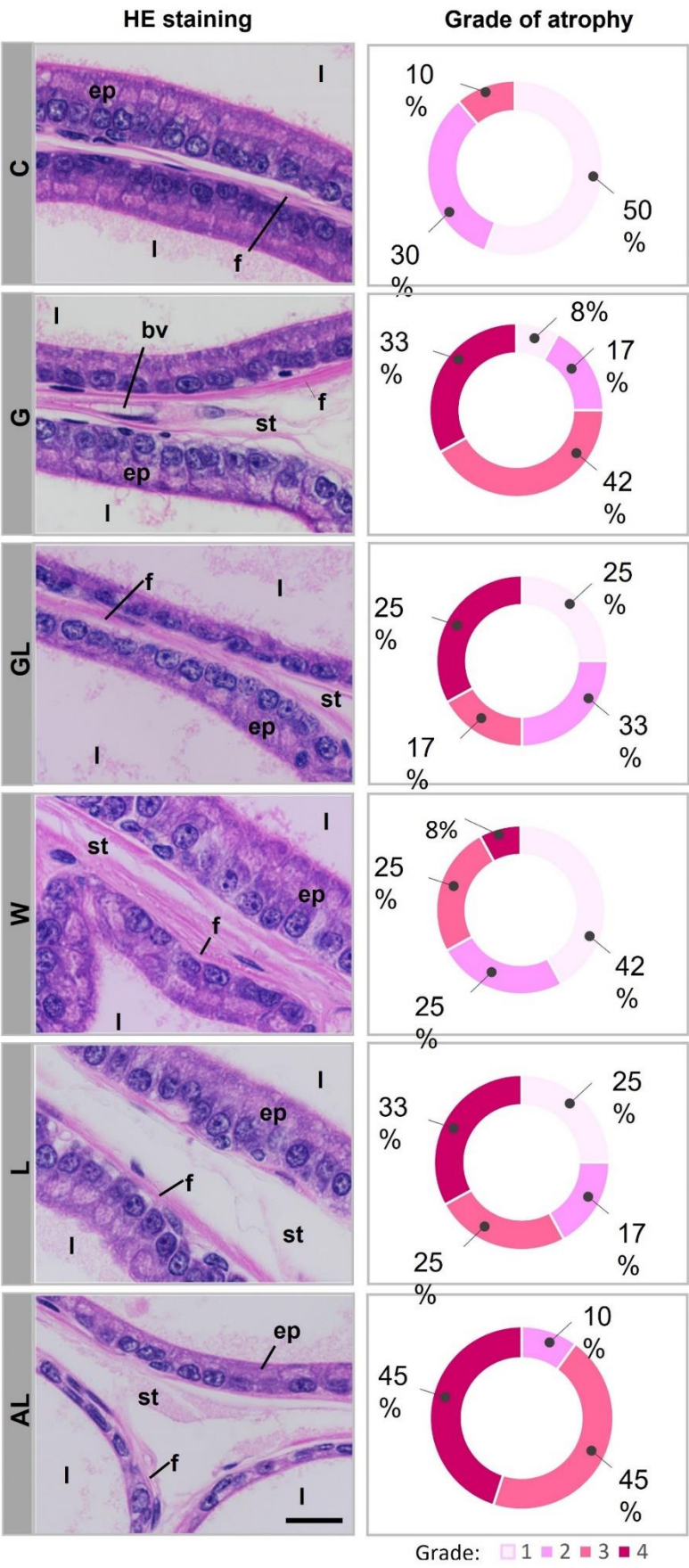


Figure 6

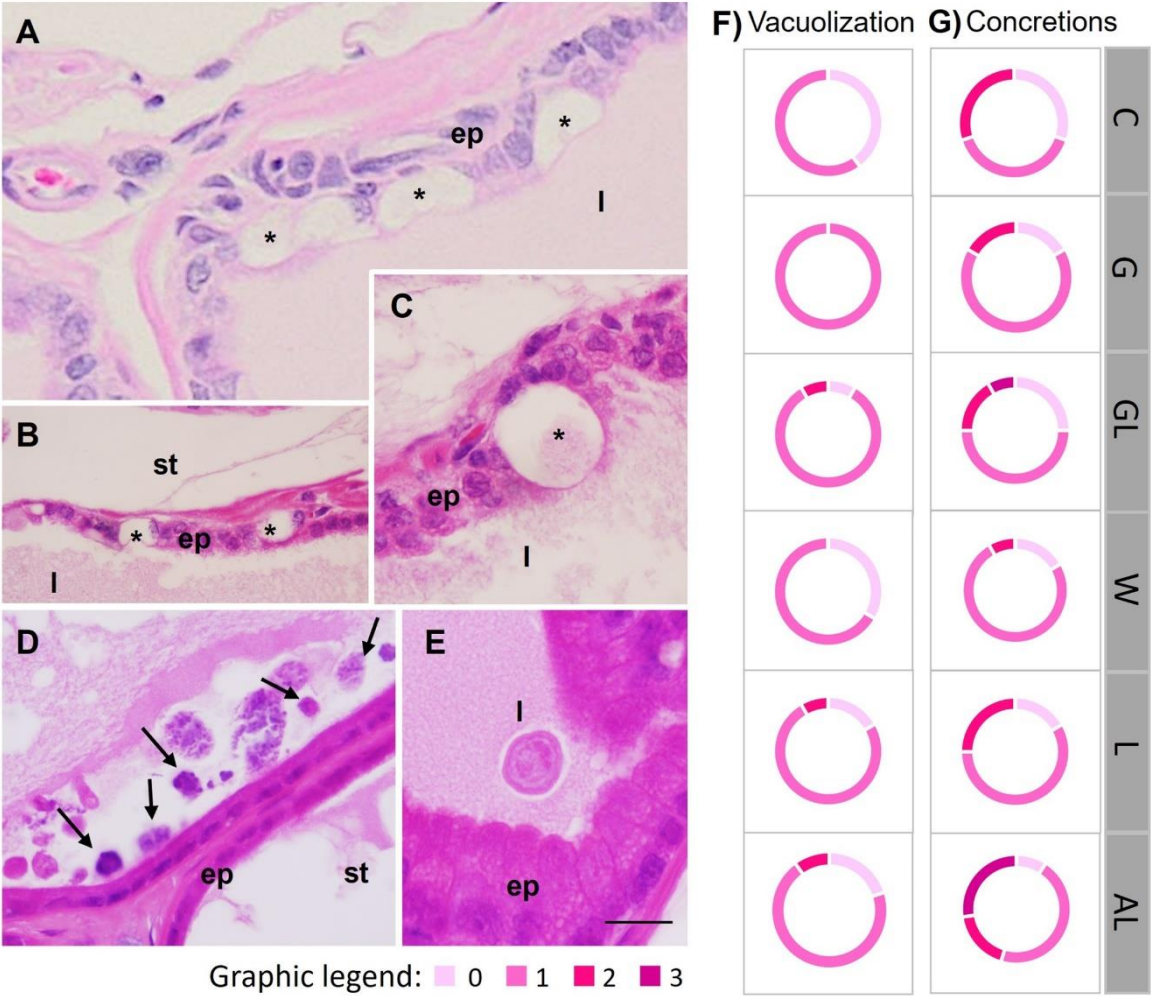


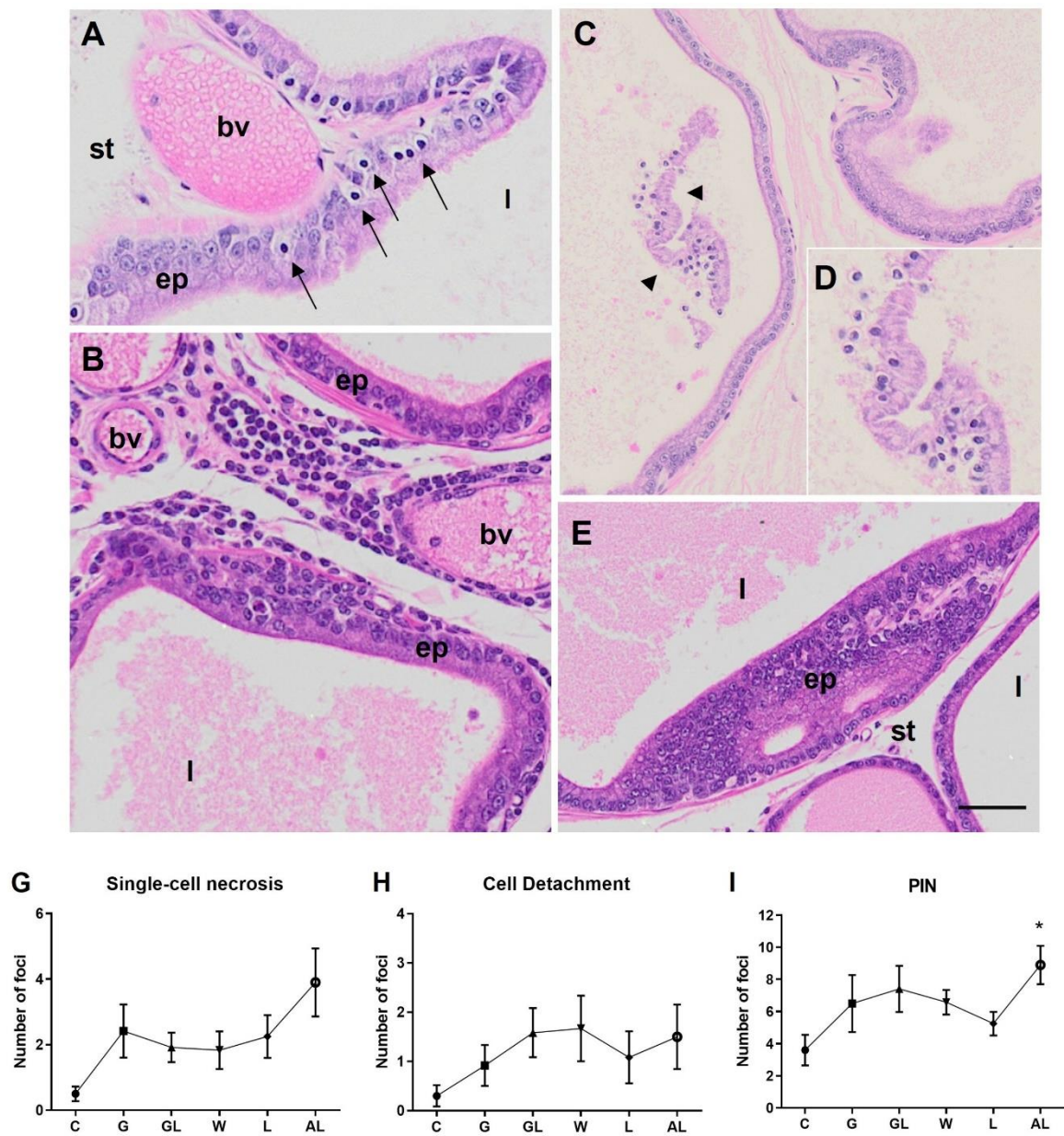
Figure 7

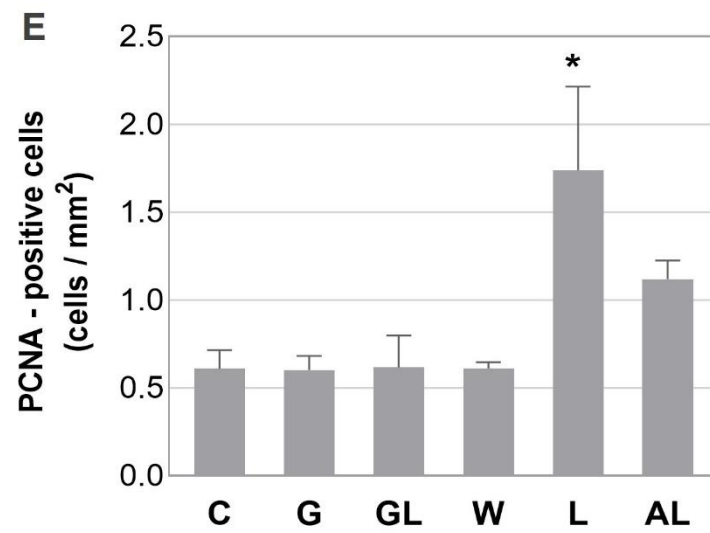
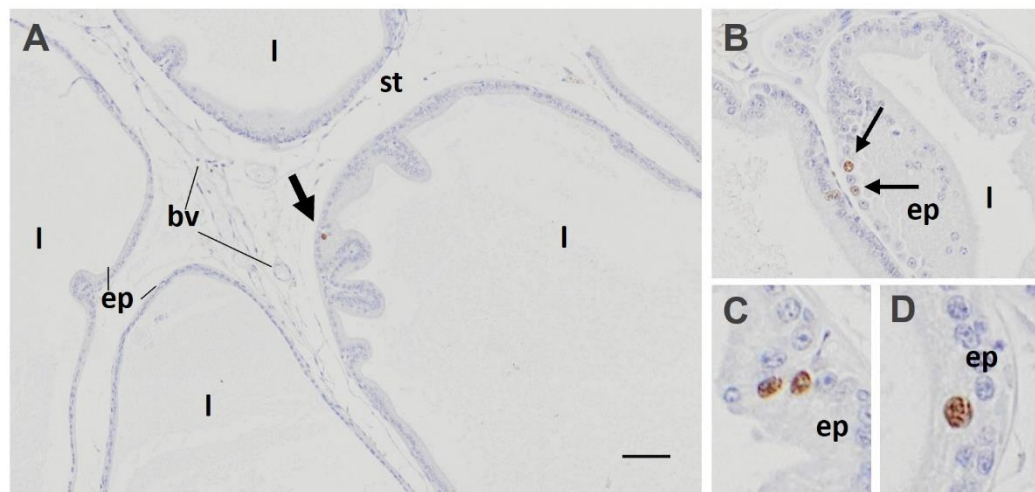
Figure 8

Figure 9

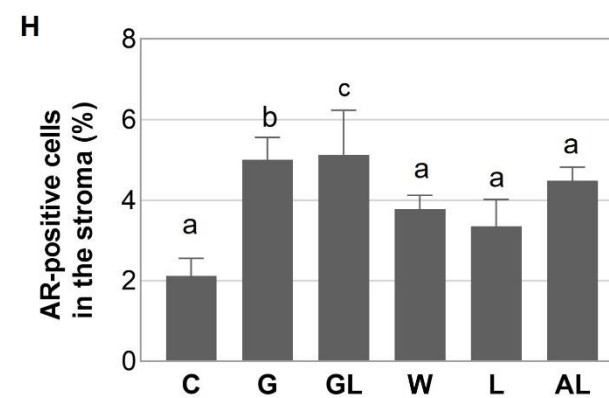
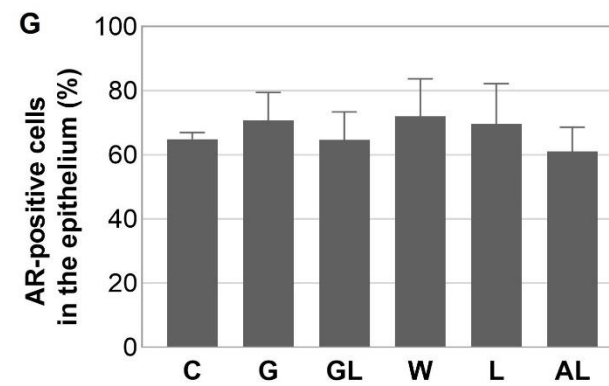
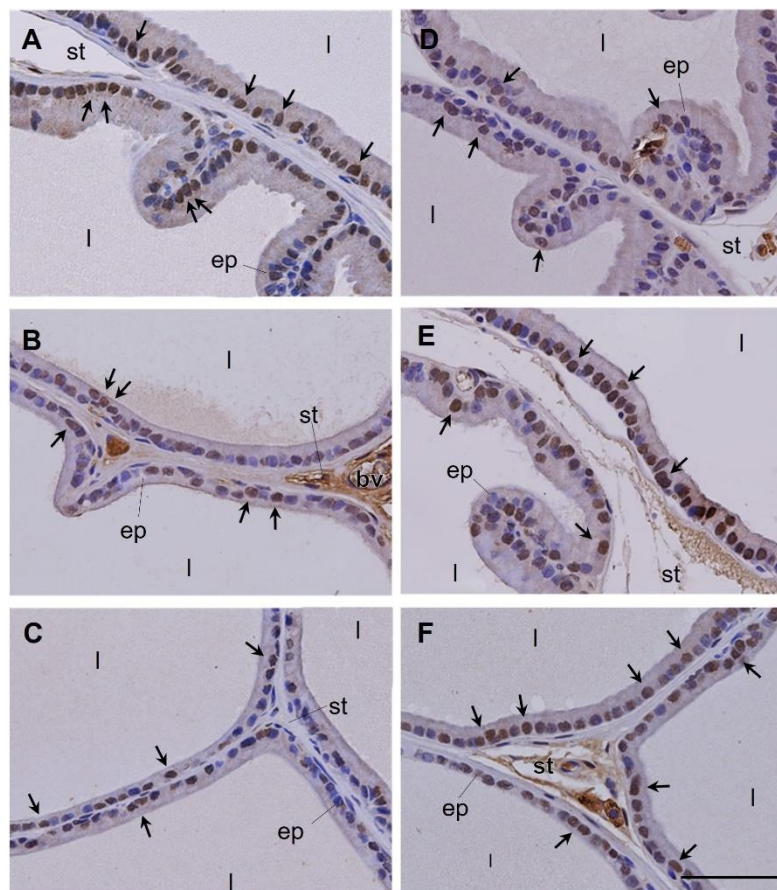
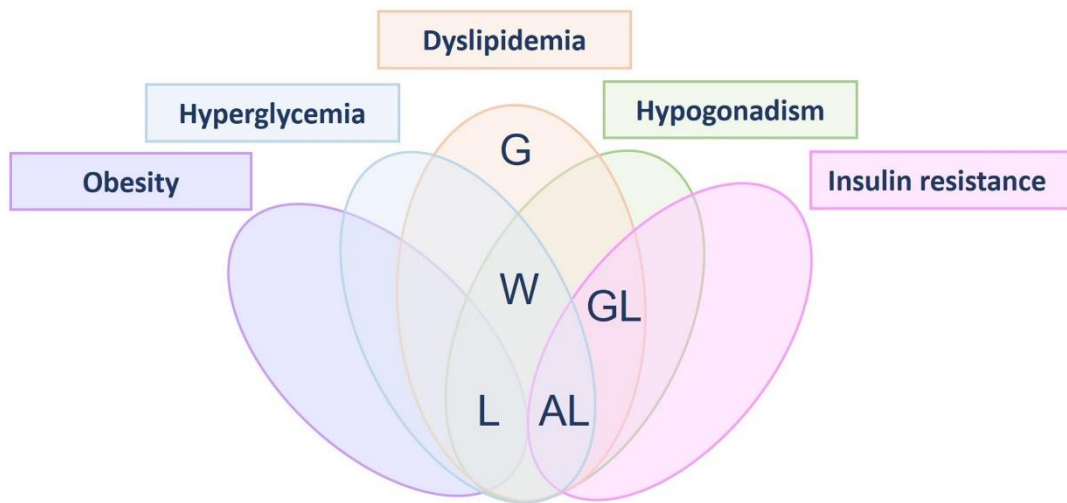


Figure 10

CAPÍTULO 2

A DIETA HIPERLIPÍDICA A LONGO PRAZO E O AMBIENTE NUTRICIONAL MATERNO RICO EM LIPÍDIOS AGRAVAM AS ALTERAÇÕES NA PRÓSTATA DORSOLATERAL DA PROLE NO ENVELHECIMENTO.

Manuscrito em elaboração

A dieta hiperlipídica a longo prazo e o ambiente nutricional rico em lipídios gestacional e perinatal agravam as alterações no lobo dorsolateral da prole de ratos no envelhecimento.

Tatiane Pereira Scarpelli¹, Bianca Gabrielly Silva¹, Paola Ferraz Sinhorini¹, Eloisa Zanin Pytlowanciv^{1,2}, Maria Etelvina Pinto-Fochi^{1,3}, Sebastião Roberto Taboga¹, Rejane Maira Góes^{1*}.

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

² Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

³ Faculdade de Medicina, União das Faculdades dos Grandes Lagos (UNILAGO), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

*Autor correspondente: E-mail: rejane.goes@unesp.br

Resumo

Distúrbios na nutrição materna ou perinatal podem comprometer o funcionamento de vários sistemas na vida adulta, mas pouco é conhecido dos efeitos sobre a histofisiologia da próstata, principalmente se somado ao consumo excessivo de lipídios na vida pós-natal. Constatou-se que a obesidade materna seguida ou não do consumo de dieta hiperlipídica causa hipertrofia prostática no início da idade adulta de ratos, perturba a expressão de receptores nucleares na glândula e aumenta a incidência de lesões patológicas. Ainda precisa ser esclarecido se esses efeitos deletérios persistem ou se agravam no envelhecimento. Os estudos experimentais com roedores geralmente se baseiam nos lobos ventrais, enquanto o lobo dorsolateral é pouco explorado. Assim, o presente estudo investigou os efeitos do ambiente nutricional rico em lipídios (ANRL) nos diferentes períodos do desenvolvimento enfatizando as alterações histopatológicas comuns da idade, além da expressão tecidual do receptor de andrógeno (AR), e a atividade proliferativa. Para isso, foram utilizados seis grupos de ratos Wistar (56 sem de idade; n=12 por grupo): ratos alimentados com dieta balanceada (controle – C, 3% de lipídeos) ou que foram expostos ao ANRL por meio de dieta hiperlipídica (20% de lipídeos) durante a gestação (G), gestação e lactação (GL), a partir do desmame (D), a partir da lactação (L) e gestação por toda a vida (GT). Os dados biométricos mostram que o grupo L apresentou aumento da circunferência da cintura e maior índice de adiposidade, além do depósito aumentado de gordura periprostática. O grupo GT apresentou aumento do peso da próstata dorsolateral, assim como um aumento na densidade de células proliferativas. A histopatologia indicou aumento de NIPs e focos de infiltrados inflamatórios, além de células em descolamento nos animais expostos ao ANRL por toda a vida. O número de mastócitos foi aumentado na próstata de grupo GT. O ANRL a partir da lactação também levou ao aumento de focos de descolamento celular na próstata dorsolateral. A frequência de células positivas para o receptor de andrógeno não se alterou no epitélio de nenhum grupo, contudo aumentou no compartimento estromal a partir do desmame. O nível de glicemia foi alterado em D e L, enquanto os grupos GL e GT se tornaram resistentes à insulina. Todos os grupos apresentaram quedas nos níveis de testosterona, exceto G. Nossos dados mostram que a exposição prolongada dos lipídios desde a gestação e por toda a vida pós-natal até a velhice, leva a modificações no metabolismo de glicose e potencializa as alterações comuns da idade, como diminuição de testosterona, aumento do volume da próstata, acompanhado de proliferação, neoplasia e quadro inflamatórios com presença de células imunes no lúmen e no estroma da prostático. A exposição ao ANRL a partir da lactação acarreta alterações nos depósitos de gorduras e no metabolismo, como já foi discutido no cap. 1, além de aumentar a atividade proliferativa na próstata. Por fim, compreendemos que quando analisada mais tardiamente, a próstata dorsolateral da prole acumula diversas alterações em resposta ao ANRL por toda a vida. É interessante ressaltar que a exposição somente pela dieta (como no grupo D) não compromete a próstata como quando ocorre o ANRL nos períodos de desenvolvimento intra-uterino e perinatal.

Palavras-chave: Próstata, Lobo dorsolateral, envelhecimento, dieta hiperlipídicas.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo caracterizado por modificações sistêmicas no organismo, devido ao acúmulo de danos celulares e teciduais que culminam em declínio ou desordem das funções (LEE, LEE, 2022). À medida que o tempo passa, muitas células se tornam senescentes, ou seja, perdem a capacidade normal de metabolizar e sinalizar fatores de sobrevivência, em resposta aos danos no DNA e mitocondriais, passando a contribuir com o surgimento de inflamações, lesões teciduais, promoção de cânceres e desencadeiam uma cascata de sinalizações parácrinas promovendo novas células senescentes (MCHUGH, GIL 2018; SHMULEVICH, KRIZHANOVSKY, 2020). Durante o envelhecimento, há um acúmulo da soma de fatores intrínsecos e extrínsecos, como o estresse oxidativo, as alterações fisiológicas e a exposição a agentes genotóxicos (SACCO, BELLONI, LATELLA, 2021). Além disso, muitos estudos evidenciam que o estresse metabólico está associado à aceleração do envelhecimento (MCHUGH, GIL 2018).

O envelhecimento é um dos fatores que contribuem para o aumento das doenças prostáticas, pois nesse período ocorrem alterações nos níveis de esteróides sexuais com aumento na relação estrógeno/testosterona acompanhadas de alterações na expressão dos seus receptores (KIM, MOON, 2011; SHAH et al., 2011; TONON, SCHOFFEN, 2009; WALSH, 2011). O desequilíbrio na produção endógena de estrógeno somado à diminuição nos níveis de testosterona, característico do envelhecimento por exemplo, tem sido vistos como potenciais indutores para inflamações crônicas e patologias pré-malignas na próstata, como prostatites e lesões neoplásicas intraepiteliais (YATKIN et al., 2008; NAKAI et al., 2012). Somado a esses fatores há uma perda progressiva da homeostase entre os processos de proliferação e morte celular apoptótica, o que pode contribuir com a evolução das doenças prostáticas (TONON, SCHOFFEN, 2009). O envelhecimento é produto do programa genético espécie-específico, sendo sensível às mutações celulares acumuladas durante toda a vida. Portanto, a exposição a certas condições, mesmo antes da velhice, pode influenciar no acúmulo de danos ou redução dos mecanismos de reparo no DNA, influenciando indiretamente a chance de ocorrência de processos patológicos, como o câncer (RICHIE et al., 2012; LEE e LEE, 2022).

A influência da dieta no desenvolvimento de doenças está associada a uma mudança no padrão de nutrição que decorre das últimas décadas (SANTOS et al., 2013). No Brasil, dados recentes publicados pelo Ministério da Saúde em 2019, mostram que a taxa de obesidade dos brasileiros passou de 11,8% para 19,8%, entre 2006 e 2018, um aumento de 67,8% (ABESO,

2019). Estes dados apontam para a relevância de investigar os efeitos da obesidade materna sobre a prole. Assim, nos últimos 30 anos, muitos estudos mostraram a relação do ambiente intrauterino com o desenvolvimento de doenças na vida adulta (NEWBOLD et al., 2007; BRODOWSKI et al., 2019). Sabe-se que a obesidade materna pode levar ao comprometimento metabólico da prole ao nascimento, e que pode se estender à vida adulta (SYMONDS, 2007; SULLIVAN et al., 2010; BRODOWSKI et al., 2019). Isso ocorre pois o desenvolvimento do feto ou recém-nascido é extremamente sensível às perturbações hormonais e ao estado nutricional e metabólico materno (SULLIVAN et al., 2010; THOMPSON et al., 2018). A obesidade altera o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal por meio de múltiplos mecanismos e pode afetar os órgãos reprodutores dependentes de esteroides sexuais, como é o caso da próstata. De fato, várias evidências, incluindo estudos anteriores do nosso grupo demonstram os efeitos prejudiciais da obesidade para a saúde prostática (RIBEIRO et al., 2012a; RIBEIRO et al., 2012b; PYTLOWANCIV, 2016). Assim, este estudo buscou avaliar a resposta do lobo dorsolateral da próstata da prole de ratos envelhecidos expostos ao ambiente nutricional rico em lipídios insaturados (1) pela influência da obesidade materna, investigando os efeitos na gestação e/ou lactação e (2) pela dieta hiperlipídica prolongada em diferentes períodos ontogenéticos até o início da velhice.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Foram utilizados ratos Wistar fornecidos pela empresa ANILAB - Animais de Laboratório, localizado em Paulínia/SP. Esses animais foram mantidos no biotério do Ibilce/Unesp, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 24°C, alimentados com ração “ad libitum” e água filtrada. Os experimentos com animais foram desenvolvidos pela então doutoranda Eloísa Zanin Pytlowanciv, em colaboração com a Tatiane Scarpelli, como parte do projeto de doutorado da primeira. O protocolo de experimentação animal (Anexo 1) foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEE/IBILCE protocolo nº. 088/2013) e o período experimental foi concluído em 2015.

A indução da obesidade foi efetuada segundo modelo previamente descrito (NASCIMENTO et al., 2008) pela alimentação com dieta hiperlipídica e hipercalórica padronizada pelo Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de

Botucatu – UNESP adquirida da Agrocere (Rio Claro, SP, Brasil). A referida dieta (Tabela 1) contém 20% de lipídios. Segundo informações dos fornecedores, confirmadas em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, o tempo necessário de exposição a essa dieta para o ganho excessivo de peso é de 15 semanas.

A obesidade foi induzida em 30 ratas da linhagem *Wistar*, com idade inicial de 28 dias (4 semanas), as quais foram divididas em 2 grupos: grupo controle – composto por 10 ratas, que receberam ração convencional e grupo obeso – composto por 20 ratas, que receberam ração hiperlipídica. Após as 15 semanas de consumo da dieta hiperlipídica, foi induzido o acasalamento das mães obesas ou controle com machos normais. A partir disso, foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais com as proles masculinas, analisadas na idade de 56 semanas (N=12 por grupo):

- **C2 - Controle** - filhos de mães alimentadas com ração murina convencional tratados com a mesma ração após o desmame;
- **G2 - ambiente nutricional rico em lipídios (ANRL) durante a gestação** - filhos de mães obesas, sujeitos ao “cross fostering” e amamentados em mães controles. Esses animais receberam ração convencional a partir do desmame
- **GL2 - ANRL durante a gestação e período neo-natal (lactação)** - filhos de mães obesas, sujeitos a superalimentação durante a amamentação e tratados com ração convencional a partir do desmame;
- **D - ANRL após o desmame** - filhos de mães alimentadas com ração murina convencional e tratados com dieta hiperlipídica a partir do desmame;
- **L2 – ANRL a partir da lactação** - grupo composto de filhos de mães controles, por “cross fostering” amamentados em mães obesas e tratados com dieta hiperlipídica a partir do desmame;
- **GT - ANRL desde a gestação e toda a vida** - filhos de mães obesas, sujeitos a superalimentação durante a amamentação e tratados com ração hiperlipídica a partir do desmame.

Parâmetros hormonais e metabólicos

Anteriormente ao dia da eutanásia dos animais, realizou-se o teste de tolerância à insulina intraperitoneal. Os ratos foram anestesiados com ketamina (800ul/kg) /xilazina (200ul/kg) e foi injetada intraperitonealmente uma dose de 2U/kg de peso corpóreo de insulina, logo após verificação da glicemia basal no tempo 0. Em seguida, foram coletadas amostras de

sangue da região das patas, durante intervalos de 15, 30 e 45 minutos para a dosagem de glicemia. A constante de decaimento da glicose (K) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformadas entre 0 e 45min após a administração da insulina. No dia da eutanásia, os animais passaram por inalação de isoflurano seguida por decaptação em guilhotina. Amostras de sangue proveniente da cervical foram imediatamente coletadas para dosagem do nível glicêmico pelo sistema de fitas (monitor digital) “Accu - Chek Active” (Roche Diagnostics), dos animais em jejum. Também foram coletadas amostras de sangue para dosagens hormonais. Para tanto, o sangue foi centrifugado e foram quantificados os níveis séricos de testosterona e estradiol, pelo método de ELISA utilizando kits comerciais específicos (Enzo Life Sciences International Inc., PA, EUA), em leitor ELISA (Biotek, Winooski, VT, USA). Para as dosagens hormonais foram utilizados cinco animais de cada grupo, em triplicata.

Parâmetros biométricos

Os animais de todos os grupos foram pesados com 56 semanas de idade. Além do peso corporal, foi determinada a circunferência abdominal (medida da cintura). Após a eutanásia e a coleta das amostras de sangue, o complexo prostático foi imediatamente removido e os lobos dorsolateral foram separados dos demais e pesados. A gordura periférica aos lobos prostáticos é chamada de gordura periprostática e foi pesada.

Processamento histológico

Após ser excisado e pesado, o complexo prostático foi separado da bexiga. Os lobos dorsolaterais também foram pesados, separados dos demais lobos e destinados a um dos dois fixadores, preparados. Uma parte dos fragmentos dos lobos foram fixados em por imersão em paraformaldeído tamponado a 4% recém-preparado durante 24 horas. Outra parte foi fixada em Metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) durante 3 horas. Após fixação, os fragmentos foram lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e incluídos em Paraplast (Merck, Darmstadt, Alemanha). Com o material incluso em parafina, foram realizados os cortes por secções de 4µm, em micrótomo rotativo automático (Leica).

Análise histopatológica

Cortes histológicos de sete animais por grupo, fixados em Metacarn foram corados por hematoxilina-eosina. Os cortes foram digitalizados em toda a sua extensão utilizando scanner de lâminas VS120-S5-OAI (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) no aumento de 200x. A partir das imagens extraídas, foram realizadas as análises de incidência (número de indivíduos acometidos) e da multiplicidade (número de focos por corte) das alterações histopatológicas, de acordo com as metodologias adaptadas de Shappel et al., 2004; Creasy et al., 2012 e Rosa-Ribeiro et al, 2014.

As alterações analisadas foram: atrofia epitelial, NIP (baixo e alto grau), descolamento celular no lúmen acinar, concreções prostáticas, inflamação (com presença de neutrófilos, linfócitos, demais células imunes) e vacuolização citoplasmática.

Cada tipo de lesão foi identificada com base nos critérios estabelecidos abaixo:

- A atrofia foi determinada por células com grande redução do volume citoplasmático, com epitélio cúbico baixo ou até pavimentoso e o lúmen acinar amplo (Creasy et al., 2012; Shappel et al. 2004).
- Segundo Shappel et al., 2004, a Neoplasia intraepitelial prostática (NIP) é uma lesão focal, caracterizada principalmente por um aumento da proliferação de células atípicas: com núcleos aumentados e nucléolo evidente. A NIP é classificada em baixo e alto grau, sendo essa última, reconhecida por alterações mais severas que a primeira.
- O descolamento é um tipo de morte, onde grupos de células aderidas umas às outras são encontradas soltas no lúmen dos ácinos, muitas vezes em fileiras de células que parecem se soltar da lâmina basal do epitélio (Rosa-Ribeiro et al., 2014).
- A inflamação foi caracterizada a partir da presença de células do sistema imune que se encontravam agrupadas no estroma e/ou no lúmen acinar, como linfócitos, neutrófilos ou qualquer tipo de leucócito. Nessa análise, foram considerados focos inflamatórios, quando houve a presença mínima de dez células inflamatórias.

A determinação da atrofia foi realizada a partir do acometimento em cada ácino, por corte do animal, classificada em diferentes graus de ocorrência: 1) menos de 25% dos ácinos; 2) 26-50% dos ácinos; 3) 51-75%; e 4) superior a 76% na área total do tecido. As demais lesões foram avaliadas quanto à multiplicidade de lesões (número de focos de lesão em cada corte histológico).

Análise imuno-histoquímica

A partir dos fragmentos fixados em paraformaldeído 4%, os cortes foram submetidos às reações imuno-histoquímicas para o receptor de andrógeno (AR) e para o antígeno nuclear da proliferação celular (PCNA). Resumidamente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (10 mM, pH 6,0) a 98°C por 45 min. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi feito através da incubação com H₂O₂ 3% em metanol por 20 min, seguido do bloqueio das interações proteicas inespecíficas com leite desnatado 5% (AR e PCNA), diluído em tampão PBS (PCNA) ou TBS-t (AR) por 40 min em temperatura ambiente. Sequencialmente, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído em BSA1% com anti-PCNA (1:100, sc- 56, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), durante 1 hora a 37°C e anti-AR (1:75, sc816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight a 4°C. Na sequência, os cortes foram lavados com tampão PBS (PCNA) ou TBS-t (AR), e a interação antígeno-anticorpo foi detectada através do kit Max Polymer (Novocastra, RE7260-K, Leica Biosystems) por 45 min cada a 37°C. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina DAB (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako, K3468) durante 1 min e a contra-coloração foi realizada em hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram obtidos com a omissão do anticorpo primário.

Determinação da proliferação celular e frequência de células AR-positivas

A contagem de células AR-positivas foi estimada no epitélio e estroma dos lóbulos prostáticos a partir de 20 cortes histológicos contíguos, digitalizados no aumento de 400x. Já o número de células PCNA-positivas foi estimado por área (mm²) do corte histológico e toda a sua extensão foi examinada. Para isso os cortes foram digitalizados em scanner de lâminas Olympus Vistual Slide System (VS120-S5-OAI) no aumento de 200x. Ambas as contagens foram feitas com o auxílio do programa Image Pro Plus Media Cyberneticsversion 4.5 for Windows (MD, USA) em pelo menos 4 animais por grupo.

Análise dos mastócitos

Para a identificação e quantificação de mastócitos indiferenciados presentes no tecido conjuntivo prostático, realizou-se a coloração com Azul de Toluídina. Cortes histológicos de fragmentos fixados em Metacarn, foram imersos e corante Azul de Toluidina por 60 min. Na sequência, os cortes foram lavados com água destilada e deixados em placa aquecedora a 60 °C, pelo tempo mínimo necessário até a secagem da lâmina. Imediatamente após secar, as lâminas foram montadas. Foram utilizados n=5/ grupo.

Para a contagem das células, foram fotografados 20 campos consecutivos da lâmina histológica de cada animal no aumento de 40x, utilizando um microscópio Zeiss-Jenaval, com câmera digital AxioCam HRc acoplada e sistema de análise de imagens AxioVision (Carl-Zeiss, Jena, Alemanha). A análise foi estimada com o auxílio do software Image Pro Plus Media Cybernetics versão 4.5 para Windows (MD, USA).

RESULTADOS

Parâmetros fisiológicos e metabólicos

Os animais expostos ao ambiente nutricional rico em lipídios (ANRL) na lactação, apresentaram maior medida de circunferência abdominal e uma tendência de maior peso corporal, como demonstrado na figura 1 (Material suplementar). Além disso, o índice de adiposidade, que foi determinado a partir do cálculo dos depósitos: [(gordura epididimal + visceral + retroperitoneal) / peso corporal x 100] foi maior no grupo L ($p=0,03$), como demonstrado na Figura 1. O grupo L também apresentou aumento nos depósitos de gordura periprostática ($p= 0,0001$) (Fig. 1). O lobo dorsolateral do grupo GT apresentou um aumento no peso ($p=0,04$), após ser exposto a ANRL desde a gestação e pela vida toda (Fig.1).

O ambiente nutricional rico em lipídios, levou à diminuição dos níveis de testosterona séricos em todos os grupos (Fig. 2^a - Material suplementar), independente do período de exposição a ANRL. Quanto mais longo o período de exposição à dieta lipídica, mais acentuada foi a queda nos níveis androgênicos da prole (Fig. 2A). Contudo, quando comparadas a C, as taxas de testosterona foram drasticamente mais baixas nos animais expostos aos lipídios no grupo GT ($p<0,0001$).

A glicemia foi maior nos grupos D e L2, com médias de 121 e 124 mg/dl, respectivamente. Contudo, estes mesmos grupos não se tornaram resistentes a insulina, como demonstrou a constante de decaimento da glicose (KiTT) na figura 3. Apesar da alta dose de insulina intraperitoneal administrada no teste de ipITT, foram os animais de GL2 ($p=0,005$) e GT ($p= 0,0008$) que se mantiveram resistentes, evidenciado pela baixa taxa de captação da glicose mesmo após 45 min, como apresentado na figura 3 (Material suplementar).

Reações imuno-histoquímicas

As marcações das células PCNA-positivas podem ser evidenciadas nas fotomicrografias da figura 4(A-F). A densidade de células em proliferação foi maior no grupo L2 ($p=0,04$) e no grupo GT ($p=0,02$), quando comparados ao controle (Fig. 4G), e não variou nos demais grupos.

A reação de imuno-histoquímica para o AR revelou que no epitélio acinar do lobo dorsolateral não houve alteração na expressão entre os grupos experimentais (Fig. 5G). Entretanto, houve um aumento da expressão de AR tecidual no estroma do grupo D ($p=0,05$), como demonstra a figura 5H.

Alterações no lobo dorsolateral

Além da proliferação celular confirmada pela análise imuno-histoquímica para o PCNA, o grupo GT também apresentou um aumento da proliferação de células com características nucleares atípicas, identificadas como NIPs de baixo grau ($p=0,01$) (Fig.6A, B, F). O ANRL durante toda a vida também resultou no aumento de infiltrados celulares inflamatórios identificados no compartimento do lúmen acinar, ($p=0,04$), além de aumentar os focos de descolamento para dentro do ácino ($p=0,005$). Também houve aumento de descolamento de células pela exposição ao ANRL a partir do desmame ($p=0,006$).

Diferente da próstata ventral (cap.1), o lobo dorsolateral não apresentou concreções prostáticas ou vacuolização celular durante a análise histopatológica. Os ácinos atróficos foram identificados a partir da incidência e grau de acometimento, como demonstrado na Figura 7C. Nenhum dos grupos experimentais apresentou incidência de atrofia com grau 2, 3 ou 4. O grupo G apresentou 14% dos animais com atrofia de grau 1, enquanto os grupos D e GT apresentaram atrofia grau 1 em 28% dos animais (Fig 7).

Contagem de mastócitos

A contagem do número de mastócitos foi feita a partir da coloração com Azul de toluidina, pois se trata de células granulocíticas, que não são facilmente diferenciadas quando corados com HE. O Azul de toluidina cora os grânulos dos mastócitos entre tom azul anil e púrpura. Foram contabilizadas todas as células presentes no tecido estromal com grânulos fortemente corados em azul-púrpura e com aspecto nítido de mastócitos (Fig. 8A-F). A análise demonstrou que o ANRL promoveu o aumento no número de mastócitos no grupo GT ($p=0,01$) (Fig. 8G). Apesar de não ser identificada diferença na análise estatística de variância, o grupo D também apresentou um aumento de populações de mastócitos ($p=0,06$) (Fig. 7G).

DISCUSSÃO

Este trabalho se insere em uma linha de pesquisa do nosso laboratório que visa examinar os efeitos do excesso de lipídios na dieta e da obesidade materna sobre a próstata da prole, baseado em estudos com roedores (RIBEIRO et al., 2012a, RIBEIRO et al., 2012b, PYTLOWANVIC et al., 2016; DE JESUS et al., 2018). Nossos resultados mostram que a exposição prolongada ao ambiente nutricional rico em lipídios (ANRL) desde a gestação e por toda a vida, promoveu um estado proliferativo no lobo dorsolateral, evidenciada pela reação de imunohistoquímica para o PCNA, e acreditamos estar associada ao aumento do peso da próstata.

O aumento de lesões proliferativas como a NIP, também foi caracterizada nos animais de GT. As lesões proliferativas são os tipos de neoplasias mais comumente encontradas como precedentes do câncer (MILLER et al., 2019) e está entre as condições mais comuns do envelhecimento (LEE e LEE, 2022). O grupo GT apresentou um perfil inflamatório de infiltrados de células no lúmen, somado ao aumento da população de mastócitos no tecido conjuntivo prostático. Os mastócitos são células imunes residentes do tecido conjuntivo saudável, desde que sejam encontradas de forma esparsa e não concentradas (SFANOS et al., 2018). A associação do aumento de mastócitos a um processo inflamatório, sugere um mau prognóstico no grupo GT (TAVERNA et al., 2013; SFANOS et al., 2018). Diversos estudos têm demonstrado a associação do aumento de mastócitos e processos inflamatórios crônicos, com indicativo de potencial desenvolvimento de câncer de próstata (MA et al., 2018; PATTABIRAMAN et al., 2021).

Muitas alterações fisiológicas são caracterizadas como processos biológicos naturais decorrentes do envelhecimento, como a desregulação nos níveis de glicose, leptina e insulina (OH et al., 2016, OBLACK et al., 2021). Os parâmetros metabólicos de glicose foram alterados nos animais com influência do ANRL a partir do desmame e da lactação. Essa resposta foi parcialmente semelhante aos resultados anteriores do nosso laboratório, porém, na prole ainda jovem (PYTLOWANCIV et al., 2016). Aqui, vimos que no envelhecimento as alterações nos níveis glicêmicos se mantêm na idade avançada, exceto no período gestacional. Nestes grupos a exposição ao ANRL se deu na maior parte do tempo pela alimentação na vida adulta, portanto, os lipídios da dieta levaram à desregulação nos níveis glicêmicos de forma permanente, como já descrito na literatura (VIKRAM, JENA, RAMARAO, 2010). Em contrapartida, os animais expostos ao ANRL durante a gestação e a lactação, apresentaram diretamente um quadro de

resistência à insulina, indicando que o ambiente gestacional somado à composição do leite de mães obesas leva a uma programação fetal no metabolismo de glicose de forma permanente (PICÓ et al., 2020). O leite possui componentes nutricionais, anticorpos e fatores imunes que são críticos para o desenvolvimento da prole, por isso perturbações nutricionais que alteram a composição do leite e induzem à alterações no desenvolvimento e no metabolismo da prole (LISBOA et al., 2021). Na literatura há evidências de que a dieta materna e o estado de obesidade refletem na modificação dos componentes do leite materno, sugerindo que os lipídios da dieta, assim como seus metabólitos passam para o leite e refletem em uma nutrição inadequada desde os primeiros momentos de vida da prole (PICÓ et al., 2020).

No envelhecimento ocorre um aumento nas doenças prostáticas, devido às alterações nos níveis de esteróides sexuais, acompanhadas de alterações na expressão dos seus receptores (SHAH et al., 2011; WALSH, 2011; PRINS et al., 1996 KIM e MOON, 2011). O resultado de nossa análise hormonal mostra que houve uma diminuição drástica nos níveis séricos de testosterona dos animais expostos ao ANRL em todos os períodos, com exceção de G que se manteve como o grupo controle. De acordo com dados da literatura, a queda da testosterona foi diretamente proporcional ao tempo de exposição da prole aos lipídios, onde os animais expostos desde a gestação e por toda a vida tiveram os menores níveis (PYTLOWANVIC et al., 2016). Nossos achados revelam que o ANRL potencializa os efeitos da idade frente aos níveis de testosterona, pois sabe-se que o perfil de hormônios esteroides durante o envelhecimento é caracterizado, principalmente, por diminuição da produção endógena de testosterona – que exerce papel anti-inflamatório - e aumento ou manutenção das taxas de estrógeno (FUJII et al., 2013; NAKAI, et al., 2013).

Os baixos níveis de testosterona identificados nos animais idosos parecem estar relacionados à resistência à insulina também descrita nos resultados. Um estudo de pacientes com câncer de próstata, após tratamento baseado em privação androgênica, resultou em quedas drásticas de testosterona, e tais pacientes desenvolveram diferentes componentes da síndrome metabólica, incluindo resistência à insulina, diabetes, obesidade e complicações cardiovasculares (PAL et al., 2019). Avaliamos previamente os efeitos dos mesmos períodos de exposição à obesidade materna ou dieta hiperlipídica na prole de ratos no início da idade adulta e constatamos que, exceto o grupo exposto apenas durante a gestação, os demais grupos apresentaram capacidade esteroidogênica testicular reduzida (PINTO -FOCHI et al., 2016). Portanto, nossos dados confirmam que esse modelo de obesidade materna leva ao

comprometimento permanente da capacidade esteroidogênica com redução da testosterona circulante.

No que diz respeito à expressão tecidual dos receptores de andrógenos, a análise mostrou que houve um aumento da expressão de AR no compartimento estromal dos animais expostos ao ANRL a partir do desmame. A expressão de AR na próstata, influenciada por lipídios, sofre respostas variáveis de acordo com o período de exposição e até mesmo a natureza lipídica. Ribeiro e colaboradores (2012a) verificaram a diminuição da expressão de AR na próstata de ratos após um consumo de dieta hiperlipídica por 15 semanas, enquanto o consumo prolongado (30 semanas) aumentou a expressão de AR. Os diferentes perfis de lipídios, saturados ou insaturados, alteram a expressão de AR de forma controversa em muitos estudos experimentais, de forma positiva ou negativamente, e independente das variações de testosterona (RIBEIRO et al., 2009, DE JEUS et al., 2015, PYTLOWANCIV et al., 2016).

Por fim, compreendemos que quando analisada mais tardiamente, a próstata dorsolateral da prole acumula diversas alterações em resposta ao ANRL por toda a vida. É interessante ressaltar que a exposição somente pela dieta (como no grupo D) não compromete a próstata como quando ocorre o ANRL nos períodos de desenvolvimento intra-uterino e perinatal.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Portal**. Disponível em: <https://abeso.org.br/>. Acesso em 19 jul. 2022.

BIANCO, M. E.; JOSEFSON, J. L. Hyperglycemia During Pregnancy and Long-Term Offspring Outcomes. **Current diabetes reports**, v. 19, n. 12, p. 143-151, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1267-6>

BRODOWSKI, L.; BÜTER, W.; KOHLS, F.; HILLEMANN, P.; VON KAISENBERG, C.; DAMMANN, O. Maternal overweight, inflammation and neurological consequences for the preterm child: results of the ELGAN study. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 79, n. 11, p. 1176-1182, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-0960-0939>

FUJII, T.; SHIMADA, K.; ASAI, O.; TANAKA, N.; FUJIMOTO, K.; HIRAO, K.; KONISHI, N. Immunohistochemical Analysis of Inflammatory Cells in Benign and Precancerous Lesions and Carcinoma of the Prostate. **Pathobiology**. v.80, p.119–126, 2013. DOI: 10.1159/000342396

GOBBO, M. G.; COSTA, C. F.; SILVA, D. G.; DE ALMEIDA, E. A.; GOES, R. M. Effect of melatonin intake on oxidative stress biomarkers in male reproductive organs of rats under experimental diabetes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.

JESUS M. M. **Interferência da exposição gestacional ao Di-N-Butil Ftalato e do consumo excessivo de lipídios saturados sobre a próstata do gerbilo: alterações histopatológicas e mecanismos envolvidos.** 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2018.

KIM, J. W.; MOON, D. G. Diagnosis and treatment of sexual dysfunctions in late-onset hypogonadism. **Korean Journal of Urology**, v. 52, n. 11, p. 725-735, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4111/kju.2011.52.11.725>

LEE, J.; LEE, J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic β -Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4843, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094843>

MA, Z.; YUE, L.; XU, Z.; ZENG, S.; MA, Y.; LI, Z.; LI, W.; WANG, D. The effect of mast cells on the biological characteristics of prostate cancer cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5114/ceji.2018.74867>

MCHUGH, D.; GIL, J.. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 1, p. 65-77, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H.; YABROFF, K. R.; ALFANO, C. M.; JEMAL, A.; KRAMER, J. L.; SIEGEL, R. L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363-385, 2019.

NAKAI, Y.; NONOMURA, N. Inflammation and prostate. **International Journal of Urology**. v. 20, p. 150–160, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2012.03101.x>

NASCIMENTO, A. F.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. S.; LIMA-LEOPOLDO, A. P.; LUVIZOTTO, R. A. M.; NOGUEIRA, C. R.; CICOGNA, A. C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.

NEWBOLD, R.R.; PADILLA-BANKS, E.; SNYDER, R.J.; PHILLIPS, T.M. e JEFFERSON, W.N. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. **Reproductive Toxicology**.; v. 23, n. 3, p. 290–296, 2007.

PAL, S. K.; SWAMI, U.; AGARWAL, N. Characterizing the Wnt Pathway in Advanced ProstateCancer: When, Why, and How. **European Urology**. v. 77, n. 1, p. 22-23, 2019.

PATTABIRAMAN, G., BELL-COHN, A. J., MURPHY, S. F., MAZUR, D. J., SCHAEFFER, A. J.; THUMBIKAT, P. Mast cell function in prostate inflammation, fibrosis, and smooth muscle cell dysfunction. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 321, n. 4, p. F466-F479, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00116.2021>

PICÓ, C.; REIS, F.; EGAS, C.; MATHIAS, P.; MATAFOME, P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. **European journal of clinical investigation**, p. 51, n. 5, e13482, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13482>

PINTO-FOCHI, M.E.; PYTLOWANCIV, E.Z.; REAME, V.; RAFACHO, A.; RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M. A high-fat diet fed during different periods of life impairssteroidogenesis of rat Leydig cells. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. 795-808. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-16-0072>

Prins, G.S. Jung, M.H. Vellanoeweth, R.L. Chatterjee, B. Roy, A.K. Age-Dependent Expression of the Androgen Receptor Gene in the Prostate and Its Implication in Glandular Differentiation and Hyperplasia. 1996. **Developmental Genetics** 1899-106

PRINS, G.S.; JUNG, M.H.; VELLANOWETH, R.L.; CHATTERJEE, B.; ROY, A.K. Age-dependent expression of the androgen receptor gene in the prostate and its implication in glandular differentiation and hyperplasia. **Developmental genetics**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 1996.

PYTLOWANCIV, E.Z.; PINTO-FOCHI, M.E.; REAME, V.; GOBBO, M.G.; LISBOA, D.L.; TABOGA, S.R.; GÓES, R.M.; Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors unbalances in the rat prostate at adulthood. **The Prostate**, v. 76, n. 7, p. 662–678, 2016.

RIBEIRO, D. L.; PINTO, M. E.; MAEDA, S. Y.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 2, p. 577-588, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1420-x>

RIBEIRO, D. L.; PINTO, M. E.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R.; MAEDA, S. Y., ANSELMO-FRANCI, J. A.; TABOGA, S. R.; GOES, R. M. High-fat diet obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. **Journal of andrology**, v. 33, n. 5, p. 854-865, 2012b. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.016089>

RICHIE JR, J. P.; DAS, A.; CALCAGNOTTO, A. M.; ALIAGA, C. A. M.; EL-BAYOUMY, K. Age related changes in selenium and glutathione levels in different lobes of the rat prostate. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 3, p. 223-228, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.11.015>

SACCO, A.; BELLONI, L.; LATELLA, L. From development to aging: the path to cellular senescence. **Antioxidants & redox signaling**, v. 34, n. 4, p. 294-307, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8071>

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R. ; LOTTENBERG, A.M.P.; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, D.B.; CESENA, F.Y.; ALVES, R.J.; FENELON, G.; NISHIOKA, S.A.D.; FALUDI, A.A.; GELONEZE, B.; SCHERR, C.; KOVACS, C.; TOMAZZELA, C.; CARLA, C.; BARRERA-ARELLANO, D.; CINTRA, D.; QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E.R.; FONSECA, F.A.H.; PIMENTEL, I.; SANTOS, J.E.; BERTOLAMI, M.C.; ROGERO, M.; IZAR, M.C.; NAKASATO, M.; DAMASCENO, N.R.T.; MARANHÃO, R.; CASSANI, R.S.L.; PERIM, R.; RAMOS, S. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2013000900001>

SFANOS, K. S.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; NELSON, W. G.; MARZO, A. M. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**, v. 15, p. 11–24, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.167>

SHAH, S.; JHA, B.; KHANAL, M.P. Effects of aging and ethnicity on serum free prostate specific antigen. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 2509, p. e12, 2011.

SHMULEVICH, R.; KRIZHANOVSKY, V. Cell senescence, DNA damage, and metabolism. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 4, p. 324-334, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8043>

TAVERNA, G.; GIUSTI, G.; SEVESO, M.; HURLE, R.; COLOMBO, P.; STIFTER, S.; GRIZZI, F. Mast cells as a potential prognostic marker in prostate cancer. **Disease markers**, v. 35, n. 6, p. 711–720, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/478303>

TONON, T.C.A.; SCHOFFEN, J.P.F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, 2009.

VIKRAM, A.; JENA, G. B.; RAMARAO, P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. **The Prostate**, v. 70, n. 1, p. 79-89, 2010.

WALSH, T. J. Male reproductive health and prostate cancer risk. **Current opinion in urology**, v. 21, n. 6, p. 506–513, 2011. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834bdf14>

YATKIN, J.B.; TALVITIE, E.; SANTTI, R. Inflammation and epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 399–410, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00930.x>

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Parâmetros biométricos da próstata dorsolateral de ratos expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a, b, c – diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Figura 2. Níveis hormonais séricos de Testosterona (dados paramétricos $p < 0,0001$) dos grupos experimentais de ratos expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a,b,c - diferença significativa entre os grupos experimentais.

Figura 3. Médias dos níveis glicêmicos (dados não-paramétricos, $p = 0,006$) e médias da constante de decaimento da glicose (dados paramétricos, $p < 0,0014$) dos grupos experimentais expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a,b,c - diferença significativa entre os grupos experimentais.

Figura 4. Fotomicrografias de imunohistoquímica para PCNA (A-L) da próstata dorsolateral. Células com núcleo em marrom são imuno-positivas (seta preta) enquanto as células azuis são negativas. (M) Variação das médias de densidade de células PCNA-positivas (dados paramétricos $p < 0,0006$) de ratos expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a,b - diferença significativa entre os grupos experimentais. Legenda: ep – epitélio acinar, st – estroma, lu – lúmen acinar, vs – vaso sanguíneo. Barra: A-F: 100 μ m, G-L: 15 μ m.

Figura 5. Fotomicrografias de imunohistoquímica para AR (A-F) da próstata dorsolateral. Células com núcleo marrom são positivas (seta simples indica marcação no epitélio, seta dupla indica marcação no estroma), enquanto células em azul são negativas. (G) Média da frequência de células AR-positivas no epitélio prostático (dados paramétricos $p = 0,52$) de ratos expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). (H) Média da frequência de células AR-positivas (dados paramétricos $p < 0,05$) no estroma prostático dorsolateral dos grupos experimentais expostos ao ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a,b -

diferença significativa entre os grupos experimentais. Legenda: ep – epitélio acinar, st – estroma, lu – lúmen acinar. Barra: 50µm.

Figura 6. (A-E) Lesões histopatológicas na próstata dorsolateral de ratos expostos ao ANRL em diferentes fases da vida. A,B- NIP de baixo grau, C- Células que sofreram descolamento para dentro do lúmen acinar, D, E- Focos de infiltrados de células do sistema imune no lúmen acinar, caracterizando um processo inflamatório com presença de linfócitos e leucócitos variados. F- Variação da média do número de focos de NIPs, G- Variação da média de focos de descolamento, H- Variação da média de focos de inflamação. Legenda: ep- epitélio acinar, lu- lúmen, st- estroma, fm- células fibromusculares. Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a, b, c – diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Barra: A-B: 105 µm, C-D: 90 µm, E: 78µm.

Figura 7. A, B- Cortes histológicos da próstata dorsolateral corados em HE. As setas indicam as regiões atróficas que caracterizam o ácino atrófico. C- Incidência por grau de atrofia de cada um dos grupos expostos ao ANRL. Legenda: ep- epitélio acinar, lu- lúmen, st- estroma. Barra: A: 100 µm, B: 200 µm.

Figura 8. Cortes histológicos da próstata dorsolateral de ratos expostos a ANRL em diferentes fases da vida (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C2) corados em azul de toluidina (A-F). As setas em preto indicam os mastócitos presentes no estroma. (G) Média do número de mastócitos nos grupos experimentais expostos a ANRL (G2, GL2, D, L2, GT) e o controle (C). Os valores representam as médias e $\pm$ desvio padrão. a,b - diferença significativa entre os grupos experimentais. Legenda: ep – epitélio acinar, st –estroma, lu – lúmen acinar. Barra: 75 µm.

FIGURAS

(As figuras 1 a 3 constam ao final, no item MATERIAL SUPLEMENTAR)

Figura 4

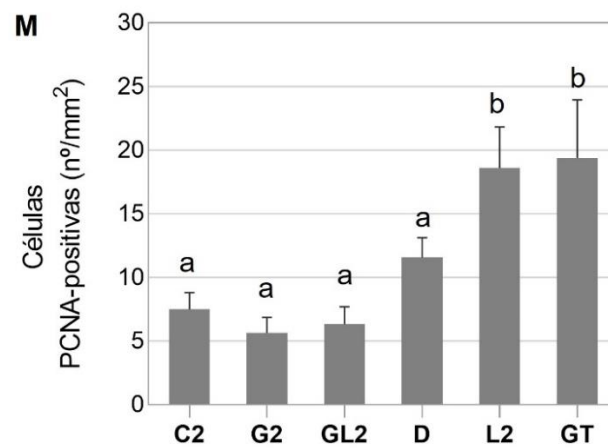
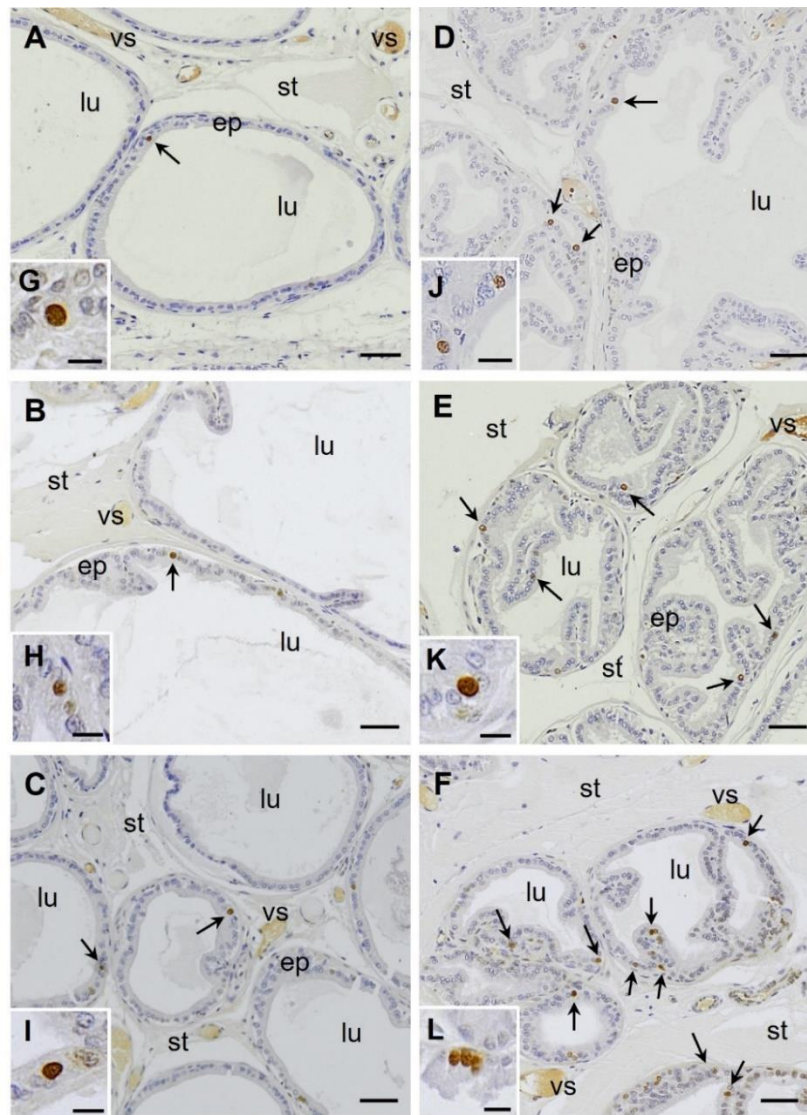


Figura 5

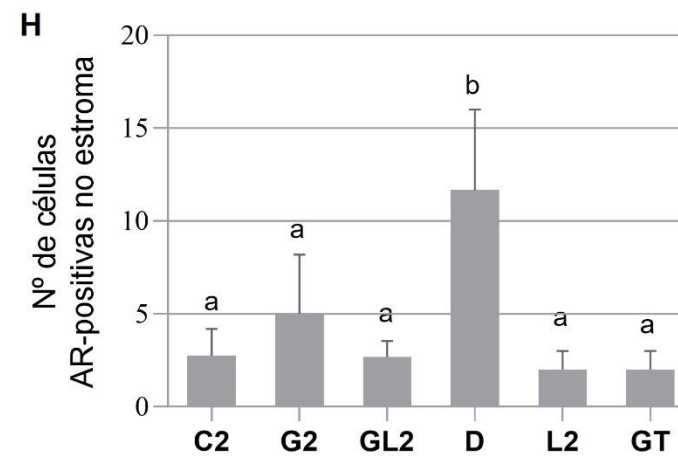
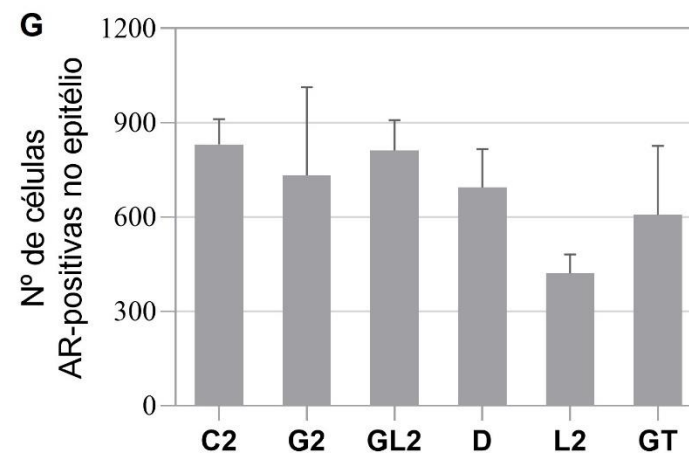
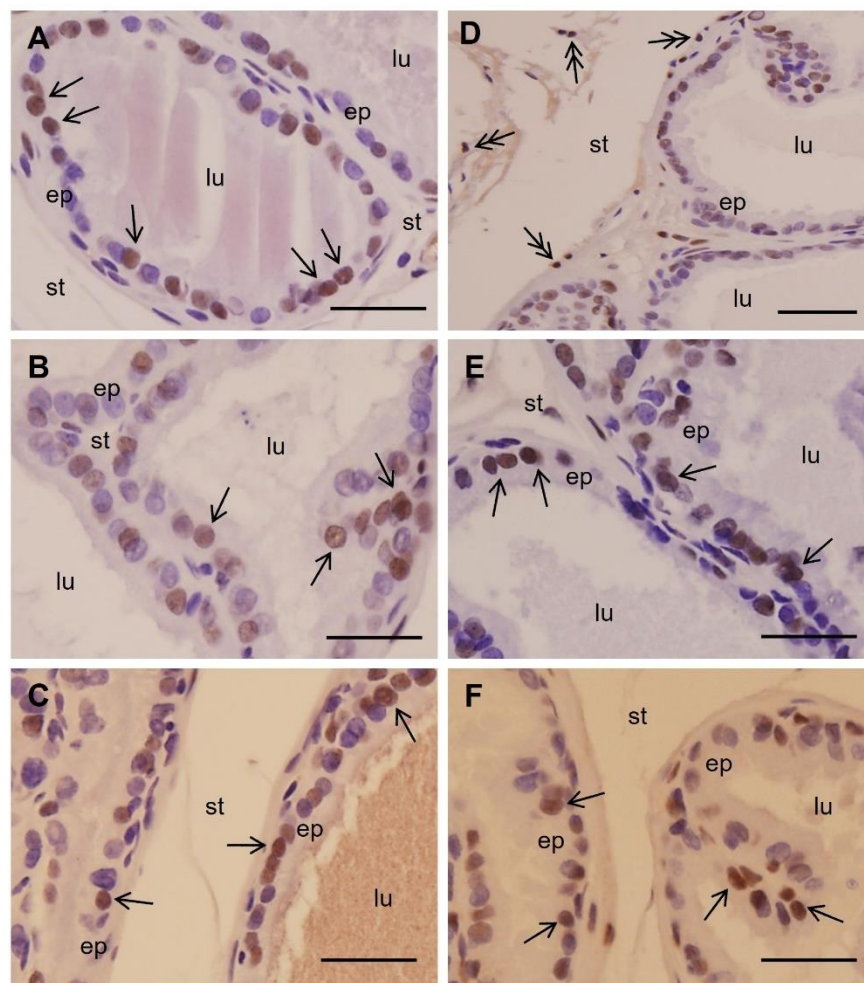


Figura 6

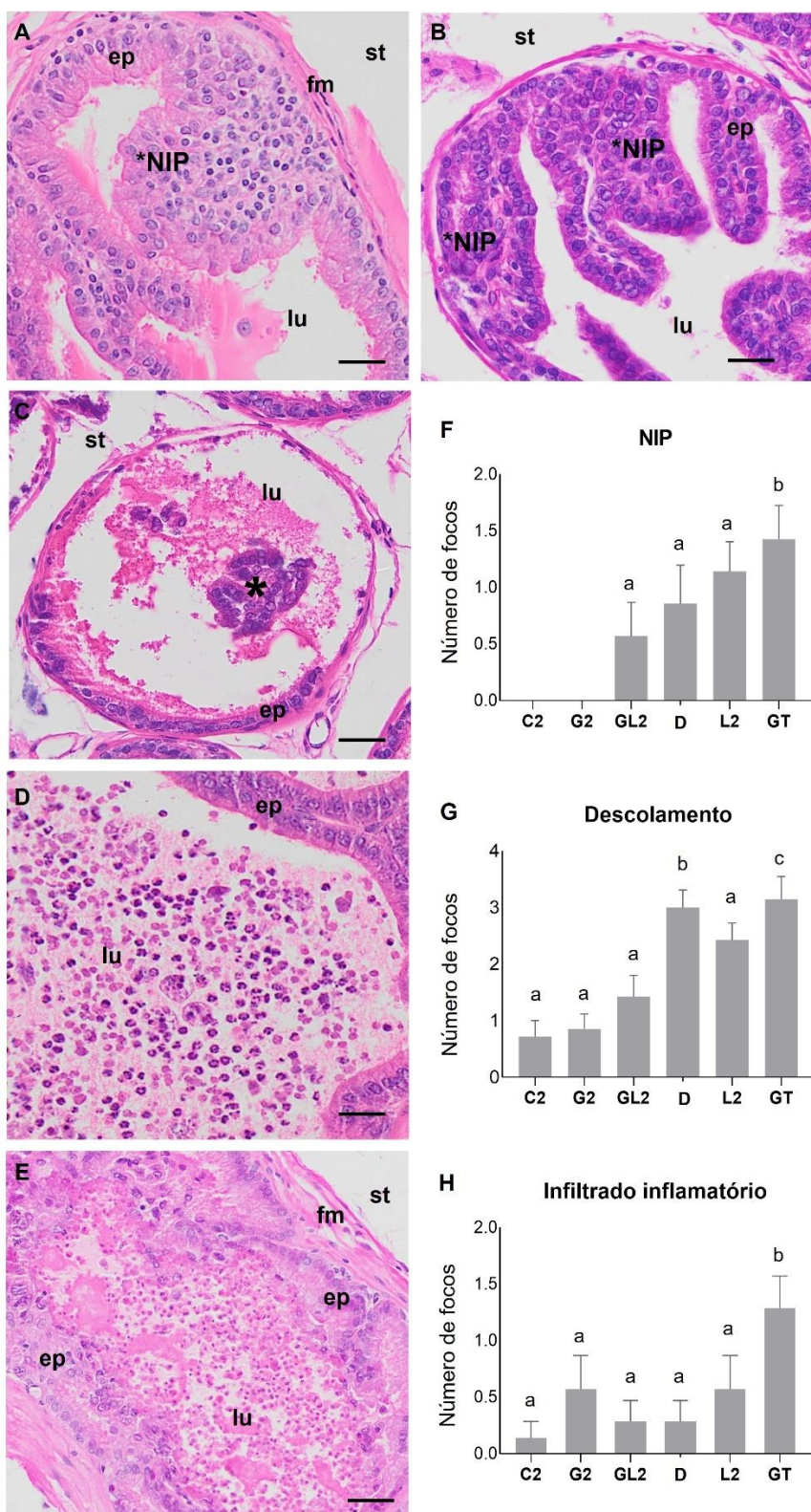
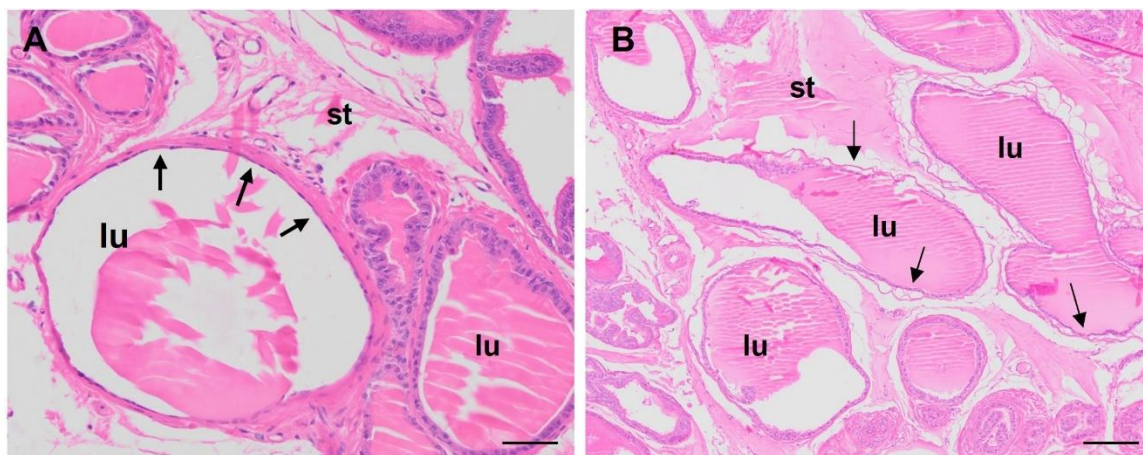
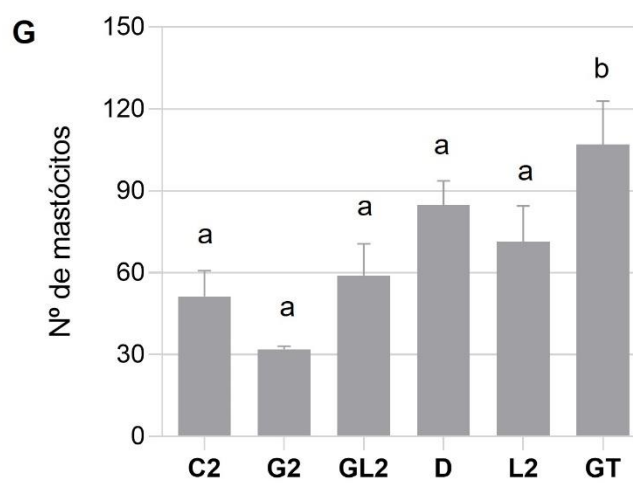
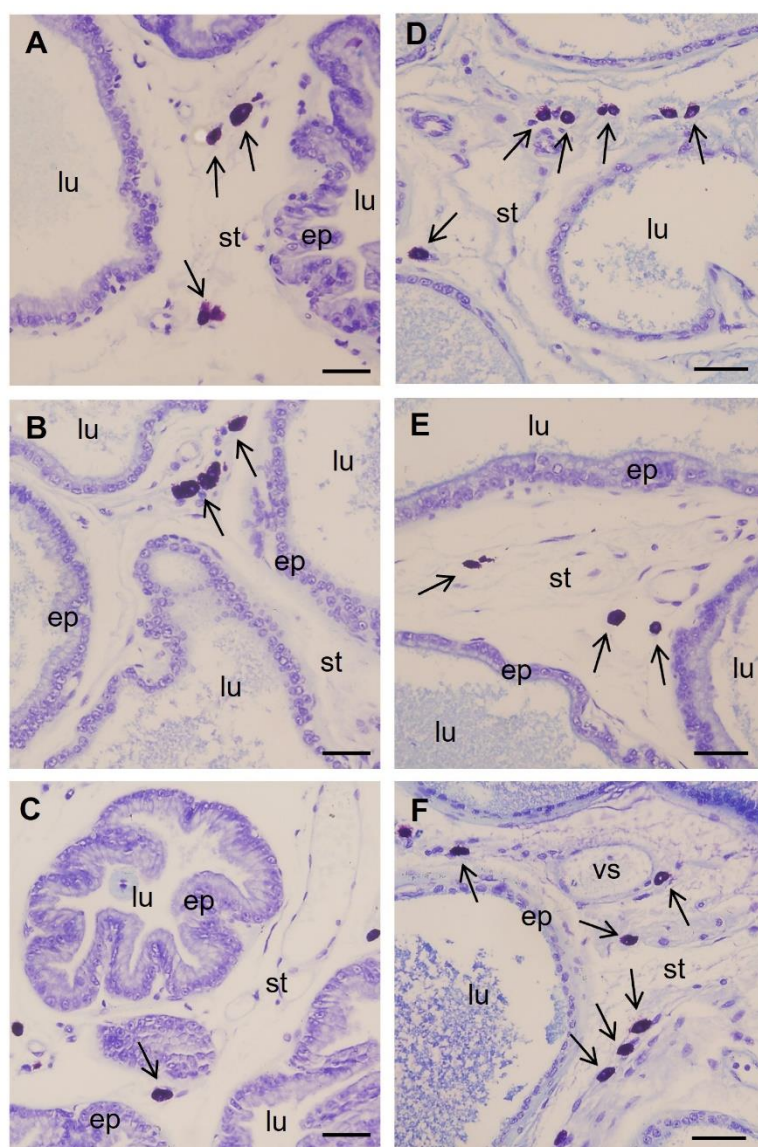


Figura 7**C**

Patologia	Grau	Grupos					
		C2	G2	GL2	D	L2	GT
Atrofia acinar	1	0%	14%	0%	28%	0%	28%
	2	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	3	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	4	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Figura 8



MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1

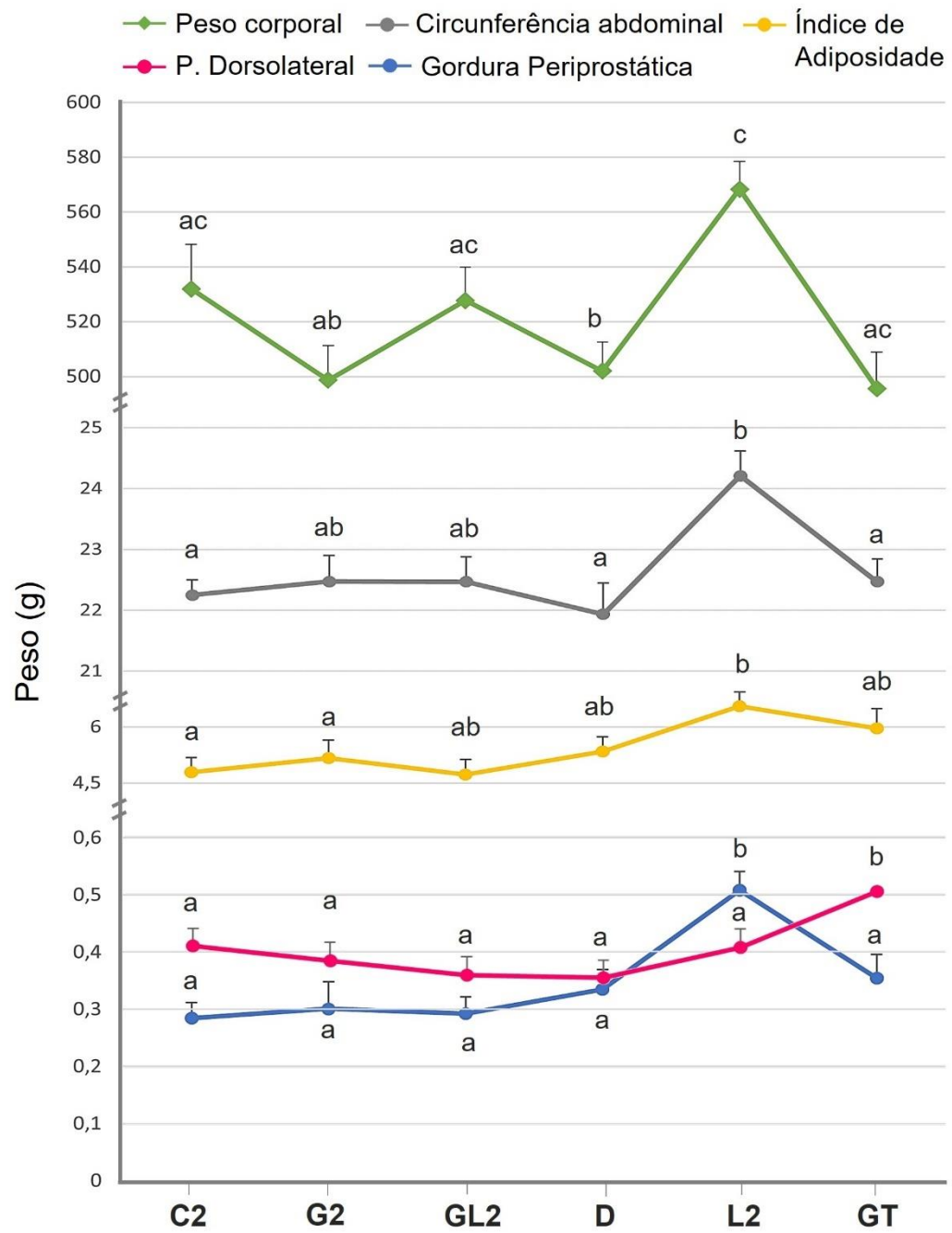


Figura 2

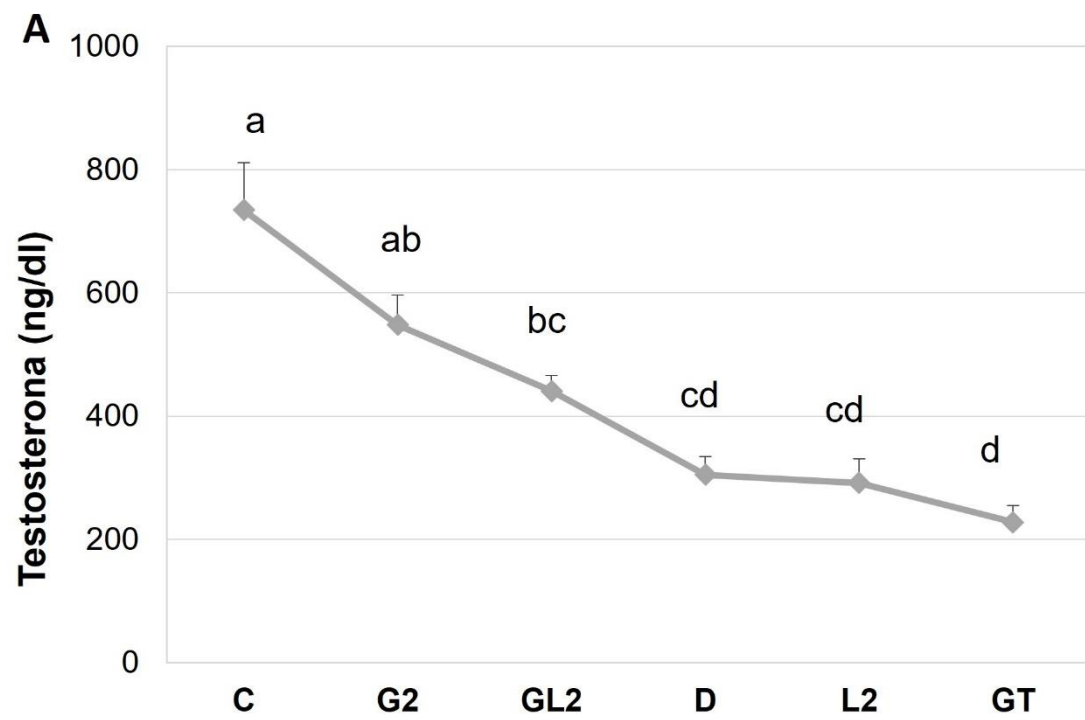
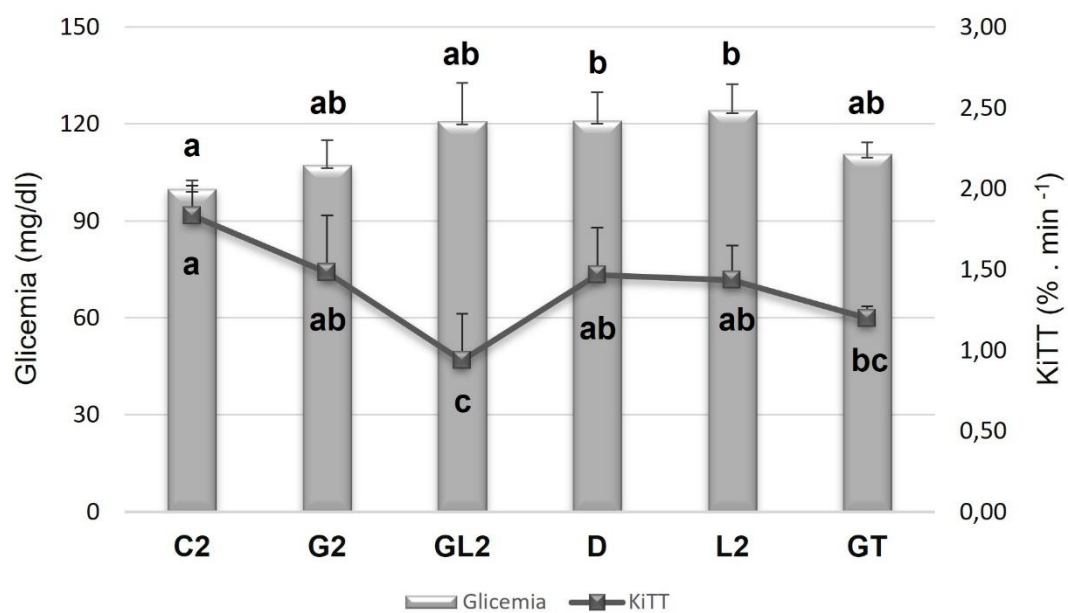


Figura 3

CONCLUSÕES GERAIS

- 1) A exposição ao ANRL durante a gestação e na gestação- amamentação, promove permanentemente a dislipidemia na prole até o início do seu envelhecimento, evidenciado pelo aumento de colesterol, triglicerídeos, LDL e diminuição de HDL. Nestes períodos do desenvolvimento, o ANRL também leva ao aumento da expressão tecidual de AR no estroma do lobo ventral da prole envelhecida.
- 2) Quando o ANRL ocorre durante toda a vida da prole, desde o desenvolvimento intrauterino, por meio da obesidade materna e seguindo na vida adulta através da dieta, até o envelhecimento, ocorre a dislipidemia, alteração no metabolismo de glicose e queda acentuada nos níveis de testosterona sérica. A exposição prolongada ao ANRL por toda a vida, afeta a histofisiologia prostática dos lobos ventral e dorsolateral, além de favorecer o desenvolvimento de lesões proliferativas como NIPs.
- 3) A partir do desmame, a exposição ao ANRL também promove alterações nos parâmetros metabólicos e hormonais. Na próstata, particularmente no lobo dorsolateral, desregula o AR, aumentando sua expressão tecidual no estroma, além de promover o descolamento das células do epitélio acinar.

Assim, a exposição ao ANRL promove diferentes respostas em cada fase do desenvolvimento prostático, e de forma particular para cada lobo da próstata da prole no envelhecimento, de modo que intensifica algumas das histopatologias que normalmente são encontradas na glândula prostática na velhice.

REFERÊNCIAS

- BERMAN, D.; RODRIGUEZ, R.; VELTRI, R. Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate, 2012, 10.1016/B978-1-4160-6911-9.00090-6.
- BHATIA-GAUR, R., DONJACOUR, A. A., SCIAVOLINO, P. J., KIM, M., DESAI, N., YOUNG, P., NORTON, C. R., GRIDLEY, T., CARDIFF, R. D., CUNHA, G. R., ABATE-SHEN, C., SHEN, M. M. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. **Genes & development**, 13(8), 966–977, 1999. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.966>
- BIANCHI-FRIAS, D., DAMODARASAMY, M., HERNANDEZ, S. A., GIL DA COSTA, R. M., VAKAR-LOPEZ, F., COLEMAN, I. M., REED, M. J., NELSON, P. S. The Aged Microenvironment Influences the Tumorigenic Potential of Malignant Prostate Epithelial Cells. **Molecular cancer research : MCR**, v.17, n. 1, p. 321–331, 2019. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0522>
- BLOOM W., FAWCETT DW. A textbook of histology. Printed in the United States of America. **Chapman & Hall**, 12th edition, 964p. ISBN: 0-412-04691-1, 1993.
- BOUFAIED, N., NASH, C., ROCHETTE, A., SMITH, A., ORR, B., GRACE, O. C., WANG, Y. C., BADESCU, D., RAGOUSSIS, J., THOMSON, A. A. Identification of genes expressed in a mesenchymal subset regulating prostate organogenesis using tissue and single cell transcriptomics. **Scientific reports**, v.7, n.1, p. 16385, 2017.
- BRAVI, F., WIENS, F., DECARLI, A., DAL PONT, A., AGOSTONI, C., FERRARONI, M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. **The American journal of clinical nutrition**, v.104, p.3, p.646–662, 2016 <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120881>
- BUSKIN, A., SINGH, P., LORENZ, O., ROBSON, C., STRAND, D. W., HEER, R. A Review of Prostate Organogenesis and a Role for iPSC-Derived Prostate Organoids to Study Prostate Development and Disease. **International journal of molecular sciences**, v.22, n.23, 13097, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222313097>
- CAGIGAL, I.R.; ALONSO, A.F.; SÁNCHEZ, A.B.; Dieta y cáncer de próstata. **Actas Urológicas Españolas**, v. 27, n.6, p. 399-409, 2003.
- COUTINHO, J.G.; GENTIL, P.C.; TORAL, N.; A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, supl. 2, p. s332-s340, 2008.
- CUNHA G. R.; RICKE W.; THOMSON A.; MARKER P. C.; RISBRIDGER G.; HAYWARD S. W.; WANG Y. Z.; DONJACOUR A. A.; KURITA T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**; v. 92, n. 4, p. 221-236, 2004.
- ERHARDT J. G.; LIM S. S.; BODE J. C.; BODE C. A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. **The Journal of Nutrition**. v. 127, p.706–709, 1997.

HOWIE, G. J., SLOBODA, D. M., KAMAL, T., VICKERS, M. H. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **The Journal of physiology**, v. 587, (Pt 4), p. 905–915, 2009. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163477>

ITTMANN M. (2018). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(5), a030346.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>

KEIKHA, M., BAHREYNIAN, M., SALEKI, M., & KELISHADI, R. Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. **Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine**, v.12, n.9, p.517–527, 2017.

<https://doi.org/10.1089/bfm.2017.0048>

LAURITZEN, L., JØRGENSEN, M. H., HANSEN, H. S., MICHAELSEN, K. F. Fluctuations in human milk long-chain PUFA levels in relation to dietary fish intake. **Lipids**, 37(3), 237–244, 2002 <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0886-2>

LONG RM, MORRISSEY C, FITZPATRICK JM, *et al.* Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. **Clin Sci**. v.108, p. 1-11, 2005.

LOVEJOY J.; DIGIROLAMO, M.; Habitual dietary intake and insulin sensitivity in lean and obese adults. **American Journal of Clinical Nutrition** v.55, p. 1174–1179, 1992.

MARKER P. C.; DONJACOUR A. A.; DAHIYA R.; CUNHA G. R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**. v. 253, p. 165-174, 2003.

MARSHALL, J.A.; BESSESEN, S.H.; and HAMMAN, R.F.; High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population – The San Luis Valley Diabetes Study. **Diabetologia** v.40, p. 430–438, 1997.

MAYER, E.J.; NEWMAN, B.; QUESENBERRY, C.P.J.R.; and SELBY, J.V. Usual dietary fat intake and insulin concentrations in healthy women twins. **Diabetes Care** v.16, p. 1459–1469, 1993.

MAYER-DAVIS, J.; MONACO, J.H.; HOEN, H.M.; CARMICHAEL, S.; VITOLINS, M.Z.; REWERS, M.J.; HAFFNER, S.M.; AYAD, M.F.; BERGMAN, R.N. and KARTER, A.J. Dietary fat and insulin sensitivity in a triethnic population The role obesitas. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **American Journal of Clinical Nutrition**. v.65, p.79–87, 1997.

MCHUGH, D., GIL, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. **The Journal of cell biology**, v. 217, n.1, p. 65–77, 2018.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

MCNEAL J. E. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. **Progress in clinical and biological research**, 145, 27–53, 1984.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal of Surgical Pathology**. v. 12, p. 619-633, 1988

- OLIVEIRA, D. S. M., DZINIC, S., BONFIL, A. I., SALIGANAN, A. D., SHENG, S., BONFIL, R. D. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n.1, p. 8–13, 2016.
- PARKER, D.R.; WEISS, S.T.; TROISI, R.; CASSANO, P.A.; VOKONES, P.S.; LANDSBERG, L.; Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations, the normative aging study. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 58, p. 129– 136, 1993.
- PRINS, G.S., PUTZ O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v.76, n.6, p. 641-59, 2008.
- REBELLO, R. J., OING, C., KNUDSEN, K. E., LOEB, S., JOHNSON, D. C., REITER, R. E., GILLESSEN, S., VAN DER KWAST, T., & BRISTOW, R. G. 2021. Prostate cancer. **Nature reviews. Disease primers**, v.7, n.1, 9, 2021.
- RICHIE JP JR, DAS A, CALCAGNOTTO AM, ALIAGA CA, EL-BAYOUMY K. Age related changes in selenium and glutathione levels in different lobes of the rat prostate. **Experimental Gerontology**, v. 47, p.223-228, 2012.
- SANTOS, R.D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, São Paulo, 2013.
- SCHMEER, C., KRETZ, A., WENGERODT, D., STOJILJKOVIC, M., & WITTE, O. W. Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. **Cells**, v. 8, n. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8111446>
- SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M.P.; Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v.32, n.6, p. 638-644, 2008.
- SHAPPELL S.B.; THOMAS G.V.; ROBERTS R.L.; Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v. 64, p. 2270–2305, 2004
- SHAPPELL S.B.; THOMAS G.V.; ROBERTS R.L.; Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v. 64, p. 2270–2305, 2004.
- TAMMA, S. M., SHORTER, B., TOH, K. L., MOLDWIN, R., GORDON, B. Influence of polyunsaturated fatty acids on urologic inflammation. **International urology and nephrology**, v. 47, p.11, 1753–1761, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11255-015-1108-8>
- TIMMS, B. G. 2008. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**. v76, n. 6, 565-577, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>
- TOIVANEN R.; SHEN M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**. v. 144, p. 1382- 1398, 2017
- TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p.403-410, set./dez. 2009.

VILAMAIOR P.S.L., TABOGA S.R., CARVALHO H.F. Postnatal growth of the ventral prostate in wistar rats: a stereological and morphometrical study. **The anatomical Record, part A**, v.288A, p. 885–892, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. **WHO Fact sheets**, n. 854, 2016.

XIA, B. W., ZHAO, S. C., CHEN, Z. P., CHEN, C., LIU, T. S., YANG, F., & YAN, Y. Relationship between serum total testosterone and prostate volume in aging men. **Scientific reports**, v.11, n.1, 14122, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93728-1>

YU S.; YE H C-R.; NIU Y.; CHANG H. C.; TSAI Y. C.; MOSES H. L.; SHYR C. R.; CHANG C.; YE H S. Altered Prostate Epithelial Development in Mice Lacking the Androgen Receptor in Stromal Fibroblasts. **The Prostate**. v. 72, p. 437-449, 2012.

ANEXO 1



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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA - IBILCE/UNESP

Protocolo nº. 080 / 2013

De 31 de outubro de 2013

IDENTIFICAÇÃO PROCESSO	
Título - Disciplina	Efeito comparativo da obesidade em diferentes fases do desenvolvimento sobre a histofisiologia da próstata ventral de ratos: possíveis relações com os hormônios esteróides e a expressão da enzima 5 ^a -redutase.
Pesquisador(a) Responsável -	Rejane Maira Góes
Executor(a) -	Eloísa Zanin Pytlowanciv
Departamento Instituição -	Depto. Zoologia e Botânica – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
Período -	Outubro/2013 a Março/2015

SEQUÊNCIA DE TRAMITAÇÃO DO PROCESSO	
1. Protocolo – Seção Técnica de Comunicações: 010027 de 31/10/2013	2. Recebimento Secretária CEUA – Gerar Protocolo:
3. Encaminhamento para parecerista em:	4. Plenária reunião: REUNIÃO PREVISTA: 12
5. Aprovado / Aprov Recomendação Pendência / Reprovado:	6. Execução Certificado:
7. Relatório:	8. Informação Complementar:
Esclarecimentos – Presidente: Profa. Rejane Maira Góes – remagoes@ibilce.unesp.br Secretária Liliane Cristina Campreguer – liliane@ibilce.unesp.br	